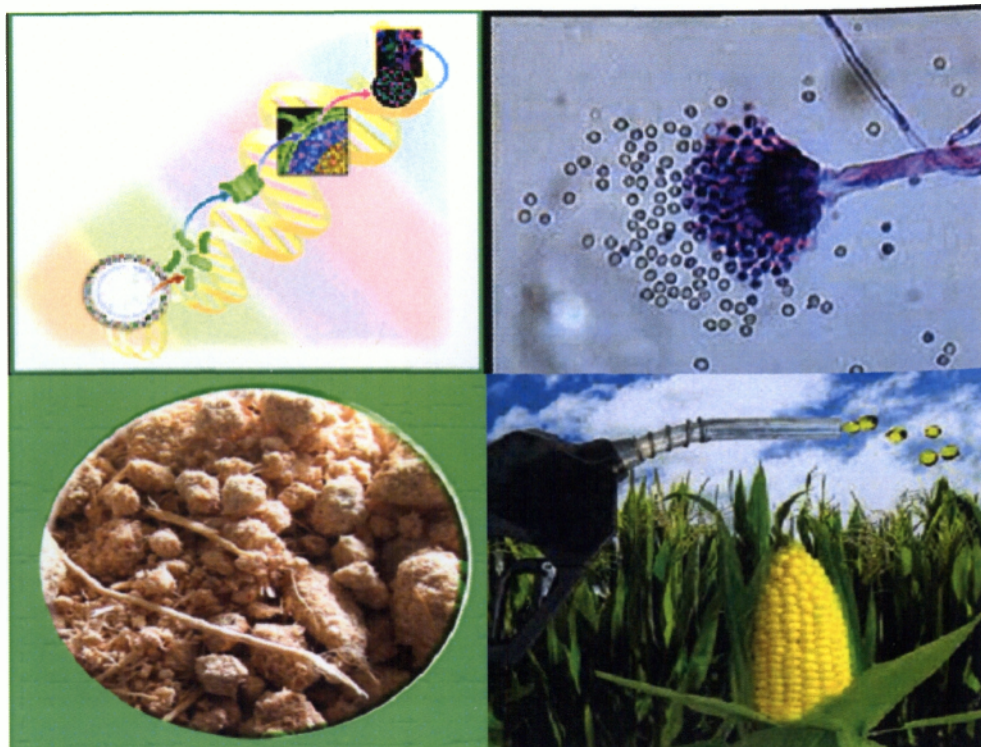




ΑΝΩΤΑΤΟ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ (Α.Τ.Ε.Ι) ΚΑΛΑΜΑΤΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ (Σ.Τ.Ε.Γ.)
ΤΜΗΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΡΓΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ
(Τ.Ε.Γ.Ε.Π)

Τ.Ε.Ι ΚΑΛΑΜΑΤΑΣ
ΤΜΗΜΑ
ΕΚΔΟΣΕΩΝ & ΒΙΒΛΙΟΦΗΚΗΣ

ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΟΥ ΛΙΠΟΥΣ ΑΠΟ
ΑΜΥΛΟΥΧΑ ΑΠΟΒΛΗΤΑ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ



Πτυχιακή Εργασία της σπουδάστριας
Μωραΐτη Ελένης

Καλαμάτα, 2011



ΑΝΩΤΑΤΟ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ (Α.Τ.Ε.Ι) ΚΑΛΑΜΑΤΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ (Σ.Τ.Ε.Γ.)
ΤΜΗΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΡΓΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ
(Τ.Ε.Γ.Ε.Π)

ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΟΥ ΛΙΠΟΥΣ ΑΠΟ
ΑΜΥΛΟΥΧΑ ΑΠΟΒΛΗΤΑ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

Πτυχιακή Εργασία της σπουδάστριάς
Μωραΐτη Ελένης

Επιβλέπων καθηγητής
Ντάϊκου Ιωάννα

Καλαμάτα, 2011

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ	6
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ	7
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΦΩΤΟΓΡΑΦΙΩΝ	7
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	8
2. ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ	9
2.1 Ζύμωση και Βιοκατάλυση	9
2.1.1 Γενικά	9
2.1.2 Παραγωγή ενζύμων από μικροοργανισμούς	9
2.2. Παραγωγή προϊόντων	10
2.2.1 <i>Μικροβιακή πρωτεΐνη</i>	10
2.2.1.1 Προϊόντα ενισχυμένα με μικροβιακή πρωτεΐνη	11
2.2.1.1.1. Πρωτεϊνούχο άμυλο	11
2.2.1.1.2. Παραγωγή πρωτεΐνης από ορρό γάλακτος	12
2.2.1.1.3. Μετατροπή της λιγνοκυτταρίνης σε πρωτεϊνούχα τροφή	12
2.2.1.1.4. Μυκοπρωτεΐνη	14
2.2.2 <i>Μεταβολίτες</i>	15
2.2.2.1 Πρωτεύοντες μεταβολίτες	15
2.2.2.1.1 Κιτρικό οξύ	16
2.2.2.1.2 Αμινοξέα (L-γλουταμινικό οξύ)	18
2.2.2.2 Δευτερεύοντες μεταβολίτες	19
2.2.2.2.1 Αμινογλυκοζίδια	20
2.2.2.2.1.1 Στρεπτομυκίνη	21
2.2.2.2.2 β-Λακτάμες	22
2.2.2.2.2.1 Πενικιλίνη	22



2.2.3 Βιοσυσσώρευση	23
3. ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΛΙΠΟΥΣ	25
3.1. Ελαιογόνοι Μικροοργανισμοί	25
3.2 Βιοχημεία Συσσώρευσης Μικροβιακού Λίπους	26
3.3 Χρήσεις Μικροβιακού Λίπους	30
3.3.1 Τρόφιμα	30
3.3.1.1 Πολυακόρεστα λιπαρά οξέα	30
3.3.1.2 Ασφάλεια χρήσης μικροβιακού λίπους στα τρόφιμα	32
3.3.2 Βιοντήζελ	32
3.3.2.1 Γενικά	32
3.3.2.2 Ελαιογόνοι μικροοργανισμοί και παραγωγή βιοντήζελ	33
4. ΑΜΥΛΟΥΧΑ ΑΠΟΒΛΗΤΑ	
4.1 Οι υδατάνθρακες ως ανανεώσιμες πηγές άνθρακα	35
4.2 Άμυλο	35
4.2.1 Δομή και ιδιότητες αμύλου	37
4.3 Μικροβιακή αφομοίωση αμύλου	39
4.4 Αμυλολυτικά ένζυμα	39
4.4.1 Εξωδραστικές αμυλάσες	39
4.4.2 Ενδοδραστικές αμυλάσες	40
4.4.3 Αμυλάσες πλευρικών κλάδων	40
4.4.4 Κυκλοδεξτρινάσες	41
4.5 Φυσικοχημική Υδρόλυση Αμύλου	41
4.6 Πηγές και Διαχείριση Αμυλούχων Αποβλήτων	42
4.6.1 Βιομηχανία επεξεργασίας κασάβας	42
4.6.1.1 Ιδιότητες των αποβλήτων αποχύμωσης της κασάβας	43

<u>Μωραΐτη Ελένη- Παραγωγή μικροβιακού λίπους από αμυλούχα απόβλητα βιομηχανίας τροφίμων</u>	5
4.6.1.2 Βιοτεχνολογική επεξεργασία των αμυλούχων αποβλήτων από βιομηχανίες επεξεργασίας κασάβας	46
4.6.2 Βιομηχανία επεξεργασίας πατάτας	47
4.6.2.1 Παραγωγή αιθανόλης από αμυλούχα απόβλητα πατάτας	47
4.6.2.2 Ζωοτροφές	48
4.6.2.3 Αναερόβια ζύμωση	48
4.6.2.4 Μικροβιακή παραγωγή προϊόντων υψηλής πρόσθετης αξίας	49
4.6.3. Παραγωγή μικροβιακού λίπους από αγροβιομηχανικά απόβλητα	49
5. ΓΕΝΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	53
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	59

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα	Τίτλος	Σελίδα
1	Διαφορετικοί τρόποι παραγωγής μικροβιακής πρωτεΐνης για τρόφιμα και ζωοτροφές από λιγνοκυτταρινούχα υποστρώματα	13
2	Μεταβολικό μονοπάτι παραγωγής κιτρικού οξέος από το μύκητα <i>Aspergillus niger</i> .	16
3	Μεταβολισμός του άνθρακα στο βακτήριο <i>C. glutamicum</i>	19
4	Στρεπταμίνη και 2-δεσοξυστρεπταμίνη	20
5	Συντακτικός τύπος της στρεπτομικίνης	21
6	Διάφορες μορφές της πενικιλίνης ανάλογα με το θρεπτικό υπόστρωμα καλλιέργειας του μικροοργανισμού	22
7	Διάγραμμα αποθήκευσης μικροβιακού λίπους από τους ελαιογόνους μικροοργανισμούς	26
8	Ο κύκλος του Krebs (κύκλος τρανζυδρογενάσης) και ο κύκλος του κιτρικού/μηλικού οξέος,	28
9	Διαγραμματική αναπαράσταση της αποθήκευσης λίπους στους ελαιογόνους μικροοργανισμούς	29
10	Διεθνής παραγωγή αμύλου τα 15 τελευταία χρόνια	36
11	Μοριακή δομή του αμύλου, α) Μονάδα άνυδρης γλυκόζης, β) Αμυλόζη, γ) Αμυλοπηκτίνη	37
12	3D δομή του ενζύμου της α-αμυλάσης	40
13	Εργαστηριακή συσκευή για την υδρόλυση του αμύλου	42
14	Διαγραμματική αναπαράσταση της απομόνωσης του αμύλου από τις ρίζες του φυτού κασάβα	44
15	Επίδραση των διαφορετικών αγροβιομηχανικών αποβλήτων στη συσσώρευση λιπιδίων και τριακυλογλυκερολών από (A) το μικροοργανισμό <i>R. oryzae</i> και (B) το μικροοργανισμό <i>Gordonia</i> sp. DG. (a) 24 h, (b) 36 h, (c) 96 h επώασης	50
16	Σύσταση λιπαρών οξέων των TAGs με τη χρήση διάφορων αγροβιομηχανικών αποβλήτων (a) <i>R. oryzae</i> , (b) <i>Gordonia</i> sp. DG	51

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας	Τίτλος	Σελίδα
1	Διατροφική ανάλυση της μικροβιακής πρωτεΐνης του μύκητα <i>Fusarium venenatum</i>	15
2	Περιεχόμενο της μικροβιακής πρωτεΐνης του μύκητα <i>Fusarium venenatum</i> σε απαραίτητα αμινοξέα (σε σύγκριση με άλλες πρωτεΐνες οι οποίες περιέχονται στα τρόφιμα)	16
3	Επιλεγμένοι μικροοργανισμοί οι οποίοι παράγουν από 40-80% λίπος	25
4	Συμβατικές και μικροβιακές πηγές των κυριότερων πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (PUFAs)	31
5	Ποσοστά αμυλόζης από διάφορες πηγές αμύλου	38
6	Κλίμακα θερμοκρασιών ζελατινοποίησης για διάφορες πηγές αμύλου	38
7	Φυσικοχημική σύσταση των αποβλήτων από την αποχύμωση της κασάβας(g/100 g ξηρού βάρους)	45
8	Μικροοργανισμοί που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή διαφόρων προϊόντων από τα αμυλούχα απόβλητα αποχύμωσης της κασάβας	46
9	Χημική σύσταση των αμυλούχων αποβλήτων από την επεξεργασία πατάτας	48

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΦΩΤΟΓΡΑΦΙΩΝ

Φώτο	Τίτλος	Σελίδα
1	α) <i>Bacillus cereus</i> , β) <i>Aspergillus</i>	39
2	Ρίζες κασάβας	43
3	Απόβλητα από την αποχύμωση της κασάβας: (α) το υπόλειμμα μετά την απομόνωση του αμύλου και (β) η αντίστοιχη σκόνη	45

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Στην πρόσφατη βιβλιογραφία υπάρχει αυξημένο ενδιαφέρον για την ανάπτυξη κατάλληλων μεθόδων επεξεργασίας και καθαρισμού των αγρο-βιομηχανικών αποβλήτων με δύο κύριους στόχους.

Ο πρώτος στόχος έχει να κάνει με τα ουσιαστικά προβλήματα ρύπανσης που προκαλούν τα βιομηχανικά απόβλητα, γεγονός το οποίο καθιστά επιτακτική την ανάπτυξη μιας κατάλληλης διαδικασίας μείωσης της παρουσίας αυτών των αποβλήτων στο περιβάλλον.

Ο δεύτερος στόχος σχετίζεται με την αξιοποίηση των βιομηχανικών αποβλήτων για την παραγωγή ανανεώσιμων ενεργειακών πόρων ή και άλλων προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας.

Η **περιβαλλοντική βιοτεχνολογία** αφορά στην πειραματική διερεύνηση και την εφαρμοσμένη γνώση που σχετίζεται με τη χρήση βιολογικών συστημάτων (φυτών, ζώων και μικροοργανισμών) με σκοπό την εξυγίανση, προστασία και διαχείριση του περιβάλλοντος καθώς και την αιεφόρο εκμετάλλευση των περιβαλλοντικών πόρων. Η συνήθης βιοτεχνολογική διαδικασία στη διαχείριση των βιομηχανικών αποβλήτων είναι η βιομετατροπή ή η βιοαποικοδόμησή τους μέσω μικροοργανισμών.

Η βιοτεχνολογική διαχείριση των αμυλούχων αποβλήτων μπορεί να οδηγήσει στην παραγωγή χρήσιμων προϊόντων όπως το μικροβιακό λίπος (**single cell oil**) και η μικροβιακή πρωτεΐνη. Ταυτόχρονα επιτυγχάνεται και ο στόχος του καθαρισμού των αποβλήτων αυτών.

Σκοπός της παρούσας βιβλιογραφικής εργασίας είναι να μελετήσει και να αξιολογήσει τα πρόσφατα βιβλιογραφικά δεδομένα σχετικά με την παραγωγή μικροβιακού λίπους από την βιοτεχνολογική επεξεργασία αμυλούχων βιομηχανικών αποβλήτων.

2. ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ

2.1 Ζύμωση και Βιοκατάλυση¹

2.1.1 Γενικά

Η συνεισφορά των μικροοργανισμών (βακτήρια, μύκητες, ζύμες κ.τ.λ), ως ανεξάντλητης πηγής για την παραγωγή μεγάλου εύρους χρήσιμων χημικών προϊόντων είναι ευρέως αναγνωρισμένη. Πράγματι, ένας ιδιαίτερα αυξημένος αριθμός χημικών προϊόντων, όπως οι διαλύτες, τα πρόσθετα τροφίμων, τα ένζυμα, τα αγροχημικά και τα βιοφαρμακευτικά προϊόντα, τα τελευταία χρόνια παράγεται με βάση τεχνικές μικροβιακής βιοτεχνολογίας όπως η ζύμωση και οι διαδικασίες βιοκατάλυσης. Πολύ συχνά δεν υπάρχει εναλλακτική οδός για τη σύνθεση κάποιων ενώσεων από τη ζύμωση. Επιπρόσθετα, όλες αυτές οι μικροβιακές διαδικασίες έχουν και περιβαλλοντικά οφέλη. Τα χημικά προϊόντα που παράγονται από τις διαδικασίες της ζύμωσης και της βιομετατροπής παρουσιάζουν τις εξής ενδιαφέρουσες ιδιότητες:

- Παράγονται από ανανεώσιμα αγρο-υποστρώματα και αγρο-βιομηχανικά απόβλητα
- Χρησιμοποιούνται ήπιες συνθήκες για τις αντιδράσεις σχηματισμού τους ("Πράσινη Χημεία")
- Τα προϊόντα αυτά είναι βιοαποικοδομήσιμα
- Επιτυγχάνεται η επιθυμητή χειρικήτητα (οπτική ενεργότητα), καθώς πρόκειται για φυσικά προϊόντα.

2.1.2 Παραγωγή ενζύμων από μικροοργανισμούς

Τα ένζυμα είναι κατ'ουσίαν βιοκαταλύτες πρωτεϊνικής φύσεως, οι οποίοι παράγονται από τα κύτταρα ζωντανών οργανισμών. Η παραγωγή αυτών των ουσιών έχει ως σκοπό να επιταχύνει και να ρυθμίσει τις διάφορες βιοχημικές αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα κατά τη διάρκεια των μεταβολικών διεργασιών στο εσωτερικό των κυττάρων.

Το πρώτο σημαντικό πλεονέκτημα των μικροοργανισμών, ως πηγή χρήσιμων ενζύμων, είναι η ενδεχομένως απεριόριστη παραγωγή τους.

Το δεύτερο κύριο πλεονέκτημα είναι ο μεγάλος αριθμός ενζύμων που μπορούν να αποκτηθούν με οικονομικό τρόπο από τους μικροοργανισμούς. Οι μόνοι σημαντικοί περιορισμοί είναι εκείνοι που επιβάλλονται ανάλογα με το είδος της ενζυμικά

καταλυόμενης αντίδρασης. Επίσης, η ποικιλία ενζύμων που παράγεται από έναν μικροοργανισμό μπορεί να θεωρηθεί πολλές φορές ως μειονέκτημα. Συχνά σε μια βιομηχανική διεργασία, όπου απαιτείται μόνο μια συγκεκριμένη ενζυμική μετατροπή, είναι δυνατό να προκληθούν ανεπιθύμητες παράπλευρες αντιδράσεις από την παρουσία ενζυμικών επιμολύνσεων.

2.2 Παραγωγή προϊόντων

2.2.1 Μικροβιακή πρωτεΐνη^{2α}

Ο όρος *μικροβιακή πρωτεΐνη* (*single-cell protein, SCP*) περιγράφει την πλούσια σε πρωτεΐνη κυτταρική μάζα, η οποία προέρχεται από την ανάπτυξη μικροοργανισμών σε μεγάλη κλιμάκα και προορίζεται είτε για ζωική είτε για ανθρώπινη κατανάλωση. Οι μικροοργανισμοί αποτελούν μια άριστη πηγή μικροβιακής πρωτεΐνης λόγω της υψηλής ταχύτητας ανάπτυξής τους, της δυνατότητάς τους να χρησιμοποιούν πολύ φθηνές πρώτες ύλες ως πηγές άνθρακα και της μοναδικής υψηλής απόδοσης, η οποία εκφράζεται ως βάρος παραγόμενης πρωτεΐνης ανά μονάδα βάρους πρώτης ύλης (π.χ. γραμμάρια ανά κιλό ή γραμμάρια ανά γραμμάριο).

Η βιομηχανική παραγωγή μικροβιακής πρωτεΐνης ήταν πιθανότατα η πρώτη προσπάθεια στην ιστορία του ανθρώπου να παράγει πρωτεϊνούχα τροφή χωρίς τη βοήθεια της γεωργίας. Αν και η γεωργική παραγωγή έχει σημαντικά πλεονεκτήματα λόγω της χρήσης ηλιακής ενέργειας και διοξειδίου του άνθρακα από την ατμόσφαιρα, η μικροβιακή παραγωγή πρωτεΐνης είναι ανεξάρτητη περιβαλλοντικών περιορισμών (κλίμα, θερμοκρασία, καιρικές μεταπτώσεις), απαιτεί λιγότερο χώρο και ένα απλό θρεπτικό υπόστρωμα ως πηγή άνθρακα για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών.

Η μικροβιακή πρωτεΐνη είναι ενδεχομένως χρήσιμη ενισχύοντας τις ανάγκες για τη διατροφή των ζώων. Η παραγωγή μικροβιακής πρωτεΐνης από υπολειμματούχα απόβλητα και πλεονασματικές πρώτες ύλες εξασφαλίζει την οικονομική διαχείριση ορισμένων μορφών περιβαλλοντικής ρύπανσης από διάφορες βιομηχανικές και αγροτικές δραστηριότητες και ταυτόχρονα δίνει λύσεις, σε έναν ορισμένο βαθμό, στο πρόβλημα της παγκόσμιας διατροφής.

Τα χαρακτηριστικά της μικροβιακής πρωτεΐνης εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από τα θρεπτικά υποστρώματα που χρησιμοποιούνται, το είδος των μικροοργανισμών και την επιλεγείσα διαδικασία ανάπτυξής τους. Η θρεπτική αξία μιας πρωτεΐνης

εξαρτάται από τα ποσοστά αμινοξέων που περιέχει και θεωρείται τόσο καλύτερη όσο πλησιάζει τα ποσοστά των αμινοξέων του αυγού (του προϊόντος με τη μεγαλύτερη θρεπτική αξία πρωτεΐνης). Ιδιαίτερη σημασία δίνεται στα θειούχα αμινοξέα όπως η κυστεΐνη, η μεθειονίνη και η κυστίνη.

Ένα από τα πρώτα προβλήματα που αντιμετωπίστηκαν κατά την παραγωγή μικροβιακής πρωτεΐνης ήταν το περιεχόμενο των μικροβιακών κυττάρων σε νουκλεϊνικά οξέα. Ενώ τα βακτήρια και κάποιες συγκεκριμένες ζύμες έχουν πολύ υψηλό ποσοστό νουκλεϊνικών οξέων, οι μύκητες και τα φύκη έχουν σχετικά χαμηλό. Τα νουκλεϊνικά οξέα είναι ανεπιθύμητα σε μεγάλες ποσότητες καθώς η χώννευσή τους οδηγεί σε ιδιαίτερα υψηλά επίπεδα ουρικού οξέος, το οποίο είναι δυνατό να οδηγήσει σε εναπόθεση ουρικών αλάτων στους ιστούς προκαλώντας συμπτώματα παρόμοια με αυτά της ποδάγρας.

Από την άλλη πλευρά, υπάρχει και η πιθανότητα παραγωγής τοξικών ουσιών, γνωστών και ως μυκοτοξίνες, οι οποίες παράγονται από πολλά είδη νηματοειδών μυκήτων, όπως ο *Aspergillus niger* και άλλοι. Οι προϋποθέσεις, πριν την έγκριση κάθε προϊόντος μικροβιακής πρωτεΐνης από την FDA (Food and Drug Administration) στις ΗΠΑ, δεν απαιτούν μόνο τον εργαστηριακό έλεγχο για την ανίχνευση ιχνών από τοξίνες αλλά και ενισχυμένη γεύση καθώς και δοκιμαστικά τεστ στα οποία χορηγείται σε γεύματα η συγκεκριμένη πρωτεΐνη.

Τα βασικά στάδια για την παραγωγή μικροβιακής πρωτεΐνης είναι τα εξής:

- α) η επιλογή του θρεπτικού υποστρώματος καθώς και η πιθανή προεπεξεργασία προκειμένου να είναι αφομοιώσιμο από τους μικροοργανισμούς
- β) η ανάπτυξη των μικροοργανισμών
- γ) ο μηχανικός διαχωρισμός του προϊόντος από το μίγμα της καλλιέργειας
- δ) ο θερμικός διαχωρισμός για την τελική παραλαβή του επιθυμητού προϊόντος

2.2.1.1 Προϊόντα ενισχυμένα με μικροβιακή πρωτεΐνη

2.2.1.1.1. Πρωτεϊνούχο άμυλο

Η πρώτη προσπάθεια παραγωγής πρωτεϊνούχας τροφής από αμυλούχο υπόστρωμα (φυτό Cassava) έγινε τη δεκαετία του 1980.^{2β} Χρησιμοποιήθηκε ένα στέλεχος του μικροοργανισμού *Aspergillus niger*, το οποίο αναπτύχθηκε σε υπόστρωμα από τις αμυλούχες ρίζες του φυτού cassava (θραυσματοποιημένο με μηχανική

κατεργασία). Το μυκήλιο είχε ποσοστό πρωτεΐνης περίπου 40%. Η διεργασία μικροβιακής ανάπτυξης έλαβε χώρα μερικώς, ώστε να μην πραγματοποιηθεί πλήρης βιομετατροπή των φυτικών υδρογονανθράκων. Εν συνεχεία, το μίγμα θερμάνθηκε ώστε να απομονωθεί το 30-35% ξηρού βάρους. Το προϊόν έπρεπε να ενισχυθεί και με άλλα θρεπτικά συστατικά, τα οποία να περιέχουν κυρίως άζωτο. Το πρωτεϊνικό περιεχόμενο του τελικού προϊόντος ήταν περίπου 20% μετά από 30 ώρες ανάπτυξης του μικροοργανισμού.

Το 1988,^{2γ} με τη χρήση του μικροοργανισμού *Rhizopus oligosporus*, επετεύχθη η παραγωγή 3.5 τόνων μικροβιακής πρωτεΐνης από 65 τόνους αμύλου cassava ενώ ταυτόχρονα παρήχθη σημαντική ποσότητα από το ισχυρά δραστικό ένζυμο αμυλογλυκοσιδάση. Εκτός από το υψηλό ποσοστό, περίπου 45%, της πρωτεΐνης του μύκητα, το ένζυμο μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ώστε 39000 τόνοι από τη ρίζα του φυτού να μετατραπούν σε γλυκόζη, η οποία μπορεί με τη σειρά της να μετατραπεί σε 15.6 εκατομμύρια λίτρα αιθανόλης με τη χρήση του βακτηρίου *Zygomonas mobilis*.

2.2.1.1.2. Παραγωγή πρωτεΐνης από ορρό γάλακτος

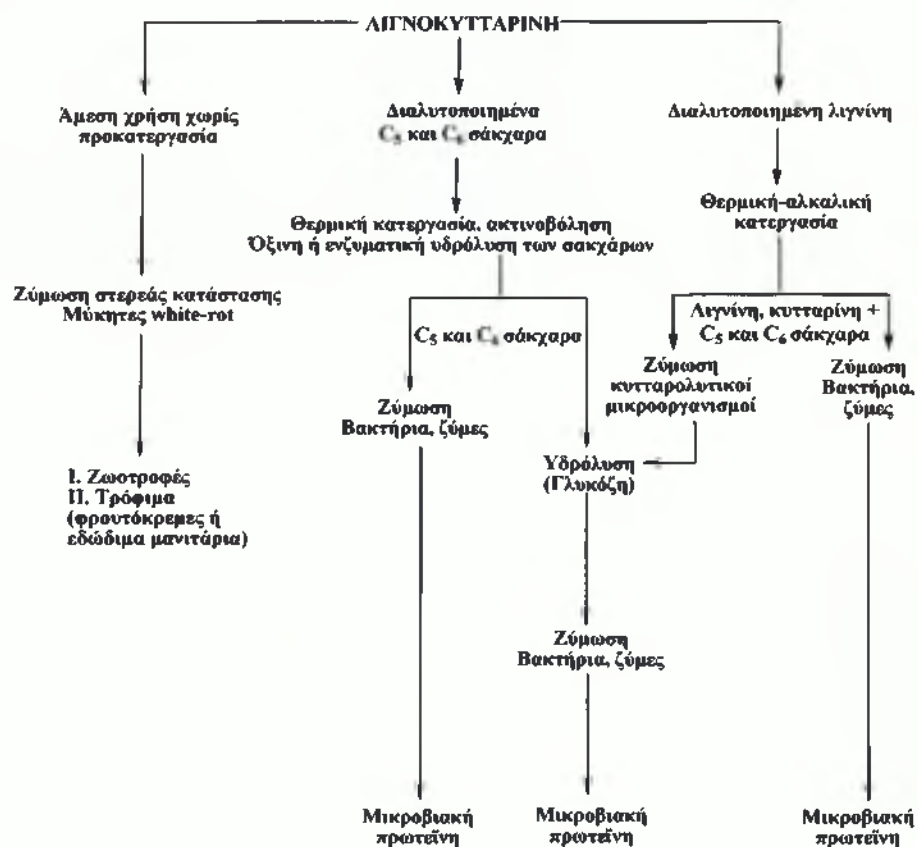
Ο ορρός του γάλακτος αποτελεί παραπροϊόν κατά την παρασκευή τυριού και βουτύρου. Η σύσταση του ορρού εξαρτάται από την προέλευσή του αλλά συνήθως περιέχει 70% λακτόζη επί ξηρού βάρους. Τα υπόλοιπα συστατικά είναι πρωτεΐνη, λιπίδια, γαλακτικό οξύ, ιχνοστοιχεία και κάποιες βιταμίνες. Μικροβιακή πρωτεΐνη μπορεί να παράχθει από το συγκεκριμένο υπόστρωμα με τους εξής τρόπους:

- α) μέσω της άμεσης χρήσης του δισακχαρίτη της λακτόζης από κατάλληλους μικροοργανισμούς
- β) μέσω της μετατροπής της λακτόζης σε γλυκόζη και γαλακτόζη με τη χρήση ενζυμικών μεθόδων υδρόλυσης και χρήση των δύο μονομερών ως θρεπτικά υποστρώματα
- γ) μέσω ζύμωσης της λακτόζης από τα βακτήρια του γαλακτικού οξέος, παράγοντας μίγμα γαλακτικού οξέος και γαλακτόζης.

Η λακτόζη μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως πηγή άνθρακα από πολλούς μικροοργανισμούς, με πιο γνωστούς τα είδη του *Kluyveromyces marxianus*.

2.2.1.1.3. Μετατροπή της λιγνοκυτταρίνης σε πρωτεϊνούχα τροφή

Πολλές προσπάθειες έχουν λάβει χώρα για την αύξηση της αφομοίωσης της λιγνοκυτταρίνης από τα μηρυκαστικά ζώα. Οι βασικές αρχές των μεθόδων που έχουν εφαρμοστεί συνίστανται στη διάσπαση του συμπλόκου κυτταρίνης-λιγνίνης με αποδόμηση της λιγνίνης. Τα κύρια προβλήματα της διατροφικής αναβάθμισης των λιγνοκυτταρινούχων υποστρωμάτων συνίστανται στην εύρεση κατάλληλων μικροοργανισμών, οι οποίοι να διαθέτουν διαφορετικά μεταβολικά μοτίβα από αυτά που περιέχονται στη μικροχλωρίδα και μικροπανίδα των μηρυκαστικών και στην ανάπτυξη φθηνών διεργασιών μεγάλης κλίμακας. Οι ιδανικοί μικροοργανισμοί για τη διατροφική αναβάθμιση των λιγνοκυτταρινούχων υποστρωμάτων πρέπει να μεταβολίζουν ισχυρά τη λιγνίνη και να αποικοδομούν σε μικρό βαθμό την κυτταρίνη και την ημικυτταρίνη. Υπάρχουν τρεις βασικές βιοτεχνολογικές οδοί για την αναβάθμιση των λιγνοκυτταρινούχων υποστρωμάτων (κυρίως αποβλήτων) σε προϊόντα μικροβιακής πρωτεΐνης, κατάλληλα για τη διατροφή των ζώων και των ανθρώπων (Σχήμα 1).



Σχήμα 1. Διαφορετικοί τρόποι παραγωγής μικροβιακής πρωτεΐνης για τρόφιμα και ζωοτροφές από λιγνοκυτταρινούχα υποστρώματα

2.2.1.1.4. Μυκοπρωτεΐνη

Παρά τα πολύ σημαντικά πλεονεκτήματα που αναφέρθηκαν παραπάνω, μόνο ένα προϊόν μικροβιακής πρωτεΐνης, το οποίο έχει εγκριθεί για ανθρώπινη κατανάλωση, έχει "κερδίσει" την αγορά. Το προϊόν αυτό είναι η **μυκοπρωτεΐνη**, η οποία παράγεται από το νηματοειδή μύκητα *Fusarium venenatum*.

Ο μύκητας *Fusarium venenatum* αναπτύσσεται με αερισμό κάτω από σταθεροποιημένες συνθήκες οι οποίες συντηρούνται με συνεχή ανανέωση του θρεπτικού υλικού και απομάκρυνση της καλλιέργειας. Οι συγκεκριμένες συνθήκες ζύμωσης επιλέχθηκαν ώστε να εμποδιστεί η παραγωγή των ιδιαίτερα τοξικών μυκοτοξινών. Η παραγωγή μυκοτοξινών από το μύκητα *Fusarium* λαμβάνει χώρα όταν η διαδικασία ανάπτυξης περιορίζεται από τη μείωση του θρεπτικού υποστρώματος, τα υψηλά ποσοστά άνθρακα στο θρεπτικό υλικό σε σχέση με το άζωτο και τη χαμηλή παροχή οξυγόνου.

Ο πίνακας 1 συνοψίζει τη σύσταση της μυκοπρωτεΐνης. Το ποσοστό της καθαρής πρωτεΐνης αγγίζει το 50% (ξηρό βάρος), περιέχοντας όλα τα απαραίτητα αμινοξέα (Πίνακας 2). Η πρωτεΐνη αυτή είναι εξαιρετικά εύπεπτη, ακριβώς όπως η καζεΐνη του γάλακτος ή το λεύκωμα του αβγού. Το 25% περίπου της μυκοπρωτεΐνης αποτελείται από συστατικά του κυτταρικού τοιχώματος των μυκήτων, χιτίνη και β-γλυκάνες. Το κλάσμα αυτό είναι αδιάλυτο και δύσπεπτο, ιδιότητες οι οποίες χαρακτηρίζουν γενικότερα τις φυτικές ίνες. Το λίπος αποτελεί περίπου το 12% της μυκοπρωτεΐνης. Λόγω της μειωμένης αναλογίας κορεσμένων προς ακόρεστα λιπαρά οξέα (Πίνακας 2), το λίπος αυτό μοιάζει περισσότερο με φυτικό παρά με ζωικό. Η μυκοπρωτεΐνη περιέχει σημαντικές ποσότητες εργοστερόλης αλλά όχι χοληστερόλης.

Έρευνες σε ζώα έχουν δείξει ότι η μυκοπρωτεΐνη δεν προκαλεί χρόνια τοξικότητα, δεν έχει αναπαραγωγική τοξικότητα, δεν προκαλεί τερατογένεση και δεν είναι καρκινογόνα. Δεν δρα ανταγωνιστικά με την απορρόφηση ασβεστίου, σιδήρου ή άλλων ανόργανων θρεπτικών συστατικών. Η εταιρεία Marlow Foods Ltd. δημοσίευσε ότι η μυκοπρωτεΐνη είναι σε πολύ μικρότερο βαθμό αλλεργιογόνα για τον άνθρωπο σε σχέση με πολλά άλλα τρόφιμα ευρείας κατανάλωσης, όπως εκείνα που περιέχουν μαλάκια ή φιστίκια. Η μυκοπρωτεΐνη είναι εμπορικά διαθέσιμη στο Ηνωμένο Βασίλειο από το 1985, σε άλλες χώρες και στην Ευρώπη από το 1991 και στις Η.Π.Α από το 2002.

Πίνακας 1.³ Διατροφική ανάλυση της μικροβιακής πρωτεΐνης^α του μύκητα *Fusarium venenatum*

Θρεπτικό συστατικό	g/100g ξηρού βάρους
Πρωτεΐνη	48
Λίπος	12
<u>Λιπαρά οξέα</u>	
Παλμιτικό (C ₁₆)	1.6
Στεαρικό (C ₁₈)	0.3
Ελαϊκό (C _{18:1})	1.4
Λινολεϊκό (C _{18:2})	4.3
α-Λινολενικό (C _{18:3})	1.0
Φυτικές ίνες ^β	25
Υδατάνθρακες	12
Νερό	0

^αΟ όρος *μικροβιακή πρωτεΐνη* χρησιμοποιείται συνήθως για να περιγράψει την κυτταρική μάζα η οποία παράγεται από μικροοργανισμούς και είναι πλούσια σε πρωτεΐνη. Η μικροβιακή πρωτεΐνη που χαρακτηρίστηκε παραπάνω είναι το προϊόν της εταιρείας Marlow Foods Ltd., γνωστό στην αγορά ως Quorn μυκοπρωτεΐνη.

^βΑυτό το υψηλό αδιάλυτο κλάσμα προέρχεται από το κυτταρικό τοίχωμα του *Fusarium venenatum*. Το κυτταρικό τοίχωμα αποτελείται από χιτίνη (πολύ-N-ακετυλογλυκοζαμίνη) και β-γλυκάνες (με β-1,3 και β-1,6 γλυκοζιτικοί δεσμοί)

Εμπορικά προϊόντα στην Ευρώπη περιλαμβάνουν burgers και φιλέτα χωρίς κρέας καθώς και έτοιμα γεύματα, στα οποία η μυκοπρωτεΐνη είναι το κυρίαρχο συστατικό. Στο Ηνωμένο Βασίλειο και στην Ευρώπη, η αποδοχή της μυκοπρωτεΐνης ως υποκατάστατο του κρέατος έχει καταστεί ιδιαίτερα σημαντική σε μια ευρεία ποικιλία τροφίμων, με πάνω από 15 εκατομμύρια πελάτες.

2.2.2 Μεταβολίτες²

2.2.2.1 Πρωτεΐοντες μεταβολίτες

Οι μικροοργανισμοί μπορούν να λειτουργήσουν ως αποτελεσματικά εργοστάσια βιομηχανικής παραγωγής βασικών μεταβολιτών. Στο στάδιο αυτό συναντάμε κάποια οργανικά οξέα και αμινοξέα, τα οποία αποτελούν και τους

σημαντικότερους εκπρόσωπους αυτής της κατηγορίας προϊόντων μικροβιακής βιοτεχνολογίας.

Πίνακας 2.³ Περιεχόμενο της μικροβιακής πρωτεΐνης του μύκητα *Fusarium venenatum* σε απαραίτητα αμινοξέα (σε σύγκριση με άλλες πρωτεΐνες οι οποίες περιέχονται στα τρόφιμα)

Απαραίτητα αμινοξέα	Περιεχόμενο σε αμινοξέα (g/100 g εδώδιμης μερίδας)					
	Μυκοπρωτεΐνη	Αγελαδινό γάλα	Αβγό	Βοδινό	Σόγια	Σιτάρι
Ιστιδίνη	0.39	0.09	0.3	0.66	0.98	0.32
Ισολευκίνη	0.57	0.20	0.68	0.87	1.77	0.53
Λευκίνη	0.95	0.32	1.1	1.53	2.97	0.93
Λυσίνη	0.91	0.26	0.90	1.6	2.4	0.30
Μεθειονίνη	0.23	0.08	0.39	0.5	0.49	0.22
Φαινυλαλανί-νη	0.54	0.16	0.66	0.76	1.91	0.68
Τρυπτοφάνη	0.18	0.05	0.16	0.22	0.53	0.18
Θρεονίνη	0.61	0.15	0.6	0.84	1.59	0.37
Βαλίνη	0.6	0.22	0.76	0.94	1.82	0.59

2.2.2.1.1 Κιτρικό οξύ

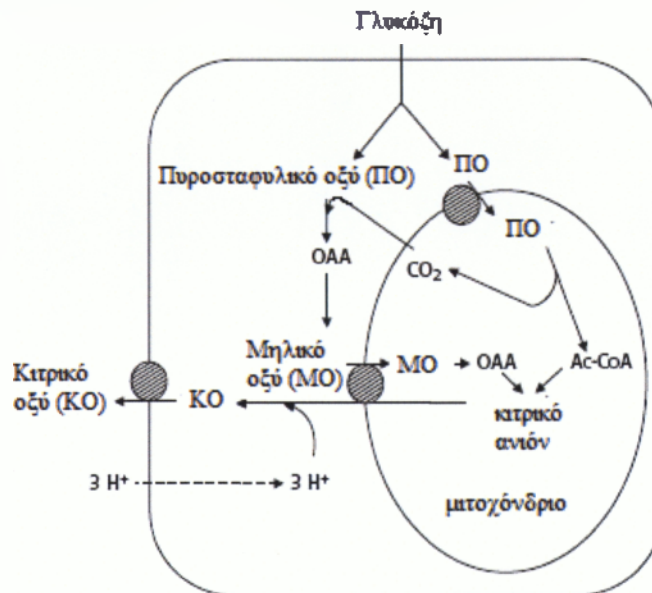
Περίπου 1 δισεκατομμύριο λίβρες κιτρικού οξέος παράγονται παγκοσμίως με ζύμωση των φυσικών στελεχών του μύκητα *Aspergillus niger*. Το κιτρικό οξύ χρησιμοποιείται ως αρωματικό συστατικό στα τρόφιμα και στα ποτά και για την προστασία των λιπών και των ελαίων από την οξειδωση και την τάγγιση. Σε ορισμένες περιπτώσεις, πάνω από το 80% των σακχάρων (θρεπτικό υλικό) μετατρέπεται σε κιτρικό οξύ.

Το κιτρικό οξύ δεν είναι ένα από τα συνηθισμένα αποβαλλόμενα προϊόντα του ενεργειακού μεταβολισμού. Συνήθως διασπάται πλήρως σε διοξείδιο του άνθρακα και νερό κατά τη λειτουργία του κύκλου του κιτρικού οξέος. Επομένως, η αποτελεσματική μετατροπή των σακχάρων, όπως η γλυκόζη και η σακχαρόζη, σε κιτρικό οξύ από τον *A.*

niger είναι ιδιαίτερα απρόσμενη, καθώς τα μιτοχόνδρια αυτού του μύκητα περιέχουν όλα τα ένζυμα του κύκλου του κιτρικού οξέος. Η παραγωγή κιτρικού οξέος λαμβάνει χώρα κυρίως κατά τη στάσιμη φάση και απαιτεί ορισμένες ασυνήθεις συνθήκες:

- (α) Το περιβάλλον πρέπει να είναι ισχυρά όξινο, με το pH να κυμαίνεται μεταξύ 1.6 και 2.2.
- (β) Η συγκέντρωση του σακχάρου πρέπει να είναι πολύ υψηλή (120 με 250 g/l).
- (γ) Το περιβάλλον πρέπει να είναι πτωχό σε Mn^{2+} .
- (δ) Το περιβάλλον πρέπει να περιέχει υψηλή συγκέντρωση ιόντων αμμωνίου.

Το μεταβολικό μονοπάτι που εμπλέκεται στην παραγωγή του κιτρικού οξέος από το μύκητα *A. niger* φαίνεται στο σχήμα 2. Πιο συγκεκριμένα, ένα μόριο πυροσταφυλικού οξέος, το οποίο προέρχεται από τη γλυκόζη μέσω της γλυκόλυσης, διεισδύει στο μιτοχόνδριο και μετατρέπεται σε ακετύλο-CoA με τη δράση της πυροσταφυλικής αφυδρογονάσης. Το άλλο μόριο πυροσταφυλικού οξέος μετατρέπεται σε οξαλοξικά ανιόντα (OAA) με τη δράση της πυροσταφυλικής καρβοξυλάσης. Παρ'όλα αυτά,



Σχήμα 2. Μεταβολικό μονοπάτι παραγωγής κιτρικού οξέος από το μύκητα *Aspergillus niger*.

επειδή δεν υπάρχει μεταφορέας οξαλοξικών στο μιτοχόνδριο, τα οξαλοξικά πρέπει να αναχθούν σε μηλικό οξύ και έπειτα να εισέλθουν στο μιτοχόνδριο στο οποίο επανέρχονται στην αρχική τους μορφή. Τα οξαλοξικά ανιόντα μαζί με το ακετύλο-CoA σχηματίζουν το κιτρικό ανιόν το οποίο εξερχόμενο από το μιτοχόνδριο πρωτονιώνεται σε κιτρικό οξύ και εγκαταλείπει το κύτταρο.

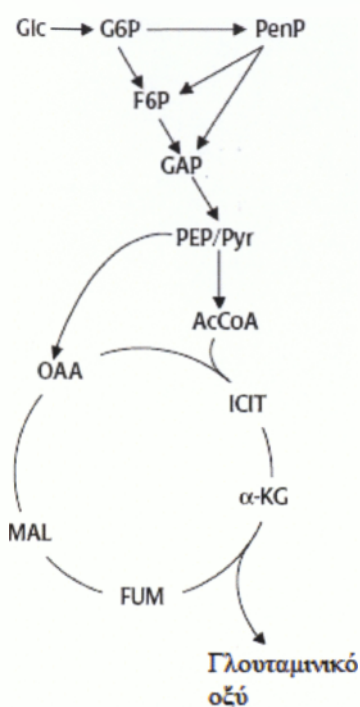
2.2.2.1.2 Αμινοξέα (L-γλουταμινικό οξύ)

Η βιομηχανική παραγωγή του L-γλουταμινικού αμινοξέος χρονολογείται από το 1908, όταν ο Ιάπωνας γεωπόνος χημικός K. Ikeda ανακάλυψε ότι το αμινοξύ αυτό ευθυνόταν για τη χαρακτηριστική γεύση, η οποία εκτιμάται ιδιαίτερα στην Ιαπωνία, τροφίμων που μαγειρεύονταν με ξηρά φύκια (konbu). Για τα πρώτα 50 χρόνια, το μονονάτριο άλας του γλουταμινικού οξέος (MSG) παρήχθη σε βιομηχανική κλίμακα με τη χρήση ιδιαίτερα ακριβών χημικών διαδικασιών, οι οποίες βασίζονταν κυρίως στην όξινη υδρόλυση πρωτεϊνών.

Το επαναστατικό βήμα για τη σύνθεση του L-γλουταμινικού αμινοξέος έγινε το 1957, όταν επιστήμονες της εταιρείας Kyowa Hakko Co. ανακάλυψαν ένα βακτήριο το οποίο είχε την ικανότητα να εκκρίνει μεγάλες ποσότητες L-γλουταμινικού αμινοξέος. Εκτός από την αιθανόλη, κάποιους άλλους οργανικούς διαλύτες και μερικές βιταμίνες, το γλουταμινικό οξύ ήταν η πρώτη οργανική ένωση που συντέθηκε σε βιομηχανική κλίμακα με εφαρμογή τεχνικών μικροβιακής ζύμωσης. Το γλουταμινικό μονονάτριο (MSG) χρησιμοποιείται ως ενισχυτικό γεύσης στα τρόφιμα σε πολύ μεγάλες ποσότητες.

Επειδή τα αμινοξέα αποτελούν δομικό λίθο για το χτίσιμο των πρωτεϊνών, η βιοσύνθεσή τους είναι ιδιαίτερα οργανωμένη. Συνεπώς, δεν είναι δυνατό να σπαταλούνται σημαντικά ποσά ενέργειας και άνθρακα για τη σύνθεση άχρηστου αποθέματος από αυτές τις ενώσεις. Γι'αυτό το λόγο, η παραγωγή L-γλουταμινικού οξέος από άγρια στελέχη βακτηρίων είναι κάτι το εκπληκτικό και ο μηχανισμός, αν και έχει εκπονηθεί τεράστια μελέτη, δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως.

Η παραγωγή του MSG απαιτεί την παρουσία του βακτηρίου *Corynebacterium glutamicum*. Στο σχήμα 3 φαίνεται ο μεταβολισμός του άνθρακα στο βακτήριο *C. Glutamicum*.



Σχήμα 3.⁴ Μεταβολισμός του άνθρακα στο βακτήριο *C. glutamicum*. (G6P: 6-φωσφορική γλυκόζη, F6P: 6-φωσφορική φρουκτόζη, PenP: φωσφορική πεντόζη, GAP: 3-φωσφορική γλυκεραλδεύδη, PEP: φωσφοενολοπιρροσταφυλικό οξύ, Pyrg: Πυρροσταφυλικό, AcCoA: Ακέτυλο-CoA, OAA: οξαλοξικά ανιόντα, ICIT: ισοκίτρικά ανιόντα, α-KG: α-κετογλουταρικό οξύ, FUM: φουμαρικό οξύ, MAL: μηλικό οξύ).

Στους περισσότερους μικροοργανισμούς, το κύριο μεταβολικό μονοπάτι για τη σύνθεση του γλουταμινικού οξέος περιγράφεται από την χημική αντίδραση:



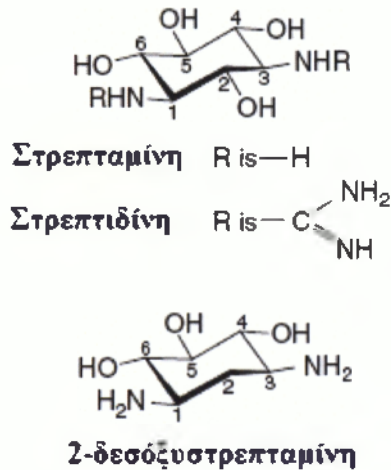
Η παραπάνω αντίδραση καταλύεται από τα ένζυμα συνθετάση της γλουταμίνης και οξογλουταρική τρανσφεράση της γλουταμίνης

2.2.2.2 Δευτερεύοντες μεταβολίτες

Σε αντίθεση με τους πρωτεύοντες μεταβολίτες, οι οποίοι είναι παρόντες στους περισσότερους ζώντες οργανισμούς και παράγονται από τα περισσότερα μεταβολικά μονοπάτια, οι δευτερεύοντες μεταβολίτες παράγονται μόνο από συγκεκριμένες κατηγορίες μικροοργανισμών μέσω ειδικών μεταβολικών οδών. Η χημική τους δομή είναι σύνθετη και συχνά παράγονται μόνο κατά τη διάρκεια κάποιας συγκεκριμένης φάσης ανάπτυξης του μικροοργανισμού, συνήθως κατά τη διάρκεια της στατικής φάσης. Οι πιο σημαντικοί από αυτούς τους δευτερεύοντες μεταβολίτες είναι τα **αντιβιοτικά**.

2.2.2.2.1 Αμινογλυκοζίδια

Πάνω από 150 αμινογλυκοζιδικά αντιβιοτικά, φυσικής προέλευσης, έχουν απομονωθεί από καλλιέργειες του *Streptomyces* και άλλων μελών της οικογένειας των ακτινομυκινών. Οι ενώσεις αυτές περιέχουν τη χαρακτηριστική ομάδα της αμινοκυκλιτόλης, η οποία είναι συνήθως η στρεπταμίνη (όπως στη στρεπτομυκίνη) ή η 2-δεσοξυστρεπταμίνη (όπως συμβαίνει στις περισσότερες άλλες ενώσεις).



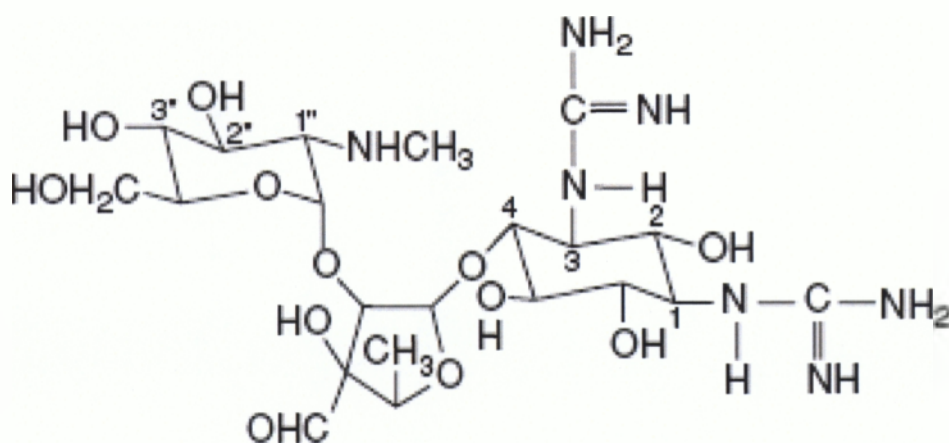
Σχήμα 4. Στρεπταμίνη και 2-δεσοξυστρεπταμίνη. Στη στρεπτομυκίνη, οι δύο αμινομάδες της στρεπταμίνης υποκαθίστανται από 2 αμιδινικές ομάδες, παράγοντας μια κυκλιτόλη η οποία καλείται στρεπτιδίνη

Τα αμινογλυκοζίδια λειτουργούν ως αναστολείς της πρωτεϊνσύνθεσης. Ο κύριος στόχος τους είναι το 70S-ριβόσωμα. Η πολυκατιονική φύση των αμινογλυκοζιδίων είναι ιδιαίτερα σημαντική σχετικά με την πρόσδεσή τους στο ριβόσωμα των βακτηρίων (η πιο σωστά, στο ανιονικό 16S rRNA), όπως έχουν δείξει κρυσταλλογραφικές μελέτες προσφάτων ετών.

Πολλά από τα αντιβιοτικά που δρουν ως αναστολείς της πρωτεϊνσύνθεσης των βακτηρίων (όπως η χλωραμφαινικόλη, η τετρακυκλίνη και η ερυθρομυκίνη) είναι βακτηριοστατικά. Αναστέλλουν δηλαδή την ανάπτυξη των βακτηρίων χωρίς όμως να τα σκοτώνουν. Παρ'όλα αυτά, τα αμινογλυκοζίδια ξεχωρίζουν από τα υπόλοιπα αντιβιοτικά καθώς είναι καθαρά βακτηριοκτόνα.

2.2.2.2.1.1 Στρεπτομυκίνη

Η στρεπτομυκίνη (εικόνα 2) ανακαλύφθηκε από το μικροβιολόγο Selman A. Waksman. Ο Waksman και οι συνεργάτες του εξέτασαν τα προϊόντα μεταβολισμού του μικροοργανισμού *Streptomyces*, αναζητώντας αντιβιοτικά τα οποία να ήταν ενεργά απέναντι στα Gram-αρνητικά βακτήρια, για τα περισσότερα από τα οποία η πενικιλίνη, το μόνο εμπορικά παραγόμενο, αντιβιοτικό, ήταν εντελώς αναποτελεσματική. Η δημοσίευση της συγκεκριμένης ομάδας το 1944, στην οποία περιγράφεται η ανακάλυψη της στρεπτομυκίνης, είναι εντυπωσιακή καθώς αναλύεται όχι μόνο η δραστικότητα της στρεπτομυκίνης εναντίον των Gram-θετικών και Gram-αρνητικών βακτηρίων αλλά και η βακτηριοκτόνα της δράση καθώς και το γεγονός ότι η παραγωγή της καθορίζεται σε μεγάλο βαθμό από τη φύση του θρεπτικού υποστρώματος και τη φάση ανάπτυξης του μικροοργανισμού.



Σχήμα 5. Συντακτικός τύπος της στρεπτομυκίνης

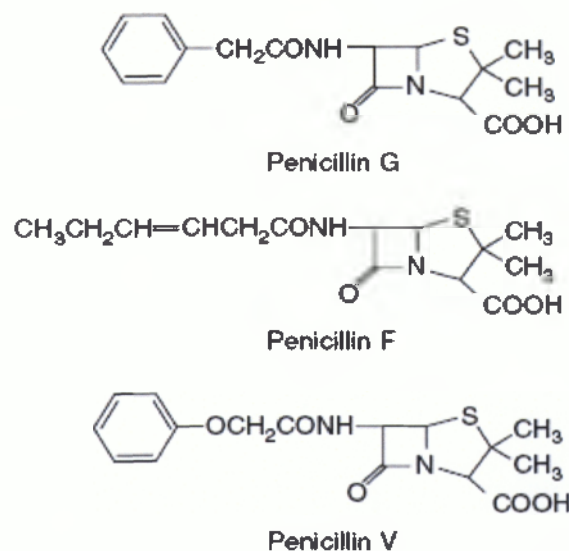
Αν και η τοξικότητα της στρεπτομυκίνης την εμπόδισε ώστε να γίνει η "πενικιλίνη για τα Gram-αρνητικά βακτήρια", η ανακάλυψη της δραστικότητας της απέναντι στο βάκιλλο της φυματίωσης έκανε το συγκεκριμένο αντιβιοτικό εξαιρετικά σημαντικό. Αν και σε πρώτη φάση χρησιμοποιείται συνήθως η ριφαμικίνη ως αντιβιοτικό πρώτης γραμμής απέναντι στη φυματίωση, η ανάπτυξη ανθεκτικότητας του μικροοργανισμού της φυματίωσης στο συγκεκριμένο αντιβιοτικό καθιστά τη χρήση στρεπτομυκίνης ένα πολύ σημαντικό εργαλείο για την αντιμετώπιση τέτοιων περιστατικών.

2.2.2.2.2 β-Λακτάμες

Οι β-λακτάμες είναι πιθανότατα η σημαντικότερη κατηγορία αντιβιοτικών για διάφορους λόγους. Ένας από αυτούς είναι η πενικιλίνη, το πρώτο αντιβιοτικό που απομονώθηκε και χαρακτηρίστηκε, η οποία ανήκει στην κατηγορία των β-λακταμών. Μια άλλη αιτία είναι η εξαιρετικά χαμηλή τοξικότητα των β-λακταμών απέναντι στα ανώτερα θηλαστικά και η ταυτόχρονη υψηλή τους δραστικότητα στην εξολόθρευση των μολυσματικών βακτηρίων. Το γεγονός αυτό οφείλεται στο ότι οι β-λακτάμες αναστέλλουν τη σύνθεση της πεπτιδογλυκάνης, μια αντίδραση η οποία δε συναντάται στο χώρο των ευκαρυωτικών οργανισμών. Η πενικιλίνη και οι κεφαλοσπορίνες είναι οι κλασικοί εκπρόσωποι της οικογένειας των β-λακταμών.

2.2.2.2.1 Πενικιλίνη

Ο μικροοργανισμός που παρήγαγε την πενικιλίνη στο εργαστήριο του Αλεξάντερ Φλέμινγκ ήταν στην πραγματικότητα μούχλα ή πιο σωστά ο μύκητας *Penicillium notatum*. Από τότε η παραγωγή πενικιλίνης έχει υποστεί δραματικές τροποποιήσεις και ως προς την ποσότητα του παραγόμενου αντιβιοτικού αλλά και ως προς τη δομή και δραστικότητά του.



Σχήμα 6. Διάφορες μορφές της πενικιλίνης ανάλογα με το θρεπτικό υπόστρωμα καλλιέργειας του μικροοργανισμού.

Σε νεότερες έρευνες γύρω από την πενικιλίνη έχει φανεί ότι η φύση του υποστρώματος ανάπτυξης επηρεάζει τον τύπο της πενικιλίνης που απομονώνεται. Για αυτό το λόγο στις Η.Π.Α, όπου χρησιμοποιήθηκαν διαλυμένοι σπόροι δημητριακών με

φαινυλοξικό οξύ ως πηγή άνθρακα στη ζύμωση, το κύριο προϊόν ήταν η πενικιλίνη G με τη βενζυλική πλευρική της ομάδα (Σχήμα 6). Αντιθέτως, στη Βρετανία απομονώθηκε ο τύπος της πενικιλίνης F, με μια 2-πεντενυλική πλευρική ομάδα (Σχήμα 6). Από τότε, διάφορες ενώσεις δοκιμάστηκαν στο θρεπτικό υπόστρωμα ανάπτυξης των μικροοργανισμών για την πιθανή απομόνωση και άλλων παραγώγων της πενικιλίνης. Τελικά, απομονώθηκε και η πενικιλίνη V, με μια φαινοξυμεθυλική-πλευρική ομάδα, μετά την προσθήκη φαινοξυοξικού οξέος αντί για φαινυλοξικού οξέος στο θρεπτικό υπόστρωμα. Η πενικιλίνη V παρουσιάζει υψηλότερη ανθεκτικότητα στο όξινο pH του στομάχου και παρέχεται με κατάποση.

2.2.3 Βιοσυσσώρευση²

Υπάρχουν αρκετές περιπτώσεις στις οποίες η βιοαποικοδόμηση μετατρέπει οργανικούς ρύπους σε μη τοξικές ανόργανες ενώσεις, όπως το διοξείδιο του άνθρακα, το νερό και διάφορα αλογονίδια. Σημαντικά πλεονεκτήματα της βιοαποικοδόμησης είναι το χαμηλό κόστος και η μη πρόκληση διαταραχών στην ισορροπία των οικοσυστημάτων. Στη φύση υπάρχει μια ποικιλία μικροοργανισμών, με κυρίαρχα τα βακτήρια, τα οποία έχουν τη δυνατότητα να αποικοδομούν ένα ευρύ φάσμα περιβαλλοντικών ρύπων αντιμετωπίζοντας αποτελεσματικά το πρόβλημα της βιοσυσσώρευσής τους.

Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελούν οι πετρελαιοκηλίδες, οι οποίες τυχαίνει πολλές φορές να σχηματιστούν από τη διαρροή πετρελαιοφόρων πλοίων μολύνοντας εκατοντάδες χιλιόμετρα της θαλάσσιας ακτογραμμής. Με την πάροδο του χρόνου το σύνολο του ενδογενούς μικροβιακού πληθυσμού επιτυγχάνει σε μεγάλο βαθμό την αποικοδόμηση του αργού πετρελαίου.

Άλλο παράδειγμα αποτελούν τα πολυχλωριωμένα παράγωγα, ενώσεις οι οποίες έχουν τύχει ιδιαίτερου ενδιαφέροντος λόγω των γνωστών προβλημάτων που προκαλούν στο περιβάλλον και στην υγεία του ανθρώπου. Τα αλειφατικά χλωριωμένα παράγωγα χρησιμοποιούνται σε υγρά καθαριστικά και διαλυτικά χρωμάτων. Τα αρωματικά πολυχλωριωμένα παράγωγα χρησιμοποιούνται σε συντηρητικά ξύλου και σε μονωτικά υλικά ενώ απελευθερώνονται στο περιβάλλον και με τη μορφή διοξινών. Οι ενώσεις αυτές αποικοδομούνται μερικώς ή εξ ολοκλήρου μέσω της συνδυασμένης δράσης διαφόρων ενδογενών μικροοργανισμών κάτω από αερόβιες ή αναερόβιες

συνθήκες. Σε αρκετές βέβαια περιπτώσεις, η μικροβιακή αποικοδόμηση τέτοιου είδους ενώσεων οδηγεί επίσης στο σχηματισμό τοξικών προϊόντων.

Ένα άλλο εξαιρετικά σημαντικό πρόβλημα αποτελεί η μόλυνση περιοχών με ραδιενεργά στοιχεία όπως το ουράνιο (U), το πλουτώνιο (Pu), το καίσιο (Cs) και το τεχνητό (Tc), τα οποία περιέχονται συνήθως στα πυρηνικά απόβλητα. Ο καθαρισμός των περιοχών αυτών αποτελεί έναν ιδιαίτερα μεγάλο στόχο. Βακτήρια του γένους *Geobacter* (δ-πρωτεοβακτήρια) συντελούν στην ακινητοποίηση του ουρανυλικού ιόντος U(VI) μέσω της αναγωγής του σε U(IV), το οποίο σχηματίζει διάφορες αδιάλυτες μορφές ενώσεων.

3. ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΛΙΠΟΥΣ

3.1 Ελαιογόνοι μικροοργανισμοί

Ελαιογόνοι μικροοργανισμοί (Oleaginous microorganisms) θεωρούνται αυτοί, οι οποίοι κατά την περίοδο ανάπτυξής τους σε καθορισμένες συνθήκες, έχουν τη δυνατότητα να αποθηκεύουν λίπος εντός των κυττάρων τους σε ποσοστό πάνω από 20% κατά βάρος επί της βιομάζας τους. Σε κάποιες περιπτώσεις, υπάρχουν μικροοργανισμοί που μπορούν να αποθηκεύσουν ενδοκυτταρικό λίπος έως και 80% κατά βάρος. Η χρησιμοποίηση ελαιογόνων μικροοργανισμών είναι γνωστή από το 2^ο Παγκόσμιο πόλεμο. Παρ'όλα αυτά, επιστημονική μελέτη πάνω στη δράση των ελαιογόνων μικροοργανισμών διενεργείται τα τελευταία 35 χρόνια.⁵

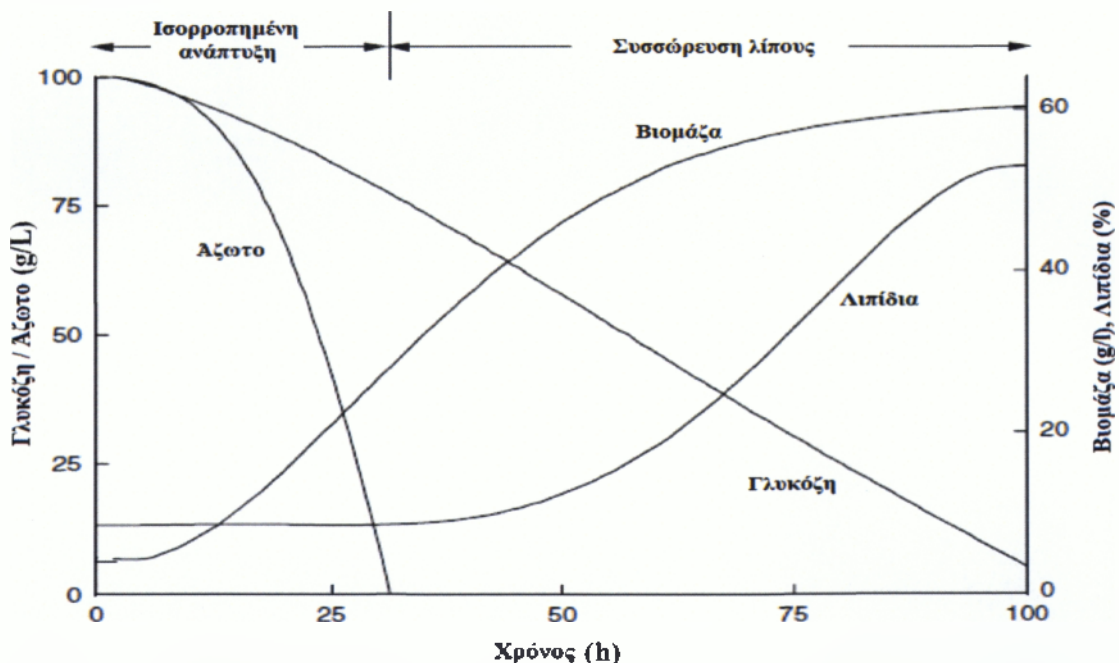
Παραδείγματα ελαιογόνων μικροοργανισμών μπορούν να βρεθούν σε ορισμένα είδη βακτηρίων, ζυμών, μυκήτων και φυκών. Στον πίνακα 3 φαίνονται κάποια χαρακτηριστικά παραδείγματα μικροοργανισμών, οι οποίοι συσσωρεύουν πάνω από 40% λίπος επί της ξηρής τους βιομάζας.⁶

Πίνακας 3.⁶ Επιλεγμένοι μικροοργανισμοί οι οποίοι παράγουν από 40-80% λίπος.

Βακτήρια	Μύκητες
<i>Arthrobacter sp.</i>	<i>Entomophthora conica</i>
Ζύμες	<i>Cunninghamella elegans</i>
<i>Cryptococcus curvatus</i>	<i>Mortierella isabelina</i>
<i>C. terricolus</i>	<i>M. pusilla</i>
<i>Candida</i> NCYC 911	<i>M. vinacea</i>
<i>Lipomyces lipofer</i>	<i>Mucor circinelloides</i>
<i>L. starkey</i>	<i>M. mucedo</i>
<i>L. tetrasporus</i>	<i>M. plumbeus</i>
<i>Rhodospiridium toruloides</i>	<i>Pythium ultimum</i>
<i>Rhodotorula glutinis</i>	<i>Aspergillus fischeri</i>
<i>Trichosporon cutaneum</i>	<i>A. oryzae</i>
<i>Endomycopsis vernalis</i>	<i>Chaetomium globosum</i>
<i>Trigonopsis variabilis</i>	<i>Fusarium bulbigenum</i>
Φύκη	<i>Oidium lactis</i>
<i>Botryococcus braunii</i>	<i>Gibberela fujicoroi</i>
<i>Dunaliella salina</i>	<i>Humicola lanuginosa</i>
<i>Nannochloris sp.</i>	<i>Penicillium lilacinum</i>
<i>Monalanthus salina</i>	<i>P. spinulosum</i>
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	<i>Cladosporium herbarum</i>
	<i>Claviceps purpurea</i>
	<i>Ustilago zeae</i>

3.2 Βιοχημεία Συσσώρευσης Μικροβιακού Λίπους

Σύμφωνα με το σχήμα 7, η αποθήκευση του μικροβιακού λίπους στους μικροοργανισμούς ακολουθεί συγκεκριμένο πρότυπο περιοριστικού θρεπτικού μέσου. Η καλλιέργεια του μικροοργανισμού διεξάγεται σε θρεπτικό υπόστρωμα με την παρουσία περίσσειας πηγής άνθρακα (γλυκόζης ή σακχαρόζης), ενώ παράλληλα περιορίζονται δραστικά τα ποσοστά αζώτου. Αποδεικνύεται ότι ο μικροοργανισμός εξαντλεί σε πρώτη φάση την πηγή αζώτου αλλά συνεχίζει να μεταβολίζει την πηγή άνθρακα. Απουσία αζώτου, παύει η κυτταρική αύξηση, καθώς το άζωτο είναι απαραίτητο για τη σύνθεση πρωτεϊνών και νουκλεοτιδίων, τα οποία αποτελούν δομικούς λίθους για τη δημιουργία νέων κυττάρων. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, τη μετατροπή της καταναλωθείσας πηγής άνθρακα σε ενδοκυτταρικό λίπος (τριγλυκερίδια) στους ελαιογόνους μικροοργανισμούς. Η αποθήκευση του μικροβιακού λίπους διεξάγεται μέχρι ενός ορισμένου σημείου, το οποίο είναι προκαθορισμένο γενετικά για κάθε μικροοργανισμό και κυμαίνεται στην κλίμακα 20%-60% (w/w επί της ξηρής βιομάζας).¹¹



Σχήμα 7.7 Διάγραμμα αποθήκευσης μικροβιακού λίπους από τους ελαιογόνους μικροοργανισμούς

Από την άλλη πλευρά, οι μη-ελαιογόνοι μικροοργανισμοί δεν είναι δυνατό να συσσωρεύσουν μικροβιακό λίπος πάνω από 10% επί της ξηρής βιομάζας. Σε καλλιέργειες τέτοιων μικροοργανισμών (περιοριστικές σε άζωτο), εκείνοι συνεχίζουν

την κατανάλωση της πηγής άνθρακα, είτε για την αποθήκευση διαφόρων οργανικών ενώσεων, είτε για την παραγωγή μεταβολιτών (όπως τα οργανικά οξέα).

Η παραγωγή μικροβιακού λίπους εξαρτάται κυρίως από 2 παράγοντες:

α) τη δυνατότητα του μικροοργανισμού να παράγει συνεχώς ακετυλοσυνένζυμο Α (Acetyl-CoA) εντός του κυτταροπλάσματος, απαραίτητη προϋπόθεση για τη βιοσύνθεση των λιπαρών οξέων και

β) την ικανότητα του μικροοργανισμού να παρέχει αρκετή ποσότητα NADPH, το οποίο είναι απαραίτητο, λόγω της αναγωγικής του δράσης, για τη σύνθεση των λιπαρών οξέων.⁸

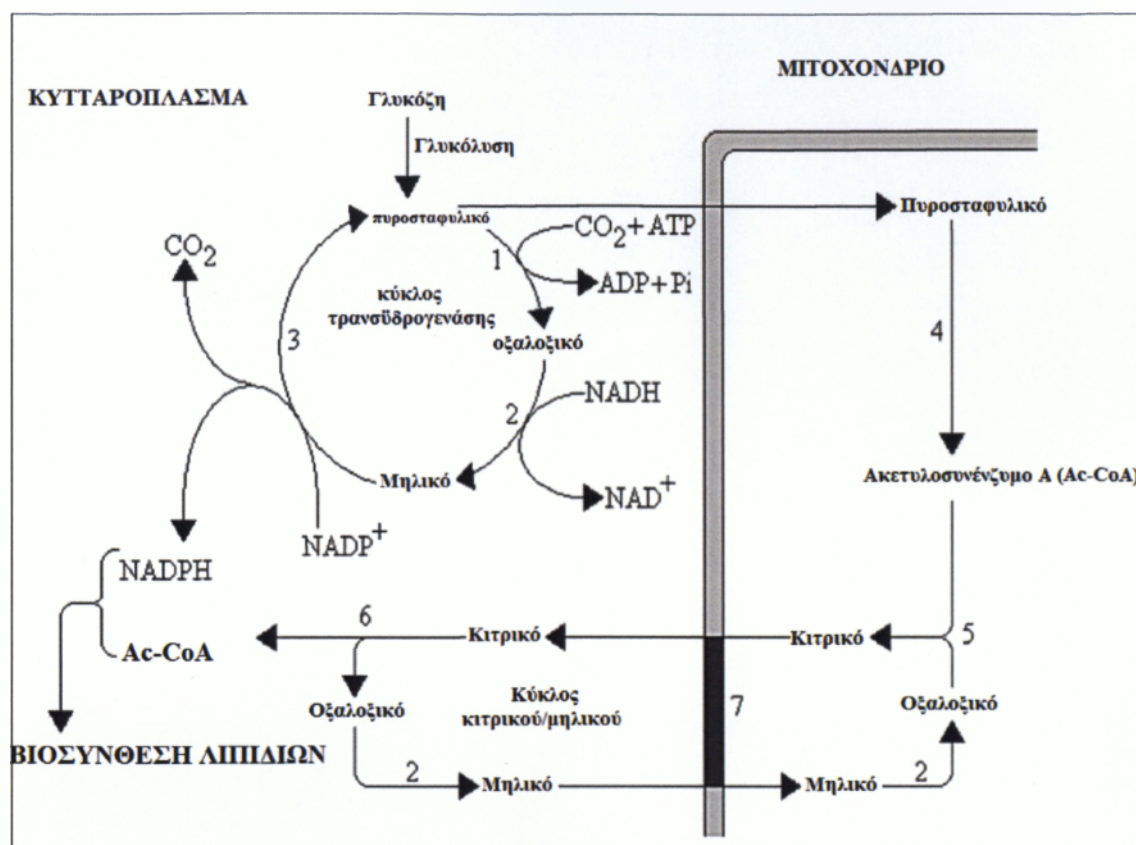
Η ικανότητα σχηματισμού ακετυλοσυνένζυμου Α στους ελαιογόνους μικροοργανισμούς οφείλεται στην παρουσία ενός ενζύμου, της ATP-κιτρικής λυάσης (ACL), το οποίο δε διαθέτει η πλειοψηφία των μη-ελαιογόνων μικροοργανισμών. Ο περιορισμός του θρεπτικού μέσου σε άζωτο έχει ως αποτέλεσμα την έναρξη ενός κύκλου αντιδράσεων, οι οποίοι οδηγούν στο σχηματισμό του ακετυλοσυνένζυμου Α.

Αρχικά, έχουμε τη συσσώρευση κιτρικού οξέος στο μιτοχόνδριο, στο οποίο δε μπορεί να μεταβολιστεί λόγω αναστολής του ενζύμου της ισοκιτρική αφυδρογονάσης. Εν συνεχεία, το κιτρικό οξύ περνάει στο κυτταρόπλασμα όπου και διασπάται από την ATP-κιτρική λυάση σε ακετυλοσυνένζυμο Α και οξαλοξικό οξύ. Έπειτα, το ακετυλοσυνένζυμο Α αξιοποιείται ως πρόδρομη ουσία για τη βιοσύνθεση των λιπαρών οξέων, ενώ το οξαλοξικό οξύ μετατρέπεται μέσω της αφυδρογονάσης του μηλικού οξέος σε μηλικό οξύ, το οποίο χρησιμοποιείται στον κύκλο κιτρικού/μηλικού οξέος (Σχήμα 2 και σχήμα 8).^{8,9} Η αντίδραση που λαμβάνει χώρα κατά την παραπάνω πορεία είναι η εξής:



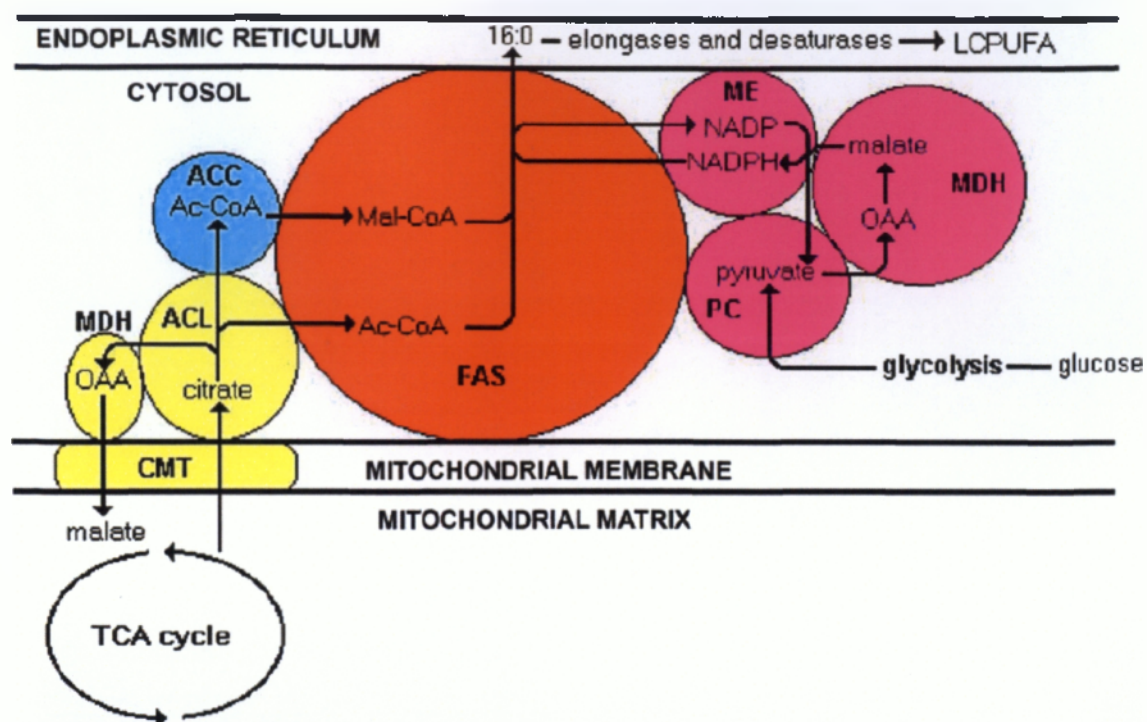
Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, για τη βιοσύνθεση των λιπαρών οξέων είναι απαραίτητη και η παροχή επαρκούς ποσότητας NADPH. Το μηλικό οξύ δρα ως πηγή NADPH κατά την ακόλουθη εξίσωση:





Σχήμα 8.⁸ Ο κύκλος του Krebs (κύκλος τρανσϋδρογενάσης) και ο κύκλος του κιτρικού/μηλικού οξέος, ως πρόδρομα μεταβολικά μονοπάτια για την παραγωγή ακετυλοσυνενζύμου Α και NADPH, ουσίες που καθορίζουν την αποθήκευση λίπους στους ελαιογόνους μικροοργανισμούς. Τα ένζυμα που συμμετέχουν στις διάφορες αντιδράσεις αριθμούνται ως εξής: 1. αποκαρβοξυλάση του πυροσταφυλικού οξέος, 2. αφυδρογονάση του μηλικού οξέος, 3. μηλικό ένζυμο, 4. αφυδρογονάση του πυροσταφυλικού οξέος, 5. κιτρική συνθάση, 6. ATP-κιτρική λυάση, 7. ένζυμο υπεύθυνο για τη λειτουργία του συστήματος μεταφοράς κιτρικού/μηλικού οξέος μεταξύ μιτοχονδρίου και κυτταροπλάσματος.

Στους περισσότερους μικροοργανισμούς συναντάται η λειτουργία του μηλικού ενζύμου και η συνεργιστική του δράση με την ATP-κιτρική λυάση και τη συνθάση των λιπαρών οξέων, ώστε να υπάρχει άμεση επικοινωνία κατά τη μετατροπή του ακετυλοσυνενζύμου Α σε λιπαρά οξέα. Μετά τη βιοσύνθεση των λιπαρών οξέων ακολουθεί η εστεροποίηση με γλυκερόλη σε τριγλυκερίδια και η ενσωμάτωσή τους, μέσω του ενδοπλασματικού δικτύου, σε σταγονίδια λιπαρών οξέων (Σχήμα 9).



Σχήμα 9. Διαγραμματική αναπαράσταση της αποθήκευσης λίπους στους ελαιογόνους μικροοργανισμούς. Κίτρινο χρώμα: κύκλος κιτρικού/μηλικού οξέος, μωβ χρώμα: κύκλος του Krebs (κύκλος της τρανσϋδρογενάσης).⁸

Στο σχήμα 9 αναπαρίσταται διαγραμματικά η διαδικασία της λιπογένεσης στους ελαιογόνους μικροοργανισμούς. Κατά τη διαδικασία αυτή πραγματοποιείται ροή της πηγής άνθρακα από το μιτοχόνδριο, μέσω του κύκλου του κιτρικού/μηλικού οξέος και του σχηματισμού του Ac-CoA, στο κυτταρόπλασμα. Εν συνεχεία, πραγματοποιείται ο σχηματισμός των λιπαρών οξέων, των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (PUFAs) και τελικά των σταγονιδίων των λιπαρών οξέων στις μεμβράνες του ενδοπλασματικού δικτύου.

Τα ένζυμα κλειδιά για την παραγωγή μικροβιακού λίπους στους ελαιογόνους μικροοργανισμούς είναι η ATP-κιτρική λυάση (ACL) και το μηλικό ένζυμο. Παρ'όλα αυτά, η δράση της ACL σε κάποιες ζύμες δεν οδήγησε στην παραγωγή μικροβιακού λίπους. Αυτό δείχνει ότι είναι απαραίτητη η δράση και άλλων ενζύμων για να εξασφαλιστεί η σύνθεση του μικροβιακού λίπους.⁹ Σχετικά με το μηλικό ένζυμο, μελέτες έχουν δείξει ότι είναι δυνατό κάποιοι ελαιογόνοι μικροοργανισμοί (*Lipomyces sp.* και *Candida sp.*), οι οποίοι δε διαθέτουν το συγκεκριμένο ένζυμο, να βιοσυνθέτουν λίπος. Είναι πιθανό οι μικροοργανισμοί αυτοί να διαθέτουν κάποιο εναλλακτικό ένζυμο,

το οποίο είναι εξειδικευμένο στην παραγωγή NADPH για την βιοσύνθεση των λιπαρών οξέων.⁸

3.3 Χρήσεις Μικροβιακού Λίπους

3.3.1 Τρόφιμα

3.3.1.1 Πολυακόρεστα λιπαρά οξέα

Το μεγάλο ενδιαφέρον σχετικά με την παραγωγή μικροβιακού λίπους (single cell oil) οφείλεται στο γεγονός ότι το λίπος αυτό αποτελεί πηγή σημαντικών λιπαρών οξέων, τα οποία σπάνια κανείς τα συναντά στη φύση. Επίσης, το λίπος αυτό είναι δυνατό να περιέχει αξιόλογες ποσότητες πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (PUFAs), τα οποία παρουσιάζουν αξιοσημείωτο διατροφικό και φαρμακευτικό ενδιαφέρον.^{5,10}

Σπουδαίο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γ-λινολενικό οξύ (GLA, C_{18:3}), ένα λιπαρό οξύ το οποίο παράγεται σε μεγάλο ποσοστό ως προϊόν του μεταβολισμού των ελαιογόνων ζυγομυκήτων.^{5,9,10} Η συγκεκριμένη ουσία έχει αναφερθεί ότι παρουσιάζει αντικαρκινική και αντιφλεγμονώδη δράση.¹¹

Επιπρόσθετα, λιπαρά οξέα όπως το εικοσιδυοεξενοϊκό οξύ (DHA, C_{22:6}, ω-3 λιπαρό οξύ) και το αραχιδονικό οξύ (ARA, C_{20:4}, ω-6 λιπαρό οξύ) παρουσιάζουν εξαιρετικό ενδιαφέρον, καθώς έχει αποδειχθεί ότι παίζουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη του εγκεφάλου των νεογνών και στη βελτίωση της μνήμης και της όρασής τους. Αν και το ιχθυέλαιο περιέχει μεγάλες ποσότητες DHA, δεν συστήνεται η χρήση του στη βρεφική διατροφή λόγω πιθανής παρουσίας τοξικών ενώσεων (διοξίνες, PCB και βαρέα μέταλλα) εξαιτίας της περιβαλλοντικής ρύπανσης. Σήμερα, υπάρχουν τουλάχιστον τρεις ζυμώσεις με διαφορετικό μικροοργανισμό για την παραγωγή DHA, ενώ για την παραγωγή ARA αξιοποιούνται διάφορα στελέχη του γένους *Mortierella alpinia*. Το εικοσιδυοεξενοϊκό οξύ και το αραχιδονικό οξύ έχουν ενσωματωθεί σε αναλογία 2:1 για τη δημιουργία διατροφικού σκευάσματος με το όνομα Formulaid, η οποία χορηγείται στα βρέφη.⁸ Στον πίνακα 4 συνοψίζονται οι συμβατικές και οι μικροβιακές πηγές των κυριότερων πολυακόρεστων λιπαρών οξέων.

Οι μικροοργανισμοί που αξιοποιούνται για την παραγωγή μικροβιακού λίπους έχουν τη δυνατότητα παραγωγής υψηλών ποσοστών από τα πολύτιμα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα. Π.χ, τα μικροφύκη του γένους *Cryptothecodinium* αποθηκεύουν λίπος του

οποίου η περιεκτικότητα σε εικοσιδυοεξανοϊκό οξύ (DHA) φθάνει το 40-50% επί του συνόλου των λιπιδίων. Οι μύκητες της τάξης των *Mucorales* παράγουν ενδοκυτταρικά γ-λινολενικό οξύ (GLA) σε ποσοστά που φθάνουν το 20-25%.

Πίνακας 4. Συμβατικές και μικροβιακές πηγές των κυριότερων πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (PUFAs).⁷

Ομάδα ω-6			Ομάδα ω-3	
γ-Λινολενικό (GLA, C _{18:3})	Αραχιδονικό (ARA, C _{20:4})	α-Λινολενικό (ALA, C _{18:3})	Εικοσιπεντενοϊκό (EPA, C _{20:5})	Εικοσιδυοεξανοϊκό (DHA, C _{22:6})
Φυτά: <i>Borago officinalis</i> , <i>Oenothera biennis</i> , <i>Ornithogalum spp.</i>	Ψάρια: <i>Brevoortia</i> , <i>Clupea</i> , <i>Sardina spp.</i> , ζωικοί ιστοί	Φυτά: <i>Brassica</i> , <i>Glycine</i> , <i>Linum spp.</i>	Ψάρια οστρακοειδή	και Ψάρια: <i>Brevoortia</i> , <i>Engraulis</i> , <i>Sardina</i> , <i>Scomber spp.</i>
Μύκητες	Μύκητες	Μικροφύκη	Μύκητες	Μύκητες
<i>Mucor</i> , <i>Mortierella</i>	<i>Pythium</i> , <i>Mortierella spp.</i>	<i>Chlorella spp.</i>	<i>Mortierella spp.</i>	<i>Thraustochytrium</i> , <i>Entomophthora spp.</i>
Μικροφύκη	Μικροφύκη	Μικροφύκη	Μικροφύκη	Μικροφύκη
<i>Chlorella spp.</i> <i>Spirulina spp.</i>	<i>Porphyridium spp.</i>	<i>Chlorella</i> , <i>Monodus</i> , <i>Porphyridium</i> , <i>Nannochloropsis</i> , <i>Cryptoleura</i> , <i>Shizymenia</i> , <i>Navicula</i>	<i>Chlorella</i> , <i>Monodus</i> , <i>Porphyridium</i> , <i>Nannochloropsis</i> , <i>Cryptoleura</i> , <i>Shizymenia</i> , <i>Navicula</i>	<i>Gonyaulax</i> , <i>Gyrodinium</i> , <i>Cryptheconidium</i> ,
		Βακτήρια	Βακτήρια	
		<i>Rhodopseudomonas</i> , <i>Shewanella spp.</i> , <i>Photobacterium</i>	<i>Colwellia</i> , <i>Moritella (Vibrio) marinus</i>	

Οι μύκητες του γένους *Mortierella* είναι επίσης πλούσιες πηγές παραγωγής πολυακόρεστων λιπαρών οξέων, όπως το αραχιδονικό και το εικοσιπεντενοϊκό οξύ. Η περιεκτικότητα του μικροβιακού λίπους σε ARA και EPA από καλλιέργειες των συγκεκριμένων μικροοργανισμών αγγίζει το 20% επί του συνόλου των λιπιδίων.

Σχετικά με την παραγωγή του εικοσιδυοεξανοϊκού οξέος (DHA), έχει διερευνηθεί η καλλιέργεια του μύκητα *Thraustochytrium aureum*, ο οποίος είναι δυνατό να αποθηκεύει πάνω από 50% DHA επί του συνόλου των λιπιδίων. Παρόλα αυτά, η απόδοση στην παραγωγή μικροβιακού λίπους είναι ιδιαίτερα χαμηλή (10-15%).

Αντιθέτως, σε μελέτη που διεξήχθη το 1997 (Yaguchi et al.) με τη χρήση του μικροφύκου *Schizochytrium* SR21, βρέθηκε ότι αποτελεί εξαιρετική πηγή παραγωγής DHA (4.7 g/L), ενώ παράλληλα παρουσιάζει και ικανοποιητική παραγωγή βιομάζας.

3.3.1.2. Ασφάλεια χρήσης μικροβιακού λίπους στα τρόφιμα¹²

Τα πλούσια σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα μικροβιακά λίπη αποτελούν νέες διατροφικές πηγές στην ανθρώπινη διαίτα. Για το λόγο αυτό, η ασφάλεια της χρήσης τους στη διατροφή (ιδιαίτερα τη βρεφική) απαιτείται να είναι ιδιαίτερα μεγάλη. Μια ειδική επιτροπή στο Ηνωμένο Βασίλειο καθόρισε σαφείς οδηγίες για τον εκτενή έλεγχο των διατροφικών και κλινικών επιδράσεων των νέων αυτών συστατικών στα προϊόντα διατροφής. Έχει διατυπωθεί από διάφορες μελέτες η άποψη ότι κάποιοι ελαιογόνοι μικροοργανισμοί είναι δυνατό να παράγουν τοξικές ουσίες και κάποια νέα είδη στερολών. Έχει διευκρινιστεί πως για τη χρήση μικροβιακού λίπους σε προϊόντα διατροφής των νεογνών πρέπει οπωσδήποτε να χρησιμοποιούνται μη-παθογόνοι μικροοργανισμοί και το μικροβιακό λίπος να είναι απαλλαγμένο από διάφορες τοξικές ουσίες.

Σε μελέτες που έγιναν σε ποντίκια, τα οποία κατανάλωσαν προϊόντα που περιείχαν μικροβιακό λίπος (DHASCO®, ARASCO® και συνδυασμούς των δύο), βρέθηκε ότι τα εξεταζόμενα μικροβιακά λίπη δεν είχαν σημαντική τοξικότητα. Επίσης, βρέθηκε ότι η χρήση μικροβιακού λίπους δεν είναι περισσότερο επικίνδυνη από αυτή του ηλιελαίου.

Σε έρευνα που έγινε σε ενήλικες άνδρες με τα ίδια προϊόντα σημειώθηκε αύξηση της συγκέντρωσης των λιπιδίων του πλάσματος σε αραχιδονικό και εικοσιδυοεξανοϊκό οξύ. Καμία άλλη επίδραση δε βρέθηκε κατά την περίοδο των 14 ημερών, στην οποία το δείγμα των ανθρώπων τρεφόταν με τα συγκεκριμένα προϊόντα μικροβιακού λίπους.

3.3.2 Βιοντήζελ¹³

3.3.2.1 Γενικά

Μια από τις πολλά υποσχόμενες ανανεώσιμη πηγή ενέργειας είναι το βιοντήζελ, το οποίο παράγεται από βιομάζα με μετεστεροποίηση των τριάκυλογλυκερολών, αποδίδοντας μονοαλκυλοεστέρες λιπαρών οξέων εκτεταμένης

ανθρακικής αλυσίδας και αλκοόλες μικρής ανθρακικής αλυσίδας, όπως για παράδειγμα οι μεθυλεστέρες και οι αιθυλεστέρες των λιπαρών οξέων (FAMES και FAEEs αντίστοιχα). Δεν αποδίδει διοξείδιο του θείου στην ατμόσφαιρα και εκπέμπει ελάχιστους αέριους ρύπους από ότι το κανονικό ντήζελ. Ένας αρνητικός παράγοντας κατά την παραγωγή βιοντήζελ είναι το υψηλό κόστος των φυτικών και των ζωικών ελαίων τα οποία χρησιμεύουν για την παραγωγή του. Εναλλακτική πηγή για τη μείωση του κόστους κατά την παραγωγή βιοντήζελ μπορούν να αποτελέσουν οι ελαιογόνοι μικροοργανισμοί.

3.3.2.2 Ελαιογόνοι μικροοργανισμοί και παραγωγή βιοντήζελ

Αν και υπάρχει μεγάλη ποικιλία μικροοργανισμών, οι οποίοι αποθηκεύουν λίπος, όπως τα μικροφύκη, οι βάκιλλοι, οι μύκητες και οι ζύμες, δεν είναι όλοι κατάλληλοι για την παραγωγή βιοντήζελ. Έχει βρεθεί ότι αρκετοί μικροοργανισμοί συσσωρεύουν σημαντικές ποσότητες λιπιδίων, παρόμοιων με τα φυτικά έλαια, τους μεθυλο-εστέρες και τους σάπωνες.

Τα μικροφύκη είναι φωτοκαθοδηγούμενα κυτταρικά εργοστάσια τα οποία μετατρέπουν το διοξείδιο του άνθρακα σε βιοκαύσιμα, όπως το βιομεθάνιο, το βιοντήζελ και το βιοϋδρογόνο. Έρευνες έχουν δείξει ότι το μεγαλύτερο ποσοστό βιομάζας των μικροφυκών είναι πλούσια πηγή ω-3 και ω-6 λιπαρών οξέων και απαραίτητων αμινοξέων όπως η λευκίνη, η ισολευκίνη, η βαλίνη κ.α. Σχεδόν σε όλους τους μικροοργανισμούς το αποθηκευμένο λίπος αποτελείται κυρίως από τριγλυκερίδια (>80%). Τα μικροφύκη αναπτύσσονται ταχύτατα και πολλά από αυτά είναι υπερβολικά πλούσια σε μικροβιακό λίπος, διπλασιάζοντας τη βιομάζα τους εντός 24 ωρών. Μέχρι στιγμής, η αγορά βιομάζας μικροφυκών παράγει περίπου 5000 τόνους ξηρής μάζας το χρόνο δημιουργώντας ετήσιο όγκο συναλλαγών της τάξης των 1.25 δισεκατομμυρίων δολλαρίων. Τα μικροφύκη έχουν θεωρηθεί ως αρκετά ισχυροί υποψήφιοι για την παραγωγή βιοντήζελ, λόγω της υψηλής φωτοσυνθετικής δραστηριότητας, της υψηλής παραγωγής βιομάζας και της ταχύτατης ανάπτυξης.

Παρά τα ισχυρά πλεονεκτήματα των μικροφυκών, σημαντικά μειονεκτήματα αποτελούν οι μεγάλες επιφάνειες για την καλλιέργειά τους και η μακρύτερη περίοδος ζύμωσης σε σχέση με τα βακτήρια. Τα βακτήρια έχουν πανίσχυρα ατού στην παραγωγή βιοντήζελ με υψηλότερη ταχύτητα βιομάζας (απόκτηση τεράστιου ποσοστού βιομάζας σε 12-24 ώρες) και απλές μεθόδους καλλιέργειας. Πιο συγκεκριμένα, βακτήρια της

ομάδας των ακτινομυκινών μπορούν να χρησιμοποιηθούν καθώς συνθέτουν πολύ υψηλές ποσότητες λιπαρών οξέων (πάνω από το 70% του κυτταρικού ξηρού βάρους) από απλές πηγές άνθρακα όπως η γλυκόζη. Παρ'όλα αυτά, τα περισσότερα βακτήρια δεν έχουν ελαιογόνα δράση, ενώ μικρός αριθμός βακτηρίων συσσωρεύει περίπλοκα λιποειδή. Η διαδικασία της απομόνωσης αποτελεί επίσης έναν αρνητικό παράγοντα, καθιστώντας την παραγωγή βιοντήζελ από βακτήρια άνευ βιομηχανικής σημασίας.

Προχωρώντας στους μύκητες και στις ζύμες, ενδιαφέρον παρουσιάζουν κάποια στελέχη μυκήτων, όπως το *Rhodospiridium sp.*, το *Rhodotorula sp.* και το *Lipomyces sp.*, τα οποία αποθηκεύουν ενδοκυτταρικό λίπος μεγαλύτερο από το 70% της ξηρής τους βιομάζας.

Η πιο αποτελεσματική ελαιογόνα ζύμη, *Cryptococcus curvatus*, μπορεί να αποθηκεύσει λιπίδια σε ποσοστό μεγαλύτερο του 60% της ξηρής της βιομάζας. Τα λιπίδια αυτά συνήθως αποτελούνται από 90% μικροβιακή τριακυλογλυκερόλη, η οποία αποτελείται από κορεσμένα λιπαρά οξέα σε ποσοστό περίπου 44%, κάτι το οποίο είναι παρόμοιο με αρκετά φυτικά έλαια.

Ένας νηματοειδής μύκητας, το στέλεχος YN-15 του μικροοργανισμού *Mortierella alliacea*, αποθήκευσε αραχιδονικό οξύ (ω -6 λιπαρό οξύ) κυρίως με τη μορφή τριγλυκεριδίου. Πιο συγκεκριμένα, από την παραπάνω καλλιέργεια, περιόδου 7 ημερών, προέκυψαν 46.1 g/L ξηρού κυτταρικού βάρους, 19.5 g/L ολικών λιπαρών οξέων και 7.1 g/L αραχιδονικού οξέος. Με βάση αυτά τα δεδομένα, οι ελαιογόνες ζύμες και οι μύκητες είναι πιθανές εναλλακτικές πηγές ελαίων για την παραγωγή βιοντήζελ.

Για να εκτιμηθεί η πιθανότητα χρήσης του βιοντήζελ ως υποκατάστατο του ντήζελ πρέπει να προσδιοριστούν κάποιες βασικές του ιδιότητες. Στις ιδιότητες αυτές περιλαμβάνονται η πυκνότητα, το ιξώδες, το σημείο ανάφλεξης, το σημείο στερεοποίησης και η θερμογόνος αξία. Ένα πολύ σημαντικό κριτήριο για το βιοντήζελ είναι η δεσμευμένη γλυκερόλη, η οποία δείχνει το ποσοστό τριγλυκεριδίων και μερικής εστεροποιημένων γλυκεριδίων στο βιοντήζελ. Τα έλαια που παράγονται από μικροοργανισμούς διαφέρουν αρκετά από τα φυτικά έλαια καθώς είναι πλούσια σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα. Η αποδοχή βιοντήζελ από μικροοργανισμούς πρέπει να πληροί κριτήρια όπως ο βαθμός ολικής ακορεστότητας του ελαίου, ο οποίος υποδεικνύεται από την τιμή του καταναλωθέντος ιωδίου. Τα πρότυπα EN 14214 και 14213 έχουν ορίσει την τιμή του ιωδίου στα 120 και 130 g/100 g βιοντήζελ αντίστοιχα.

4. ΑΜΥΛΟΥΧΑ ΑΠΟΒΛΗΤΑ

4.1 Οι υδατάνθρακες ως ανανεώσιμες πηγές άνθρακα

Φθινοί υδατάνθρακες όπως η ζάχαρη, το άμυλο και τα υδρολυμένα τους παράγωγα χρησιμοποιούνται σχεδόν σε όλο τον κόσμο ως ανανεώσιμες πηγές άνθρακα σε μεγάλου εύρους διεργασίες ζύμωσης. Η παγκόσμια συνολική χρήση υδατανθράκων, από φυσικές πρώτες ύλες τροφοδοσίας, για βιομηχανικές διεργασίες ζύμωσης εκτιμάται ότι αγγίζει τους 4×10^7 τόνους ετησίως.

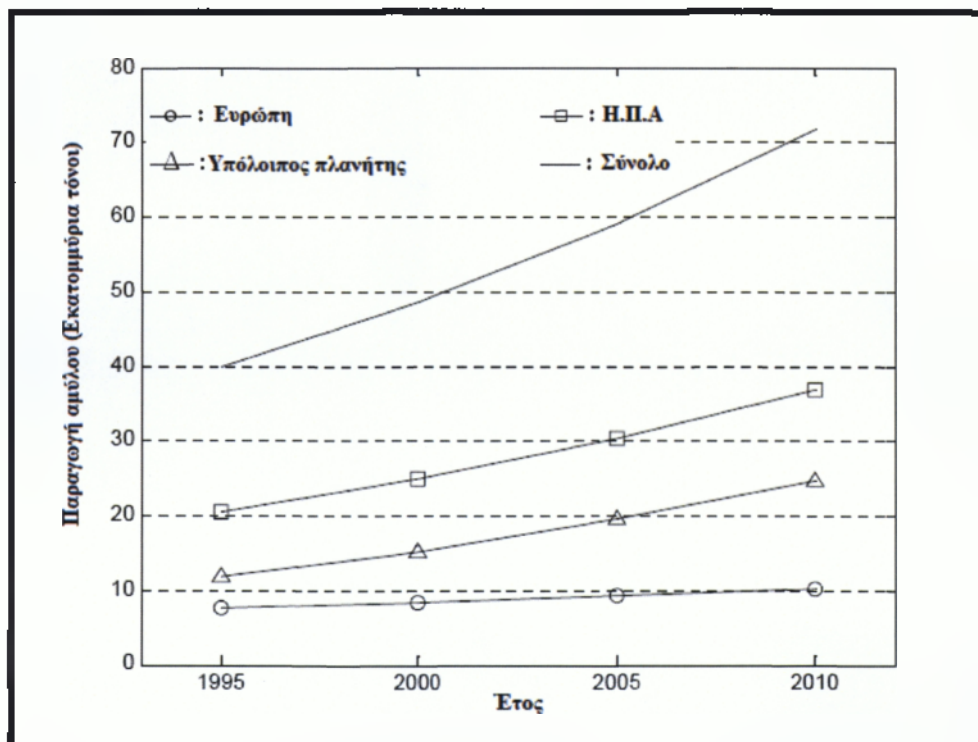
Το άμυλο γενικώς δε μπορεί να χρησιμοποιηθεί αυτούσιο σε εφαρμογές ζύμωσης, καθώς υφίσταται ζελατινοποίηση κατά τη διάρκεια της αποστείρωσης του υπό ζύμωση μίγματος, γεγονός το οποίο οδηγεί σε μεγάλη αύξηση του ιξώδους. Είναι απαραίτητη η προκατεργασία του αμύλου με την α-αμυλάση ώστε να μειωθεί το ιξώδες. Το επεξεργασμένο άμυλο μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως πηγή άνθρακα, από τη στιγμή που οι μικροοργανισμοί παράγουν τις απαραίτητες γλυκοαμυλάσες όπως οι βάκιλλοι και οι μύκητες. Οι μαλτοδεξτρίνες που προκύπτουν από την ενζυματική ή την όξινη υδρόλυση του αμύλου μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την παραγωγή αντιβιοτικών όπως η πενικιλίνη, η κεφαλοσπορίνη και η στρεπτομυκίνη.

Από τη δράση των αμυλασών στα αμυλούχα υποστρώματα είναι δυνατό να παραχθούν και παχύρρευστα διαλύματα γλυκόζης μέσω μιας διαδικασίας που καλείται σακχαροποίηση. Τα σιρόπια αυτά (85-90% γλυκόζη), γνωστά και ως αμυλούχα υδρολύματα, είναι αυτά που χρησιμοποιούνται συχνότερα σε εφαρμογές ζύμωσης όπως π.χ η παραγωγή κίτρικου οξέος, γλυκονικού οξέος, ιτακονικού οξέος, L-αμινοξέων (μονονάτριο-γλουταμινικό, L-λυσίνη, L-θρεονίνη), ξανθίνη, θρομβίνη, σκληρογλυκάνη, ερυθριτόλη και διάφορα αντιβιοτικά. Για την παραγωγή γαλακτικού οξέος και διαφόρων άλλων χημικών ενώσεων προτιμάται συνήθως η καθαρή γλυκόζη (δεξτρόζη) για τη διευκόλυνση της παραγωγής.

Παχύρρευστα διαλύματα μαλτόζης, τα οποία αποκτώνται από τη δράση των β-αμυλασών σε υποστρώματα αμύλου, είναι κατάλληλα για ζυμώσεις, στις οποίες είναι ενεργή η κατασταλτική δράση της γλυκόζης, όπως συμβαίνει σε διάφορες αντιβιοτικές ζυμώσεις.

4.2 Άμυλο

Το 75% της οργανικής ύλης στον πλανήτη συναντάται με τη μορφή των πολυσακχαριτών.¹⁴ Από τους πιο σημαντικούς πολυσακχαρίτες είναι το άμυλο. Τα φυτά συνθέτουν και αποθηκεύουν το άμυλο στους ιστούς ώστε να καλύψουν τις ενεργειακές τους ανάγκες. Το άμυλο γενικώς εναποτίθεται με τη μορφή μικρών κόκκων διαμέτρου 1-100 μm.¹⁵ Το άμυλο βρίσκεται στους σπόρους (π.χ καλαμπόκι, σιτάρι, ρύζι, σόργο ή κριθάρι) και στους βολβούς ή τις ρίζες (π.χ πατάτας) των φυτών.¹⁵⁻¹⁶ Το μεγαλύτερο ποσοστό αμύλου που παράγεται διεθνώς προέρχεται από το καλαμπόκι, αλλά και άλλοι τύποι αμύλου όπως της γλυκοπατάτας, της πατάτας και του σιταριού παράγονται επίσης σε μεγάλες ποσότητες.^{15,17-18} Η πατάτα δεσμεύει περίπου 75% άμυλο (σε ξηρό βάρος) με μια απόδοση 21 τόνων αμύλου για κάθε εκτάριο καλλιέργειας, ενώ οι σπόροι καλαμποκιού αποτελούνται από 65-80% άμυλο με μια μέση απόδοση 4.9 τόνων για κάθε εκτάριο.¹⁹

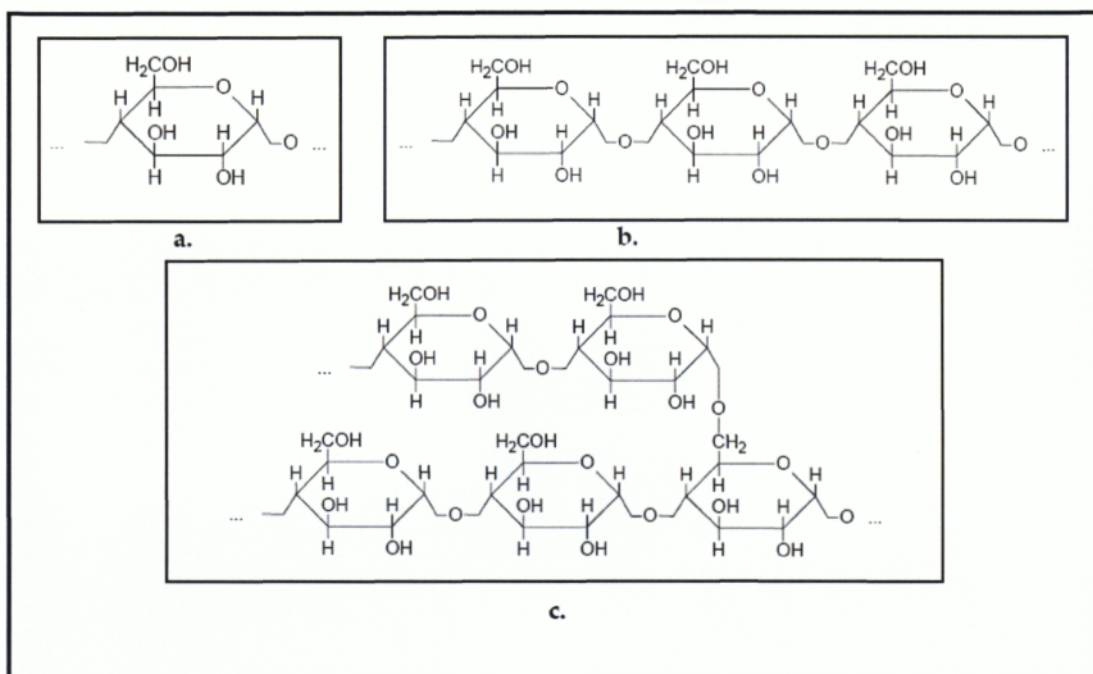


Σχήμα 10.²⁰ Διεθνής παραγωγή αμύλου τα 15 τελευταία χρόνια.

Η παγκόσμια παραγωγή αμύλου το 2008 ήταν περίπου 66 εκατομμύρια τόνοι.²⁰ Το μεγαλύτερο ποσοστό αμύλου παρήχθη στις Η.Π.Α. Ακολουθούν η Ευρώπη με την Ασία.¹⁷⁻¹⁸ Στο σχήμα 10 φαίνεται η παγκόσμια παραγωγή αμύλου τα 15 τελευταία χρόνια.

4.2.1 Δομή και ιδιότητες αμύλου

Το άμυλο είναι ένα πολυμερές που αποτελείται από μονομερή γλυκόζης ενωμένα με γλυκοζιτικούς δεσμούς μέσω αντίδρασης αφυδάτωσης (Σχήμα 11). Δύο τύποι πολυμερών γλυκόζης συναντώνται συνήθως στο άμυλο: η αμυλόζη και η αμυλοπηκτίνη. Η αμυλόζη είναι ουσιαστικά ένα γραμμικό πολυμερές στο οποίο οι μονάδες της γλυκόζης συνδέονται με α -D-(1,4)-γλυκοζιτικούς δεσμούς. Το μοριακό βάρος της αμυλόζης εξαρτάται από την φυτική πηγή και από τη μέθοδο κατεργασίας. Συνήθως όμως κυμαίνεται στην περιοχή $1.6-7 \times 10^5$ Dalton.



Σχήμα 11. Μοριακή δομή του αμύλου, a) Μονάδα άνυδρης γλυκόζης, b) Αμυλόζη, c) Αμυλοπηκτίνη

Η αμυλοπηκτίνη είναι ένα διακλαδισμένο πολυμερές, το οποίο περιέχει περιοδικά διακλαδώσεις οι οποίες συνδέονται με το γραμμικό σκελετό του πολυμερούς μέσω α -D-(1,6)-γλυκοζιτικών δεσμών. Κάθε διακλάδωση περιέχει περίπου 20-30 μονάδες γλυκόζης. Το μοριακό βάρος της αμυλοπηκτίνης είναι μεγαλύτερο από το αντίστοιχο της αμυλόζης ($4-5 \times 10^8$ Dalton). Το περιεχόμενο της αμυλόζης και της αμυλοπηκτίνης στο άμυλο ποικίλλει και εξαρτάται δραματικά από την πηγή από την οποία απομονώνεται. Τυπικά, το περιεχόμενο της αμυλόζης κυμαίνεται από 18 έως 28%.¹⁵ Στον πίνακα 5 δίνονται τα ποσοστά της αμυλόζης από διάφορες πηγές αμύλου.¹⁶

Πίνακας 5.¹⁶ Ποσοστά αμυλόζης από διάφορες πηγές αμύλου

Πηγές αμύλου	Αμυλόζη (%)
Μαράντα	20.5
Καλαμπόκι	28
Βρώμη	27
Μανιόκα	15.7
Πατάτα	20
Ρύζι	18.5
Φοίνικας	25.8
Γλυκοπατάτα	17.8
Ταπιόκα	16.7
Σιτάρι	26

Το άμυλο είναι αδιάλυτο στο κρύο νερό, αλλά είναι πολύ υγροσκοπικό και δεσμεύει νερό με αντιστρεπτό τρόπο. Θερμαίνοντας ένα αμυλούχο διάλυμα έχουμε διάσπαση των δεσμών υδρογόνου στο εσωτερικό του κόκκου του αμύλου και έναρξη της **ζελατινοποίησής** του. Το εναιώρημα του ζελατινοποιημένου αμύλου περιέχει ένα μίγμα από γραμμικά πολυμερή αμυλόζης, διογκωμένους κόκκους αμύλου και κλάσματα κόκκων. Ανάλογα με την ποσότητα του νερού έχουμε και το σχηματισμό κόλλας ή ζελατίνας. Η κλίμακα θερμοκρασιών ζελατινοποίησης μπορεί να οριστεί ως η θερμοκρασία στην οποία ξεκινά η διογκωση των κόκκων του αμύλου μέχρι τη θερμοκρασία στην οποία σχεδόν το 100% των κόκκων έχει ζελατινοποιηθεί. Η κλίμακα θερμοκρασιών ζελατινοποίησης για διάφορους τύπους αμύλου δίνεται στον Πίνακα 6.

Πίνακας 6.²¹ Κλίμακα θερμοκρασιών ζελατινοποίησης για διάφορες πηγές αμύλου

Πηγή αμύλου	Κλίμακα θερμοκρασιών ζελατινοποίησης [° C]
Πατάτα	59-68
Ταπιόκα	58.5-70
Καλαμπόκι	62-72
Σιτάρι	58-64

4.3 Μικροβιακή αφομοίωση αμύλου

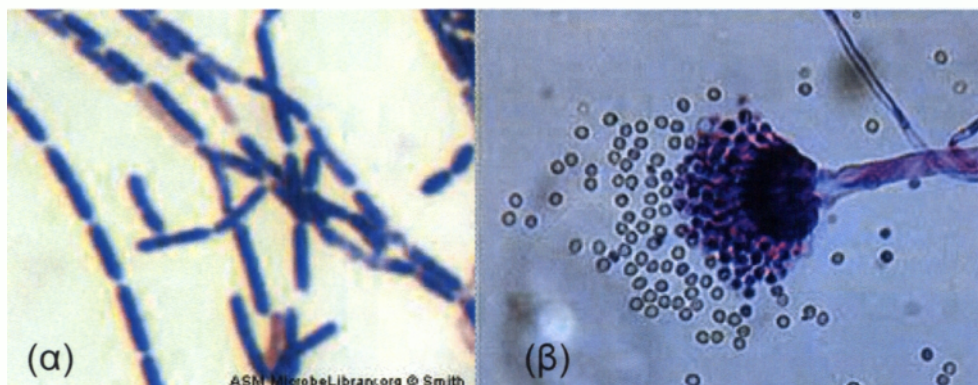
Η μικροβιακή αφομοίωση του αμύλου προϋποθέτει την διάσπασή του προς παραγωγή γλυκόζης, μέσω μιας διεργασίας που λέγεται υδρόλυση. Υπάρχουν

μικροοργανισμοί που διαθέτουν τα κατάλληλα υδρολυτικά ένζυμα (αμυλάσες), ενώ άλλοι όχι. Στη δεύτερη περίπτωση, πριν την χρησιμοποίηση του αμύλου σαν υπόστρωμα για κάποια βιοτεχνολογική εφαρμογή πρέπει να προηγηθεί υδρόλυσή του είτε ενζυμικά είτε φυσικοχημικά.

4.4. Αμυλολυτικά ένζυμα

4.4.1 Εξωδραστικές αμυλάσες

Οι γλυκοαμυλάσες (1,4-α-D-γλυκανες γλυκοϋδρολάσες) καταλύουν την υδρόλυση των α-1,4 και α-1,6 γλυκοζιτικών δεσμών ώστε να απελευθερωθεί β-D-γλυκόζη από το άμυλο. Έχει αναφερθεί σε μεγάλο αριθμό μελετών η παρουσία των ενζύμων αυτών σε ένα μεγάλο αριθμό μικροοργανισμών, όπως τα βακτήρια, οι ζύμες και οι μύκητες. Παρ'όλα αυτά, οι νηματοειδείς μύκητες είναι εκείνοι που αποτελούν την κύρια πηγή ανάμεσα σε όλους τους μικροοργανισμούς και τα στελέχη του γένους *Aspergillus* και *Rhizopus* είναι αυτά που χρησιμοποιούνται κυρίως στη βιομηχανική παραγωγή.²²



Φώτο 1. (α) *Bacillus cereus*, (β) *Aspergillus*

Οι β-αμυλάσες είναι γνωστό ότι παράγονται μόνο από τα φυτά και από κάποια βακτήρια, κυρίως από διάφορα είδη του γένους *Bacillus*, όπως *B. polymyxa*, *B. cereus*, *B. pectinatus* όπως επίσης και από το *Clostridium thermosulfurogenes*. Υδρολύουν τους α-1,4 δεσμούς αλλά δε μπορούν να παρακάμψουν τους α-1,6 γλυκοζιτικούς δεσμούς στην αμυλοπηκτίνη. Παράγουν μαλτόζη από την αμυλόζη και μαλτόζη και β-δεξτρίνη από την αμυλοπηκτίνη.²³

4.4.2 Ενδοδραστικές αμυλάσες

Οι α-αμυλάσες υδρολύουν τους α-1,4 δεσμούς και παρακάμπτουν τους α-1,6 γλυκοζιτικούς δεσμούς στην αμυλοπηκτίνη. Παρά την ευρεία κατανομή των αμυλασών στα μικρόβια, τα ζώα και τα φυτά, στις βιομηχανίες προτιμώνται κυρίως βακτηριακές αμυλάσες και αμυλάσες από μύκητες. Μεταξύ των βακτηρίων, ο *Bacillus sp.*, χρησιμοποιείται ευρέως για τη θερμοανθεκτική παραγωγή α-αμυλάσης ενώ ο μύκητας του γένους *Aspergillus* χρησιμοποιείται συνηθέστερα.

Οι α-αμυλάσες ταξινομούνται σε δύο κατηγορίες ανάλογα με το βαθμό στον οποίο υδρολύουν το άμυλο. Οι υγροποιητικές α-αμυλάσες υδρολύουν το 30-40% του αμύλου ενώ οι σακχαροποιητικές α-αμυλάσες το 50-60%.²⁴



Σχήμα 12. 3D δομή του ενζύμου της α-αμυλάσης

4.4.3 Αμυλάσες πλευρικών κλάδων

Οι ισοαμυλάσες και οι πολλαπλασιάσες (pullulanases) είναι ένζυμα τα οποία υδρολύουν μόνο τους α-1,6 γλυκοζιτικούς δεσμούς. Ανάλογα με την κατηγορία υποστρώματος και το μοτίβο του προϊόντος, οι πολλαπλασιάσες (pullulan α-γλυκανο-υδρολάσες) έχουν ταξινομηθεί σε δύο ομάδες: τύπου I και τύπου II. Καθώς υδρολύουν τους ανθεκτικούς α-1,6 γλυκοζιτικούς δεσμούς στις δεξτρίνες, βελτιώνουν την ταχύτητα και την απόδοση της σακχαροποίησης του αμύλου όταν χρησιμοποιούνται μαζί με τις α-γλυκοζιδάσες. Πολλά μεσόφιλα (*Aerobacter aerogenes*, *B. macerans*, *B. acidopullulyticus* και *Bacillus sp*), θερμόφιλα και υπερθεμόφιλα βακτήρια και αρχαία (*B.*

stearotherophilus, *Clostridium thermosulfurogenes*, *Pyrococcus* και *Thermococcus*) έχει αναφερθεί ότι παράγουν πολλαπλασιαστές.^{25,26}

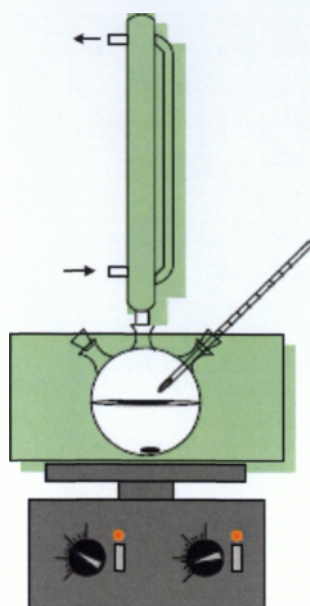
4.4.4 Κυκλοδεξτρινάσες

Οι γλυκοζυλοτρανσφεράσες της κυκλοδεξτρίνης (α-1,4-D-γλυκάνες, α-4-D-(α-1,4-D-γλυκανο)-τρανσφεράσες) παράγουν μια σειρά από μη ανηγμένες κυκλικές δεξτρίνες (α-, β- και γ-κυκλοδεξτρίνες) από το άμυλο, την αμυλόζη και άλλους πολυσακχαρίτες. Οι α-, β- και γ-κυκλοδεξτρίνες περιέχουν έξι, επτά και οκτώ μονάδες γλυκόζης αντίστοιχα, οι οποίες συνδέονται με α-1,4 δεσμούς. Οι περισσότερο γνωστοί μικροοργανισμοί για την παραγωγή αυτών των ενζύμων είναι ο *Thermococcus* sp., ο *B. coagulans*, ο *C. Thermohydrosulfuricum*, ο *B. sphaericus* και ο *Bacillus* sp.²⁷

4.5 Φυσικοχημική Υδρόλυση Αμύλου²⁸

Η φυσικοχημική υδρόλυση του αμύλου περιλαμβάνει την κατεργασία του με υδατικό διάλυμα υδροχλωρικού (HCl) ή θειικού οξέος (H₂SO₄) και τη διατήρηση του μίγματος σε θερμοκρασία ανάμεσα σε αυτή του περιβάλλοντος και της θερμοκρασίας ζελατινοποίησης. Από τη στιγμή που επιτυγχάνεται το επιθυμητό ιξώδες, το οξύ εξουδετερώνεται και το άμυλο ανακτάται με διήθηση. Οι αμυλοδεξτρίνες *Nageli* παράγονται μετά την εμβάπτιση του αμύλου σε διάλυμα θειικού οξέος (συνήθως συγκέντρωσης 1.7 M ή 15%) σε θερμοκρασία δωματίου για συγκεκριμένο χρονικό διάστημα. Κατεργασία του αμύλου με υδατικό διάλυμα HCl 2.2 M σε υψηλότερες θερμοκρασίες (συνήθως γύρω στους 30 με 40 °C) παράγει το άμυλο *Lintner*.

Εκτός από την κατεργασία με οξέα σε υδατικά διαλύματα, η όξινη υδρόλυση του αμύλου μπορεί επίσης να λάβει χώρα και σε άνυδρες αλκοόλες όπως η μεθανόλη, η αιθανόλη, η 2-προπανόλη και η 1-βουτανόλη. Τα είδη βέβαια του τροποποιημένου αμύλου είναι διαφορετικά από αυτά που λαμβάνονται σε υδατικά διαλύματα.²⁹



Σχήμα 13. Εργαστηριακή συσκευή για την υδρόλυση του αμύλου

Η όξινη υδρόλυση του αμύλου προχωρά ανεξέλεγκτα, με διάσπαση και των α -1,4 και των α -1,6 γλυκοζιτικών δεσμών και με συρρίκνωση του μήκους της πολυσακχαριτικής αλυσίδας συναρτήσει του χρόνου. Οι α -1,4 γλυκοζιτικοί δεσμοί και οι άμορφες περιοχές, οι οποίες περιέχουν α -1,6 γλυκοζιτικούς δεσμούς, είναι περισσότερο ευπρόσβλητες στην προσθήκη οξέος και στην υδρόλυση. Η όξινη τροποποίηση του αμύλου περιλαμβάνει δύο στάδια προσβολής των κόκκων. Στο πρώιμο στάδιο, λαμβάνει χώρα μια ταχεία εναρκτήρια προσβολή στις άμορφες περιοχές του αμύλου οι οποίες περιέχουν διακλαδισμένα ολιγομερή τα οποία συνδέονται με α -1,6 γλυκοζιτικούς δεσμούς. Στο στάδιο αυτό παρατηρείται μία αύξηση στο γραμμικό κλάσμα του αμύλου. Κατά τη διάρκεια του δεύτερου σταδίου, λαμβάνει χώρα βραδύτερη υδρόλυση των περισσότερο κρυσταλλικών περιοχών. Παράγοντες οι οποίοι καθορίζουν την όξινη υδρόλυση του αμύλου περιλαμβάνουν τον τύπο του οξέος και τη συγκέντρωσή του, τη θερμοκρασία και το χρόνο, τον τύπο της αλκοόλης και τον τύπο του αμύλου.²⁹

4.6 Πηγές και Διαχείριση Αμυλούχων Αποβλήτων

4.6.1 Βιομηχανία επεξεργασίας κασάβας

Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Τροφίμων, πάνω από 600 εκατομμύρια άνθρωποι εξαρτώνται από την ταπιόκα που προέρχεται από το φυτό

κασάβα (Φώτο 2) στην Αφρική, στην Ασία και στη Λατινική Αμερική.³⁰ Η συνολική παραγωγή ριζών κασάβας υπολογίζεται περί στα 166 εκατομμύρια τόνους και εκτιμάται ότι θα ξεπεράσει τους 266 εκατομμύρια τόνους το 2020 σύμφωνα με τους τωρινούς ρυθμούς παραγωγής. Το μεγαλύτερο μερίδιο στην παραγωγή ριζών κασάβας προέρχεται από τις αναπτυσσόμενες χώρες και από χώρες της Αφρικής.³¹

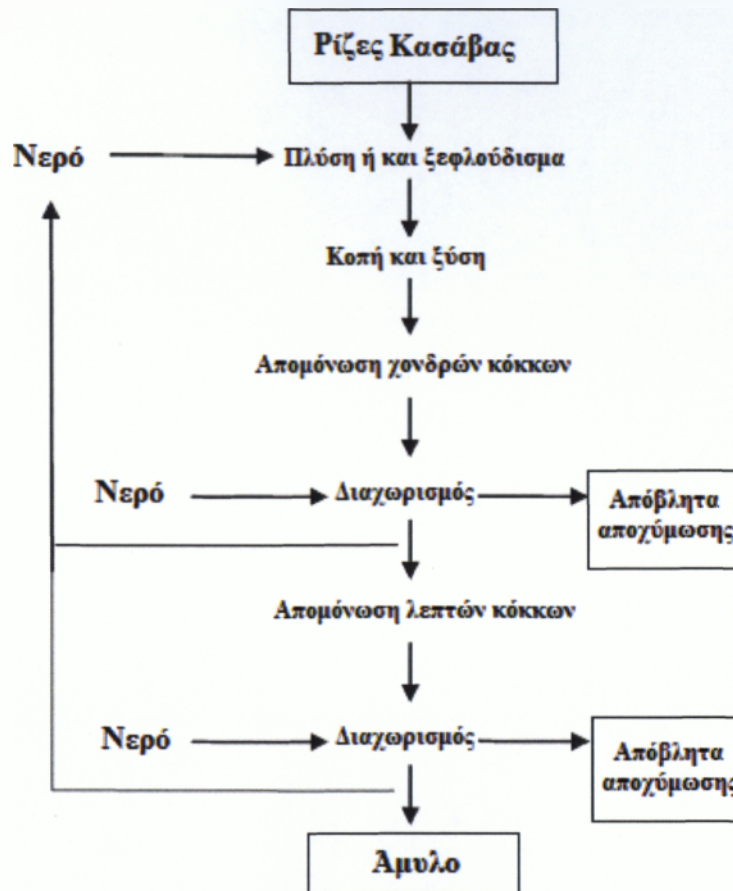


Φώτο 2. Ρίζες κασάβας

Η βιομηχανική επεξεργασία των ριζών κασάβας (ταπιόκα) αποσκοπεί κυρίως στην απομόνωση του άλευρου και του αμύλου (Σχήμα 14). Τα στερεά απόβλητα από αυτή την επεξεργασία περιλαμβάνουν φλούδες, σαρκώδη μέρη, άχρηστες ρίζες, κατάλοιπα αποχύμωσης και αλευρώδη απορρίμματα. Τα κατάλοιπα από την αποχύμωση της κασάβας αποτελούν τα κύρια αμυλούχα απόβλητα (Φώτο 3). Η επεξεργασία 250-300 τόνων φρέσκων ριζών κασάβας οδηγεί στην παραγωγή 280 περίπου τόνων υγρών καταλοίπων αποχύμωσης. Τα κατάλοιπα αυτά της ταπιόκας περιβάλλονται από ινώδες ριζικό υλικό και περιέχουν άμυλο το οποίο δεν μπορεί να απομονωθεί με φυσικές διαδικασίες.

4.6.1.1 Ιδιότητες των αποβλήτων αποχύμωσης της κασάβας

Τα απόβλητα αποχύμωσης της κασάβας προσροφούν σε αρκετά μεγάλο ποσοστό υγρασία (περίπου 75%). Λόγω του χαμηλού τους περιεχομένου σε άζωτο, τα

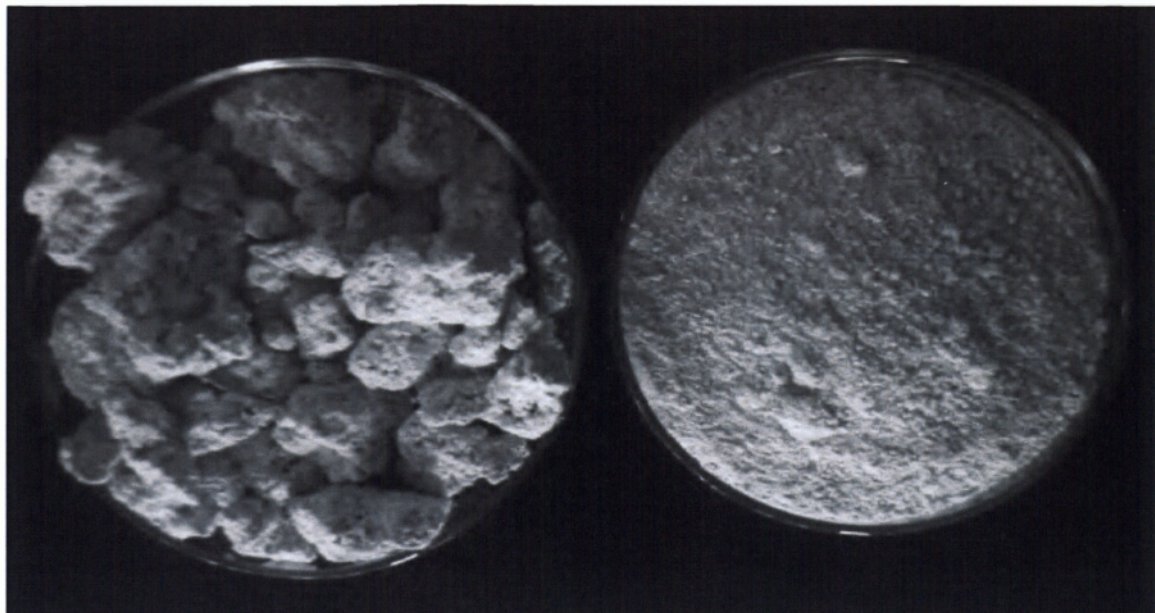


Σχήμα 14. Διαγραμματική αναπαράσταση της απομόνωσης του αμύλου από τις ρίζες του φυτού κασάβα.

απόβλητα αυτά δεν είναι δυνατό να χρησιμοποιηθούν για ζωοτροφές. Το χαμηλό θρεπτικό τους περιεχόμενο τα καθιστά άχρηστα δημιουργώντας σοβαρό πρόβλημα περιβαλλοντικής μόλυνσης. Η εφαρμογή των αποβλήτων αυτών ως θρεπτικό μικροβιακό υπόστρωμα προβάλλει ως μια πολύ καλή εναλλακτική λύση στο πρόβλημα της ρύπανσης που προκαλούν. Στον πίνακα 7 φαίνεται η κύρια φυσικοχημική σύσταση των αποβλήτων από την αποχύμωση της κασάβας με βάση διαφορετικά βιβλιογραφικά δεδομένα.³²

Πίνακας 7.³² Φυσικοχημική σύσταση των αποβλήτων από την αποχύμωση της κασάβας (g/100 g ξηρού βάρους)

Σύσταση	Soccol 1994	Cereda 1994	Sterz 1997	Vandenberghe 1998
Υγρασία	5.02	9.52	10.70	11.20
Πρωτεΐνη	1.57	0.32	1.60	1.61
Λιπίδια	1.06	0.83	0.53	0.54
Ίνες	50.55	14.88	22.20	21.10
Τέφρα	1.10	0.66	1.50	1.44
Υδατάνθρακες	40.50	63.85	63.40	63.00



(α)

(β)

Φώτο 3.³² Απόβλητα από την αποχύμωση της κασάβας: (α) το υπόλειμμα μετά την απομόνωση του αμύλου και (β) η αντίστοιχη σκόνη

Η απομόνωση του αμύλου από τη ρίζα του φυτού κασάβα λαμβάνει χώρα ατελώς, καθώς μεγάλο μέρος του είναι παγιδευμένο στο ινώδες υπόλειμμα. Η μόνη εναλλακτική λύση που θα μπορούσε να μειώσει το ρυπογόνο χαρακτήρα των αποβλήτων πολτοποίησης της κασάβας και να τους δώσει πρόσθετη αξία είναι η ανάκτηση του αμύλου, είτε ως άμυλο αυτό καθ'εαυτό είτε με τη μορφή σακχάρων.

4.6.1.2 Βιοτεχνολογική επεξεργασία των αμυλούχων αποβλήτων από βιομηχανίες επεξεργασίας κασάβας

Τα ινώδη αμυλούχα απόβλητα από τις βιομηχανίες επεξεργασίας της κασάβας είναι δυνατό να αξιοποιηθούν στην παραγωγή αρκετών χρήσιμων προϊόντων με τη χρήση μυκήτων (Πίνακας 8).

Πίνακας 8. Μικροοργανισμοί που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή διαφόρων προϊόντων από τα αμυλούχα απόβλητα αποχύμωσης της κασάβας

Μικροοργανισμός	Προϊόν	Βιβλιογραφική αναφορά
<i>Aspergillus niger</i> LPB 21	Κιτρικό οξύ	Kolicheski et al. (1997)
<i>A. niger</i> NRRL 2001	Κιτρικό οξύ	Vandenberghe et al. (2000)
<i>A. niger</i> CFRTI 30	Κιτρικό οξύ	Shankaranand and Lonsane (1994)
<i>Candida lipolytica</i>	Κιτρικό οξύ	Vandenberghe et al. (1998)
<i>Candida fimbriata</i>	Αρωματικές ενώσεις	Bramorski et al. (1998)
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	Αρωματικές ενώσεις	Medeiros (1998)
<i>Pleurotus sajor-caju</i>	Μανιτάρια	Barbosa et al. (1995)
<i>Rhizopus arrhizus</i>	Φουμαρικό οξύ	Carta et al. (1999)
<i>R. ciricians</i>	Φουμαρικό οξύ	Carta et al. (1999)
<i>R. delemere</i>	Φουμαρικό οξύ	Carta et al. (1999)
<i>R. formosa</i>	Φουμαρικό οξύ	Carta et al. (1999)
<i>R. oligosporus</i>	Φουμαρικό οξύ	Carta et al. (1999)
<i>R. oryzae</i>	Φουμαρικό οξύ	Carta et al. (1999)
<i>R. oryzae</i>	Αρωματικές ενώσεις	Bramorski et al. (1998)
<i>Lactobacillus casei</i>	Γαλακτικό οξύ	Rojan et al. (2005)
<i>L. delbrueckii</i>	Γαλακτικό οξύ	John et al. (2006)
<i>Xanthomonas campestris</i>	Κόμμι ξανθίνης	Woiciechowski et al. 2004

4.6.2 Βιομηχανία επεξεργασίας πατάτας³³

Τα βιομηχανικά απόβλητα από την επεξεργασία της πατάτας περιέχουν υψηλές συγκεντρώσεις βιοαποικοδομήσιμων ουσιών όπως το άμυλο και οι πρωτεΐνες. Επιπρόσθετα, λόγω της υψηλής συγκέντρωσης του απαιτούμενου χημικά οξυγόνου (Chemical Oxygen Demand, COD) και των ολικών αιωρούμενων στερεών σωματιδίων (Total Suspended Solids, TSS), οι πατατοβιομηχανίες αποτελούν σοβαρό πρόβλημα ρύπανσης. Το ποσοστό αποβλήτων από τις συγκεκριμένες βιομηχανίες είναι ιδιαίτερα υψηλό. Το ένα τέταρτο από την εισερχόμενη πρώτη ύλη της πατάτας κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας εξέρχεται με τη μορφή αποβλήτων. Τα αμυλούχα απόβλητα της πατάτας αποτελούν μαζί με τα φλοιώδη απόβλητα τις κύριες μορφές αποβλήτων.

Τα απόβλητα που παράγονται από την αποφλοιώση της πατάτας υπολογίζονται στα 90 kg/τόνο πατάτας και διαμοιράζονται σε 50 kg από φλούδες πατάτας, 30 kg από άμυλο και 10 kg από αδρανείς ουσίες. Ένα άλλο πρόβλημα για τη βιομηχανία επεξεργασίας πατάτας είναι η χρήση μεγάλων ποσοτήτων νερού και συνεπώς η παραγωγή αρκετά υψηλών ποσοστών υγρών αποβλήτων. Για ένα τόνο πατάτας απαιτούνται 4.78 τόνοι νερού. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα καμία μέθοδος, που εφαρμόζεται στις περισσότερες βιομηχανίες για την ανάκτηση του αμύλου, να μην είναι αποτελεσματική από τη στιγμή που τα στερεά απόβλητα εγκαταλείπουν τη βιομηχανία μαζί με τα υγρά απόβλητα.

Ένα ολοκληρωμένο σύστημα διαχείρισης υγρών αποβλήτων πατάτας πρέπει να περιλαμβάνει:

1. Ελαχιστοποίηση του χρησιμοποιούμενου νερού μέσω ανακύκλωσης
2. Διαχωρισμός του αμύλου και των υγρών αποβλήτων και αξιοποίησή τους για την παραγωγή προϊόντων υψηλής πρόσθετης αξίας, όπως η βιοαιθανόλη για την ενέργεια.
3. Οξείδωση των υγρών αποβλήτων, ως προκαταρκτικό βήμα πριν τη βιοτεχνολογική επεξεργασία, με τη χρήση φυσικοχημικών μεθόδων όπως η μέθοδος Fenton.³⁴

4.6.2.1 Παραγωγή αιθανόλης από αμυλούχα απόβλητα πατάτας

Στον πίνακα 9 φαίνεται η χημική σύσταση των αμυλούχων αποβλήτων από την επεξεργασία πατάτας. Παρατηρείται υψηλό ποσοστό αμύλου (52 % ξηρού βάρους) αλλά χαμηλό ποσοστό ζυμώσιμων ανηγμένων σακχάρων (0.6 % ξηρού βάρους). Με βάση αυτά τα δεδομένα συμπεραίνουμε ότι τα αμυλούχα απόβλητα από την

Πίνακας 9. Χημική σύσταση των αμυλούχων αποβλήτων από την επεξεργασία πατάτας

Παράμετροι	% Ξηρού βάρους
Υγρασία	85.06
Άζωτο	1.3
Πρωτεΐνη	8
Ολικά διαλυτά σάκχαρα	1
Ολικοί υδατάνθρακες	58.7
Ανάγοντα σάκχαρα	0.61
Λίπος	2.6
Τέφρα	6.34
Άμυλο	52.14

επεξεργασία της πατάτας δε μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως πρώτη ύλη για την παραγωγή αιθανόλης αλλά απαιτείται ένα αρχικό στάδιο υδρόλυσης (φυσικοχημικής ή ενζυμικής) των σύνθετων υδατανθράκων (αμύλου και κυτταρίνης). Σε δοκιμές που έγιναν για την παραγωγή αιθανόλης από αμυλούχα απόβλητα, η απόδοση αντιστοιχούσε πάνω από το 91% της μέγιστης θεωρητικά απόδοσης.

4.6.2.2 Ζωοτροφές

Η χρήση αμυλούχων αποβλήτων από τη βιομηχανία επεξεργασίας πατάτας για τη διατροφή ζώων είναι ενδεχομένως μη βιώσιμη οικονομικά περίπτωση. Πρώτα απ'όλα, τα εξερχόμενα απόβλητα από τη βιομηχανική εγκατάσταση περιέχουν ιδιαίτερα υψηλό ποσοστό υγρασίας (70-80%) η οποία περιορίζει τη θρεπτική τους αξία ως ζωοτροφή. Η ξήρανσή τους είναι δυνατό να ανεβάσει αρκετά το κόστος και να αυξήσει σημαντικά τα μεταφορικά κόστη. Δεύτερος λόγος είναι η ποσότητα πρωτεΐνης (8%) του ξηρού υλικού, η οποία θεωρείται χαμηλή για τη διατροφή ζώων και ιδιαίτερα των μηρυκαστικών. Παρόλα αυτά, το συγκεκριμένο ποσοστό μπορεί να αυξηθεί με τη χρήση κατάλληλων μικροβιακών μεθόδων ζύμωσης. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η χρήση εδώδιμων μυκήτων (*Lentinula edodes*, *Pleurotus ostreatus*), οι οποίοι διαθέτουν πανίσχυρα λιγνοκυτταρινικά ένζυμα.³⁵

4.6.2.3 Αναερόβια ζύμωση

Η αναερόβια ζύμωση των στερεών αποβλήτων από την επεξεργασία της πατάτας μπορεί να γίνει από κοινού με τα υγρά αμυλούχα απόβλητα για την παραγωγή βιοαερίου. Η μέθοδος αυτή παρουσιάζει σημαντικά πλεονεκτήματα όπως το χαμηλό κόστος, η απλότητα και το ότι μπορεί να διεξαχθεί στην ίδια περιοχή που παράγονται τα απόβλητα *in situ*. Έχει αποδειχθεί ότι για κάθε τόνο αμυλούχων αποβλήτων παράγονται 250 m³ μεθανίου. Η απαιτούμενη ημερήσια ποσότητα αμυλούχων αποβλήτων είναι 5 τόνοι ώστε η συγκεκριμένη μέθοδος να μπορεί να εφαρμοστεί.

4.6.2.4 Μικροβιακή παραγωγή προϊόντων υψηλής πρόσθετης αξίας

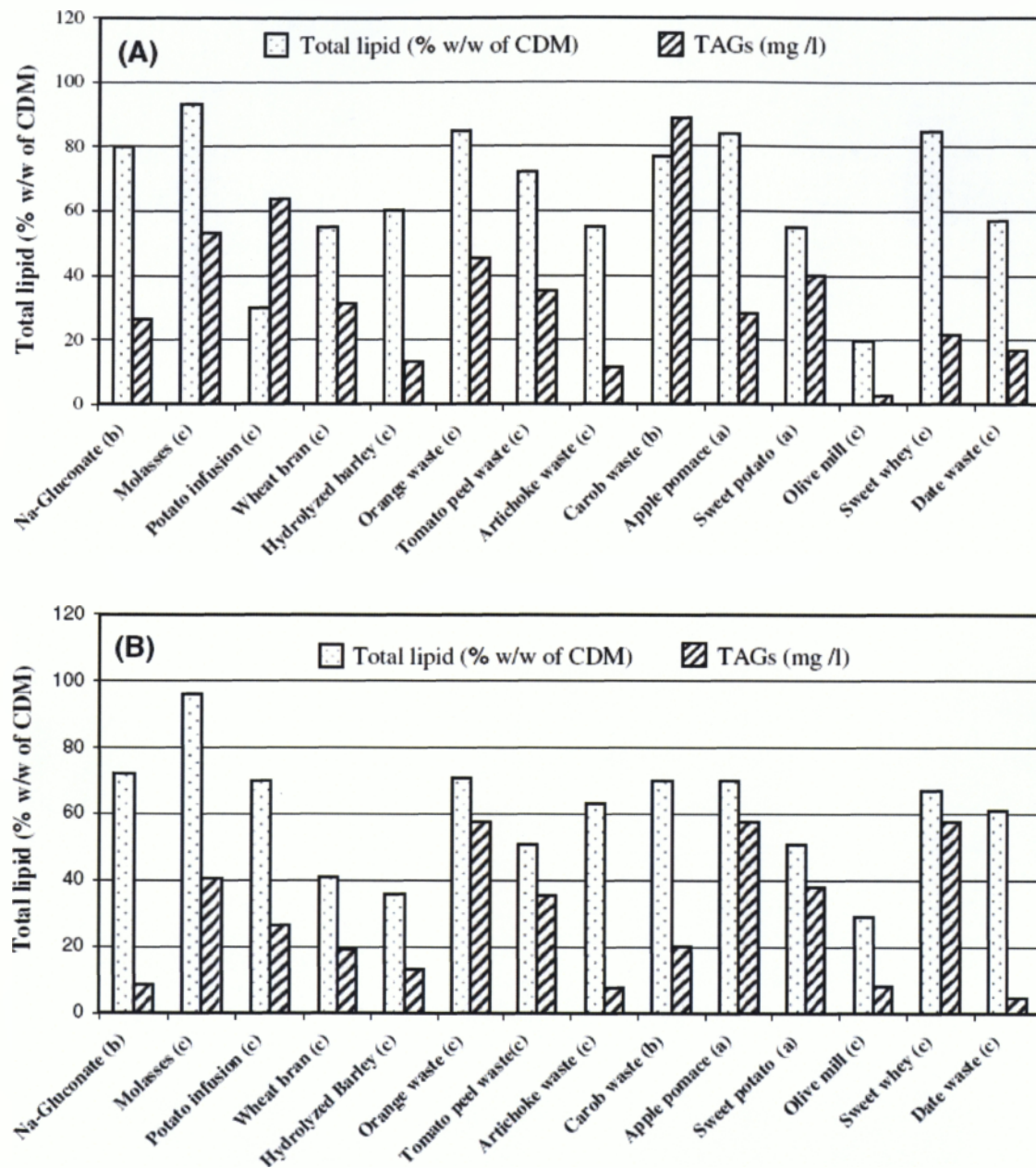
Έχει δειχθεί ότι τα αμυλούχα απόβλητα αποτελούν συμφέρουσα πρώτη ύλη για βιομηχανικές ζυμώσεις, συγκριτικά με τα παραδοσιακά θρεπτικά υποστρώματα όπως οι μελάσσες και τα σιρόπια.³⁶ Η παραγωγή εξωκυτταρικών ενζύμων, αμυλασών, πρωτεασών και πολυγαλακτουρονασών από τα αμυλούχα απόβλητα της βιομηχανίας επεξεργασίας πατάτας με τη χρήση του βακτηρίου *Bacillus subtilis*, αφήνει πολλές υποσχέσεις για πιθανές βιομηχανικές εφαρμογές.³⁷

Επιπρόσθετα, από την ενζυματική υδρόλυση των αμυλούχων αποβλήτων είναι δυνατό να παραχθεί ένας πολύ σημαντικός βιομηχανικά πολυσακχαρίτης, η pullulan, σε συνδυασμό με τη ζύμωση των αποβλήτων από το ζυμομύκητα *Aureobasidium pullulans*.³⁸ Επίσης, πρέπει να τονιστεί ότι η απόδοση του υποστρώματος και η καθαρότητα του παραγόμενου πολυσακχαρίτη είναι μακράν η υψηλότερη ανάμεσα στα αγροβιομηχανικά απόβλητα που χρησιμοποιούνται για τον ίδιο σκοπό, κάτι το οποίο αποτελεί σημαντικό παράγοντα αναφορικά με την οικονομική βιωσιμότητα της συγκεκριμένης παραγωγικής διαδικασίας.³⁹

4.6.3. Παραγωγή μικροβιακού λίπους από αγροβιομηχανικά απόβλητα⁴⁰

Σε πρόσφατη μελέτη, διάφορα αγροβιομηχανικά απόβλητα εξετάστηκαν για την καταλληλότητά τους ως πηγές άνθρακα για τη συσσώρευση μικροβιακού λίπους από τους μικροοργανισμούς *Rhizopus oryzae* και *Gordonia sp.* DG. Τα αποτελέσματα, τα οποία φαίνονται στο σχήμα 15, δείχνουν ότι το μεγαλύτερο ποσοστό των εξεταζόμενων αποβλήτων υποστηρίζει σε μεγάλο ποσοστό τη συσσώρευση λίπους (41-96%) από το μύκητα *R. oryzae* PD630. Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι το μέγιστο ποσοστό τριακυλογλυκερών (TAG, 88.9 mg/l), που αποκτήθηκε από το

μικροοργανισμό *R. oracus* PD630, προέκυψε όταν ως πηγή άνθρακα χρησιμοποιήθηκαν απόβλητα χαρουπιών.

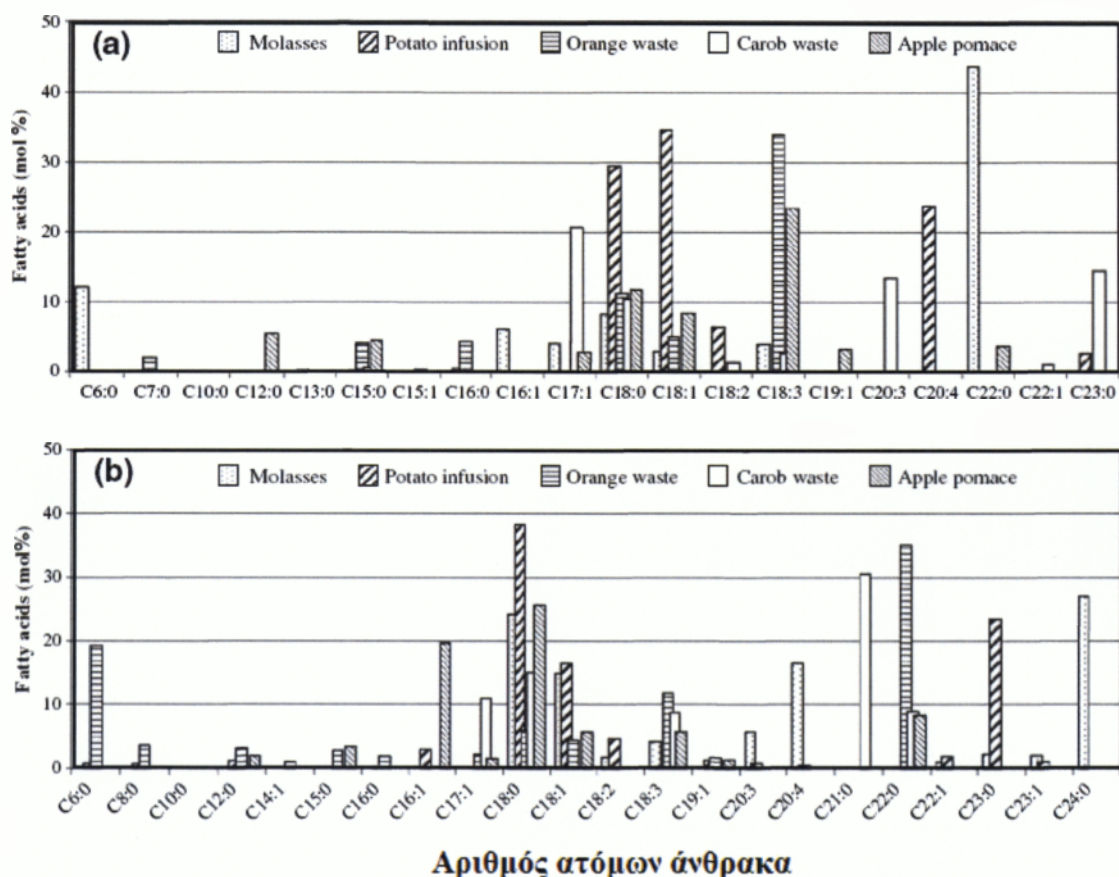


Σχήμα 15. Επίδραση των διαφορετικών αγροβιομηχανικών αποβλήτων στη συσσώρευση λιπιδίων και τριακυλογλυκερολών από (A) το μικροοργανισμό *R. oracus* και (B) το μικροοργανισμό *Gordonia* sp. DG. (a) 24 h, (b) 36 h, (c) 96 h επώασης.

Ο μικροοργανισμός *Gordonia* sp. DG αποθήκευσε πάνω από 50% λιπιδίων με τα περισσότερα από τα εξεταζόμενα απόβλητα. Το μεγαλύτερο ποσοστό

τριάκυλογλυκερολών (57.8 mg/l) παρήχθη με τη χρήση αποβλήτων πορτοκαλιού ως πηγής άνθρακα.

Η σύσταση των λιπαρών οξέων των TAGs αναλύθηκε με τη χρήση αέριας χρωματογραφίας (GC). Σε γενικές γραμμές, τα δεδομένα έδειξαν ότι το μοτίβο των λιπαρών οξέων, από τα οποία συνίστανται οι τριάκυλογλυκερόλες, εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την πηγή άνθρακα και το είδος του μικροοργανισμού. Στο σχήμα 16 αναπαρίσταται το μοτίβο των λιπαρών οξέων που παρήχθησαν από τους δύο μελετώμενους μικροοργανισμούς με τη χρήση αγροβιομηχανικών αποβλήτων.



Σχήμα 16. Σύσταση λιπαρών οξέων των TAGs με τη χρήση διάφορων αγροβιομηχανικών αποβλήτων **(a)** *R. oracus*, **(b)** *Gordonia sp. DG*

Η χρήση αποβλήτων πατατοβιομηχανίας ως θρεπτικό υπόστρωμα στο μικροοργανισμό *R. oracus* ευνόησε την παραγωγή λιπαρών οξέων άρτιας αλυσίδας σε ποσοστό 95 % (C18:0, C18:1 και C20:4). Επιπρόσθετα, τα ακόρεστα λιπαρά οξέα συνιστούν το 64.85% των συνολικά ταυτοποιημένων λιπαρών οξέων. Από την άλλη πλευρά, η χρήση αποβλήτων από χαρούπια οδηγεί στην παραγωγή λιπαρών οξέων περιπτής αλυσίδας, με το C17:1 να αποτελεί τον κύριο εκπρόσωπο (20.7%). Με τη

χρήση αποβλήτων από μήλα ευνοήθηκε η παραγωγή κυρίως των λιπαρών οξέων C18:0, C18:1 και C18:3.

Μελετώντας τα αποτελέσματα από τη χρήση του μικροοργανισμού *Gordonia sp. DG* παρατηρούμε ότι η σύσταση των λιπαρών οξέων αλλάζει από υπόστρωμα σε υπόστρωμα, σε σχέση με το μύκητα *R. oracis*. Πιο συγκεκριμένα, η χρήση αποβλήτων πατατοβιομηχανίας ως θρεπτικού υποστρώματος οδήγησε στην παραγωγή κορεσμένων λιπαρών οξέων (73.24%) με κύρια τα C18:0 και C23:0, τα οποία αναπαριστούν το 61.8% των συνολικά ταυτοποιημένων λιπαρών οξέων. Παρουσία αποβλήτων από χαρούπια ως πηγή άνθρακα, παρατηρήθηκε η παραγωγή λιπαρών οξέων περιττής αλυσίδας, με τα C17:1 και C:21:0 (11.1 και 30.6% αντίστοιχα) να είναι οι κύριοι εκπρόσωποι. Η χρήση αποβλήτων από μήλα είχε ως αποτέλεσμα την ανίχνευση κυρίως των λιπαρών οξέων C16:1 και C18:0.

5. ΓΕΝΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα βιβλιογραφική εργασία μελετήθηκε η αξιοποίηση των αμυλούχων αποβλήτων από τις βιομηχανίες τροφίμων, ως θρεπτικά υποστρώματα για την παραγωγή μικροβιακού λίπους. Τα συμπεράσματα που προέκυψαν μετά το πέρας της συγγραφής αυτής της μελέτης συνοψίζονται ως εξής:

- Η χρήση τεχνικών μικροβιακής τεχνολογίας για την παραγωγή προϊόντων σε βιομηχανική κλίμακα αποτελεί εξαιρετικά ενδιαφέρον επιστημονικό πεδίο καθώς οι μικροοργανισμοί αποτελούν ανεξάντλητες πηγές μιας μεγάλης ποικιλίας ενζύμων ικανών να καταλύουν βιοχημικά τη σύνθεση διαφόρων χρήσιμων ουσιών.
- Η σύνθεση προϊόντων με τη χρήση της μικροβιακής βιοτεχνολογίας παρουσιάζει ιδιαίτερα σημαντικά πλεονεκτήματα όπως η χρήση ανανεώσιμων θρεπτικών υποστρωμάτων, ήπιων συνθηκών και η παραγωγή βιοαποικοδομήσιμων προϊόντων.
- Η μικροβιακή πρωτεΐνη (*single cell protein, SCP*) είναι δυνατό να δώσει λύσεις σε μείζονα προβλήματα, όπως αυτό των ζωοτροφών αλλά και του εμπλουτισμού τροφίμων για τον άνθρωπο με επιπρόσθετη πρωτεΐνη. Ουσίες όπως το άμυλο, ο ορός του γάλακτος και η λιγνοκυτταρίνη είναι δυνατό να αναβαθμιστούν διατροφικά με τη χρήση μικροοργανισμών οι οποίοι χρησιμοποιούν τα υποστρώματα αυτά για την παραγωγή μικροβιακής πρωτεΐνης.
- Η μυκοπρωτεΐνη, το μόνο είδος μικροβιακής πρωτεΐνης που έχει εγκριθεί προς κατανάλωση από τον άνθρωπο, χρησιμοποιείται ήδη σε τρόφιμα και ζωοτροφές ενώ έρευνες σε ζώα έχουν δείξει ότι δεν προκαλεί χρόνια τοξικότητα, δεν έχει αναπαραγωγική τοξικότητα, δεν προκαλεί τερατογένεση και δεν είναι καρκινογόνα.
- Πρωτεύοντες μεταβολίτες, όπως το κιτρικό οξύ και το L-γλουταμινικό, είναι δυνατό να συντεθούν με τη βοήθεια μικροοργανισμών σε βιομηχανική κλίμακα. Τα προϊόντα αυτά ήδη χρησιμοποιούνται σε τρόφιμα και ποτά ως ενισχυτικά γεύσης, συντηρητικά ή ρυθμιστές οξύτητας.
- Οι δευτερεύοντες μεταβολίτες αποτελούν προϊόντα εξειδικευμένης μεταβολικής δραστηριότητας μικροοργανισμών. Κύριοι εκπρόσωποι αυτής της κατηγορίας είναι τα αντιβιοτικά όπως η πενικιλίνη, η στρεπτομυκίνη, τα αμινογλυκοζίδια και οι κεφαλοσπορίνες.

- Η μικροβιακή αποικοδόμηση τοξικών ενώσεων, οι οποίες συσσωρεύονται στο περιβάλλον, αποτελεί σημαντική προσφορά των μικροοργανισμών στην προστασία του περιβάλλοντος από το φαινόμενο της βιοσυσσώρευσης. Χαρακτηριστικά παραδείγματα μόλυνσης λόγω βιοσυσσώρευσης αποτελούν οι πετρελαιοκηλίδες, τα πολυχλωριωμένα παράγωγα και οι ενώσεις ραδιενεργών μετάλλων. Η συνδυασμένη δράση μικροοργανισμών, κυρίως βακτηρίων, οδηγεί στη βιοαποικοδόμηση αυτών των ρυπαντών ή στην ακινητοποίησή τους ώστε να μην επεκταθεί η ρύπανση.
- Για την παραγωγή μικροβιακού λίπους απαιτείται η παρουσία ελαιογόνων μικροοργανισμών (οι οποίοι αποθηκεύουν μικροβιακό λίπος σε ποσοστό >20 % επί της ξηρής βιομάζας) και θρεπτικού υποστρώματος πλούσιου σε πηγή άνθρακα και πτωχού σε άζωτο, ώστε να αποφευχθεί η σύνθεση πρωτεϊνών και νουκλεϊνικών οξέων.
- Κύριοι βιοχημικοί παράγοντες που επηρεάζουν τη βιοσύνθεση των λιπαρών οξέων είναι η δυνατότητα του μικροοργανισμού να παράγει συνεχώς ακετυλοσυνένζυμο Α (Acetyl-CoA) εντός του κυτταροπλάσματος και η ικανότητά του να παρέχει αρκετή ποσότητα NADPH, το οποίο είναι απαραίτητο, λόγω της αναγωγικής του δράσης, για τη σύνθεση των λιπαρών οξέων.
- Το μικροβιακό λίπος παρουσιάζει σπουδαίο ενδιαφέρον αναφορικά με τη χρήση του σε τρόφιμα καθώς περιέχει σε μεγάλο ποσοστό πολυακόρεστα λιπαρά οξέα, τα οποία παρουσιάζουν αξιοσημείωτο διατροφικό και φαρμακευτικό ενδιαφέρον. Παραδείγματα τέτοιων λιπαρών οξέων αποτελούν το γ-λινολενικό οξύ (GLA, C_{18:3}), το εικοσιδυοεξενοϊκό οξύ (DHA, C_{22:6}, ω-3 λιπαρό οξύ) και το αραχιδονικό οξύ (ARA, C_{20:4}, ω-6 λιπαρό οξύ). Το γ-λινολενικό οξύ έχει αναφερθεί ότι παρουσιάζει αντικαρκινική και αντιφλεγμονώδη δράση ενώ το εικοσιδυοεξενοϊκό οξύ και το αραχιδονικό οξύ έχει αποδειχθεί ότι παίζουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη του εγκεφάλου των νεογνών και στη βελτίωση της μνήμης και της όρασής τους
- Σε μελέτες που έγιναν σε ποντίκια, τα οποία κατανάλωσαν προϊόντα που περιείχαν μικροβιακό λίπος (DHASCO®, ARASCO® και συνδυασμούς των δύο), βρέθηκε ότι τα εξεταζόμενα μικροβιακά λίπη δεν είχαν σημαντική τοξικότητα. Επίσης, βρέθηκε ότι η χρήση μικροβιακού λίπους δεν είναι περισσότερο επικίνδυνη από αυτή του ηλιελαίου. Σε έρευνα που έγινε σε ενήλικες άνδρες με τα ίδια προϊόντα σημειώθηκε αύξηση της συγκέντρωσης των λιπιδίων του πλάσματος σε αραχιδονικό και εικοσιδυοεξενοϊκό οξύ.

Καμία άλλη επίδραση δε βρέθηκε κατά την περίοδο των 14 ημερών, στην οποία το δείγμα των ανθρώπων τρεφόταν με τα συγκεκριμένα προϊόντα μικροβιακού λίπους.

- Οι αρνητικές περιβαλλοντικές επιδράσεις των ορυκτών καυσίμων και οι συχνές αναταραχές για το πετρέλαιο έχουν αναδείξει ως πρωταρχικής σημασίας την έρευνα γύρω από τα ανανεώσιμα βιοκαύσιμα. Η κύρια πρόκληση για τον άνθρωπο αυτό τον αιώνα είναι η ανάπτυξη ελαιογόνων μικροοργανισμών, μέσω των οποίων θα επιτευχθεί η παραγωγή αρκετά μεγάλης ποσότητας βιοντήζελ για τη βιομηχανία ώστε να μειωθεί αποτελεσματικά η χρήση του πετρελαίου για την παραγωγή ντήζελ και η χρήση φυτικών ή ζωικών ελαίων για την παραγωγή βιοντήζελ. Η ανάπτυξη μικροοργανισμών που θα συσσωρεύουν σε αρκετά μεγάλο ποσοστό λίπος ή ο σχεδιασμός νέων στελεχών μικροοργανισμών για την παραγωγή βιοντήζελ θα αποτελέσει μια πολλά υποσχόμενη εναλλακτική λύση στο μέλλον για το ενεργειακό ζήτημα.

- Φθινοί υδατάνθρακες όπως η ζάχαρη, το άμυλο και τα υδρολυμένα τους παράγωγα χρησιμοποιούνται σχεδόν σε όλο τον κόσμο ως ανανεώσιμες πηγές άνθρακα σε μεγάλου εύρους διεργασίες ζύμωσης.

- Η μικροβιακή αφομοίωση του αμύλου προϋποθέτει την διάσπασή του προς παραγωγή γλυκόζης, μέσω μιας διεργασίας που λέγεται υδρόλυση. Η υδρόλυση γίνεται είτε ενζυματικά είτε φυσικοχημικά.

- Η ενζυματική υδρόλυση του αμύλου γίνεται με τη βοήθεια αμυλολυτικών ενζύμων όπως οι εξωδραστικές αμυλάσες (γλυκοαμυλάσες και β-αμυλάσες), οι ενδοδραστικές αμυλάσες (υγροποιητικές α-αμυλάσες και σακχαροποιητικές α-αμυλάσες), οι αμυλάσες πλευρικών κλάδων (ισοαμυλάσες και πολλαπλασιάσες) και οι κυκλοδεξτρινάσες (γλυκοζυλοτρανσφεράσες της κυκλοδεξτρίνης).

- Η φυσικοχημική υδρόλυση του αμύλου περιλαμβάνει την κατεργασία του με υδατικό διάλυμα υδροχλωρικού (HCl) ή θεικού οξέος (H₂SO₄) και τη διατήρηση του μίγματος σε θερμοκρασία ανάμεσα σε αυτή του περιβάλλοντος και της θερμοκρασίας ζελατινοποίησης. Παράγοντες οι οποίοι καθορίζουν την όξινη υδρόλυση του αμύλου περιλαμβάνουν τον τύπο του οξέος και τη συγκέντρωσή του, τη θερμοκρασία και το χρόνο, τον τύπο της αλκοόλης και τον τύπο του αμύλου.

- Τα κατάλοιπα από την αποχύμωση της κασάβας αποτελούν κλασική περίπτωση αμυλούχων αποβλήτων. Η επεξεργασία 250-300 τόνων φρέσκων ριζών ταπιόκας οδηγεί στην παραγωγή 280 περίπου τόνων υγρών καταλοίπων αποχύμωσης. Το χαμηλό θρεπτικό τους περιεχόμενο τα καθιστά άχρηστα δημιουργώντας σοβαρό πρόβλημα περιβαλλοντικής μόλυνσης. Η εφαρμογή των αποβλήτων αυτών ως θρεπτικό μικροβιακό υπόστρωμα προβάλλει ως μια πολύ καλή εναλλακτική λύση στο πρόβλημα της ρύπανσης που προκαλούν.
- Τα ινώδη αμυλούχα απόβλητα από τις βιομηχανίες επεξεργασίας της ταπιόκας είναι δυνατό να αξιοποιηθούν στην παραγωγή αρκετών χρήσιμων προϊόντων, όπως το κιτρικό οξύ, το φουμαρικό οξύ, το γαλακτικό οξύ, τα μανιτάρια και αρωματικές ουσίες, με τη χρήση τεχνικών μικροβιακής βιοτεχνολογίας.
- Τα βιομηχανικά απόβλητα από την επεξεργασία της πατάτας περιέχουν υψηλές συγκεντρώσεις βιοαποικοδομήσιμων ουσιών όπως το άμυλο και οι πρωτεΐνες. Το ένα τέταρτο από την εισερχόμενη πρώτη ύλη της πατάτας κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας εξέρχεται με τη μορφή αποβλήτων.
- Σε δοκιμές που έγιναν για την παραγωγή αιθανόλης από αμυλούχα απόβλητα, η απόδοση αντιστοιχούσε πάνω από το 91% της μέγιστης θεωρητικά απόδοσης.
- Η χρήση αμυλούχων αποβλήτων από τη βιομηχανία επεξεργασίας πατάτας για τη διατροφή ζώων είναι μια αρκετά ριψοκίνδυνη περίπτωση, λόγω του υψηλού ποσοστού υγρασίας που περιέχουν (70-80%) και της χαμηλής περιεκτικότητας σε πρωτεΐνη, παράγοντες που τα καθιστούν ιδιαίτερα φτωχά από θρεπτικής άποψης.
- Η αναερόβια ζύμωση των στερεών αποβλήτων από την επεξεργασία της πατάτας μπορεί να γίνει από κοινού με τα υγρά αμυλούχα απόβλητα για την παραγωγή βιοαερίου.
- Η παραγωγή εξωκυτταρικών ενζύμων, αμυλασών, πρωτεασών και πολυγαλακτουρονασών από τα αμυλούχα απόβλητα της βιομηχανίας επεξεργασίας πατάτας με τη χρήση του βακτηρίου *Bacillus subtilis*, αφήνει πολλές υποσχέσεις για πιθανές βιομηχανικές εφαρμογές.
- Από την ενζυματική υδρόλυση των αμυλούχων αποβλήτων είναι δυνατό να παραχθεί ένας πολύ σημαντικός βιομηχανικά πολυσακχαρίτης, η pullulan, σε συνδυασμό με τη

ζύμωση των αποβλήτων από το ζυμομύκητα *Aureobasidium pullulans*. Η απόδοση του υποστρώματος και η καθαρότητα του παραγόμενου πολυσακχαρίτη είναι μακράν η υψηλότερη ανάμεσα στα αγροβιομηχανικά απόβλητα που χρησιμοποιούνται για τον ίδιο σκοπό.

- Σε μελέτες που έγιναν στους μικροοργανισμούς *Rhizopus oracus* και *Gordonia sp* μετά την ανάπτυξη τους σε θρεπτικό υπόστρωμα βασισμένο σε αγροβιομηχανικά απόβλητα ως πηγή άνθρακα, βρέθηκε ότι το μεγαλύτερο ποσοστό των εξεταζόμενων αποβλήτων υποστηρίζει σε μεγάλο ποσοστό τη συσσώρευση λίπους (41-96%) από το μύκητα *R. Oracus* PD630. Το μέγιστο ποσοστό τριακυλογλυκερολών (TAG, 88.9 mg/l), που αποκτήθηκε από το μικροοργανισμό *R. Oracus* PD630, προέκυψε όταν ως πηγή άνθρακα χρησιμοποιήθηκαν απόβλητα χαρουπιών.

- Ο μικροοργανισμός *Gordonia sp.* DG αποθήκευσε πάνω από 50% λιπιδίων με τα περισσότερα από τα εξεταζόμενα απόβλητα. Το μεγαλύτερο ποσοστό τριακυλογλυκερολών (57.8 mg/l) παρήχθη με τη χρήση αποβλήτων πορτοκαλιού ως πηγής άνθρακα.

- Τα αποτελέσματα από αεριοχρωματογραφικές μετρήσεις έδειξαν ότι το μοτίβο των λιπαρών οξέων, από τα οποία συνίστανται οι τριακυλογλυκερόλες, εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την πηγή άνθρακα και το είδος του μικροοργανισμού.

- Η χρήση αποβλήτων πατατοβιομηχανίας ως θρεπτικό υπόστρωμα στο μικροοργανισμό *R. oracus* ευνόησε την παραγωγή λιπαρών οξέων άρτιας αλυσίδας σε ποσοστό 95 % (C18:0, C18:1 και C20:4). Επιπρόσθετα, τα ακόρεστα λιπαρά οξέα συνιστούν το 64.85% των συνολικά ταυτοποιημένων λιπαρών οξέων.

- Η χρήση αποβλήτων από χαρούπια ως θρεπτικό υπόστρωμα για την ανάπτυξη του *R. oracus* οδηγεί στην παραγωγή λιπαρών οξέων περιττής αλυσίδας, με το C17:1 να αποτελεί τον κύριο εκπρόσωπο (20.7%). Με τη χρήση αποβλήτων από μήλα ευνοήθηκε η παραγωγή κυρίως των λιπαρών οξέων C18:0, C18:1 και C18:3.

- Η χρήση αποβλήτων πατατοβιομηχανίας ως θρεπτικού υποστρώματος για την ανάπτυξη του μικροοργανισμού *Gordonia sp.* DG οδήγησε στην παραγωγή κορεσμένων λιπαρών οξέων (73.24%) με κύρια τα C18:0 και C23:0, τα οποία αναπαριστούν το 61.8% των συνολικά ταυτοποιημένων λιπαρών οξέων. Παρουσία αποβλήτων από χαρούπια

ως πηγή άνθρακα, παρατηρήθηκε η παραγωγή λιπαρών οξέων περιττής αλυσίδας, με τα C17:1 και C:21:0 (11.1 και 30.6% αντίστοιχα) να είναι οι κύριοι εκπρόσωποι. Η χρήση αποβλήτων από μήλα είχε ως αποτέλεσμα την ανίχνευση κυρίως των λιπαρών οξέων C16:1 και C18:0.

Κλείνοντας την παρούσα βιβλιογραφική μελέτη μπορούμε να αναφέρουμε ως τελικό συμπέρασμα ότι τα αμυλούχα απόβλητα της βιομηχανίας τροφίμων μπορούν κάλλιστα να χρησιμοποιηθούν ως θρεπτικά υποστρώματα για την ανάπτυξη ελαιογόνων μικροοργανισμών, με απώτερο σκοπό τη βιοσύνθεση μικροβιακού λίπους. Αυτό το γεγονός είναι δυνατό να μειώσει το κόστος παραγωγής μικροβιακού λίπους και παράλληλα να ελαχιστοποιήσει τις τεράστιες ποσότητες αποβλήτων που προέρχονται από τις βιομηχανίες τροφίμων. Επιπρόσθετα, η ποικιλία που εμφανίζεται στο μοτίβο των λιπαρών οξέων ανάλογα με με το είδος του μικροοργανισμού και την πηγή άνθρακα είναι δυνατό να μας δώσει τη δυνατότητα επιλέγοντας την κατάλληλη πηγή άνθρακα (είδος βιομηχανικών αποβλήτων) να παράγουμε λιπίδια με συγκεκριμένες ιδιότητες.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. P. Singh nee' Nigam and A. Pandey, "*Biotechnology for agro-industrial residues utilization*", (2009), ISBN: 978-1-4020-9941-0, Springer Science & Business Media B.V.
2. (α) A.N. Glazer and H. Nikaido, "*Microbial Biotechnology*", Second Edition (2007), Cambridge University Press, ISBN-10: 0-521-84210-7. (β) Senez, J. C., (1987), "*Single-cell Protein: past and present developments.*" In *Microbial Technology in the Developing World*, [E.J. Da Silva, Y.R. Dommergues, E.J. Nyns, C. Ratledge, eds], Oxford University Press, pp 238-259 (γ) Sukara, E. and Doelle, H.W. (1989), "*Optimisation of single-cell protein production from cassava starch (Rhizopus oligosporus)*", *Acta Biotechnol.*, 9, 99-110.
3. Miller, S. A., and Dwyer, J. T. (2001). "*Evaluating the safety and nutritional value of mycoprotein*", *Food Technology*, 55, 42–47.
4. Sonntag K., et al., "*Applied Microbiology and Biotechnology*", (1995), 44, 489–495.
5. Αγγελής Γ., "*Μικροβιολογία και Μικροβιακή Τεχνολογία*", (2007), Εκδόσεις Σταμούλη.
6. Leman J., "*Oleaginous microorganisms: An Assessment of the Potential*", *Advances in Applied Microbiology*, 1997, 43, 195-243.
7. Ratledge C., Wynn J.P.. "*Microbial production of oils and fats*". *Food Biotechnology*, (2006), Second Edition. Taylor & Francis, p. 460-481.
8. Ratledge C.. "*Fatty acid biosynthesis in microorganisms being used for Single Cell Oil production*". (2004), *Biochimie*, 86, 807-815.
9. Ratledge C., Wynn J.. "*The biochemistry and molecular biology of lipid accumulation in oleaginous microorganisms*" *Advances in Applied Microbiology*, (2002), 51, 1-51.
10. Ratledge C., "*Yeasts, moulds, algae and bacteria as sources of lipids*". *Technological advances in improved and alternative sources of lipids*", (1994) Kamel B. S., Kakuda Y. (Eds.), Blackie academic and professional, London (UK), pp 235–291.
11. Certik M. and Shimizu S., "*Biosynthesis and Regulation of Microbial Polyunsaturated Fatty Acid Production*". *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 1999, 87, 1-14.
12. Fidler N., Koletzko B. and Sauerwald T.U, "*Single cells oil: Production and Application*", *Zb. Biotehni.ke fak. Univ. v Ljubljani. Kmetijstvo. Zootehnika*, (1999), 37-45.
13. Meng X. Yang J. Xu X. Zhang L. Nie Q. Xian M., "*Biodiesel production from oleaginous microorganisms*", *Renewable Energy*, (2009), 1-5.

14. E.S. Stevens: *Green Plastics, An Introduction to the New Science of Biodegradable Plastics*, Princeton University Press, New Jersey, USA, **2002**.
15. O.B. Wurzburg: Introduction, in *Modified Starches: Properties and Uses* (Ed. O.B. Wurzburg), CRC Press, Inc., Boca Raton, USA, **1986**.
16. A.H. Young: Fractionation of starch, in *Starch: Chemistry and Technology* (Ed. R.L. Whistler, J.N. Bemiller, E.F. Passchall), Academic Press, Inc., London, UK, **1984**.
17. Website of International Starch Institute, Aarhus, Denmark: <http://www.starch.dk/isi/stat/rawmaterial.html>,
18. R.M. de Bragança, P. Fowler: *Industrial markets for starch*, The Biocomposites Centre, University of Wales, Bangor, Gwynedd, UK, **2004**.
19. C. Nawrath, Y. Poirier, C. Somerville: Mini review: Plant polymers for biodegradable plastics: cellulose, starch, and polyhydroxyalkanoates. *Mol. Breed.* **1995**, *1*, 105-122.
20. C.A. Holmes: *Interactive European Network for Industrial Crops and their Applications, Summary Report for the European Union, 2000-2005*, Agricultural and Rural Strategy Group, Central Science Laboratory, Sand Hutton, York, UK, **2005**.
21. R.L. Whistler, J.R. Daniel: Starch, in *Kirk Othmer Encyclopedia of Chemical Technology Volume 22, Fifth Edition* (Ed. A. Seidel), John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, USA, **2005**.
22. Pandey. A., (1995) *Glucoamylase research: An overview. Starch*, *47*, 439–445.
23. Selvakumar P, Ashakumary L, Pandey A., (1998) *Biosynthesis of glucoamylase from Aspergillus niger by solid state fermentation using tea waste as the basis of a solid substrate. Bioresour. Technol.*, *65*, 83–85.
24. Sivaramakrishnan S, Gangadharan D, Nampoothiri KM et al. (2006) *α-amylases from microbial sources – An overview on recent developments. Food Technol. Biotechnol.*, *44* (2), 173–184.
25. Gomes I, Gomes J, Stenier W., (2003) *Highly thermostable amylase and pullulanase of the extreme thermophilic eubacterium Rhodothermus marinus: production and partial characterization. Bioresour. Technol.*, *90*, 207–214.
26. Kunamneni A, Singh S (2006) *Improved high thermal stability of pullulanase from a newly isolated thermophilic Bacillus sp. AN-7. Enzyme Microb. Technol.*, *39*, 1399–1404.
27. Bertoldo. C, Antranikian G., (2002) *Starch-hydrolyzing enzymes from thermophilic archaea and bacteria. Curr. Opin. Chem. Biol.*, *6*, 151–160.

28. Cui S. W., *FOOD CARBOHYDRATES: Chemistry, Physical Properties & Applications*, (2005), CRC Press, Taylor & Francis Group, ISBN 0-8493-1574-3.
29. Ma, W. and Robyt, J.F. *Preparation and characterization of soluble starches having different molecular sizes and composition, by acid hydrolysis in different alcohols*. Carbohydrate Research, (1987), 166, 283–297.
30. Elkholy H, Eltantawy A (2000) *The world of cassava production: An overview*. J. Root Crops, 26,1–5
31. Tonukari NJ (2004) *Cassava and the future of starch*. Electronic J Biotechnol 7, 5–7.
32. Pandey A, Soccol C.R, Nigam P, Soccol V.T, Vandenberghe L.P.S, Mohan R (2000) *Biotechnological potential of agro-industrial residues. II: cassava bagasse*. Bioresour Technol 74, 81–87.
33. D. Arapoglou, A. Vlyssides, Th. Varzakas, K. Haidemenaki, V. Malli, R. Marchant and C. Israilides, *Alternative ways for potato industries waste utilisation*, Proceedings of the 11th International Conference on Environmental Science and Technology, (2009), Chania, Crete, Greece.
34. Vlyssides A.G., Barampouti E.M., Mai S. and Vlyssides A.A., (2008). *Application of Fenton's Reagent on Wastewater from a Wood Processing Industry*. Environmental Engineering Science, 25, 1-5.
35. Han Y.W. and Callihan C.D., (1974). *Cellulose fermentation: effect of substrate pretreatment on microbial growth*, Applied Microbiology, 27, 155-159.
36. Underkofler L.A. and Lockwood L.B., (1976). *Starch production technology*, Applied Science, London, 399.
37. Mahmood A.U., Greenman J. and Scragg A.H., (1998). *Orange and potato peel extracts: Analysis and use as Bacillus substrates for the production of extracellular enzymes in continuous culture*. Enzyme and Microbial Technology, 22, 130-137.
38. Barnett C., Smith A., Scanlon B., and Israilides C., (1999). *Pullulan production by Aureobasidium pullulans growing on hydrolysed potato starch waste*. Carbohydrate Polymers, 38, 203-209.
39. Israilides C.J., Smith A., Scanlon B., and Barnett C., (1999). *Pullulan from agroindustrial wastes*, Biotechnology and Genetic Engineering Reviews, 16, 309-324.

40. Mona K., Gouda Z., Sanaa H., Omar Z., and Linda M. Aouad. (2008), *Single cell oil production by Gordonia sp. DG using agro-industrial wastes*, World J. Microbiol. Biotechnol. 24, 1703–1711.