



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ

Τομέας IV: Σύνθεσης και Ανάπτυξης Βιομηχανικών Διαδικασιών
Εργαστήριο: Βιοτεχνολογίας

Διπλωματική εργασία με θέμα:

**Μελέτη του μύκητα *Fusarium oxysporum* ως προς την
ικανότητα βιοσύνθεσης ενδοκυτταρικού λίπους σε
συνθετικά υποστρώματα και ρευστοποιημένα στελέχη
γλυκού σόργου**

Γιαννάκου Μαρία

Υπεύθυνος Καθηγητής: Τόπακας Ε.

Αθήνα, 2014

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

Ε. ΤΟΠΑΚΑΣ, Λέκτορας Ε.Μ.Π.

Δ. ΚΕΚΟΣ, Καθηγητής Ε.Μ.Π.

Φ. ΚΟΛΙΣΗΣ, Καθηγητής Ε.Μ.Π.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας, της Σχολής Χημικών Μηχανικών, του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου στα πλαίσια της ολοκλήρωσης του κύκλου σπουδών μου στη σχολή.

Σε αυτό το σημείο αισθάνομαι την ανάγκη να ευχαριστήσω όλους τους συντελεστές που συνέβαλαν στην διεκπεραίωση και ολοκλήρωσης της εργασίας. Συγκεκριμένα, τους επιβλέποντες καθηγητές κ. Χριστακόπουλο Παύλο και κ. Τόπακα Ευάγγελο για την καθοδήγηση τους.

Θέλω να απευθύνω θερμές ευχαριστίες στον υποψήφιο διδάκτορα Λεωνίδα Μάτσακα, για την προθυμία του, την ουσιαστική βοήθεια που μου παρείχε, την ενθάρρυνση και το εξαιρετικό κλίμα που δημιούργησε στη μεταξύ μας συνεργασία. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαιτέρως τον υποψήφιο διδάκτορα Θωμά Πάσχο για την καθοδήγησή του, και την υποψήφια διδάκτορα Δανάη Αλαμάνου για τη βοήθεια της, το διάστημα απουσίας του Λεωνίδα Μάτσακα. Τέλος, ευχαριστώ όλους τους διδάκτορες και το προσωπικό του εργαστηρίου Βιοτεχνολογίας για τη φιλική και δημιουργική ατμόσφαιρα που διαμόρφωσαν.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου-που η στήριξη της τα χρόνια των σπουδών μου ήταν καθοριστική- και τους φίλους μου, οι οποίοι, είτε κοντά είτε μακριά, με βοήθησαν σε κάθε στάδιο. Με τη σειρά που σας γνώρισα: Ναταλία, Αλέξη, Αλεξάνδρα, Άννα, Σεμίνα, Βαρβάρα, Ελένη, Εύη, Μάκη, σας ευχαριστώ !

Περιεχόμενα

| | |
|---|----|
| Περίληψη..... | 5 |
| Abstract | 7 |
| I. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ..... | 9 |
| 1. Ανανεώσιμες πηγές ενέργειας και η αναγκαιότητα ύπαρξης και υλοποίησης τους . | 10 |
| 2. Βιοκαύσιμα..... | 12 |
| 2.1 Γενικά..... | 15 |
| 2.2 Μελλοντικά | 18 |
| 3. Βιοντίζελ | 18 |
| 3.1 Ιστορικά στοιχεία | 19 |
| 3.2 Παραγωγή βιοντίζελ και πρώτες ύλες | 20 |
| 3.3 Μεθεστεροποίηση | 24 |
| 3.4 Μετρούμενες ιδιότητες και Πρότυπα –Σύγκριση με το πετροντίζελ..... | 25 |
| 3.5 Νομοθεσία..... | 29 |
| 3.6 Είναι το βιοντίζελ μια πρακτική και βιώσιμη λύση σήμερα? | 29 |
| 4. Ελαία μικροβιακής προέλευσης- Γενικά | 30 |
| 4.1 Ελαιόγονοι μικροοργανισμοί | 32 |
| 4.2 Ο μύκητας <i>Fusarium oxysporum</i> | 34 |
| 4.3 Συνθήκες καλλιέργειας και η επίδραση τους | 36 |
| 4.4 Είδη και τύποι καλλιέργειας | 37 |
| 4.5 Η βιοχημεία πίσω από τη συσσώρευση ενδοκυτταρικού λίπους | 38 |
| 4.6 Λειτουργικότητα των παραγόμενων λιπιδίων | 44 |
| 4.7 Χρήσεις μικροβιακού λίπους | 45 |
| 5 Βιομάζα-γενικά..... | 46 |
| 5.1 Ανανεώσιμα υποστρώματα κατάλληλα για παραγωγή λίπους..... | 49 |
| 5.2 Γλυκό σόργο | 51 |
| 5.3 Liquid Fraction | 53 |
| II. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ..... | 54 |
| 1. ΥΛΙΚΑ | 55 |
| 1.1 Σόργο | 55 |
| 1.2 Liquid Fraction | 55 |
| 1.3 Μικροοργανισμός | 55 |
| 2. ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ | 56 |
| 2.1 Στερεό υπόστρωμα για sland | 56 |

| | | |
|-------|--|-----|
| 2.2 | Υγρό υπόστρωμα προκαλλιέργειας | 56 |
| 2.3 | Υγρό υπόστρωμα καλλιέργειας..... | 57 |
| 3. | ΑΝΑΛΥΣΕΙΣ..... | 58 |
| 3.1 | Δειγματοληψία..... | 58 |
| 3.2 | Προσδιορισμός pH | 58 |
| 3.3 | Προσδιορισμός βιομάζας στις καθαρές πηγές | 58 |
| 3.4 | Προσδιορισμός βιομάζας στο σόργο και στο Liquid Fraction..... | 59 |
| 3.5 | Προσδιορισμός αναγωγικών σακχάρων | 60 |
| 3.6 | Εκχύλιση λιπαρών | 62 |
| 3.7 | Προσδιορισμός Αζώτου Ελεύθερων Αμινομάδων (FAN)..... | 63 |
| 3.8 | Προσδιορισμός Ολικών Πρωτεϊνών (Lowry)..... | 64 |
| 3.9 | Ενζυμική υδρόλυση σόργου..... | 65 |
| III. | ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ..... | 66 |
| 4.1 | Καθαρές Πηγές..... | 68 |
| 4.1.1 | Επίδραση πηγής Άνθρακα..... | 68 |
| 4.1.2 | Συζήτηση αποτελεσμάτων για την επίδραση της πηγής Άνθρακα..... | 76 |
| 4.1.3 | Επίδραση πηγής Αζώτου | 78 |
| 4.1.4 | Συζήτηση αποτελεσμάτων για την επίδραση της πηγής Αζώτου | 90 |
| 4.1.5 | Επίδραση λόγου Άνθρακα/Αζώτου | 93 |
| 4.1.6 | Συζήτηση αποτελεσμάτων για την επίδραση του λόγου Άνθρακα/Αζώτου | 97 |
| 4.2 | Σόργο | 99 |
| 4.2.1 | Επίδραση προσθήκης αζώτου | 100 |
| 4.2.2 | Επίδραση προσθήκης ενζύμων | 107 |
| 4.1.1 | Επίδραση διαφορετικής συγκέντρωσης στερεών..... | 111 |
| 4.2 | Liquid Fraction | 115 |
| IV. | ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ..... | 117 |
| V. | ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΠΙΝΑΚΩΝ, ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ & ΕΙΚΟΝΩΝ | 120 |
| VI. | ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ..... | 124 |

Περίληψη

Το βιοντίζελ αποτελεί μια ελπιδοφόρα ανανεώσιμη πηγή ενέργειας σαν απάντηση της τρέχουσας κατάστασης που χαρακτηρίζεται από αύξηση της ζήτησης της ενέργειας παγκοσμίως, τη μόλυνση του περιβάλλοντος από την συσσώρευση αερίων του θερμοκηπίου και την επικείμενη εξάντληση των ορυκτών καυσίμων. Κατά κύριο λόγο, παράγεται μέσω αλκαλικής μετεστεροποίησης των τριγλυκεριδίων που περιέχονται σε έλαια φυτικής ή ζωικής προέλευσης.

Τα τελευταία χρόνια κερδίζει έδαφος η έρευνα για χρήση λίπους μικροβιακής προέλευσης στην παραγωγή βιοντίζελ αλλά και σε άλλες εφαρμογές. Η συσσώρευση λιπιδίων στους ελαιογόνους μικροοργανισμούς, αποτελεί παράδειγμα δευτερογενούς αναβολικής δραστηριότητας και συμβαίνει σε συνθήκες περιορισμού αζώτου και περίσσεια πηγής άνθρακα. Επίσης, σημαντική παράμετρο αποτελεί και η δυνατότητα χρήσης λιγνινοκυταρινούχας βιομάζας σαν υπόστρωμα για τις ζυμώσεις για παραγωγή μικροβιακών ελαίων, έναντι βρώσιμων καλλιεργειών.

Στην παρούσα μελέτη έγινε η διερεύνηση για την ικανότητα ανάπτυξης και παραγωγής ενδοκυτταρικού λίπους για το μύκητα *Fusarium oxysporum* σε καθαρές πηγές και σε ρευστοποιημένα στελέχη γλυκού σόργου. Όλες οι ζυμώσεις που πραγματοποιήθηκαν ήταν ασυνεχούς τύπου σε ανακινούμενο επωαστήρα

Για την περίπτωση των **καθαρών πηγών**, αρχικά έγινε η προσπάθεια εύρεσης της **βέλτιστης πηγής άνθρακα** ανάμεσα στα σάκχαρα που περιέχονται στο γλυκό σόργο δηλαδή γλυκόζη, φρουκτόζη, σακχαρόζη και μείγμα τους σε αρχική συγκέντρωση 40 g/L και σε λόγο C/N ίσο με 100. Προέκυψε ότι καλύτερη πηγή άνθρακα αποτελεί το μείγμα των τριών σακχάρων με παραγωγή λίπους 3,3 g/L και ποσοστό λιπιδίων επί ξηρής βιομάζας ίσο με 52,93%. Στη συνέχεια έγινε εύρεση της **βέλτιστης πηγής αζώτου**. Χρησιμοποιήθηκαν οργανικές πηγές αζώτου: ουρία, πεπτόνη και yeast extract και ανόργανες: χλωριούχο αμμώνιο (NH_4Cl), θειικό αμμώνιο ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) και όξινο φωσφορικό αμμώνιο ($(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$). Ως πηγή άνθρακα χρησιμοποιήθηκε μίγμα σακχαρόζης, γλυκόζης και φρουκτόζης με αρχική συγκέντρωση 40 g/L σε λόγο C/N ίσο με 100. Την καλύτερη απόδοση από άποψη ποσότητας λίπους έδωσε το yeast extract με παραγωγή λίπους 3,67 g/L και ποσοστό λιπιδίων επί ξηρής βιομάζας ίσο με 49,50%. Τέλος, έγινε έλεγχος για την εύρεση του **βέλτιστου λόγου C/N**, με χρήση του μείγματος των τριών σακχάρων σαν πηγή άνθρακα σε σταθερή συγκέντρωση 40 g/L και το yeast extract σαν πηγή αζώτου. Ο βέλτιστος λόγος C/N για την παραγωγή ενδοκυτταρικού λίπους ήταν ο 50 με μέγιστη παραγωγή λίπους 3,84 g/L και ποσοστό λιπιδίων επί ξηρής βιομάζας ίσο με 37,76%. Βέβαια να σχολιαστεί ότι η απόδοση σε λίπος που αντιστοιχεί στο λόγο 50 είναι πολύ κοντινή με την τιμή 3,67 g/L που είναι η απόδοση για το λόγο 100, γεγονός που υποδηλώνει ότι η διαφορά στο λόγο δεν έχει μεγάλη επίδραση στην παραγωγή λίπους.

Στην περίπτωση χρησιμοποίησης του **γλυκού σόργου** σαν υπόστρωμα, αρχικά έγινε η προσπάθεια διερεύνησης για το εάν μπορεί ο μύκητας να αξιοποιήσει το πρωτεϊνικό άζωτο που περιέχεται στο σόργο ή όχι, πραγματοποιώντας πειράματα **με και χωρίς προσθήκη πηγής αζώτου**, η οποία ήταν το yeast extract καθώς αυτό είχε βγάλει τα καλύτερα ποσοτικά

αποτελέσματα λίπους στις καθαρές πηγές. Προέκυψε ότι η προσθήκη αζώτου, δεν έχει επίδραση στην ποσότητα των παραγόμενων λιπιδίων καθώς και στις δυο περιπτώσεις το λίπος που συσσωρεύτηκε ανέρχεται στα 1,91 g/L. Στα παραπάνω πειράματα η συγκέντρωση των στερεών ήταν 8,69%. Στη συνέχεια για την ίδια συγκέντρωση στερεών, διερευνήθηκε η **επίδραση της προσθήκης ενζύμων** για την υδρόλυση της κυτταρίνης και προέκυψε ότι η ενζύμικη υδρόλυση είναι σημαντική καθώς χωρίς αυτή, η απόδοση σε απόδοση σε ποσότητα λίπους ήταν ιδιαίτερα χαμηλή (0,71 g/L). Τέλος, μελετήθηκε η **επίδραση της αύξησης της συγκέντρωσης των στερεών** στο μέσο της καλλιέργειας και συγκεκριμένα δοκιμάστηκαν οι συγκεντρώσεις 12% και 16%. Προέκυψε ότι με αύξηση της μειώνεται σημαντικά και η ποσότητα των παραγόμενων λιπιδίων.

Τέλος, πραγματοποιήθηκαν δυο πειράματα με χρήση Liquid Fraction (υγρό κλάσμα από την κατεργασία άχυρου σίτου) σαν υπόστρωμα με και χωρίς προσθήκη πηγής αζώτου, η οποία ήταν το yeast extract. Σαν αποτέλεσμα, μικροοργανισμός δεν σημείωσε ικανοποιητική ανάπτυξη και η παραγωγή μικροβιακού λίπους έφτασε τα 0,55 g/L και 0,57 g/L αντίστοιχα για κάθε περίπτωση.

Abstract

Biodiesel is a promising renewable energy source in response to the current situation which includes an increase in the energy demand world-wide, environmental pollution by the accumulation of greenhouse gases and the impending depletion of fossil fuels. Primarily it is produced by alkaline transesterification of triacylglycerols of vegetable or animal origin.

In recent years several researchers have evaluated the production and the use of microbial oil for biodiesel production and other applications. Lipid accumulation in oleaginous microorganisms typically occurs during secondary metabolic growth, in nitrogen-limited conditions and in the presence of high amounts of sugars. An important parameter is also the possibility of the use of lignocellulosic material as substrate for fermentations for microbial oil production, instead of using edible crops.

The aim of the present study was to investigate the ability of the fungus *Fusarium oxysporum* to accumulate intracellular lipid grown on synthetic media and media containing liquefied sweet sorghum stalks. Batch cultivations were carried out at a rotary shaker.

In the case of synthetic media, the use of the sugars contained in sweet sorghum, namely glucose, fructose, sucrose and mixture of them was evaluated in order to find which of them can induce higher lipid production. Initial sugar concentration was adjusted to 40 g/L, while the C/N ratio was 100. The results showed that the best carbon source is the mixture of the three sugars and more specifically concentration of SCO reached 3,3 g/L giving a yield of 52.93%. Subsequently, the effect of the nitrogen source was evaluated. Both organic and inorganic sources were tested. More specifically organic sources of nitrogen were: urea, peptone and yeast extract, and the inorganic were: ammonium chloride (NH_4Cl), ammonium sulphate ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) and diammonium phosphate $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$. The carbon source used was a mixture of sucrose, glucose and fructose at an initial concentration of 40 g/L, while the C/N ratio was 100. The best results in terms of intracellular lipid concentration were obtained when yeast extract was used, as SCO reached 3,67 g/L giving a yield of 49,50% w/w. Finally, the optimal ratio C/N was examined using a mixture of three sugars as carbon source at a concentration of 40 g/L and yeast extract as nitrogen source. The optimum ratio C/N in terms of concentration of intracellular lipid was 50 as SCO reached 3,84 g/L with a yield of 37,76% w/w. This value of SCO production is very close to the SCO production achieved when C/N ratio is 100 (3,67 g/L), suggesting that C/N ratio has not a significant effect on lipid accumulation.

When using media containing liquefied sweet sorghum stalks as a substrate, the ability of fungus to utilize the nitrogen (as protein) contained in sorghum was tested. For this reason, experiments with and without addition of nitrogen source were carried out. The nitrogen source used was yeast extract as it showed best results during the previous series of experiments. The results showed that addition of nitrogen has no effect on the quantity of lipids accumulated, as in both cases SCO production reached 1,91 g/L. The initial concentration of sweet sorghum stalks was 8,69 %. Subsequently, using the same initial concentration of sorghum stalks, the effect of enzymatic hydrolysis of cellulose was examined and results showed that SCO obtained without hydrolysis is very low (0,71 g lipids

/L), implying that hydrolysis before fermentation has a positive effect on lipid accumulation. Finally, the effect of increasing the amount of sorghum stalks in the culture medium was tested, using concentrations of 12% and 16 %. Results showed that the increase of sorghum stalks reduced significantly the amount of lipid accumulated.

Finally, the use of Liquid Fraction (from hydrothermal treatment of wheat straw) was examined as a substrate for oil production with and without addition of yeast extract as nitrogen source. The results showed that the fungus could not effectively consume and grow. The SCO production reached quite low concentrations: 0,55 g/L και 0,57 g/L respectively.

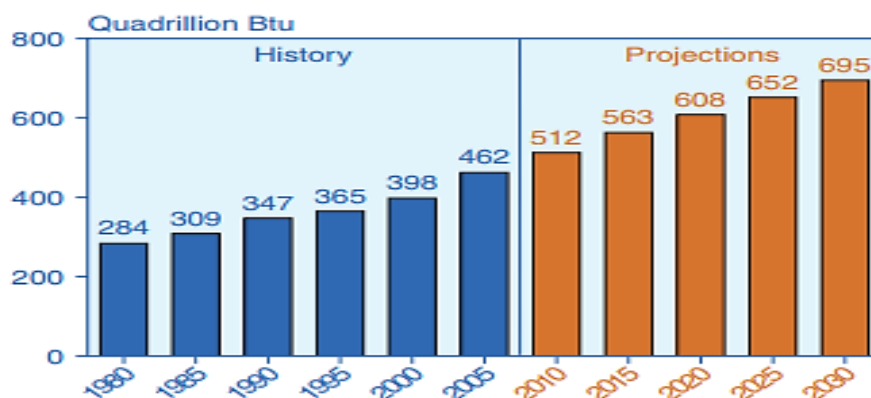
I. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. Ανανεώσιμες πηγές ενέργειας και η αναγκαιότητα ύπαρξης και υλοποίησης τους

Η ενέργεια, από την αρχή της χρήσης της από τον άνθρωπο έγινε η βασική κινητήριος δύναμη της ανθρώπινης ιστορίας. Χωρίς την ενέργεια, η ανθρώπινη διαβίωση και εξέλιξη θα ήταν δραματικά χαμηλότερες. Με την πάροδο των χρόνων και με τη δημιουργία των μεγάλων πόλεων-κέντρων που έμελλε να αποτελέσουν τις εστίες για την μεγάλη τεχνολογική και βιομηχανική ανάπτυξη τους τελευταίους αιώνες, η ζήτηση της όχι μόνο σταθεροποιήθηκε αλλά άρχισε να γίνεται μεγαλύτερη και μάλιστα με αυξανόμενο ρυθμό.

Καθοριστικός παράγοντας στην αύξηση της ζήτησης της είναι και η αύξηση του παγκόσμιου πληθυσμού. Σε χρονικό διάστημα μικρότερο των δυο αιώνων, ο πληθυσμός της γης πενταπλασιάστηκε και, σύμφωνα με εκτιμήσεις, μέχρι το 2050 θα πλησιάζει ακόμη και 9 δισεκατομμύρια. (1)

Επίσης, η αναφερθείσα αύξηση του πληθυσμού σε συνδυασμό με την ολοένα αυξανόμενη ενεργειακή ζήτηση σε επίπεδο χωρών, οδηγούν σε μια σταδιακή ετήσια αυξητική τάση της κατανάλωσης ενέργειας της τάξης περίπου του 1% για τις χώρες που είναι μέλη του Οργανισμού Οικονομικής Συνεργασίας και Ανάπτυξης, ΟΟΣΑ (Ευρώπη, Β. Αμερική) και έως 3,5% για τις αναπτυσσόμενες (Μ. Ανατολή, Κεντρική και Ν. Αμερική, Αφρική). Στο διάγραμμα που ακολουθεί, φαίνεται παραστατικά η αύξηση της ενεργειακής ζήτησης σε παγκόσμιο επίπεδο. (2)



Διάγραμμα 1: Η πορεία της παγκόσμιας ενεργειακής κατανάλωσης από το 1980 φτάνοντας ως το 2030 σύμφωνα με εκτιμήσεις (2)

Ταυτόχρονα όμως με την αύξηση της ενεργειακής ζήτησης, τίθεται η παράμετρος της διασφάλισης της μελλοντικής διαθεσιμότητας των ορυκτών καυσίμων, μιας και σε αυτά βασίζεται κατά κύριο λόγο η παραγωγή ενέργειας παγκοσμίως σε ποσοστό που φτάνει το 80-86%. Οι προβλέψεις ωστόσο για την επάρκεια τους για το μέλλον είναι μάλλον δυσοίωτες. Πιο συγκεκριμένα και με βάση μοντέλα που έχουν εξαχθεί, προβλέπεται ότι το πετρέλαιο θα εξαντληθεί μέσα στα επόμενα 35-50 χρόνια, οι γαιάνθρακες σε 107-164 χρόνια και το φυσικό αέριο σε 37-64 χρόνια. (3), (4)

Επιπλέον, ένα άλλο θέμα που πλέον αναφέρεται και συζητιέται μαζί με την έννοια της ενέργειας είναι το περιβάλλον και οι επιπτώσεις σε αυτό από την ανθρωπογενή

δραστηριότητα που σχετίζεται με την παραγωγή και κατανάλωση της ενέργειας. Ειδικότερα όσον αφορά στο αέριο διοξειδίου του άνθρακα (CO₂), οι εκπομπές του αυξήθηκαν σε ποσοστό 80% τα τελευταία χρόνια ενώ τα ¾ των εκπομπών του οφείλονται σε ανθρωπογενή δραστηριότητα που σχετίζεται με χρήση ορυκτών καυσίμων. Πριν τη βιομηχανική επανάσταση η τιμή της συγκέντρωσης του διοξειδίου του άνθρακα στην ατμόσφαιρα της γης ήταν 280 ppm, το έτος 2008 έφτασε τα 380 ppm και σύμφωνα με προβλέψεις η τιμή της συγκέντρωσης του το 2030 μπορεί να γίνει 450 ppm ενώ μέχρι τα μέσα του 21^{ου} αιώνα δεν αποκλείεται να φτάσει τα 560 ppm. Η προαναφερθείσα αύξηση της συγκέντρωσης του διοξειδίου του άνθρακα εντείνει το φαινόμενο του θερμοκηπίου, το οποίο είναι ως ένα σημείο επιθυμητό για την ζωή στον πλανήτη, ωστόσο η υπέρμετρη ενίσχυση του προκαλεί προβλήματα μεταξύ των οποίων είναι η αύξηση της μέσης θερμοκρασίας του πλανήτη, η αλλαγή του κλίματος, το λιώσιμο των πάγων και η αύξηση της στάθμης της θάλασσας. Η επίδραση της ανθρωπογενούς δραστηριότητα επεκτείνεται και στην απελευθέρωση τοξικών ουσιών όπως χλωροφθοράνθρακες (CFC's) και ρύπων όπως οξειδία του αζώτου (NO_x), οξειδία του θείου (SO_x) και όζον (O₃). (4) , (5)

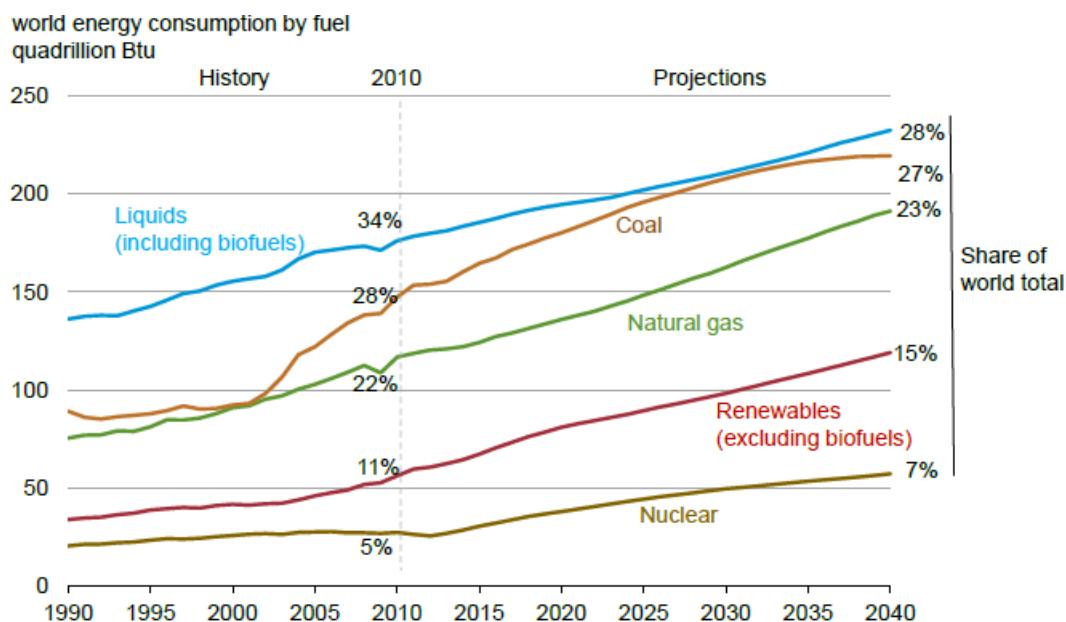
Είναι επομένως φανερό πως για την αντιμετώπιση των παραπάνω ζητημάτων, υπάρχει η ανάγκη στροφής της παγκόσμιας κοινότητας συλλογικά στη δημιουργία και ανάπτυξη νέων ή/και καινοτόμων εφαρμογών για την παραγωγή, διαχείριση, αξιοποίηση και εξοικονόμηση της ενέργειας. Μάλιστα οι εφαρμογές αυτές θα πρέπει να είναι φιλικές προς το περιβάλλον, να εγγυώνται αειφορική και ταυτόχρονα οικονομική ανάπτυξη των χωρών και να συμβαδίζουν με την πρόοδο της τεχνολογίας και της επιστήμης. Έτσι, ο μοναδικός τρόπος για την προσέγγιση αυτού του στόχου είναι η σταδιακή απομάκρυνση και απεξάρτηση από τις συμβατικές μορφές ενέργειας στις ανανεώσιμες.

Σαν συμβατικές μορφές ενέργειας νοούνται οι μη ανανεώσιμες μορφές ενέργειας, οι οποίες προέρχονται από την αποσύνθεση φυτικής ή ζωικής ύλης και που με φυσική επεξεργασία, με φυσική επεξεργασία και με την πάροδο εκατομμυρίων ετών μετασχηματίστηκαν σε πετρέλαιο, φυσικό αέριο ή γαιάνθρακα καθώς και η πυρηνική ενέργεια. (6)

Από την άλλη, ως ανανεώσιμη πηγή ενέργειας (ΑΠΕ, renewable energy source) ονομάζεται εκείνη η μορφή ενέργειας η οποία δεν εξαντλείται στο απώτερο ορατό μέλλον της ανθρωπότητας και μπορεί να χρησιμοποιηθεί με σταθερό και αξιόπιστο τρόπο. Σύμφωνα όμως με τον ορισμό τους από το International Energy Association (IEA), οι ΑΠΕ ταξινομούνται ως εξής: 1) Ηλιακή ενέργεια, 2) Υδροηλεκτρική ενέργεια ή υδροϊσχύς, 3) Αιολική ενέργεια, 4) Καύσιμες ανανεώσιμες πηγές και απορρίμματα (combustible renewables and waste, CRW), βασικά η ζυμώσιμη βιομάζα είναι εκείνη που θα αναπτυχθεί στα πλαίσια αυτής της εργασίας, 5) Γεωθερμία (και οι γεωθερμικές αντλίες θερμότητας), 6) Παλιρροϊκή ενέργεια, 7) Ενέργεια από τα κύματα ενέργειες από τη θάλασσα και 8) Θερμότητα από τους ωκεανούς. (6)

Πάντως, παρά τις δυσκολίες και τους περιορισμούς των ανανεώσιμων πηγών ενέργειας (π.χ. δυσκολία στην αποθήκευσή τους) τα τελευταία χρόνια φαίνεται αυτές να διεκδικούν σταθερά μια σημαντική θέση με το ποσοστό τους στην παγκόσμια ενεργειακή κατανάλωση σε σχέση με τις υπόλοιπες συμβατικές μορφές ενέργειας.

Συγκεκριμένα οι ανανεώσιμες πηγές ενέργειας ακολουθούμενες από την πυρηνική, είναι από τις εκείνες τις μορφές ενέργειας που η πορεία της χρήσης τους ακολουθεί μεγάλη άνοδο με ενθαρρυντικές προβλέψεις για το μέλλον. (7)



Διάγραμμα 2: Η συνεισφορά των διάφορων μορφών ενέργειας στη διαμόρφωση της παγκόσμιας ενεργειακής κατανάλωσης (7)

2. Βιοκαύσιμα

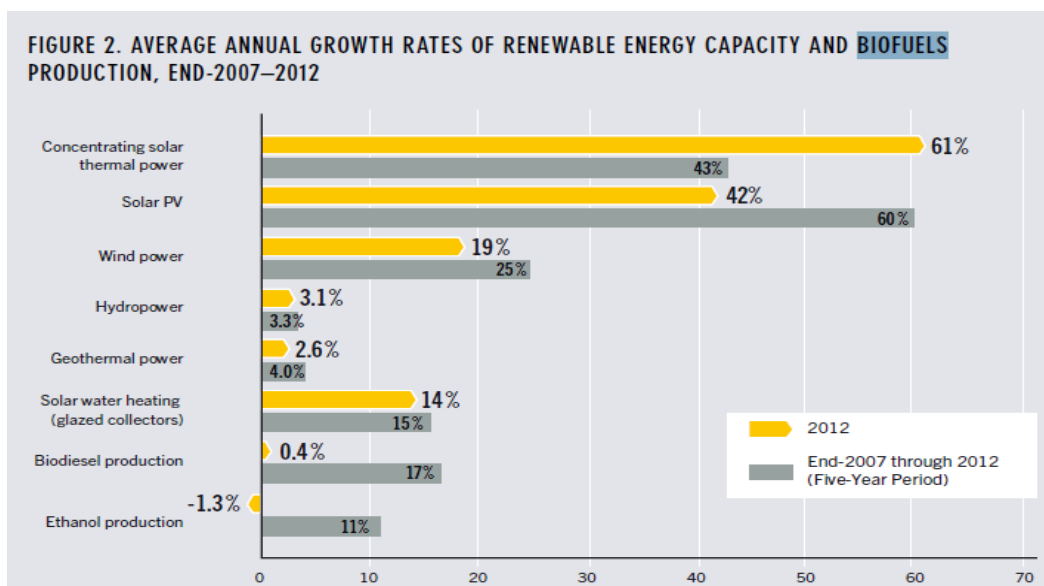
Τα βιοκαύσιμα είναι υγρά ή αέρια καύσιμα κίνησης τα οποία παράγονται από βιομάζα, όπως ορίζει η Οδηγία 2009/28/ΕΚ. Ειδικότερα, όπως ορίζει ο Νόμος 3468/2006, Βιοκαύσιμα θεωρούνται και τα ακόλουθα καύσιμα:

- Βιοντίζελ (πετρέλαιο βιολογικής προέλευσης) είναι οι μεθυλεστέρες λιπαρών οξέων (ΜΛΟ – FAME) που παράγονται από φυτικά ή ζωικά έλαια και λίπη και είναι ποιότητας πετρελαίου ντίζελ, για χρήση ως βιοκαύσιμο. Το βιοκαύσιμο αυτό θα μελετηθεί περαιτέρω στη συνέχεια της παρούσης εργασίας.
- Βιοαιθανόλη είναι η αιθανόλη που παράγεται από βιομάζα ή από βιοαποικοδομήσιμο κλάσμα αποβλήτων, για χρήση ως Βιοκαύσιμο.
- Βιοαέριο είναι το καύσιμο αέριο που παράγεται από Βιομάζα ή βιοαποικοδομήσιμο κλάσμα βιομηχανικών και αστικών αποβλήτων, το οποίο μπορεί να καθαριστεί και να αναβαθμιστεί σε ποιότητα φυσικού αερίου, για χρήση ως Βιοκαύσιμο, ή το ξυλαέριο.
- Βιομεθανόλη είναι η μεθανόλη που παράγεται από Βιομάζα, για χρήση ως Βιοκαύσιμο.

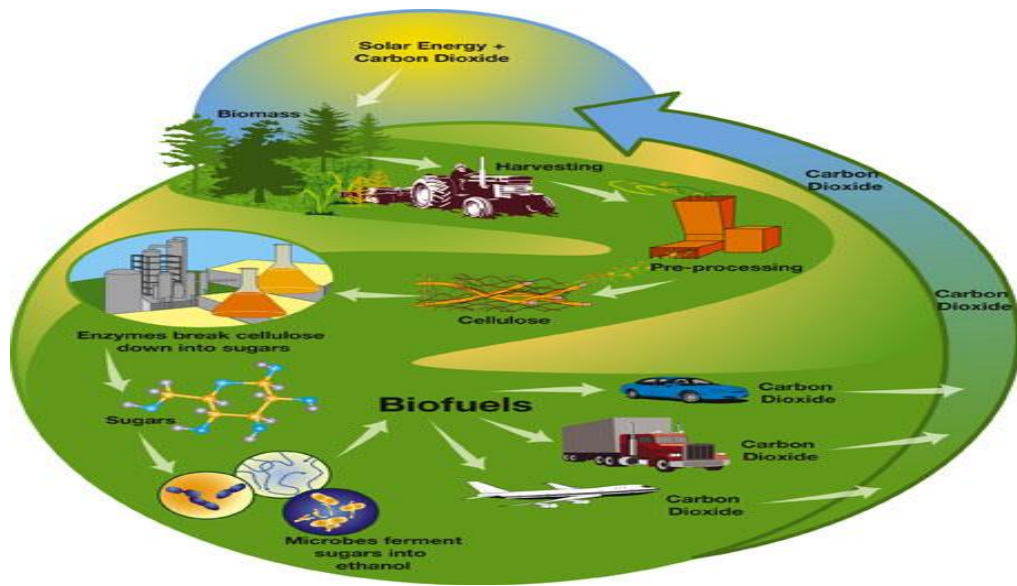
- Βιο-ΕΤΒΕ είναι ο αιθυλο-τριτοταγής-βουτυλαιθέρας (ΕΤΒΕ) που παράγεται από βιοαιθανόλη, για χρήση ως Βιοκαύσιμο. Το κατ' όγκο ποσοστό Βιο-ΕΤΒΕ που υπολογίζεται ως Βιοκαύσιμο είναι 47% επί του συνόλου του.
- Βιο-ΜΤΒΕ είναι ο μεθυλο-τριτοταγής-βουτυλαιθέρας (ΜΤΒΕ) που παράγεται από μεθανόλη, για χρήση ως Βιοκαύσιμο. Το κατ' όγκο ποσοστό Βιο-ΜΤΒΕ που υπολογίζεται ως Βιοκαύσιμο είναι 36% επί του συνόλου του (8)

Τα βιοκαύσιμα -συμπεριλαμβανομένων των υγρών καυσίμων αιθανόλη και βιοντίζελ, καθώς και το βιοαέριο –μπορούν να καούν στους κινητήρες των οχημάτων, όπως τα ορυκτά καύσιμα που χρησιμοποιούνται για τις μεταφορές αλλά και σε σταθερές μηχανές για την παραγωγή θερμότητας και ηλεκτρικής ενέργειας. Μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν για οικιακή θέρμανση και χρήση (μαγείρεμα). Σαν προηγμένα βιοκαύσιμα (advanced biofuels) χαρακτηρίζονται εκείνα που παράγονται με βιώσιμο τρόπο από μη εδώδιμες πηγές βιομάζας με χρήση τεχνολογιών που βρίσκονται ακόμη σε πιλοτικό στάδιο. Ένα παράδειγμα τέτοιου βιοκαυσίμου αποτελεί το λεγόμενο 'πράσινο ντίζελ', το οποίο παράγεται με καταλυτική υδρογόνωση των φυτικών ελαίων (το υδρογόνο χρησιμοποιείται για την αφαίρεση του οξυγόνου από τα έλαια με στόχο την παραγωγή καυσίμων υδρογονανθράκων πιο παρόμοιο με diesel), το οποίο όμως παράγεται σήμερα και μάλιστα έχει εμπορικές εφαρμογές. (9), (10)

Να σημειωθεί ότι τα βιοκαύσιμα αποτελούν μια πολλά υποσχόμενη υποκατηγορία ανανεώσιμων πηγών ενέργειας. Όπως αποδεικνύουν και σχετικά στατιστικά στοιχεία (Διάγραμμα 3), τόσο η βιοαιθανόλη όσο και το βιοντίζελ την τελευταία πενταετία σημειώνουν σταδιακή αύξηση της παραγωγής τους και κατ' επέκταση της χρήσης τους.



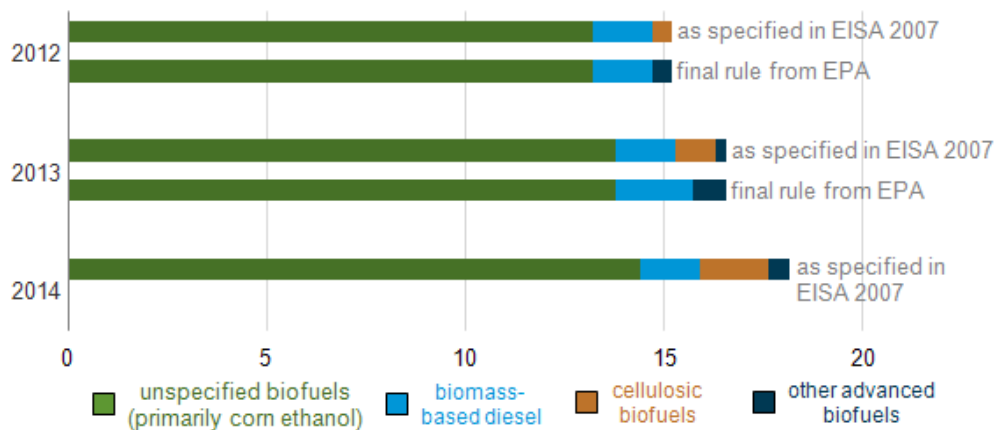
Διάγραμμα 3: Παρουσίαση της μέσης ετήσιας αύξησης παραγωγής βιοκαυσίμων για το 2012 και η μεταβολή που σημειώθηκε από το 2007-2012 (9)



Εικόνα 1: Παραστατική αναπαράσταση της παραγωγής βιοκαυσίμων (11)

Στο διάγραμμα που ακολουθεί φαίνεται η διαφορετική προέλευση των βιοκαυσίμων. Αρχικά να σχολιαστεί η αυξητική τάση της παραγόμενης ποσότητας βιοκαυσίμων. Ειδικότερα, παρατηρείται ότι το μεγαλύτερο ποσοστό των βιοκαυσίμων που χρησιμοποιήθηκε τα έτη 2012 και 2013 και προβλέπεται να χρησιμοποιηθεί το έτος 2014, είναι φυτικής προέλευσης. Παρατηρείται επίσης ότι κατά την πάροδο των ετών αυξάνεται το ποσοστό των βιοκαυσίμων που προέρχονται από βιομάζα.

Renewable Fuels Standard target volumes
billions of gallons of ethanol equivalent



Source: U.S. Energy Information Administration, based on U.S. Environmental Protection Agency

Διάγραμμα 4: Προέλευση των βιοκαυσίμων (12)

2.1 Γενικά

Η ανάπτυξη της πορείας των βιοκαυσίμων που σχετίζεται με τις μεθόδους παραγωγής και την προέλευση της πρώτης ύλης τους, χωρίζεται σε 3 και προσφάτως 4 γενιές. Παρακάτω ακολουθεί μια συνοπτική ανασκόπηση της εξέλιξης τους.

1^η γενιά

Οι τρεις κύριοι τύποι βιοκαυσίμων πρώτης γενιάς που έχουν πρακτική εφαρμογή, είναι το βιοντίζελ (βιο-εστέρες), η βιοαιθανόλη, και το βιοαέριο, των οποίων, πλέον, η παραγωγή διαδικασία χαρακτηρίζεται ως «καθιερωμένη τεχνολογία». Το βιοντίζελ θα αναλυθεί στη συνέχεια της εργασίας. Η βιοαιθανόλη μπορεί να χρησιμοποιηθεί σαν υποκατάστατο της βενζίνης ενώ μπορεί και να αποτελέσει πλήρες υποκατάστατο της βενζίνης στα αποκαλούμενα 'flexi-fuel' οχήματα. Παράγεται μέσω ζύμωσης ζάχαρης ή άλλων σακχάρων γενικά. Η βιοαιθανόλη μπορεί επίσης να χρησιμεύσει ως πρώτη ύλη για την παρασκευή αιθυλο-τριτοταγή-βουτυλαιθέρας (ETBE), ο οποίος χρησιμοποιείται σαν πρόσθετο στη βενζίνη. Το βιοαέριο ή βιομεθάνιο σχηματίζεται με αναερόβια χώνεψη οργανικής ύλης με τη βοήθεια μικροοργανισμών και μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε βενζινοκίνητα οχήματα, αφού πρώτα υποστούν προσαρμογές.

Οι βασικές πρώτες ύλες για την παραγωγή τους είναι οι διάφοροι εδώδιμοι σπόροι, δημητριακά, ή ολόκληρα φυτά από καλλιέργειες όπως καλαμπόκι, ζαχαροκάλαμο, ελαιοκράμβη, σιτάρι, ηλιόσποροι ή φοινικέλαιο. Το βασικό μειονέκτημα των βιοκαυσίμων αυτής της κατηγορίας είναι ο ανταγωνισμός που δημιουργείται ανάμεσα στα τρόφιμα και καύσιμα, και οποίος οδηγεί σε αύξηση των τιμών των τροφίμων. Επιπλέον, για την κάλυψη των αναγκών σε πρώτες ύλες απαιτείται και αποψίλωση μεγάλων δασικών εκτάσεων για την καλλιέργεια των απαιτούμενων σοδιών καθώς και μεγάλη κατανάλωση νερού. Επομένως, η απουσία του ανανεώσιμου χαρακτήρα τους λόγω της αρνητικής επίδρασης στη διαθεσιμότητα των τροφών και στη διατήρηση της βιοποικιλότητας, έχει σαν αποτέλεσμα το πέρασμα στη 2^η γενιά βιοκαυσίμων. (13), (14), (15)

2^η γενιά

Η 2^η γενιά βιοκαυσίμων -από τη 2^η γενιά και πέρα, τα βιοκαύσιμα χαρακτηρίζονται και σαν «προηγμένα βιοκαύσιμα» (advanced biofuels)- έχει σαν στόχο την χρησιμοποίηση μη εδώδιμων πρώτων υλών ώστε να μην υπάρχει ανταγωνισμός με τομείς τροφίμων. Πιο συγκεκριμένα, αυτά παράγονται από βιομάζα, δηλαδή παρουσιάζουν βιώσιμο χαρακτήρα, και μάλιστα η παραγωγή τους είναι ουδέτερη όσον αφορά στο ισοζύγιο άνθρακα και αρνητική όσον αφορά στο ισοζύγιο διοξειδίου του άνθρακα και στις επιπτώσεις της ατμοσφαιρικής του συγκέντρωσης. Στο πλαίσιο της παραγωγής βιοκαυσίμων, με τον όρο «φυτική βιομάζα» νοείται κυρίως λιγνινοκυτταρινούχο υλικό καθώς αυτό αποτελεί ένα φθινό και άφθονο υλικό προερχόμενο από φυτά. Πιο συγκεκριμένα η λιγνινοκυτταρινούχα βιομάζα είναι πλούσια σε πολυσακχαρίτες, οι οποίοι παρέχουν τα σάκχαρα που θα αξιοποιηθούν στην παραγωγή των βιοκαυσίμων.

Ως πρώτη ύλη για τα βιοκαύσιμα 2^{ης} γενιάς μπορούν να χρησιμοποιηθούν τα παρακάτω:

- Φυτά πλούσια σε κυτταρίνη όπως γλυκό σόργο, αγριαγκινάρα, πολυετή αγρωστώδη (μίσχανθος, γρασίδι)
- Γεωργικά παραπροϊόντα όπως άχυρα, φύλλα και κελύφη καρπών
- Βιομηχανικά παραπροϊόντα όπως πριονίδι, όξινα έλαια, λιπαρά οξέα και απόβλητα σφαγείων

Τα λιγνινοκυτταρινούχα υλικά αποτελούν πρώτη ύλη για βιοκαύσιμα είτε μέσω υδρόλυσης και ζύμωσης, π.χ. παραγωγή βιοαιθανόλης, είτε μέσω αεριοποίησης, π.χ. παραγωγή FT-diesel (Fischer-Tropsch βιοντίζελ), βιο-DME (Dimethyl Ether) και βιο-SNG (Synthetic Natural Gas). Γενικότερα άλλα βιοκαύσιμα 2ης γενιάς είναι τα ακόλουθα: βιοντίζελ, βιοαιθανόλη, βιομεθανόλη, βιοϋδρογόνο, πράσινο ντίζελ και συνθετική κηροζίνη.

Επί του παρόντος, η παραγωγή τέτοιων καυσίμων δεν είναι οικονομικά αποδοτική, διότι υπάρχουν μια σειρά από τεχνικά εμπόδια που πρέπει να ξεπεραστούν την υλοποίησή τους. Μέχρι σήμερα, το δυναμικό της παραγωγής βιοκαυσίμων από αγροτικά υπολείμματα καλλιεργειών, όπως το άχυρο και ροκανίδια ξύλου, βρίσκεται σε ερευνητικό στάδιο. Ωστόσο, η παραγωγή βιοκαυσίμων από γεωργικά προϊόντα που θα μπορούσαν να ικανοποιήσουν κάποιο ποσοστό της αυξανόμενης ζήτησης για τα υγρά καύσιμα, έχει προκαλέσει μεγάλο ενδιαφέρον για τη χρήση ειδικών καλλιεργειών βιομάζας ως πρώτη ύλη για την παραγωγή βιοκαυσίμων.

Ωστόσο, ένα βασικό μειονέκτημα, που εξακολουθεί να υπάρχει, αφορά στη διαθεσιμότητα των πρώτων υλών η οποία απαιτεί δέσμευση καλλιεργήσιμων εκτάσεων και κατανάλωση νερού. Βέβαια, σύμφωνα με εκτιμήσεις, για την περίπτωση των βιοκαυσίμων 2^{ης} γενιάς, οι ερευνητές εμφανίζονται πιο αισιόδοξοι καθώς θεωρούν ότι για την ίδια έκταση καλλιεργήσιμης έκτασης, θα ληφθεί μεγαλύτερο ενεργειακό περιεχόμενο σε σχέση με την περίπτωση παραγωγής βιοκαυσίμων 1^{ης} γενιάς. Επίσης, μελλοντικά τείνει να αναιρεθεί το μειονέκτημα δέσμευσης καλλιεργήσιμων εκτάσεων με τη χρήση υποδεέστερων ποιοτικά εδαφών. (13), (14), (15), (16)

Η μικροβιακή παραγωγή ελαίου που μελετήθηκε στα πλαίσια αυτής της διπλωματικής εργασίας ανήκει στην 2^η βιοκαυσίμων.

3^η γενιά

Τα βιοκαύσιμα 3^{ης} γενιάς παράγονται από μικροφύκη (μικροάλγη) και θεωρείται ότι αποτελούν έναν σχετικά πιο βιώσιμο τρόπο παραγωγής ενέργειας, μιας και στερούνται κάποιων μειονεκτημάτων που συνδέονται με την 1^η και 2^η γενιά βιοκαυσίμων. Τα συστήματα μικροαλγών είναι σε θέση να παράγουν 15-300 φορές περισσότερο έλαια για την παραγωγή βιοντίζελ σε σχέση με τις παραδοσιακές καλλιέργειες. Επί πλέον, σε σύγκριση με τα συμβατικά καλλιεργούμενα φυτά που συνήθως συλλέγονται μόνο μία ή δύο φορές το χρόνο, τα μικροφύκη έχουν σύντομο κύκλο συγκομιδής και υπάρχει η δυνατότητα για πολλαπλές και συνεχείς συγκομιδές. Αλλά πλεονεκτήματα που

παρουσιάζουν είναι το μικρό κόστος πρώτων υλών για την ανάπτυξη τους καθώς απαιτούν φως (ηλιακή ακτινοβολία κατά βάση), νερό, διοξείδιο του άνθρακα και ανόργανα άλατα και το ότι δεν απαιτείται καλλιεργήσιμη έκταση για την καλλιέργεια τους και επομένως δεν ανταγωνίζονται την παραγωγή τροφίμων . Τα συστήματα μικροφυκών επί του παρόντος προωθούνται ως μια ιδανική πρώτη ύλη για την παραγωγή βιοκαυσίμων αποτελούν αντικείμενο μελέτης πολλών ερευνητών παγκοσμίως. (17), (5), (15)

4^η γενιά

Η ανάπτυξη της 4^{ης} γενιάς βιοκαυσίμων έχει στόχο όχι μόνο την παραγωγή βιώσιμης ενέργειας, αλλά και έναν τρόπο για τη δέσμευση και (γεω)αποθήκευση του διοξειδίου του άνθρακα. Η βιομάζα, η οποία έχει απορροφήσει διοξείδιο του άνθρακα για την ανάπτυξη της, θα μετατρέπεται σε καύσιμο με τις ίδιες μεθόδους όπως τα βιοκαύσιμα 2^{ης} γενιάς. Αυτή η διαδικασία διαφέρει από τη 2^η και 3^η γενιά παραγωγής καθώς σε όλα τα στάδια της παραγωγικής διαδικασίας το διοξείδιο του άνθρακα θα συλλέγεται χρησιμοποιώντας διαδικασίες όπως ανάφλεξη (oxy-fuel combustion). Το διοξείδιο του άνθρακα μπορεί στη συνέχεια να αποθηκεύεται, σε παλιά κοιτάσματα πετρελαίου και φυσικού αερίου ή σε υδροφόρους ορίζοντες. Αυτή η δέσμευση του άνθρακα καθιστά 4^η γενιά βιοκαυσίμων αρνητική ως προς το ισοζύγιο μάζας του άνθρακα και όχι ουδέτερη, καθώς τελικά απομακρύνει περισσότερο διοξείδιο του άνθρακα από όσο παράγει. Το σύστημα αυτό όχι μόνο μειώνει το διοξείδιο του άνθρακα από την ατμόσφαιρα λόγω της αποθήκευσης του, αλλά επίσης μειώνει τις εκπομπές του από την αντικατάσταση των ορυκτών καυσίμων. Παραδείγματα βιοκαυσίμων είναι τα ακόλουθα : βιοϋδρογόνο, βιομεθάνιο, συνθετικά βιοκαύσιμα κλπ. (18), (15)

Τα βασικά πλεονεκτήματα των βιοκαυσίμων συνοψίζονται παρακάτω:

- Παράγονται από Ανανεώσιμες Πηγές, αφού ως πρώτη ύλη χρησιμοποιείται βιομάζα από καλλιέργειες . Επίσης τα βιοκαύσιμα μπορούν να παραχθούν και να χρησιμοποιηθούν σε μικρότερο χρονικό διάστημα από ό, τι τα ορυκτά καύσιμα, τα οποία χρειάζονται εκατομμύρια χρόνια.

- "Πράσινη" λύση στο ενεργειακό ζήτημα

Δεδομένου ότι τα βιοκαύσιμα δεν αποτελούνται από υδρογονάνθρακες , παράγουν πολύ χαμηλότερα επίπεδα των αερίων του θερμοκηπίου κατά την καύση , και επομένως είναι λιγότερο επιβλαβή για την ατμόσφαιρα. Ωστόσο , παράγουν μεγαλύτερη ποσότητα οξειδίων του αζώτου, μία από την αιτία της όξινης βροχής, από τα συμβατικά καύσιμα.

- Δεν απαιτούνται τροποποιήσεις στους κινητήρες καύσης τους

Η βιοαιθανόλη και το βιοντίζελ μπορεί να χρησιμοποιηθεί στα αυτοκίνητα με καθόλου ή ελάχιστες αλλαγές στον κινητήρα . Η βιοαιθανόλη χρησιμοποιείται ήδη σε πολλές χώρες - κυρίως η Βραζιλία - ως πρόσθετο ή ακόμη υποκατάστατο για τα συμβατικά καύσιμα.

- Τέλος στο μονοπώλιο καυσίμων

Δεδομένου ότι τα βιοκαύσιμα παράγονται σε πληθώρα διαφορετικών καλλιεργειών που μπορούν να είναι σε κάθε χώρα, θα μπορούσε ενδεχομένως να γίνουν αυτάρκειες στον τομέα των ενεργειακών αναγκών.

- Υποστηρίζουν, επίσης, την αγροτική κοινότητα του κόσμου και να συμβάλει στην ανάπτυξη της γεωργίας .

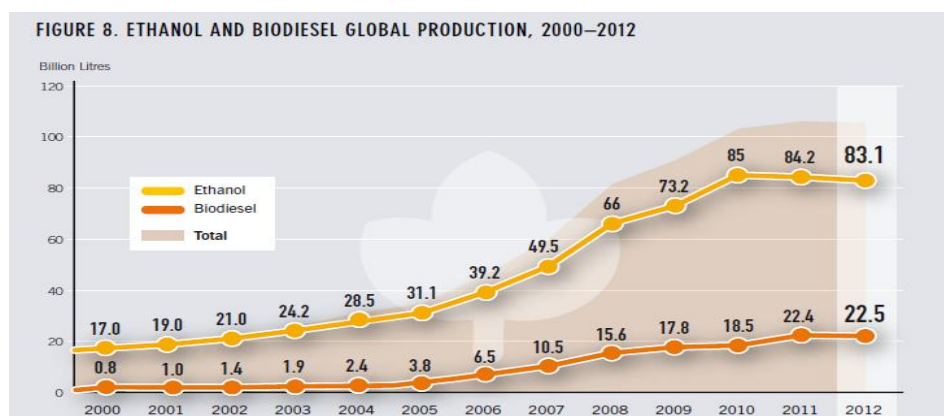
-Είναι εύκολη η χρήση τους στην πράξη από την πλειοψηφία των πολιτών καθώς δεν απαιτούνται μεγάλες αλλαγές στους κινητήρες των αυτοκινήτων ή και γενικά στα συστήματα θέρμανσης.

2.2 Μελλοντικά

Δεδομένου ότι τα βιοκαύσιμα καλύπτουν τις παρακάτω ανάγκες/προβλήματα

- Περιορισμός των αποθεμάτων των ορυκτών καυσίμων
- Εμπλουτισμός ατμόσφαιρας με CO₂
- Απεξαρτοποίηση από περιορισμένη και ελεγχόμενη εξωγενώς διάθεση Πρώτων Υλών
- Ενίσχυση αγροτικής οικονομίας, (15)

είναι φανερό ότι πρόκειται για έναν τομέα με μεγάλη εξέλιξη στο μέλλον. Πράγματι, όπως προκύπτει από το Διάγραμμα 5 για τις χρονιές από το 2000 ως το 2012, η παραγωγή βιοκαυσίμων σε δισεκατομμύρια λίτρα συνολικά σχεδόν εξαπλασιάστηκε. Επίσης σύμφωνα με εκτιμήσεις, η μελλοντική τους πορεία είναι ενθαρρυντική καθώς, ειδικότερα από ημερήσια κατανάλωση 86,1 εκ. βαρέλια το 2007, η ημερήσια κατανάλωση το 2035 αναμένεται να φτάσει έως και 110,6 εκ. βαρέλια. (19)



Διάγραμμα 5: Ετήσια παραγωγή βιοκαυσίμων για τα έτη 2000-2012 (9)

3. Βιοντίζελ

Ως βιοντίζελ ορίζεται το καύσιμο που αποτελείται από μονο-αλκυλ εστέρες λιπαρών οξέων μακρών αλυσίδων που προέρχονται από φυτικά έλαια ή ζωικά λίπη, και μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε κινητήρες ντίζελ αφού προηγηθούν κάποιες μικρές τροποποιήσεις, είτε σε καθαρή μορφή ή να αναμιχθεί σε οποιοδήποτε αναλογία με πετρέλαιο ντίζελ. (20), (13)

Αναφέροντας πιο τεχνικά στοιχεία, όταν χρησιμοποιείται σαν καύσιμο το βιοντίζελ σε καθαρή μορφή, τότε ορίζεται σαν B100, και πρέπει να πληροί τις προδιαγραφές των ASTM D 6751. Διαφορετικά, όταν χρησιμοποιείται μαζί με το πετρελαϊκό ντίζελ, πρέπει να πληροί

τις κατά ASTM D 6751 προδιαγραφές και ορυκτού ντίζελ. Συμβολίζεται με ΒΧΧ όπου ΧΧ αναπαριστά τον ποσοστιαίο όγκο του βιοντίζελ στο μίγμα. (21)

3.1 Ιστορικά στοιχεία

Στην πραγματικότητα, η χρήση των φυτικών ελαίων σε μηχανή diesel ομολογείται ήδη από τις 10 Αυγούστου 1893. Εκείνη την ημέρα, ο Rudolf Diesel, ο εφευρέτης του κινητήρα που πήρε το όνομά του, σε παρουσίαση ενός μοντέλου κινητήρα που κατασκεύασε και έγινε στη Γερμανία, χρησιμοποίησε σαν καύσιμο φυστικέλαιο. Σε ανάμνηση αυτού του γεγονότος, εκείνη η μέρα έχει ανακηρυχθεί σαν «Παγκόσμια Ημέρα βιοντίζελ».

Η χρήση των φυτικών ελαίων σαν καύσιμο συνεχίστηκε μέχρι το 1920, οπότε τα ορυκτά καύσιμα εκτόπισαν και τελικά εξάλειψαν εντελώς τη χρήση των πρώτων, λόγω μικρότερου κόστους και μεγαλύτερης διαθεσιμότητας. Μάλιστα για τη μετάβαση στο πετρελαικό ντίζελ ο κινητήρας ντίζελ δέχθηκε κάποιες τροποποιήσεις.

Ωστόσο, κατά τη δεκαετία του 1970 υπήρξε νέο ενδιαφέρον για τη χρήση φυτικών ελαίων ως εναλλακτική πηγή ενέργειας, λόγω της ανασφάλειας που εμφανίστηκε σχετικά με τη διαθεσιμότητα των ορυκτών καυσίμων. Τα προβλήματα όμως που αναφέρθηκαν από την απευθείας χρήση των φυτικών ελαίων όπως το υψηλό ιξώδες των φυτικών ελαίων το οποίο οδηγούσε σε κακή εξαέρωση, η χαμηλή πτητικότητα και οι αυξημένες επικαθήσεις άνθρακα σε μέρη του κινητήρα, κατέστησαν την χρήση τους ακατάλληλη. Έτσι αναγκαστικά θα έπρεπε να προηγηθεί προεπεξεργασία τους πριν την χρήση τους σαν καύσιμο. Οι προσπάθειες προς αυτή την κατεύθυνση περιελάμβαναν διεργασίες όπως πυρόλυση, ανάμειξη με ορυκτά καύσιμα, μικρογαλακτωματοποίηση και τη μετεστεροποίηση. Το τροποποιημένο αυτό προϊόν ονομάστηκε βιοντίζελ.

Η διαδικασία μετεστεροποίησης φυτικών ελαίων, διεξήχθη το 1853 από τους επιστήμονες E. Duffy και J. Patrick, και μπορεί να μετατρέψει τα φυτικά έλαια στους αλκυλ-εστέρες τους μειώνοντας το ιξώδες τους στο επίπεδο του ορυκτού ντίζελ. Αυτή η μέθοδος, η οποία θα περιγραφεί αναλυτικότερα παρακάτω, έχει γίνει πλέον η πιο βιώσιμη διαδικασία για την μετατροπή των φυτικών ελαίων ώστε να μπορούν να χρησιμοποιηθούν στους υπάρχοντες ντιζελοκινητήρες χωρίς τροποποιήσεις.

Από την άλλη, η αύξηση των επιχορηγήσεων στην αγορά του πετρελαίου εμπόδισε οποιαδήποτε σημαντική εξέλιξη για την παραγωγή του βιοντίζελ έως τα τέλη της δεκαετίας του 1990, οπότε οι αυξανόμενες ανησυχίες σχετικά με το περιβάλλον και τη βιωσιμότητα οδήγησαν τελικά στην ανάπτυξη της εμπορικής παραγωγής βιοντίζελ. Κατά τη διάρκεια αυτής της περιόδου, βιομηχανίες παραγωγής βιοντίζελ εμφανίστηκαν σε πολλές ευρωπαϊκές χώρες, συμπεριλαμβανομένης της Τσεχικής Δημοκρατίας, της Γερμανίας, της Γαλλίας και της Σουηδίας. Έως το 1998 συνολικά 21 χώρες θα ξεκινούσαν προσπάθειες παραγωγής και χρήσης βιοντίζελ. Το 2004, η κυβέρνηση των Φιλιππίνων θέσπισε υποχρεωτική την ενσωμάτωση 1% βιοντίζελ στο ντίζελ για χρήση σε οχήματα της κυβέρνησης. Το 2005, Μινεσότα έγινε η πρώτη πολιτεία των ΗΠΑ, η οποία κατέστησε

υποχρεωτική την περιεκτικότητα τουλάχιστον 2% βιοντίζελ σε όλα τα καύσιμα ντίζελ που πωλούνται στην πολιτεία. Από το 2006 στη χώρα μας, και σύμφωνα με συμμόρφωση με την Ευρωπαϊκή Νομοθεσία το συμβατικό ντίζελ θα αναμειγνύεται με βιοντίζελ σε αναλογία έως 5% v/v στις τοπικές εγκαταστάσεις φορτώσεων (διυλιστήρια) και θα διανέμεται κανονικά μέσω της υπάρχουσας υποδομής της αγοράς καυσίμων ντίζελ. (22), (23), (24), (5)

3.2 Παραγωγή βιοντίζελ και πρώτες ύλες

Τα βιοχημικά μόρια τα οποία αποτελούν φορείς μεγάλου ποσού ενέργειας, την οποία μπορούν να αποδώσουν με καύση, είναι τα λιπαρά οξέα, και μάλιστα τα τριγλυκερίδια. Αυτά βρίσκονται σε επεξεργάσιμη μορφή σε φυτικά και ζωικά λίπη.

Τα φυτικά έλαια, αν και μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως καύσιμο, διαθέτουν και χαρακτηριστικά τα οποία προκαλούν προβλήματα στην απευθείας χρήση σε κινητήρα diesel, τα οποία συνδέονται με τα μεγάλα μοριακά βάρη των τριγλυκεριδίων τα οποία εμπεριέχονται σε αυτά. Τα πιο σημαντικά από τα προβλήματα αυτά είναι:

- Το υψηλό ιξώδες τους σε σχέση με το πετρελαϊκό diesel προκαλεί δυσλειτουργία του συστήματος εισαγωγής του καυσίμου στο θάλαμο καύσης και σε ατελή εξαέρωση του.
- Με την κακή επαφή του λαδιού με τον αέρα προκαλείται ατελής καύση και άρα αυξημένες εκπομπές ρύπων.
- Αυξημένες επικαθίσεις στο θάλαμο καύσης.
- Λόγω της ποικιλίας στο είδος και την θερμογόνο δύναμη του λαδιού σε διαφορετικά κλίματα δεν υπάρχει σταθερό επίπεδο στην ποιότητα του καυσίμου.
- Τα φυτικά έλαια έχουν αυξημένο σημείο θόλωσης και σημείο ροής σε σχέση με το πετρελαϊκό diesel, με αποτέλεσμα να είναι ακατάλληλο καύσιμο για χρήση σε χαμηλές θερμοκρασίες.

Για την αντιμετώπιση των προβλημάτων αυτών, γίνεται η επεξεργασία των φυτικών ελαίων έτσι ώστε τα χαρακτηριστικά τους να προσεγγίζουν περισσότερο αυτά του πετρελαϊκού diesel, με τη διεργασία της μετεστεροποίησης, η οποία θα περιγραφεί στη συνέχεια της εργασίας. (25)

Να σχολιαστεί ότι γενικά, δεν είναι ωφέλιμη η χρήση βρώσιμων υλικών για την παραγωγή καυσίμων, καθώς πρωταρχικό μέλημα του κάθε κράτους είναι η σίτιση των πολιτών. Σαν αποτέλεσμα, για χρήση στην παραγωγή βιοντίζελ χρησιμοποιούνται μη βρώσιμα προϊόντα, όπως φυτικά έλαια με τοξικότητα, χρησιμοποιημένα (καμένα) βρώσιμα έλαια και υπολείμματα από βιομηχανίες παραγωγής ζωικών προϊόντων.

Στην κατηγορία των μη βρώσιμων φυτικών ελαίων, ανήκουν τα έλαια των καρπών τα οποία κρίνονται ακατάλληλα προς βρώση. Υπάρχει μεγάλη ποικιλία στα είδη καρπών που επιλέγονται για τη συγκεκριμένη χρήση. Ανάλογα με τις κλιματικές συνθήκες της χώρας

όπου γίνεται η παραγωγή του βιοντίζελ επιλέγεται και το κατάλληλο είδος καρπού ο οποίος θα παράξει το φυτικό έλαιο για την διεργασία. Για παράδειγμα, στην Ευρώπη ο καρπός που χρησιμοποιείται ως επί το πλείστον για παραγωγή βιοντίζελ είναι η ελαιοκράμβη (rapeseed) ενώ στην Αμερική επιλέγεται ο καρπός της σόγιας. Άλλα είδη καρπών που μπορούν να χρησιμοποιηθούν είναι: ελαιοκράμβη χαμηλού ερουσικού οξέος (canola – LEAR), λιναρόσπορος (linseed), σπόροι ηλιοτρόπιου (sunflower seeds) και το *Jatropha curcas*. Ωστόσο, σήμερα ορισμένα άλλα μη βρώσιμα έλαια, όπως τα: *Calophyllum inophyllum*, *Moringa oleifera*, *Sterculia foetida*, *Madhuca indica*, *Croton megalocarpus* και *Pongamia pinnata* έχουν κερδίσει το ενδιαφέρον των μελετητών παγκοσμίως. (26), (22), (27)

Η επόμενη κατηγορία ελαίων είναι εκείνη των χρησιμοποιημένων μαγειρικών ελαίων. Η επεξεργασία τους για την παραγωγή βιοντίζελ γίνεται με μεθεστεροποίηση, όπως και των καθαρών φυτικών ελαίων. Το κόστος όμως των καθαρών φυτικών ελαίων είναι αρκετά μεγαλύτερο από αυτό των χρησιμοποιημένων μαγειρικών λαδιών. Σε πρόσφατη μελέτη όπου συγκρίνονται οι απαιτήσεις σε μηχανολογικό εξοπλισμό σε διεργασίες αλκαλικής μετεστεροποίησης φυτικών ελαίων και των μαγειρικών ελαίων, προέκυψε ότι η επεξεργασία μαγειρικών ελαίων αυξάνει το κόστος μηχανολογικού εξοπλισμού, καθώς είναι απαραίτητη η προεργασία τους για την αφαίρεση ελεύθερων λιπαρών οξέων. (28), (29)

Στην επόμενη κατηγορία μη βρώσιμων ελαίων ανήκουν τα έλαια από ζωικά υπολείμματα. Μάλιστα σε πρόσφατη έρευνα έχει εξεταστεί η χρήση υπολειμμάτων γαλακτοκομικών βιομηχανιών για παραγωγή βιοντίζελ. Τα υπολείμματα των γαλακτοκομικών βιομηχανιών αποτελούνται από βούτυρο και συναφή λιπαρά στοιχεία τα οποία αποβάλλονται κατά την διαδικασία παραγωγής γαλακτοκομικών προϊόντων. Με αντίδραση αλκαλικής μετεστεροποίησης και με βελτιστοποιημένες συνθήκες επετεύχθη απόδοση 96,7% σε μεθυλεστέρες βιοντίζελ. Ωστόσο να αναφερθεί πως κάποιες ιδιότητες όπως το σημείο θόλωσης και το σημείο ροής ήταν μεγαλύτερα από τα αντίστοιχα στην περίπτωση που σαν πρώτη ύλη είναι φυτικά έλαια, γεγονός που κάνει απαγορευτική τη χρήση τους σε κρύα κλίματα. Επίσης ο αριθμός κετανίου του παραγόμενου βιοντίζελ είναι χαμηλός σε σχέση με των φυτικών ελαίων. Σε κάθε περίπτωση όμως χρήση παραπροϊόντων σαν πρώτη ύλη για την παραγωγή βιοντίζελ, μπορεί να μειώσει έως 60-70% το κόστος των πρώτων υλών καθιστώντας τη διεργασία παραγωγής βιοντίζελ πιο ανταγωνιστική. (30)

Η τελευταία κατηγορία ελαίων είναι εκείνη της μικροβιακής προέλευσης, η οποία και αναλύεται στο μεγαλύτερο μέρος της παρούσας εργασίας.

Το βιοντίζελ τυπικά περιλαμβάνει 14 διαφορετικούς τύπους λιπαρών οξέων τα οποία μετασχηματίζονται χημικά σε εστέρες των ελεύθερων λιπαρών οξέων, οι οποίοι παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα. (31)

Επίσης διαφορετικά κλάσματα από κάθε τύπο των ελεύθερων λιπαρών οξέων που υπάρχουν σε διάφορες πρώτες ύλες και επηρεάζουν μερικές από τις ιδιότητες του καυσίμου (Πίνακας 2). Για παράδειγμα, υψηλά επίπεδα κορεσμένων λιπαρών οξέων (C14:0, C16:0, C18:0) αυξάνουν το σημείο θόλωσης (cloud point), αυξάνουν τον αριθμό κετανίου, μειώνουν τα οξειδία του αζώτου (NO_x) και βελτιώνουν τη σταθερότητα. Σε

αντίθεση, η παρουσία πολλών πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (C18:2, C18:3) θα οδηγήσει στη μείωση του σημείου θόλωσης και του αριθμού κετανίου, θα μειώσει τη σταθερότητα (εκτός κι αν χρησιμοποιηθούν πρόσθετα σταθερότητας) και θα αυξήσουν τα οξειδία του αζώτου. Η σημασία των ιδιοτήτων αυτών θα δοθεί συνοπτικά παρακάτω. (31)

Πίνακας 1: Δομές λιπαρών οξέων που μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως πρώτες ύλες για το βιοντίζελ (31)

| Fatty Acid Name | No. Of Carbons & Double Bonds | Chemical Structure (= denotes double bond placement) |
|-----------------|-------------------------------|---|
| Caprylic | C8 | $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_6\text{COOH}$ |
| Capric | C10 | $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_8\text{COOH}$ |
| Lauric | C12 | $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{COOH}$ |
| Myristic | C14 | $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}\text{COOH}$ |
| Palmitic | C16:0 | $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COOH}$ |
| Palmitoleic | C16:1 | $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_5\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$ |
| Stearic | C18:0 | $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{COOH}$ |
| Oleic | C18:1 | $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$ |
| Linoleic | C18:2 | $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$ |
| Linolenic | C18:3 | $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$ |
| Arachidic | C20:0 | $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{18}\text{COOH}$ |
| Eicosenoic | C20:1 | $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_9\text{COOH}$ |
| Behenic | C22:0 | $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{20}\text{COOH}$ |
| Eurcic | C22:1 | $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_{11}\text{COOH}$ |

Πίνακας 2: Βάρος επί τις εκατό λιπαρών οξέων σε διάφορες πρώτες ύλες του βιοντίζελ (31)

| Fatty Acid Fat or Oil | C8:0 | C10:0 | C12:0 | C14:0 | C16:0 | C16:1 | C18:0 | C18:1 | C18:2 | C18:3 | C20:0 C22:0 | C20:1 C22:1 | Other |
|-----------------------|------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|----------------|----------------|-------|
| Tallow | -- | -- | 0.2 | 2-3 | 25-30 | 2-3 | 21-26 | 39-42 | 2 | -- | 0.4-1 | 0.3 | 0.5 |
| Lard | -- | -- | -- | 1 | 25-30 | 2-5 | 12-16 | 41-51 | 4-22 | -- | - | 2-3 | 0.2 |
| Coconut | 5-9 | 4-10 | 44-51 | 13-18 | 7-10 | -- | 1-4 | 5-8 | 1-3 | -- | -- | -- | -- |
| Palm Kemal | 2-4 | 3-7 | 45-52 | 14-19 | 6-9 | 0-1 | 1-3 | 10-18 | 1-2 | -- | 1-2 | -- | -- |
| Palm | -- | -- | -- | 1-6 | 32-47 | -- | 1-6 | 40-52 | 2-11 | -- | -- | -- | -- |
| Safflower | -- | -- | -- | -- | 5.2 | -- | 2.2 | 76.3 | 16.2 | -- | -- | -- | -- |
| Peanut | -- | -- | -- | 0.5 | 6-11 | 1-2 | 3-6 | 39-66 | 17-38 | -- | 5-10 | -- | -- |
| Cottonseed | -- | -- | -- | 0-3 | 17-23 | -- | 1-3 | 23-41 | 34-55 | -- | -- | 2-3 | -- |
| Corn | -- | -- | -- | 0-2 | 8-10 | 1-2 | 1-4 | 30-50 | 34-56 | -- | -- | 0-2 | -- |
| Sunflower | -- | -- | -- | -- | 6.0 | -- | 4.2 | 18.7 | 69.3 | 0.3 | 1.4 | -- | -- |
| Soybean | -- | -- | -- | 0.3 | 7-11 | 0-1 | 3-6 | 22-34 | 50-60 | 2-10 | 5-10 | -- | -- |
| Rapeseed | -- | -- | -- | -- | 2-5 | 0.2 | 1-2 | 10-15 | 10-20 | 5-10 | .9 | 50-60 | -- |
| Linseed | -- | -- | -- | 0.2 | 5-9 | -- | 0-1 | 9-29 | 8-29 | 45-67 | -- | -- | -- |
| Mustard | -- | -- | -- | -- | 3.0 | -- | 1.5 | 15-60 | 12 | 5-10 | -- | 10-60 | -- |

Όσον αφορά στις μεθόδους παραγωγής βιοντίζελ, μέχρι σήμερα έχουν μελετηθεί τρεις μέθοδοι παραγωγής με στόχο, κυρίως, την επίτευξη μείωσης του υψηλού ιξώδους των φυτικών ελαίων, ώστε αυτά να μπορούν να χρησιμοποιηθούν στους κοινούς κινητήρες ντίζελ χωρίς προβλήματα λειτουργίας, όπως για παράδειγμα εκείνα που σχετίζονται με τις επικαθίσεις στον κινητήρα. Αυτές οι μέθοδοι είναι οι εξής:

- Ανάμειξη με πετροντίζελ (blending)

Η χρήση των φυτικών ελαίων σε κινητήρες ντίζελ απαιτεί σημαντικές μετατροπές στον κινητήρα διαφορετικά η χρήση τους μπορεί να προκαλέσει έως και καταστροφή τμημάτων του. Τα ακατέργαστα φυτικά έλαια όμως, μπορούν να αναμιχθούν ή να αραιωθούν με ορυκτά καύσιμα πρωτίστως για τη βελτίωση του ιξώδους και την αύξηση της πτητικότητας τους. Η θέρμανση και η ανάμειξη των φυτικών ελαίων ορυκτά καύσιμα, βελτιώνουν τα δυο παραπάνω χαρακτηριστικά αλλά εξακολουθούν να υπάρχουν προβλήματα όπως τα ελεύθερα λιπαρά οξέα και η δημιουργία επικαθίσεων (gums formation) λόγω οξείδωσης και πολυμερισμού κατά την αποθήκευση και την ανάφλεξη. (32)

- Πυρόλυση (pyrolysis)

Η πυρόλυση είναι η μετατροπή μιας οργανικής ουσίας σε μια άλλη μέσω της επίδρασης της θερμότητας με ή χωρίς καταλύτη. Το πυρολυόμενο υλικό μπορεί να είναι φυτικό έλαιο, ζωικό λίπος, φυσικά λιπαρά οξέα ή μεθυλεστέρες λιπαρών οξέων. Η μετατροπή των φυτικών ελαίων και των ζωικών λιπών, που αποτελούνται κυρίως από τριγλυκερίδια, με χρήση θερμικών αντιδράσεων πυρόλυσης αποτελεί μια πολλά υποσχόμενη μέθοδο για παραγωγή βιοντίζελ, καθώς μέσω αυτής μπορούν να ληφθούν προϊόντα κατάλληλα για ντιζελοκινητήρες. Τα προϊόντα που προκύπτουν από την πυρόλυση έχουν χαμηλότερο ιξώδες, σημείο ανάφλεξης (flash point), και σημείο ροής (pour point) από το ορυκτό ντίζελ αλλά είναι ισοδύναμα στη θερμογόνο δύναμη. Επίσης, ο αριθμός κετανίου των προϊόντων πυρόλυσης είναι χαμηλότερος από τον αντίστοιχο του ορυκτού ντίζελ. (32), (33)

- Μικρογαλακτωματοποίηση (microemulsification)

Μικρογαλακτωματοποίηση είναι ο σχηματισμός μικρογαλακτωμάτων (cosolvency) και αποτελεί μια πιθανή λύση για την επίλυση του προβλήματος του υψηλού ιξώδους των φυτικών ελαίων. Μικρογαλάκτωμα είναι μια διαυγής, ισότροπη και θερμοδυναμικά σταθερή διασπορά ελαίου, νερού, επιφανειοενεργού (surfactant) και συχνά ενός αμφίφυλου μορίου που ονομάζεται συνεπιφανειοενεργό. Μικρογαλάκτωμα μπορεί να σχηματιστεί με την ανάμειξη φυτικού ελαίου, εστέρα σε μέσο διασποράς (συνδιαλύτης) ή φυτικού ελαίου αλκοόλης και επιφανειοενεργού. Με αυτό τον τρόπο μειώνεται το ιξώδες και βελτιώνεται ο ψεκασμός του καυσίμου. (32), (33)

- Μεθεστεροποίηση (transesterification)

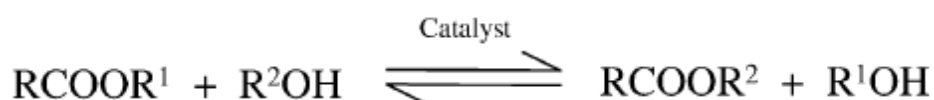
Η τελευταία είναι η πιο κοινή και ευρύτερα εφαρμοσμένη μέθοδος και να σημειωθεί πως μόνο μέσω της αντίδρασης της μεθεστεροποίησης οδηγούμαστε στα προϊόντα εκείνα που χαρακτηρίζονται ως βιοντίζελ.

Σε ένα γενικότερο πλαίσιο, η παραγωγή βιοντίζελ από μικροβιακό λίπος μπορεί να γίνει ακολουθώντας 2 διαφορετικές μεθόδους. Η πρώτη μέθοδος είναι η απευθείας μετεστεροποίηση του μικροβιακού λίπους χωρίς εκχύλιση από την κυτταρική μάζα (χρήση όξινου καταλύτη και μεθανόλης), ενώ στη δεύτερη, προηγείται ο διαχωρισμός του μικροβιακού λίπους από την κυτταρική μάζα και κατόπιν το στάδιο της μετεστεροποίησης. (34), (35)

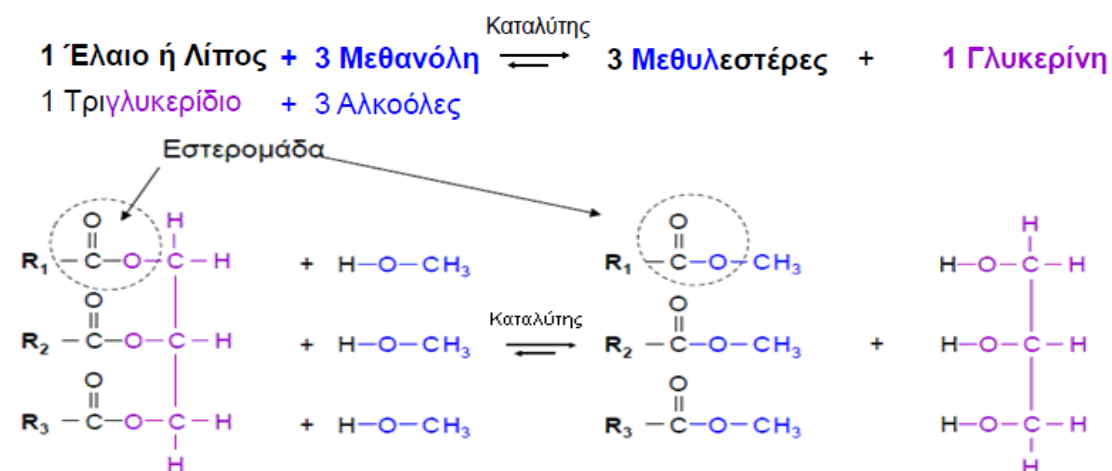
3.3 Μεθεστεροποίηση

Μεθεστεροποίηση ή αλκοόλυση, η χημική αντίδραση μεταξύ τριγλυκεριδίων και αλκοόλης παρουσία καταλύτη για να παραχθούν οι μονο εστέρες. Οι μακριές και διακλαδισμένες αλυσίδες τριγλυκεριδίων μετασχηματίζονται σε μονό εστέρες και γλυκερίνη. Η αντίδραση μεθεστεροποίησης αντιπροσωπεύεται από την γενική αντίδραση, όπως φαίνεται παρακάτω.

Η μεθεστεροποίηση είναι μια αντιστρεπτή αντίδραση και ουσιαστικά λαμβάνει χώρα με την ανάμιξη των αντιδρώντων, ενώ η παρουσία ενός καταλύτη επιταχύνει τη μετατροπή. (36), (33), (27)



Εικόνα 2: Γενική αντίδραση μεθεστεροποίησης



Εικόνα 3: Αντίδραση μεθανόλυσης τριγλυκεριδίων

Διάφοροι παράγοντες, όπως ο τύπος του καταλύτη (ομογενής -αλκαλικός ή όξινος- ή ετερογενής ή ενζυμικός), η αναλογία αλκοόλης/ελαίου, η θερμοκρασία, η καθαρότητα των αντιδραστηρίων (κυρίως περιεκτικότητα σε νερό), και η περιεκτικότητα σε ελεύθερο λιπαρό οξύ, επηρεάζουν την αντίδραση μεθεστεροποίησης ελαίου. (36) Όσον αφορά στη συμβολή της βιοτεχνολογίας, αυτή εντοπίζεται και στην επιλογή του καταλύτη. Η χρήση ενζύμων ως καταλυτών της αντίδρασης μεθεστεροποίησης σε χαμηλές θερμοκρασίες, περιβάλλον με ουδέτερο pH, και μέσω της ακινητοποίησης τους σε σταθερές βάσεις, καθιστά δυνατή την επαναχρησιμοποίηση τους και συνακόλουθα μειώνει το κόστος της διεργασίας. Επιπλέον, ως ετερογενείς καταλύτες, αποτρέπουν το σχηματισμό σαπώνων που επιμολύνουν το παραγόμενο βιοντίζελ. Συγκεκριμένα, το ένζυμο που χρησιμοποιείται ευρύτερα για την παραγωγή βιοντίζελ είναι η λιπάση, λόγω τόσο του χαμηλού κόστους της όσο και της ικανότητας της να καταλύει τις αντιδράσεις μεθεστεροποίησης και υδρόλυσης των τριγλυκεριδίων σε ήπιες συνθήκες.

Σε γενικές γραμμές, αλκοόλες, όπως η μεθανόλη, η αιθανόλη, η προπανόλη, η βουτανόλη, η αμυλική αλκοόλη και άλλες, μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην όξινη μεθεστεροποίηση για να ληφθούν υψηλές αποδόσεις βιοντίζελ. Προτιμάται η μεθανόλη λόγω του χαμηλού κόστους της και της ευρείας διαθεσιμότητάς της, αλλά η βιοπαραγόμενη αιθανόλη θα ήταν ιδανική για τη σύνθεση ενός πλήρους βιολογικά παραγόμενου καυσίμου (biogenerated fuel). Προηγμένες διαδικασίες περιλαμβάνουν την αντικατάσταση της μεθανόλης από βιοαιθανόλη για την παραγωγή αιθυλικού εστέρα λιπαρού οξέος αντί μεθυλικού εστέρα λιπαρού οξέος (ο τελευταίος είναι το παραδοσιακό βιοντίζελ). (37)

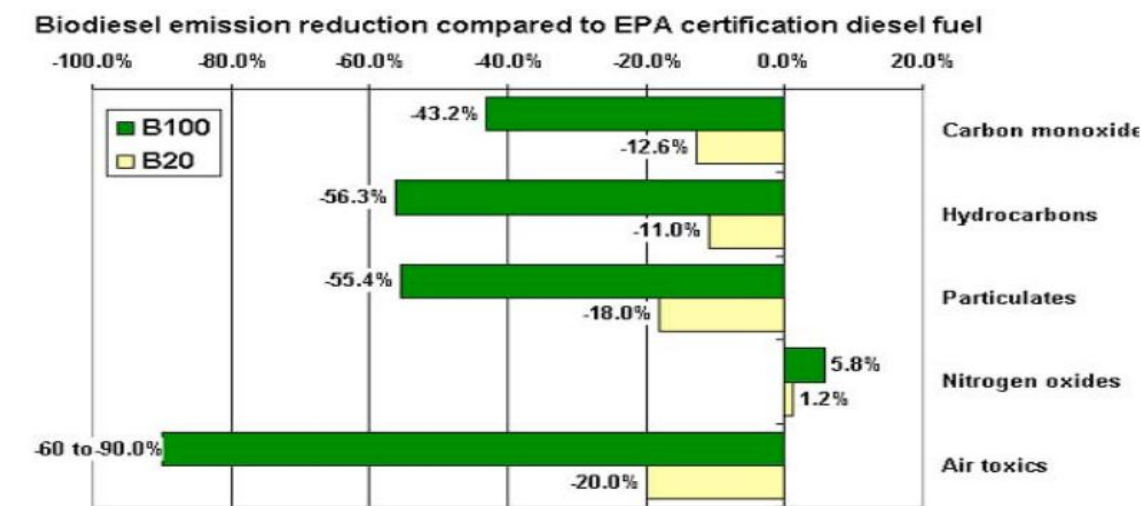
3.4 Μετρούμενες ιδιότητες και Πρότυπα –Σύγκριση με το πετροντίζελ

Το βιοντίζελ, ως εναλλακτικό καύσιμο για μηχανές εσωτερικής καύσης, παρουσιάζει αρκετά πλεονεκτήματα μεταξύ των οποίων είναι: μπορεί να προέρχονται από εγχώριους πόρους, είναι βιοδιασπώμενο και μη τοξικό, έχει εξαιρετικές λιπαντικές ιδιότητες, και είναι πιο ασφαλές από άποψη διαχείρισης γιατί έχει υψηλότερο σημείο ανάφλεξης (~423 K) σε σχέση με το πετροντίζελ (~337 K). (38)

Να σημειωθεί πως παρόλο που το βιοντίζελ μπορεί να συντεθεί από πολλές και διαφορετικές πρώτες ύλες, εντούτοις οι ιδιότητες του τελικού καυσίμου διαφέρουν στα όρια που διαφέρουν για το ορυκτό ντίζελ (π.χ. διαφορετικές περιοχές άντλησης, ηλικία, κλπ). Η ύπαρξη προδιαγραφών και για τις πρώτες ύλες θα περιορίζε τυχόν μεταβολές στις ιδιότητες του καυσίμου. (31)

Το βιοντίζελ έχει ειδικό βάρος 0,88 σε σύγκριση με το 0,85 για το πετρελαϊκό ντίζελ. Δεν περιέχει άζωτο και αρωματικά και τυπικά περιέχει λιγότερο από 15 ppm θείου. Επίσης, περιέχει 11% κατά βάρος σε οξυγόνο, το οποίο δικαιολογεί την ελαφρώς χαμηλότερη του θερμογόνου δύναμη σε σχέση με το ορυκτό ντίζελ και έχει χαμηλές εκπομπές μονοξειδίου του άνθρακα, σωματιδίων (PM), αιθάλης, και υδρογονανθράκων. Ωστόσο όσον αφορά στις περιβαλλοντικές επιπτώσεις των εκπομπών του βιοντίζελ, τα υψηλότερα ποσοστά

εκπομπών οξειδίων του αζώτου αποτελούν το βασικό μειονέκτημα του, όπως φαίνεται και από το διάγραμμα που ακολουθεί. Το τελευταίο διάστημα όμως, όλο και περισσότερες μελέτες δημοσιεύονται που παρουσιάζουν πιθανούς τρόπους επίλυσης της αυξημένης εκπομπής NOx συνδυάζοντας πολλές και διαφορετικές τεχνολογίες (ανάμειξη ειδικού προσθέτου, μικρές τροποποιήσεις στην λειτουργία των ντιζελοκινητήρων κλπ). (31), (39)



Διάγραμμα 6: Η μείωση στις εκπομπές του βιοντίζελ σε σχέση με καύσιμο που αποτελείται από μείγμα βιοντίζελ-πετροντίζελ (40)

Μια άλλη παράμετρος προς σύγκριση με το πετροντίζελ, είναι το καθαρό ενεργειακό ισοζύγιο το οποίο δίνει τη σχέση της ενέργειας που αποδίδει το καύσιμο (output/kg βιοντίζελ) με την ενέργεια που καταναλώνεται κατά την παραγωγή του (input/kg βιοντίζελ) και αποτελεί σημαντικό δείκτη για την οικονομική και περιβαλλοντική βιωσιμότητα των βιο- καυσίμων. Το βιοντίζελ έχει την υψηλότερη τιμή στο καθαρό ενεργειακό ισοζύγιο σε σχέση με τα υπόλοιπα υγρού καυσίμου και μάλιστα με θετικό πρόσημο καθώς έχουν αναφερθεί τιμές από 2,5-3,2. Αντίθετα, τα περισσότερα ορυκτά καύσιμα παρουσιάζουν αρνητικό ενεργειακό κέρδος, γεγονός που σημαίνει ότι απαιτείται περισσότερη ενέργεια για την ανάκτηση, τη μεταφορά και την επεξεργασία του από αυτή που θα αποδώσει (π.χ. το ορυκτό ντίζελ έχει τιμή 0,83). (41)

Το «πρότυπο» είναι ένα σύνολο τεχνικών προδιαγραφών λειτουργίας που χρησιμοποιείται ως κανόνας λειτουργίας, κατευθυντήρια γραμμή ή ακόμα και για τον ορισμό παραμέτρων. Σκοπός των προτύπων (τουλάχιστον στον τομέα των καυσίμων) είναι η βελτίωση της ποιότητας και της ασφάλειας χρήσης του προϊόντος καθώς και η μείωση των ενδιάμεσων φόρων και την τελικής τιμής.

Οι προδιαγραφές διασφαλίζουν ότι ικανοποιούνται οι ακόλουθοι σημαντικοί παράγοντες στην παραγωγή του βιοντίζελ: Πλήρης αντίδραση μεθεστεροποίησης, απομάκρυνση της γλυκερίνης, απομάκρυνση του καταλύτη, απομάκρυνση της αλκοόλης, απουσία ελεύθερων λιπαρών οξέων και χαμηλή περιεκτικότητα σε θείο.

Για το βιοντίζελ κίνησης, δυο είναι τα ισχύοντα πρότυπα, το ευρωπαϊκό (EN 14214) και το αμερικάνικο (ASTM 6751). (42), (43)

Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται κάποιες από τις πιο σημαντικές ιδιότητες του βιοντίζελ και οι τιμές τους και σε σύγκριση με το ντίζελ.

Πίνακας 3: Επιλεγμένες ιδιότητες για το ντίζελ και το βιοντίζελ (31)

| Fuel Property | Diesel | Biodiesel |
|---------------------------------------|---------------|------------------|
| Fuel Standard | ASTM D975 | ASTM PS 121 |
| Fuel composition | C10-C21 HC | C12-C22 FAME |
| Lower Heating Value, Btu/gal | 131,295 | 117,093 |
| Kin. Viscosity, @ 40 °C | 1.3-4.1 | 1.9-6.0 |
| Specific Gravity kg/l @ 60 °F | 0.85 | 0.88 |
| Density, lb/gal @ 15°C | 7.079 | 7.328 |
| Water, ppm by wt | 161 | .05% max |
| Carbon, wt % | 87 | 77 |
| Hydrogen, wt % | 13 | 12 |
| Oxygen, by dif. wt % | 0 | 11 |
| Sulfur, wt % | .05 max | 0.0 - 0.0024 |
| Boiling Point, °C | 188-343 | 182-338 |
| Flash Point, °C | 60-80 | 100-170 |
| Cloud Point, °C | -15 to 5 | -3 to 12 |
| Pour Point, °C | -35 to -15 | -15 to 10 |
| Cetane Number | 40-55 | 48-65 |
| Stoichiometric Air/Fuel Ratio wt./wt. | 15 | 13.8 |
| BOCLE Scuff, grams | 3,600 | >7,000 |
| HFRR, microns | 685 | 314 |

Τέλος, θα παρουσιαστούν συνοπτικά κάποια βασικά σημεία τα οποία πρέπει να ληφθούν υπόψη όταν εξετάζεται η ικανότητα χρήσης του βιοντίζελ ή μιγμάτων του σαν καύσιμο.

-Για το βιοντίζελ, το σημείο flash είναι συνήθως μεγαλύτερο από 90°C και ανήκει στην κατηγορία των μη επικίνδυνων υλικών. Ένα χαμηλό σημείο flash είναι και ένδειξη ύπαρξης ποσότητας μεθανόλης στο τελικό προϊόν, οπότε με περαιτέρω διαχωρισμό το σημείο flash του βιοντίζελ αυξάνεται (το σημείο flash για το B100 είναι περίπου 150°C).

- Η παρουσία νερού στο βιοντίζελ μπορεί να προκαλέσει ταγγισμό και να αλλάξει τη χημική του δομή. Αν το νερό παραμείνει για μεγάλο διάστημα στο καύσιμο μπορεί να αυξήσει το επίπεδο ελεύθερων λιπαρών οξέων, τα οποία μπορούν να διαβρώσουν τα μεταλλικά μέρη αγωγών διανομής, ή να δημιουργήσει μονογλυκερίδια. Ακόμη και αν το βιοντίζελ δεν περιέχει καθόλου και δεδομένου ότι είναι πιο υγροσκοπικό από το ντίζελ, μπορεί να απορροφά νερό και να το εκρροφά (ανάλογα με τις μεταβολές της θερμοκρασίας).

-Άλλες ενώσεις που μπορεί να υπάρχουν μαζί με το βιοντίζελ είναι τα μονογλυκερίδια ή λάδια που δεν αντέδρασαν κατά την παραγωγική διαδικασία. Οι ενώσεις αυτές, είναι βαρύτερες από το βιοντίζελ και έτσι συσσωρεύονται στον πυθμένα του δοχείου αποθήκευσης.

- Κατά την καύση του, το βιοντίζελ αφήνει στάχτη (αντίθετα με την τέλεια καύση) η οποία οφείλεται σε άκαυστους υδρογονάνθρακες και ανόργανες ακαθαρσίες. Οι ακαθαρσίες οφείλονται κατά κύριο λόγο στην ύπαρξη (ή μη απομάκρυνση) προσθέτων και καταλυτών, και μπορούν να προκαλέσουν αρκετά προβλήματα στον κινητήρα, (όπως αποθέσεις στην αντλία καυσίμου κλπ).

-Η ιδιότητα 'διάβρωση χαλκού' (Copper strip corrosion) αφορά την διαβρωτική επίδραση του καυσίμου σε μέρη του συστήματος διανομής ή του κινητήρα που περιέχουν χαλκό, ορείχαλκο ή άλλα παρόμοια κράματα. Ο έλεγχος αφορά την περιεκτικότητα σε όξινες ή θειούχες ενώσεις.

-Ο αριθμός κετανίου δείχνει τη συμπεριφορά καύσης του καυσίμου μέσα σε κατάλληλο θάλαμο συμπίεσης. Γενικά βιοντίζελ που προέρχεται από πηγές πλούσιες σε κορεσμένα λιπαρά, έχει υψηλότερο αριθμό κετανίου από το αντίστοιχο που προέρχεται από πηγές πλούσιες σε ακόρεστα.

-Γενικά, το βιοντίζελ παγώνει σε υψηλότερες θερμοκρασίες σε σχέση με το πετροντίζελ, γεγονός που δυσχεραίνει τη χρήση του πρώτου έναντι του δεύτερου. Το σημείο θόλωσης (cloud point, CP), είναι η θερμοκρασία στην οποία παρατηρούνται οι πρώτοι κρύσταλλοι στερεού στο καύσιμο καθώς αυτό παγώνει. Είναι άμεσα συνδεδεμένο με το σημείο απόφραξης ψυχρού φίλτρου (cold filter plugging point, CFPP) στο οποίο το καύσιμο φράζει το φίλτρο και εμποδίζει τη λειτουργία του κινητήρα. Το σημείο θόλωσης εξαρτάται από το προφίλ των λιπαρών οξέων από τα οποία παράγεται το βιοντίζελ, καθώς και από τις ακαθαρσίες που περιέχονται στο τελικό προϊόν. Τα μονογλυκερίδια αυξάνουν κατά πολύ το cloud point όπως επίσης και τα κορεσμένα λιπαρά ως πρώτη ύλη.

-Ο αριθμός οξύτητας (acid number), ο οποίος δείχνει την οξύτητα του καυσίμου. Το καθαρό βιοντίζελ δεν είναι καθόλου όξινο. Η οξύτητα μπορεί να υπάρξει κατά το σχηματισμό λιπαρών οξέων με προσρόφηση νερού, ή κατά την απομάκρυνση του καταλύτη με όξινα διαλύματα. Καύσιμα με μεγάλη οξύτητα μπορούν να διαβρώσουν τη δεξαμενή αποθήκευσης, το δίκτυο διανομής κτλ. Ο αριθμός αυτός μπορεί να χρησιμοποιηθεί και ως ένδειξη «παλαιότητας» του καυσίμου, δεδομένου πως το βιοντίζελ οξειδώνεται με την πάροδο του χρόνου.

-Η γλυκερίνη επηρεάζει αρκετά την ποιότητα του βιοντίζελ. Αν βρίσκεται σε μεγαλύτερη ποσότητα από την απαιτούμενη (ή την ορισμένη με βάση τις προδιαγραφές), τότε συσσωρεύεται στον πυθμένα της δεξαμενής και σχηματίζει ένα μίγμα με μεγάλο ιξώδες που μπορεί να φράξει τα φίλτρα στο δίκτυο διανομής και να δημιουργήσει προβλήματα στους κινητήρες. Η γλυκερίνη σχηματίζεται (και παραμένει) στο βιοντίζελ από ατελή αντίδραση εστεροποίησης.

-Το ασβέστιο και το μαγνήσιο μπορούν να προστεθούν στο βιοντίζελ κατά τη διαδικασία παραγωγής του (ενώσεις ασβεστίου χρησιμοποιούνται ως καταλύτες). Η ύπαρξη των δυο αυτών στοιχείων μπορεί να προκαλέσει πολλά προβλήματα, από ελάττωση του χρόνου προκαθορισμένου ελέγχου του κινητήρα, μέχρι σοβαρή φθορά της αντλίας και του πιστονιού και σχηματισμό αποθέσεων.

-Ο φωσφόρος μπορεί να δημιουργήσει προβλήματα στους καταλυτικούς μετατροπείς που χρησιμοποιούνται σε συστήματα ελέγχου εκπομπών και γι' αυτό το ποσοστό του στο βιοντίζελ (και σε κάθε καύσιμο) πρέπει να διατηρείται χαμηλό. Γενικότερα, το βιοντίζελ δεν έχει μεγάλα ποσοστά ύπαρξης φωσφόρου. (44)

3.5 Νομοθεσία

Γενικά, μεταξύ των πιθανών βιοκαυσίμων που απαριθμούνται στην Οδηγία 2003/30/ΕΚ, τα προσφορότερα για την Ελλάδα είναι το βιοντίζελ και η βιοαιθανόλη, ενώ έχει εκδηλωθεί ενδιαφέρον και για τα καθαρά φυτικά έλαια.

Το βιοντίζελ μπορεί να διατεθεί χωρίς προβλήματα μέσω της υπάρχουσας υποδομής της αγοράς πετρελαίου κίνησης στη χώρα μας. Σε πρώτη φάση, από το τέλος Δεκεμβρίου 2005, το βιοντίζελ αναμιγνύεται στα διυλιστήρια ή στις εταιρίες εμπορίας πετρελαιοειδών με το πετρέλαιο κίνησης σε ποσοστό που σήμερα κυμαίνεται περίπου στο 4,5% κατ' όγκο, αλλά μπορεί να ανέλθει μέχρι και 5% κατ' όγκο (όπως προβλέπει και το πρότυπο EN 590:2004) κάτι που αναμένεται προς τις αρχές του 2009, ενώ διατίθεται από το υπάρχον δίκτυο διανομής πετρελαίου κίνησης σε όλη τη εγχώρια αγορά. Αργότερα, μετά την επίλυση κάποιων τεχνικών και θεσμικών θεμάτων, σχεδιάζεται να κυκλοφορήσουν και μίγματα βιοντίζελ με πετρέλαιο κίνησης με ποσοστό ανάμιξης άνω του 5% κατ' όγκο, προοριζόμενο για στόλους αυτοκινήτων (όπως οχήματα δημόσιων μεταφορών, κλπ.), καθώς και αυτούσιο βιοντίζελ.

Παράλληλα εξετάζεται η δυνατότητα χρησιμοποίησης του βιοντίζελ ως καυσίμου θέρμανσης, για βιομηχανική ή άλλες χρήσεις, ακόμη και για παραγωγή ηλεκτρικής ενέργειας ή συμπαραγωγή ηλεκτρισμού και θερμότητας, όπως προβλέπει ο Ν. 3468/2006 «Παραγωγή Ηλεκτρικής Ενέργειας από Ανανεώσιμες Πηγές Ενέργειας και Συμπαραγωγή Ηλεκτρισμού και Θερμότητας Υψηλής Απόδοσης και λοιπές διατάξεις» (45)

3.6 Είναι το βιοντίζελ μια πρακτική και βιώσιμη λύση σήμερα?

Το μεγαλύτερο μειονέκτημα για την εμπορευματοποίηση βιοντίζελ είναι το μεγάλο κόστος παραγωγής του, το οποίο μπορεί να είναι έως και 3 φορές υψηλότερο από του ορυκτού diesel και το οποίο δεν το καθιστά ανταγωνιστικό. (46)

Επί του παρόντος, η σύνθεση του βιοντίζελ γίνεται κυρίως με χημική κατάλυση, καθώς η ενζυμική, αν και έχει μελετηθεί πολύ σε ερευνητικό επίπεδο και έχει σημειωθεί σημαντική πρόοδος στον τομέα αυτό, εξακολουθεί να παρεμποδίζεται για εφαρμογή σε βιομηχανική κλίμακα από το υψηλό της κόστος. Συγκεκριμένα το κόστος παραγωγής ενζυματικά παραγόμενου βιοντίζελ είναι μια τάξη μεγέθους ακριβότερη από τη χημική.

Όσον αφορά την προέλευση της πρώτης ύλης δηλαδή των ελαίων, το κόστος παραγωγής ελαίων μικροβιακής προέλευσης (SCO) παραμένει ακόμη πολύ υψηλότερο σε σχέση με τα φυτικά έλαια. Το κόστος αυτό εξαρτάται κυρίως από το είδος του μικροοργανισμού που επιλέγεται, τη συγκέντρωση λιπιδίων που επιτυγχάνεται στη βιομάζα και την ποσότητα της βιομάζας που θα αναπτυχθεί. Δεδομένου ότι το κόστος για το υπόστρωμα (πηγή άνθρακα)

καταλαμβάνει έως και το 75% του συνολικού κόστους παραγωγής, κρίσιμης σημασίας αποτελεί η δυνατότητα για χρησιμοποίηση φθηνών υποστρωμάτων όπως για παράδειγμα ρευμάτων αποβλήτων από βιομηχανίες επεξεργασίας τροφίμων.

Ενδεικτικά αναφέρεται ότι για το έτος 2008 η τιμή μικροβιακού ελαίου (προερχόμενο από ζύμη) ήταν περίπου 3,0 \$/kg (χωρίς να συμπεριλαμβάνεται το κόστος υποστρώματος), όταν η τιμή για τα έλαια φυτικής προέλευσης κυμαίνεται από 1,4 - 1,9 \$/ kg. Να αναφερθεί επίσης, ότι όσον αφορά στο λίπος προερχόμενο από μικροάλγη, το κόστος του προς το παρόν είναι σημαντικά υψηλότερο από τις προηγούμενες κατηγορίες καθώς κυμαίνεται σε ένα εύρος από 5,6-21 \$/ kg (χωρίς να λαμβάνεται το κόστος εκχύλισης του).

Σύμφωνα με μελέτη, τιμή του βιοντίζελ παραγμένο κατά βάση από μικροβιακό λίπος, έχει υπολογιστεί σε περίπου 5,5 L/ kg, κόστος που μπορεί να μειωθεί έως και κατά 70% και να φτάσει στα 1,7 \$/ L με χρήση σακχάρων προερχόμενα από λιγνινοκυτταρινούχα βιομάζα (συμπεριλαμβανομένων και των κοστών επεξεργασίας της).

Ωστόσο, όπως περιγράφηκε παραπάνω, η ανάγκη για παραγωγή εναλλακτικών πηγών ενέργειας και η προσπάθεια για μη χρησιμοποίηση των φυτικών ελαίων και συνακόλουθα αύξηση του ανταγωνισμού του τομέα της ενέργειας με τα τρόφιμα, έχει σαν αποτέλεσμα την αναγκαιότητα ανακάλυψης νέων (μη συμβατικών) πηγών ελαίων. Προς αυτή την κατεύθυνση, η μέθοδος των μικροβιακών καλλιεργειών έχει τραβήξει το ενδιαφέρον και η εύρεση ελαιογόνων μικροοργανισμών ικανών να παράξουν συγκεκριμένης ποιότητας έλαια σε επαρκείς ποσότητες αποτελεί αντικείμενο πολλών μελετών. (47), (48), (49), (50)

4. Ελαία μικροβιακής προέλευσης- Γενικά

Τα έλαια μικροβιακής προέλευσης, τα οποία εναλλακτικά ονομάζονται και μονοκυτταρικά έλαια (Single Cell Oils), είναι λιπίδια τα οποία παράγονται από ελαιογόνους μικροοργανισμούς, και έχουν αποτελέσει αντικείμενο ενδιαφέροντος και μελέτης για πολλούς ερευνητές κατά τις τελευταίες δεκαετίες λόγω κάποιων ιδιαιτέρων χαρακτηριστικών τους και δυνατοτήτων χρήσης τους. (51), (52)

Η ερευνά για τα μικροβιακά λιπίδια (SCO) έχει μια μακρά ιστορία. Πριν από τη δεκαετία του 1980, πολλοί επιστήμονες είχαν ασχοληθεί με τη βιοχημεία και το μεταβολισμό της συσσώρευσης λιπιδίων σε μικροοργανισμούς. Κατά τα επόμενα 20 χρόνια, άρχισε να ερευνάται ο ρόλος που θα μπορούσε να παίξει το μικροβιακό λίπος και σε φαρμακευτικές/κλινικές εφαρμογές αντικαθιστώντας κάποια ακριβά υλικά όπως το βούτυρο κακάο. Η πρώτη εμπορική παραγωγή μικροβιακού λίπους (SCO) ξεκίνησε το έτος 1995 και κράτησε μόνο για 6 χρόνια μέχρι που διακόπηκε καθώς είχε παύσει να είναι οικονομικά αποδοτική. Κατά τη διάρκεια των δεκαετιών '80 και '90, η διαδικασία της συσσώρευσης λιπιδίων διευκρινίζεται σε μεγάλο βαθμό και οι ερευνητές προσπαθώντας να εξηγήσουν τη συσσώρευση λιπιδίων ανακάλυψαν τα ένζυμα που εμπλέκονται καθώς και τα βασικά ενδιάμεσα για τη βιοσύνθεση των λιπιδίων. Επιπλέον, αντικείμενο μελέτης

αποτέλεσε και η έρευνα για το ποιοι μικροοργανισμοί μπορούν να χαρακτηριστούν σαν ελαιογόνοι. (51), (52)

Το ενδιαφέρον για την μικροβιακή παραγωγή λίπους, αυξάνει συνεχώς καθώς όλο και περισσότερα στοιχεία γνωστοποιούνται σχετικά με την κλινική/διατροφική αξία του και ειδικά για τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα. Ταυτόχρονα, επειδή το κόστος της πρώτης ύλης εξακολουθεί να είναι υψηλό για την παραγωγή βιοντίζελ, όλο και περισσότερες επιστημονικές ομάδες προσπαθούν να χρησιμοποιήσουν μικροβιακό λίπος, του οποίου η σύνθεση είναι παρόμοια με τα παραδοσιακά φυτικά έλαια, ως εναλλακτικές λύσεις για την παραγωγή βιοντίζελ. (51), (53)

Επειδή σήμερα οι μηχανισμοί για τη συσσώρευση λιπιδίων στους μικροοργανισμούς έχουν πλέον αποσαφηνιστεί, οι περισσότεροι ερευνητές επικεντρώνονται στη βελτιστοποίηση της παραγωγικότητας των ζυμώσεων καθώς και στη μείωση του κόστους των διεργασιών αυτών. Προς την κατεύθυνση της μείωσης του κόστους, η ερευνά στρέφεται στην εύρεση φθηνών υποστρωμάτων προς ζύμωση σαν εναλλακτική πρώτη ύλη για την μικροβιακή παραγωγή ελαίων με έμφαση στη χρήση της λιγνοκυτταρινούχας βιομάζας. (51)

Τα μικροβιακά έλαια, πιστεύεται ότι είναι από τις πιο ελπιδοφόρους μεθόδους για την παραγωγή βιοντίζελ καθώς φαίνεται να αποτελούν μια άφθονη πηγή ελαίων με πολλά πλεονεκτήματα όπως σύντομο κύκλο ζωής καθώς οι ζυμώσεις κρατούν μερικές ημέρες και δεν έχουν εξάρτηση από την εποχικότητα, το κλίμα και την περιοχή σε αντίθεση με την περίπτωση των ελαίων φυτικής προέλευσης.

Το ότι οι μικροοργανισμοί είναι ικανοί να παράγουν και να συσσωρεύουν λίπος είναι γνωστό εδώ και πολλά χρόνια αλλά, δεν είναι όλοι οι μικροοργανισμοί ικανοί να κάνουν αυτή τη διαδικασία και επίσης κάποια είδη μικροοργανισμών είναι σε θέση να παράγουν περισσότερο σε σχέση με κάποια άλλα είδη. Πιο συγκεκριμένα, από τα 600 είδη ζυμών, λιγότερα από 30 μέχρι στιγμής έχουν αναγνωριστεί ως ικανά να συσσωρεύουν λιπίδια σε ποσοστό μεγαλύτερο από το 25% του βάρους τους. Για παράδειγμα, τα είδη *Rhodotorula* spp. και *Cryptococcus curvatus* μπορούν να συσσωρεύσουν λιπίδια σε ποσοστό έως και 40-70% επί της βιομάζας τους, ενώ η ζύμη *Saccharomyces cerevisiae* και η *Candida utilis* μπορούν να συσσωρεύσουν λίπος σε ποσοστό 5-10% επί της βιομάζας τους, ακόμη και αν έχουν αναπτυχθεί στις ίδιες συνθήκες καλλιέργειας με τα προαναφερθέντα είδη ζυμών. (52)

4.1 Ελαιογόνοι μικροοργανισμοί

Ως μικροοργανισμοί παραγωγής λίπους (ελαιογόνοι) μπορούν να χαρακτηριστούν ως εκείνοι οι μικροοργανισμοί οι οποίοι μπορούν να συσσωρεύσουν τα παραγόμενα λιπίδια σε ποσοστό μεγαλύτερο από το 20% του ξηρού τους βάρους. Στην κατηγορία αυτή περιλαμβάνονται βακτήρια, ζύμες, μύκητες και μικροφύκη. (51), (52) Κάποιο άλλο, βιοχημικό κριτήριο δεν υπάρχει, ωστόσο η ικανότητα ενός μικροοργανισμού να συσσωρεύει λιπίδια συνδέεται με τη δράση του ενζύμου ATP-λυάση (ATP-lyase, ACL). (54)

Πολλές μελέτες περιγράφουν την εφαρμογή ελαιογόνων οργανισμών για παραγωγή λίπους που θα καταλήξει για παραγωγή βιοντίζελ. Σε ένα πολύ γενικό πλαίσιο, οι μύκητες και τα βακτήρια εφαρμόζονται κυρίως για λειτουργική παραγωγή λιπιδίων, αλλά λιγότερο για την παραγωγή βιοντίζελ σε σχέση με τις ζύμες και τα μικροφύκη. Για παράδειγμα οι ζύμες *Rhodotorula glutinis*, *Rhodosporidium toruloides*, *Trichosporon fermentans*, και *Lipomyces starkeyi*, έχουν τη δυνατότητα να παράγουν λίπος το οποίο μέσω της διαδικασίας της μετεστεροποίησης χρησιμοποιείται για την παραγωγή βιοντίζελ. Επιπλέον, από μικροφύκη, τα πιο ελπιδοφόρα για παραγωγή βιοντίζελ είναι τα *Nannochloropsis oculata*, *Neochloris oleoabundans*, *Cladophora fracta*, *Chlorella protothecoides*, και *Chlorella vulgaris*. Βασικά τους μειονεκτήματα, ωστόσο, αποτελούν οι χαμηλοί και αργοί ρυθμοί ανάπτυξης τους, η εξάρτηση από περιβαλλοντικές/κλιματικές συνθήκες όπως ύπαρξη φωτός, η αναγκαιότητα για χρήση μεγάλων χώρων, η δυσκολία για κλιμάκωση στις καλλιέργειες (scale up) και η ανάπτυξη τους σε περιορισμένης ποικιλίας υποστρώματα. Όσον αφορά στα βακτήρια μόνο λίγα είδη μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την παραγωγή βιοντίζελ καθώς η σύνθεση των λιπιδίων τους δεν είναι κατάλληλη για τέτοια χρήση, παρά τα πλεονεκτήματα που παρουσιάζει η ανάπτυξη τους (υψηλός ρυθμός ανάπτυξης, ευκολίες κατά την καλλιέργεια). Συνεπώς μόνο η χρήση μεταβολικής μηχανικής στα βακτήρια θα μπορούσε να οδηγήσει στον εντοπισμό των νέων βακτηριακών στελεχών για την παραγωγή βιοντίζελ (*Escherichia coli*). (51), (55), (56)

Δεδομένου ότι ο μικροοργανισμός που χρησιμοποιήθηκε στα πλαίσια αυτής της διπλωματικής είναι μύκητας, τα θεωρητικά στοιχεία για την παραγωγή λιπιδίων θα επικεντρωθούν για αυτό το είδος μικροοργανισμών.

Οι μύκητες όπως και οι ζύμες, θεωρούνταν από τα πιο ελπιδοφόρα είδη μικροοργανισμών για την παραγωγή μικροβιακού λίπους (SCO) ήδη από το 1980, καθώς έχει αναφερθεί –και για τα δυο είδη–ότι μπορούν να συσσωρεύσουν ενδοκυτταρικό λίπος σε ποσοστό έως και 80% επί του ξηρού τους βάρους. Η πιο αποδοτική ζύμη, η *Cryptococcus curvatus*, μπορεί να συσσωρεύσει λιπίδια σε ποσοστό που φτάνει μέχρι και > 60% σε βάση ξηρού βάρους, και αυτά τα λιπίδια συνήθως βρίσκονται κατά κύριο λόγο στη μορφή τριακυλογλυκερόλης ή τριγλυκεριδίων (TAG) με ποσοστό σε κορεσμένα λιπαρά οξέα (SFA) περίπου 44%, σύσταση η οποία παρόμοια με εκείνη των ελαίων φυτικής προέλευσης. Οι μύκητες, επιπρόσθετα εμφανίζουν και άλλα πλεονεκτήματα όπως παραγωγή λιπαρών (ελεύθερα λιπαρά οξέα και σαπωνοποιήσιμα) με προφίλ που τα καθιστά ικανά για παραγωγή βιοντίζελ καλής ποιότητας, χρησιμοποίηση πολλών υποστρωμάτων σαν πηγή άνθρακα (διάφορα σάκχαρα συμπεριλαμβανομένης της ξυλόζης, λιγνινοκυταρινούχα

βιομάζα) και ικανότητα ανάπτυξης σε συνθήκες ζύμωσης στερεάς κατάστασης (SSF), τεχνική χαμηλού κόστους. (51), (47)

Γενικά, οι ζύμες και μύκητες συσσωρεύουν το λίπος σε μορφή τριγλυκεριδίων πλούσια σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα. Για παράδειγμα το ελαϊκό (18:1), το λινελαϊκό (18:2), το παλμιτικό (16:00) και το παλμιτελαϊκό οξύ (C16: 1) είναι από τα πιο συχνά λιπαρά οξέα που απατώνται στη σύσταση των λιπιδίων σε αυτά τα είδη μικροοργανισμών. Οι μύκητες από την άλλη, συσσωρεύουν λίπος με ικανοποιητικό ποσοστό κορεσμένων λιπαρών οξέων. (51), (35)

Κατά τα τελευταία έτη, έχει αυξηθεί ο αριθμός μελετών πάνω σε ελαιγόνους μικροοργανισμούς ικανούς να παράγουν και να συσσωρεύουν λιπίδια (SCO) που θα χρησιμοποιηθούν κυρίως για την παραγωγή βιοντίζελ.

Στους μικροοργανισμούς η έκταση της συσσώρευσης λιπιδίων καθορίζεται από τη γενετική σύσταση τους, ενώ η μέγιστη εφικτή ποσότητα λιπιδίων που μπορεί να συσσωρευτεί σε καθέναν μπορεί να ποικίλει σε μεγάλο βαθμό μεταξύ των ειδών, ακόμη και μεταξύ των στελεχών. Ωστόσο σημαντική επίδραση έχουν και οι συνθήκες καλλιέργειας, τόσο για τη διαφορετική ποσότητα και ποιοτική σύσταση των λιπιδίων που θα συσσωρευτούν τελικά. (51), (52)

Με βάση δεδομένα βιβλιογραφίας καθώς και με τα παραπάνω παραδείγματα που παρουσιάστηκαν, είναι γενικά αποδεκτό ότι οι ζύμες και οι μύκητες είναι από τους βασικούς μικροοργανισμούς που έχουν πολλές δυνατότητες να χρησιμοποιηθούν για την παραγωγή μικροβιακού λίπους το οποίο θα αξιοποιηθεί για την παραγωγή βιοντίζελ.

Πίνακας 4: Η περιεκτικότητα σε έλαια επί ξηρής βιομάζας για κάποια αντιπροσωπευτικά είδη μικροοργανισμών (52)

| Microorganisms | Oil content (% dry wt) | Microorganisms | Oil content (% dry wt) |
|------------------------------------|------------------------|-------------------------------|------------------------|
| Microalgae | | Yeast | |
| <i>Botryococcus braunii</i> | 25–75 | <i>Candida curvata</i> | 58 |
| <i>Cylindrotheca</i> sp. | 16–37 | <i>Cryptococcus albidus</i> | 65 |
| <i>Nitzschia</i> sp. | 45–47 | <i>Lipomyces starkeyi</i> | 64 |
| <i>Schizochytrium</i> sp. | 50–77 | <i>Rhodotorula glutinis</i> | 72 |
| Bacterium | | Fungi | |
| <i>Arthrobacter</i> sp. | >40 | <i>Aspergillus oryzae</i> | 57 |
| <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> | 27–38 | <i>Mortierella isabellina</i> | 86 |
| <i>Rhodococcus opacus</i> | 24–25 | <i>Humicola lanuginosa</i> | 75 |
| <i>Bacillus alcalophilus</i> | 18–24 | <i>Mortierella vinacea</i> | 66 |

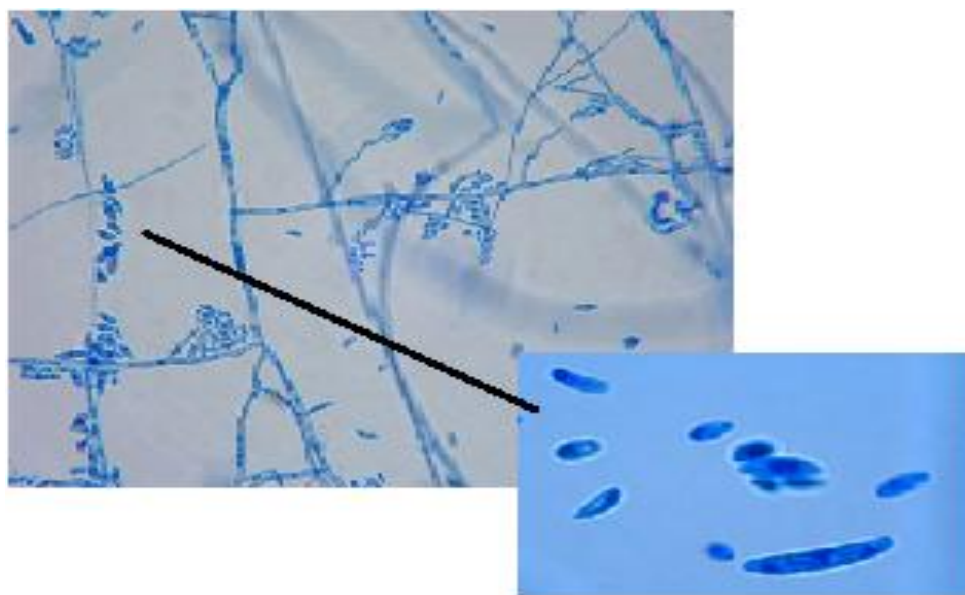
Πίνακας 5: Η ποιοτική σύσταση των παραγόμενων λιπιδίων ανά κατηγορία μικροοργανισμού (52)

| Microorganisms | Lipid composition (w/total lipid) | | | | | |
|----------------|-----------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | C16:0 | C16:1 | C18:0 | C18:1 | C18:2 | C18:3 |
| Microalga | 12-21 | 55-57 | 1-2 | 58-60 | 4-20 | 14-30 |
| Yeast | 11-37 | 1-6 | 1-10 | 28-66 | 3-24 | 1-3 |
| Fungi | 7-23 | 1-6 | 2-6 | 19-81 | 8-40 | 4-42 |
| Bacterium | 8-10 | 10-11 | 11-12 | 25-28 | 14-17 | - |

4.2 Ο μύκητας *Fusarium oxysporum*

Ο μύκητας *Fusarium oxysporum* είναι ένας νηματοειδής μύκητας, ο οποίος αποτελεί παθογόνο παράγοντα μόλυνσης σε πολλά είδη φυτών και καλλιεργήσιμων σοδιών όπως βαμβάκι, μπανάνα, φοινικόδεντρο.

Η ταξινόμηση των μυκήτων που ανήκουν στο γένος *Fusarium* είναι η εξής: Eukaryota:(Υπερβασιλείο), Fungi Phylum Ascomycota:(Βασιλείο), Sordariomycetes: (Κλάση), Hygrocreales: (Τάξη), Nectriaceae: (Οικογένεια), *Fusarium*: (Γένος), *Fusarium oxysporum*: (Είδος). (57)



Εικόνα 4: Ο μύκητας *Fusarium oxysporum* στο μικροσκόπιο με μικρότερη και μεγαλύτερη εστίαση

Όσον αφορά στη χρησιμοποίησή του σε ζυμώσεις, υπάρχουν πολλές βιβλιογραφικές αναφορές για εφαρμογή του στην παραγωγή αιθανόλης αλλά λιγότερες στην παραγωγή μικροβιακού λίπους. Από τη δεκαετία του 1980, οπότε και άρχισε να ερευνάται η μικροβιακή παραγωγή λίπους πιο συστηματικά, σύμφωνα με μελέτες, ο μύκητας αυτός είχε αναγνωρισθεί σαν δυνητικά ελαιογόνος, όπως φαίνεται και στον πίνακα που ακολουθεί.

Πίνακας 6: Μελέτες για την εύρεση μικροοργανισμών που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για παραγωγή μικροβιακού λίπους (58)

| S. No | Name of organisms | Results | | | |
|-------|----------------------------------|---------|----|--------------------------------------|---|
| 1 | <i>Arachnia terrutic</i> | - | 26 | <i>D. papendorffii</i> | - |
| 2 | <i>Aspergillus carbonarius</i> | - | 27 | <i>D. rostrata</i> | - |
| 3 | <i>A. Clavatus</i> | - | 28 | <i>Epicoculum nigricans</i> | - |
| 4 | <i>A. candidus</i> | + | 29 | <i>Fusarium acuminatum</i> | + |
| 5 | <i>A. flavus</i> | - | 30 | <i>F. moniliforme</i> | - |
| 6 | <i>A. fumigatus</i> | - | 31 | <i>F. oxysporum</i> | + |
| 7 | <i>A. giganteus</i> | + | 32 | <i>F. semitectum</i> | + |
| 8 | <i>A. nidulans</i> | + | 33 | <i>F. solani</i> | + |
| 9 | <i>A. niger</i> | + | 34 | <i>Helminthosporium nodulosum</i> | - |
| 10 | <i>A. ochraceus</i> | - | 35 | <i>H. tetramea</i> | - |
| 11 | <i>A. oryzae</i> | - | 36 | <i>Monilia stophila</i> | - |
| 12 | <i>A. sydowi</i> | + | 37 | <i>Penicillium aurantio-brunneum</i> | - |
| 13 | <i>A. terreus</i> | - | 38 | <i>P. chrysogneum</i> | - |
| 14 | <i>A. ustus</i> | + | 39 | <i>P. crustorum</i> | - |
| 15 | <i>A. versicolor</i> | - | 40 | <i>P. cyaneum</i> | - |
| 16 | <i>Blastoeladiella emersonii</i> | - | 41 | <i>P. expansum</i> | - |
| 17 | <i>Candida albicans</i> | - | 42 | <i>P. funiculosum</i> | + |
| 18 | <i>Cladosporium clamptoniae</i> | - | 43 | <i>P. javanicum</i> | - |
| 19 | <i>Circinella museae</i> | - | 44 | <i>P. oxalicum</i> | - |
| 20 | <i>Curvularia clavata</i> | - | 45 | <i>P. oxysporum</i> | + |
| 21 | <i>C. lunata</i> | - | 46 | <i>P. vinaceum</i> | - |
| 22 | <i>C. ovoidea</i> | - | 47 | <i>Rhodotorula glutinis</i> | - |
| 23 | <i>C. tuberculata</i> | - | | | |
| 24 | <i>C. versiculosa</i> | - | | | |
| 25 | <i>Drechslera hawaiiensis</i> | - | | | |

Στη συνέχεια θα δοθούν κάποια αποτελέσματα για παραγωγή λίπους αυτού του μικροοργανισμού, από μελέτες που έχουν βρεθεί στη βιβλιογραφία:

-Με χρήση γλυκόζης (20g/L) σαν πηγή άνθρακα και νιτρικού αμμωνίου (1g/L) σαν πηγή αζώτου έχει αναφερθεί παραγωγή λίπους έως και 48,9% επί ξηρής βιομάζας ενώ με την ίδια πηγή άνθρακα (40g/L) και με νιτρικό νάτριο (1g/L) σαν πηγή αζώτου, αναφέρεται παραγωγή λίπους έως και 44,9% επί ξηρής βιομάζας. (58)

-Με χρήση σακχαρόζης σαν πηγή άνθρακα και νιτρικού αμμωνίου σαν πηγή αζώτου επετεύχθη παραγωγή λίπους 51% επί ξηρής βιομάζας. Σύμφωνα με την ίδια μελέτη το προφίλ των λιπαρών που παρήχθησαν έχει ως εξής: καπριλικό οξύ (C8): 0,5%, πελαργονικό οξύ(C9): 0,3%, καπρικό οξύ (C10): 0,5%, λαυρικό οξύ (C12): 1,75%, μυριστικό οξύ (C14): 7,6%, παλμιτικό οξύ (C16): 29,5% και ολεϊκό οξύ(C18:1): 52,5%. Επίσης από το 92,5% των λιπαρών οξέων που παρήχθησαν, το 43,4 ήταν κορεσμένα και το υπόλοιπο 56,6 ακόρεστα. (59)

- Με χρήση σακχαρόζης (50g/L) σαν πηγή άνθρακα και νιτρικό κάλιο (0,4g/L) σαν πηγή αζώτου επετεύχθη παραγωγή λίπους 25,8% επί ξηρής βιομάζας και 0,98 g λίπους/L, ενώ με χρήση νιτρικού αμμωνίου (0,4g/L) σαν πηγή αζώτου επετεύχθη παραγωγή λίπους 17,4% επί ξηρής βιομάζας και 1,74 g λίπους/L. Στην ίδια μελέτη είχε γίνει και διερεύνηση της βέλτιστης συγκέντρωσης πηγής άνθρακα και συγκεκριμένα της σακχαρόζης, η οποία βρέθηκε ότι ήταν 25 g/L με παραγωγή λίπους 24,6% επί ξηρής βιομάζας και 2,88 g λίπους/L. (πηγή αζώτου νιτρικό κάλιο 2,88 g/L). Τέλος, μεταξύ διαφορετικών πηγών άνθρακα, η καλύτερη προέκυψε ότι είναι η σακχαρόζη (παραγωγή λίπους 26,5% επί ξηρής βιομάζας και 2,96 g λίπους/L) , ακολουθούμενη από τη γλυκόζη (παραγωγή λίπους 24,8% επί ξηρής

βιομάζας και 2,48 g λίπους/L)και από τη μελάσα (παραγωγή λίπους 15,9% επί ξηρής βιομάζας και 1,58 g λίπους/L) για συγκέντρωση πηγής άνθρακα 50g/L και πηγή αζώτου νιτρικό κάλιο 2,88g/L. (60)

Επιπρόσθετα, ένα θετικό χαρακτηριστικό του είναι ότι διαθέτει ο ίδιος τα κατάλληλα ένζυμα (κυτταρινάσες, ημικυτταρινάσες), τα οποία των καθιστούν ικανό να μπορεί να διασπάσει και υποστρώματα που προέρχονται από λιγνινοκυτταρινούχα βιομάζα σε απλά σάκχαρα τα οποία θα καταναλώσει. (61)

Σαν μύκητας λόγω των υφών που αναπτύσσει, όπως αναλύεται στη συνέχεια, μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε καλλιέργειες στερεής κατάστασης, με το πλεονέκτημα του χαμηλού κόστους διεργασίας.

4.3 Συνθήκες καλλιέργειας και η επίδραση τους

Πολλοί παράγοντες έχουν επίδραση στο ρυθμό ανάπτυξης της βιομάζας και στη βιοσύνθεση των λιπιδίων, συμπεριλαμβανομένων της σύνθεσης του μέσου ανάπτυξης, το pH του, τη θερμοκρασία και τα επίπεδα αερισμού (οξυγόνο). (54)

Η πηγή άνθρακα μπορεί να επηρεάσει σημαντικά τη βιοσυσσώρευση λιπιδίων τόσο ποσοτικά όσο και ποιοτικά, λόγω διαφορών κατά το μεταβολισμό τους. Συνήθως η γλυκόζη αποτελεί την καλύτερη πηγή άνθρακα. (49), (54)

Ο βαθμός περιορισμού του περιοριστικού παράγοντα (άζωτο), συχνά καθορίζει την ποσότητα της βιομάζας που παράγεται, ενώ η συγκέντρωση της πηγής άνθρακα καθορίζει σε μεγάλο βαθμό την ποσότητα των λιπιδίων που θα παραχθούν. Οι δυο παραπάνω παράμετροι συνοψίζονται στο λόγο C/N. Γενικά, για να ξεκινήσει η διαδικασία συσσώρευσης λιπιδίων απαιτείται λόγος C/N > 20. Όσο αυξάνεται ο λόγος C/N αυξάνεται και η ποσότητα των παραγόμενων λιπιδίων αλλά σε εφαρμογή πολύ υψηλών λόγων μειώνεται, γεγονός που υποδηλώνει ότι υπάρχει ένας βέλτιστος λόγος C/N για τη μέγιστη συγκέντρωση λιπιδίων. (48)

Ο (ειδικός) ρυθμός πρόσληψης σακχάρων (qS), αναφέρεται ότι έχει επίδραση στην συσσώρευση των αποθεματικών λιπιδίων στα κύτταρα/μυκηλκία. Για παράδειγμα στην περίπτωση του μύκητα *Cunninghamella Echinulata* με υπόστρωμα υδρολύμα παραπροϊόντων από επεξεργασία τομάτας ή άχυρου, η μειωμένη πρόσληψη σακχάρων είχε σαν αποτέλεσμα αύξηση της παραγόμενης βιομάζας αλλά μείωση των παραγόμενων λιπιδίων. Αυτό συμβαίνει διότι, σε υψηλές ρυθμούς πρόσληψης, η ροή του άνθρακα ενισχύθηκε και έτσι ο άνθρακας διοχετευόταν στο εσωτερικό των μυκηλκίων πιο γρήγορα και σε μεγαλύτερες ποσότητες προς την κατευθυνση σύνθεσης βιομάζας ελεύθερης λίπους. (48)

Η πηγή αζώτου έχει αναφερθεί, επίσης, να είναι ιδιαίτερα σημαντική για την έκταση της συσσώρευσης λιπιδίων για τους ελαιογόνους μύκητες και ζύμες. Η χρήση οργανικών πηγών άνθρακα λόγω της περιεκτικότητας τους σε άλλες πρωτεΐνες, συνήθως επιταχύνουν την

κατανάλωση υποστρώματος και ευνοούν μεγαλύτερη συγκέντρωση λιπιδίων (ζύμη *R. Toruloides* και μύκητας *C. Echinulata*). Ωστόσο, αυτό δεν αποτελεί κανόνα καθώς υπάρχουν περιπτώσεις όπου η χρήση ανόργανων πηγών αζώτου ευνοεί τη συσσώρευση λιπιδίων (ζύμη *Cryptococcus albidus*). (48)

Σημαντική επίσης παράμετρο αποτελεί και η θερμοκρασία επώασης, με επίδραση τόσο στην ποσότητα των παραγόμενων λιπιδίων όσο και στα ποιοτικά τους χαρακτηριστικά, καθώς συνδέεται με δράσεις ενζύμων που συμμετέχουν στη βιοσυσσώρευση λιπιδίων. (48)

Όσον αφορά στο pH της καλλιέργειας, δεδομένου ότι οι περισσότεροι μικροοργανισμοί είναι σε θέση να αναπτύσσονται σε μία ευρεία περιοχή τιμών, δεν αποτελεί πολύ σημαντικό παράγοντα για τη συσσώρευση λιπιδίων. (48)

Τέλος, βασική προϋπόθεση για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών αποτελεί και η παρουσία ποσοτήτων μεταλλοιδίων όπως Mg^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{+3} , τα οποία παρέχονται με την προσθήκη των αντίστοιχων αλάτων τους. (62)

4.4 Είδη και τύποι καλλιέργειας

ΩΣ ΠΡΟΣ ΠΕΡΙΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΣΤΕΡΕΩΝ

Η τεχνική ζύμωσης που θα χρησιμοποιεί έχει τεράστια σημασία διότι έχει επίδραση στην παραγωγικότητα αλλά και αποτελεί μια σημαντική παράμετρο στη διαμόρφωση του κόστους της διεργασίας. Γενικά, δυο είναι οι βασικές κατηγορίες της ζύμωσης: (i) η βυθισμένη ή υγρή ζύμωση (submerged fermentation-SmF ή liquid fermentation-LF) και (ii) η ζύμωση στερεής κατάστασης (solid state fermentation-SSF).

Στη βυθισμένη ή υγρή ζύμωση χρησιμοποιούνται υγρά υποστρώματα, στα οποία τα θρεπτικά είναι διαλυμένα σε αυτά. Είναι καταλληλότερη για μικροοργανισμούς, όπως βακτήρια, που απαιτούν υψηλά ποσοστά ενεργότητας νερού.

Στη ζύμωση στερεάς κατάστασης, χρησιμοποιούνται στερεά υποστρώματα, όπως πίτουρο, άχυρο, υπολείμματα ζαχαροκάλαμου (βαγάση), σόργο κ.α. Το κύριο πλεονέκτημα της μεθόδου αυτής είναι ότι μπορούν να χρησιμοποιηθούν σαν υποστρώματα απόβλητα/παραπροϊόντα, τα οποία είναι πλούσια σε θρεπτικά συστατικά και να παραχθούν προϊόντα υψηλής προστιθέμενης αξίας. Σε αυτή την τεχνική, συνήθως τα υποστρώματα καταναλώνονται αργά επιτρέποντας μεγάλα χρονικά διαστήματα ζύμωσης. Η ζύμωση στερεάς κατάστασης είναι καταλληλότερη για μύκητες κυρίως ή μικροοργανισμούς που απαιτούν χαμηλά επίπεδα ενεργότητας νερού. Μάλιστα, οι μύκητες κατέχουν βασικό ρόλο στη μέθοδο αυτή, καθώς η ανάπτυξη των υφών τους, τους επιτρέπει να διεισδύουν αποτελεσματικά και να χρησιμοποιούν το στερεό υπόστρωμα ενώ μπορούν να χρησιμοποιήσουν το δεσμευμένο νερό του υποστρώματος και ως εκ τούτου αναπτύσσονται απουσία ελεύθερου νερού. Επίσης άλλο πλεονέκτημα της μεθόδου αυτής αποτελεί η υψηλότερη παραγωγικότητα και γενικότερα η κατανάλωση μικρότερων όγκων που

καθιστούν τις διαδικασίες κατά γενική βάση πιο οικονομικά βιώσιμες. Βασικό μειονέκτημα της αποτελεί η δυσκολία για εφαρμογή της σε βιομηχανική κλίμακα καθώς τότε παρουσιάζονται προβλήματα όπως η σταδιακή ανάπτυξη βαθμίδων θερμοκρασίας, pH, υγρασίας, συγκέντρωσης υποστρώματος ή O₂, που είναι δύσκολο να ρυθμιστούν υπό συνθήκες περιορισμένης διαθεσιμότητας νερού. (63), (64), (65)

Στα πλαίσια της παρούσας διπλωματικής, όλες οι ζυμώσεις που πραγματοποιήθηκαν με υπόστρωμα το γλυκό σόργο μπορούν να χαρακτηρισθούν σαν κάτι «ενδιάμεσο» της υγρής ζύμωσης και της ζύμωσης στερεάς κατάστασης, αφού υπήρχαν μεν στερεά αλλά και σχετικά υψηλή ενεργότητα νερού.

ΩΣ ΠΡΟΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

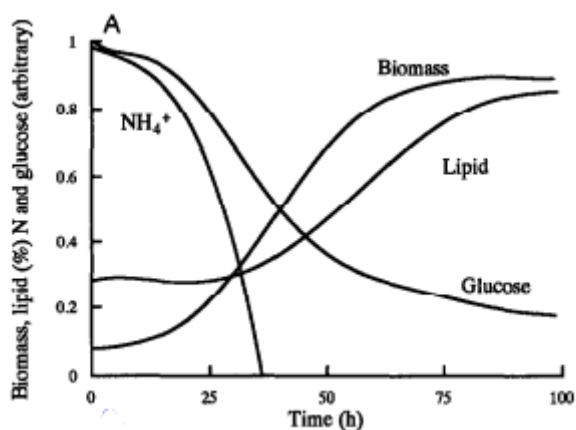
Γενικά οι μελέτες που έχουν γίνει στη μικροβιακή παραγωγή λίπους και σε περιοριστικές συνθήκες αζώτου περιλαμβάνουν διαδικασίες ασυνεχούς ή διαλείποντος έργου (batch), ημι-διαλείποντος (fed-batch) είτε σε φιάλη είτε σε βιοαντιδραστήρα και συνεχούς λειτουργίας ενός σταδίου (single stage continuous) ή συνεχούς έργου με ανακύκλωση βιομάζας (continuous with biomass recycling cultures). (66), (56)

Στα πλαίσια της παρούσας διπλωματικής, όλες οι ζυμώσεις που πραγματοποιήθηκαν ήταν ασυνεχούς έργου και σε φιάλες.

4.5 Η βιοχημεία πίσω από τη συσσώρευση ενδοκυτταρικού λίπους

Η βιοσύνθεση λιπιδίων, χρησιμοποιώντας σαν υπόστρωμα σάκχαρα και συναφή συστατικά, αποτελεί ένα παράδειγμα δευτερογενούς αναβολικής δραστηριότητας και ξεκινάει μετά από εξάντληση κάποιου απαραίτητου θρεπτικού συστατικού στο μέσο.

Η συσσώρευση των λιπιδίων σε έναν ελαιογόνο μικροοργανισμό, αρχίζει όταν εξαντλείται ένα θρεπτικό από το μέσο (συνήθως άζωτο), αλλά υπάρχει περίσσεια άνθρακα, η οποία είναι ακόμη αφομοιώσιμη από τα κύτταρα και μετατρέπεται σε τριγλυκερίδια (TAG). Ο περιορισμός του αζώτου επιπλέον, εμποδίζει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων και το παραγόμενο λίπος αποθηκεύεται στα ήδη υπάρχοντα κύτταρα, τα οποία δεν μπορούν να διαιρεθούν. Επομένως, γίνεται συσσώρευση λίπους. Για την ακρίβεια η βιομάζα αυξάνεται αλλά ο ρυθμός αύξησης της είναι μειωμένος, λόγω της έλλειψης του θρεπτικού. (52), (54), (50)



Διάγραμμα 7: Τυπικό διάγραμμα για την ανάπτυξη της βιομάζας και την πορεία συσσώρευσης των λιπιδίων σε συνθήκες ασυνεχούς καλλιέργειας (batch) (67)

Δύο είναι τα κρίσιμα και ρυθμιστικά ένζυμα που έχουν επίδραση στην συσσώρευση λιπιδίων στα κύτταρα: το ένα είναι το μηλικό ένζυμο (malate enzyme) συμπεριλαμβανομένου του ATP (τριφωσφορική αδενοσίνη) και το ένζυμο ATP κιτρική λυάση (ATP citrate lyase-ACL). Όσον αφορά στη δράση του μηλικού ενζύμου, να αναφερθεί ότι η χαμηλή ενεργότητα του μπορεί να μειώσει και να διακόψει την κατανάλωση γλυκόζης κατά τη διάρκεια της βιοσυσσώρευσης λιπιδίων. Για το ATP κιτρική λυάση, υπάρχει ισχυρή συσχέτιση μεταξύ της παρουσίας δραστηριότητας του και της ικανότητας των ελαιογόνων μικροοργανισμών (ζύμες και μύκητες) να συσσωρεύουν λίπος. Γενικά, η παρουσία του ενζύμου ACL αποτελεί προϋπόθεση για την πραγματοποίηση της συσσώρευσης λιπιδίων αλλά η ύπαρξη του δεν διαβεβαιώνει ότι θα γίνει συσσώρευση λιπιδίων στον εκάστοτε μικροοργανισμό, καθώς υπάρχουν και άλλα ένζυμα τα οποία είναι υπεύθυνα για τον έλεγχο της έκτασης της βιοσύνθεσης λιπιδίων. Επίσης, για να επιτευχθεί η σύνθεση των λιπαρών οξέων, είναι απαραίτητη η παροχή μεγάλης ποσότητας αναγωγικών ουσιών όπως το NADPH. Η σύνθεση 1 mol ενός λιπαρού οξέος με 18 άτομα άνθρακα (C18) απαιτεί 16 mols NADPH. Τέλος, καθοριστικής σημασίας είναι και η δράση του ενζύμου AMP- desaminase, η λειτουργία και ο ρόλος του οποίου περιγράφεται παρακάτω. (52), (66), (68), (50), (48)

Στο κομμάτι αυτό θα περιγραφεί η «De novo» συσσώρευση των κυτταρικών λιπιδίων, η οποία περιλαμβάνει την χρήση υδρόφιλων υποστρωμάτων σαν πηγή άνθρακα και η οποία ακολουθήθηκε στα πλαίσια των πειραμάτων της παρούσας διπλωματικής. Σε αντίθεση, υπάρχει και η «Ex novo» συσσώρευση λιπιδίων, κατά την οποία χρησιμοποιούνται υδρόφοβα υποστρώματα. Σύγκριση με παραδείγματα των δυο ειδών συσσώρευσης λιπιδίων θα περιγραφεί παρακάτω.

Η «De novo» συσσώρευση λιπιδίων, είναι μια αναβολική βιοχημική διαδικασία στην οποία, μέσω του acetyl-CoA που παράγεται από τον ενδιάμεσο κυτταρικό μεταβολισμό, δημιουργούνται τελικά λιπαρά οξέα, τα οποία στη συνέχεια εστεροποιούνται με γλυκερίνη, παράγοντας δομικά λιπίδια (φωσφολιπίδια, σφιγγολιπίδια) και αποθεματικά (κυρίως TAGs) λιπίδια.

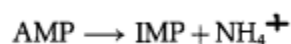
Η «De novo» σύνθεση λιπιδίων, περιλαμβάνει μεγάλο αριθμό πηγών άνθρακα για χρήση σαν υποστρώματα για ελαιογόνους μικροοργανισμούς με εξαίρεση τη μεθανόλη και την κυτταρίνη. Χρησιμοποιούνται απλά σάκχαρα όπως γλυκόζη και φρουκτόζη, δισακχαρίτες λακτόζη, σακχαρόζη, αλλά και υλικά όπως ορός γάλακτος, απόβλητα με περιεκτικότητα σε διάφορα σάκχαρα, μελάσα, κλπ. Πρόσφατα το ενδιαφέρον έχει στραφεί στο μονοσακχαρίτη ξυλόζη, που προκύπτει μετά από χημική υδρόλυση διαφόρων λιγνινοκυτταρινούχων υλικών, λόγω της αφθονίας του. Επιπλέον, έχει μελετηθεί και η χρησιμοποίηση υποστρωμάτων με βάση πιο σύνθετα σάκχαρα όπως πολυσακχαρίτες (π.χ. άμυλο και πηκτίνη). (66)

Μολονότι τα παραπάνω υποστρώματα μεταβολίζονται από μικροοργανισμούς, τα αποτελέσματα από άποψη τόσο της παραγόμενης ποσότητας λιπιδίων όσο και της ποιοτικής σύνθεσης των λιπαρών οξέων που παράγονται, παρουσιάζουν αξιοσημείωτες διαφορές. (66)

Η βιοχημεία, της «De novo» βιοσύνθεσης λιπιδίων, μπορεί να χωριστεί σε δυο διακριτά μέρη: το ενδιάμεσο κυτταρικό μεταβολισμό και τη βιοσύνθεση των TAGs.

Το καθαρό προϊόν της γλυκόλυσης είναι πυροσταφυλικό οξύ, το οποίο περνά μέσω της μιτοχονδριακής μεμβράνης στο εσωτερικό του μιτοχονδρίου. Στη συνέχεια, η πυροσταφυλική αφυδρογονάση καταλύει το σχηματισμό του acetyl-CoA από πυροσταφυλικό οξύ και έπειτα το acetyl-CoA είτε εισέρχεται στον κύκλο του Krebs, ή μεταφέρεται και πάλι μέσα στο κυτταρόπλασμα προκειμένου να ενισχύσει τη βιοσύνθεση των λιπαρών οξέων. Στους ελαιογόνους μικροοργανισμούς, το acetyl-CoA προέρχεται από τη διάσπαση του κιτρικού οξέος, το οποίο υπό ορισμένες συνθήκες έχει προηγουμένως συσσωρευτεί στα μιτοχόνδρια και μεταφέρεται μέσα στο κυτταρόπλασμα.

Το βασικό στάδιο για τη συσσώρευση λιπιδίων στα ελαιογόνα είδη είναι η αλλαγή της ενδοκυτταρικής συγκέντρωσης διαφόρων μεταβολιτών, σαν αποτέλεσμα μετά την εξάντληση ορισμένων θρεπτικών συστατικών στο μέσο καλλιέργειας. Στην περίπτωση εξάντλησης του αζώτου, αυτή έχει σαν αποτέλεσμα συσσώρευση αποθεματικών λιπιδίων. Η εξάντληση του, προκαλεί μια ταχεία μείωση της συγκέντρωσης του ενδοκυτταρικού AMP (μονοφωσφορική αδενοσίνη) [και μέσω της δράσης της AMP- desaminase,] το AMP διασπάται σε IMP (inosine monophosphate) και ιόντα NH_4^+ . Τα ιόντα NH_4^+ αποτελούν μια συμπληρωματική πηγή αζώτου, απαραίτητη για τη σύνθεση του κυτταρικού υλικού μετά τον περιορισμό εξωκυτταρικού αζώτου.



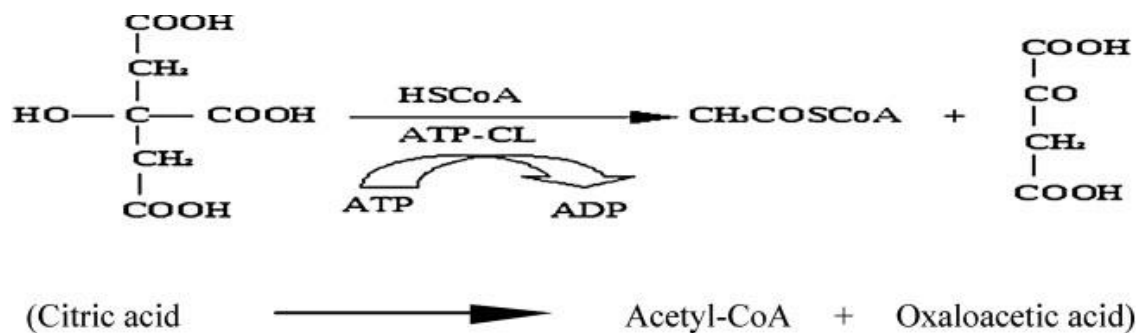
Η υπερβολική μείωση της ενδοκυτταρικής συγκέντρωσης AMP μεταβάλλει τη λειτουργία κύκλο του Krebs. Το NAD^+ - (και σε διάφορες περιπτώσεις το NADP^+) ισοκιτρική αφυδρογονάση, ένζυμο που είναι υπεύθυνο για τη μετατροπή του ισοκιτρικού οξέος σε ακετογλουταρικό οξύ, χάνει την ενεργότητα του καθώς ενεργοποιείται αλλοστερικά από το ενδοκυτταρικό AMP. Έτσι, το ισοκιτρικό οξύ συσσωρεύεται στο εσωτερικό του μιτοχονδρίου. Αυτό το οξύ βρίσκεται σε ισορροπία με το κιτρικό (αντίδραση που καταλύεται από το ένζυμο isocitrate acotinase- κύκλος τρικαρβοξυλικού οξέος).

ισοκιτρικό οξύ <-> κιτρικό οξύ

Όταν η ενδο-μιτοχονδριακή συγκέντρωση κιτρικού οξέος φτάσει μία κρίσιμη τιμή, το κιτρικό οξύ εισέρχεται στο κυτταρόπλασμα σε ανταλλαγή με το μηλικό. Τέλος, το κιτρικό οξύ διασπάται από την ATP - κιτρική λυάση (ATP - CL), σε acetyl-CoA και οξαλοξικό.

Το acetyl-CoA, με την αντίστροφη αντίδραση της β - οξείδωσης, θα δημιουργήσει λιπαρά οξέα. Το NADPH, απαραίτητο για τη βιοσύνθεση λιπαρών οξέων, παρέχεται από το ενδιάμεσο κυτταρικό μεταβολισμό, στον οποίο η σημασία του μηλικό ένζυμο (malic enzyme) είναι καθοριστικής σημασίας, όπως θα αναλυθεί παρακάτω.

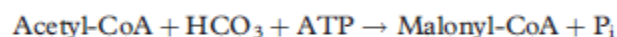
Η αντίδραση που καταλύεται μέσω του ενζύμου ACL απεικονίζεται στο παρακάτω σχήμα:



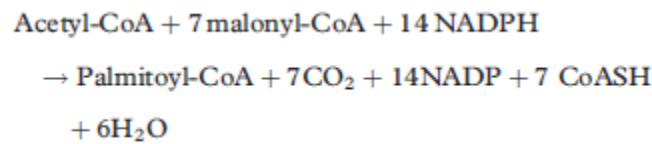
Το προϊόν που προκύπτει από τη δράση του ενζύμου ACL, επομένως, είναι acetyl- CoA που θα μετατραπεί περαιτέρω σε ενδο-κυτταρικά λιπαρά οξέα και οξαλοξικό. Το οξαλοξικό θα μετατρέπεται σε μηλικό οξύ και θα επιστρέψει στο μιτοχόνδριο για να μετατραπεί σε μηλικό προς σχηματισμό κιτρικού. Εάν το ενζυματικό αυτό σύμπλοκο δεν υπάρχει, η εξάντληση του αζώτου οδηγεί στην συσσώρευση κιτρικού οξέος στο εσωτερικό του κυτταροπλάσματος. Στην περίπτωση αυτή, το κιτρικό οξύ είτε θα αποβληθεί στο μέσο της καλλιέργειας (περίπτωση της παραγωγής κιτρικού οξέος με *Aspergillus niger* και στελέχη *Candida* sp.) ή θα προκαλέσει την αναστολή της 6-φωσφορο-φρουκτοκινάσης, με αποτέλεσμα την ενδοκυτταρική συσσώρευση πολυσακχαριτών. (περίπτωση του *Aureobasidium pullulans*).

Τα στάδια του ενδιάμεσου μεταβολισμού της «de novo» βιοσύνθεσης λιπιδίων παρουσιάζονται στο σχήμα που ακολουθεί:

Η πρώτη αντίδραση για τη βιοσύνθεσης λιπαρού οξέος, είναι η ακόλουθη και καταλύεται από το ένζυμο καρβοξυλάση του acetyl-CoA (acetyl-CoA carboxylase), το οποίο για κάποιους μικροοργανισμούς ενεργοποιείται και από την παρουσία κιτρικού οξέος, δημιουργώντας έτσι μια ενεργή μακροδομή της: (66), (53), (56)



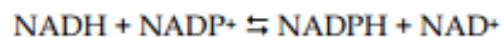
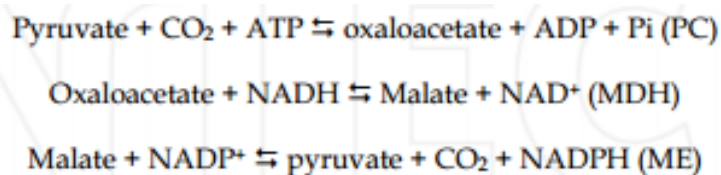
Μετά τη δημιουργία του malonyl-CoA, η βιοσύνθεση των λιπαρών οξέων γίνεται με τη με τη βοήθεια του πολυ-ενζυματικού συμπλόκου της συνθετάσης του λιπαρών οξέων (FAS). Η αλληλουχία των αντιδράσεων συνοψίζονται ως εξής:



Μετά τη βιοσύνθεση των λιπαρών-CoA εστέρων esters (fatty-CoA Esters) λαμβάνει χώρα εστεροποίηση με γλυκερόλη, προκειμένου τα αποθεματικά λιπίδια να αποθηκευτούν στη μορφή των TAGs. Η αλληλουχία των αντιδράσεων για το σχηματισμό των TAGs, διεξάγεται κυρίως από το μονοπάτι της α-glycerol phosphate acylation. Σε αυτό το μεταβολικό μονοπάτι, τα λιπαρά ελεύθερα λιπαρά ενεργοποιούνται με απομάκρυνση συνενζύμου A και στη συνέχεια χρησιμοποιούνται για την ακυλίωση της γλυκερίνης προς το σχηματισμό των TAGs. (66)

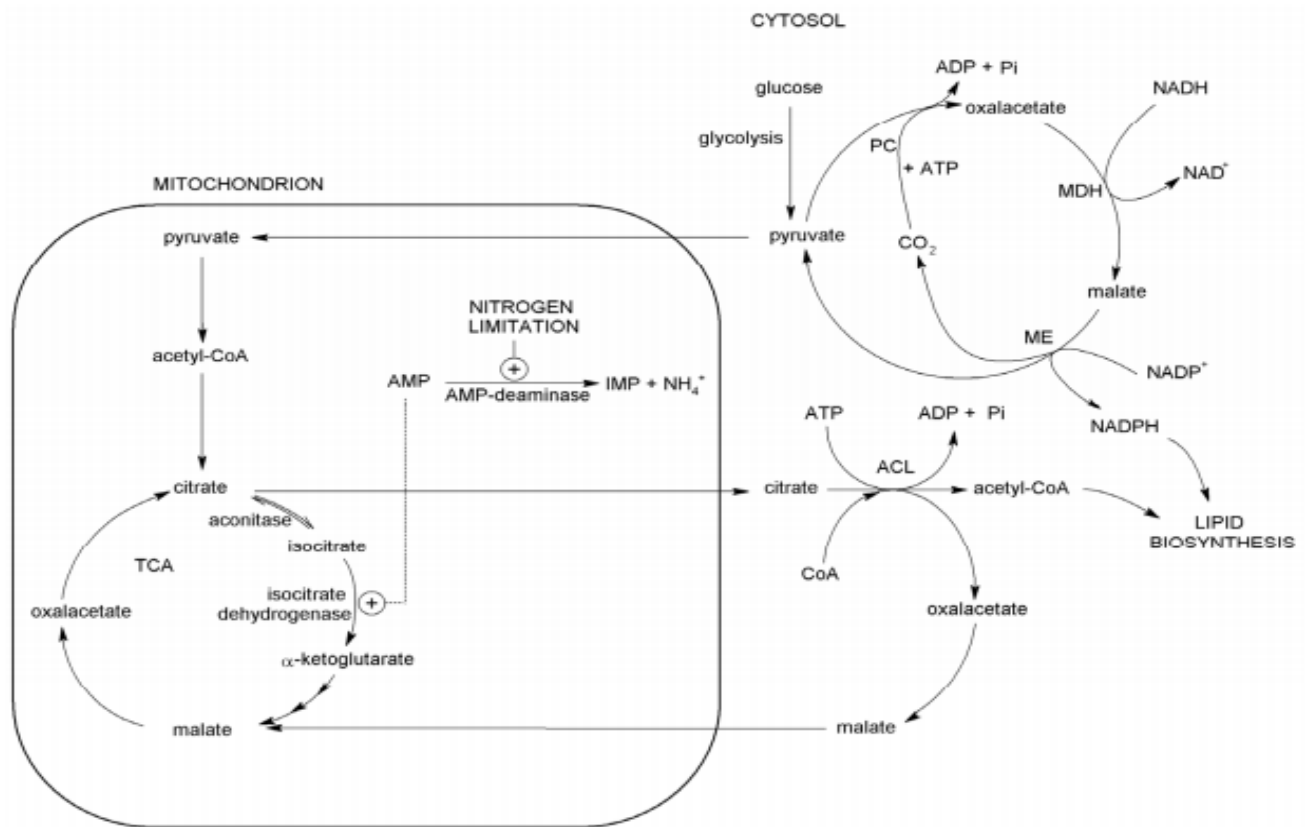
Τέλος, όσον αφορά στη δομή των παραγόμενων TAGs, αν και η τελική τους δομή θα μπορούσε θεωρητικά να είναι αποτέλεσμα υποκατάστασης των ομάδων ακυλο-CoA (acyl-CoA) σε τυχαίες με τη γλυκερόλη, στην περίπτωση των ελαιογόνων μικροοργανισμών που έχουν μελετηθεί, παράγονται ακόρεστα λιπαρά οξέα (τα οποία προσομοιάζουν τα έλαια φυτικής προέλευσης). Σημαντικό ρόλο στην παραγωγή των ακόρεστων λιπαρών οξέων έχει η δράση των ενζύμων desaturases και elongases. (66), (67)

Όσον αφορά στην ποσότητα του αναγωγικού NADPH, το οποίο πρέπει να παρέχεται σε επαρκείς ποσότητες για τη λιπογένεση, αυτό προκύπτει από την παρακάτω σειρά αντιδράσεων (transhydrogenase cycle), ανεξάρτητες από τον κύκλο του κιτρικού/μηλικού οξέος:



Το παραγόμενο NADPH παράγεται σε ποσότητες που επαρκούν για τη βιοσύνθεση των λιπαρών οξέων καθώς και για τις υπόλοιπες αντιδράσεις που θα οδηγήσουν στην ακορεστότητα των λιπαρών οξέων. (69), (68)

Το ένζυμο που καταλύει καθεμία από τια παραπάνω αντιδράσεις βρίσκεται στην παρένθεση και η συντομογραφίες τους δίνονται στη λεζάντα του διαγράμματος ροής που ακολουθεί:



Εικόνα 5: Διάγραμμα ροής που αναπαριστά την πορεία αντιδράσεων που οδηγούν στην βιοσυσσώρευση λιπιδίων σε ελαιογόνα είδη. Οπου: TCA: κύκλος τρικαρβοξυλικού οξέος, ACL: ATP-κιτρική λυάση, MDH (malate dehydrogenase): αφυδρογονάση του μηλικού οξέος, ME (malate enzyme): μηλικό ένζυμο, PC (pyruvate carboxylase): καρβοξυλάση του πυροσταφυλικού οξέος (69)

Σύμφωνα με τη στοιχειομετρία στην περίπτωση μεταβολισμού της γλυκόζης (και παρόμοιων σακχάρων όπως λακτόζη, φρουκτόζη, κλπ) προκύπτει ότι περίπου 1,1 moles acetyl-CoA παράγεται για 100 g γλυκόζης (0,56 moles) που καταβολίζονται. Για την περίπτωση της ξυλόζης, αυτή μπορεί να μεταβολιστεί είτε μέσω του μονοπατιού της phosphoketolase reaction, το οποίο είναι το πιο αποδοτικό, καθώς μέσω αυτού παράγονται περίπου 1,2 moles acetyl-CoA ανά 100 g ξυλόζης (0,66 mole) που χρησιμοποιούνται, ή το μονοπάτι των φωσφορυλιωμένων πεντοζών, μέσω του οποίου παράγεται περίπου 1.0 acetyl-CoA ανά 100 g ξυλόζης. Ως εκ τούτου, εάν όλη η ποσότητα του παραγόμενου acetyl-CoA, διοχετευόταν προς τη σύνθεση λιπιδίων, η μέγιστη θεωρητική απόδοση των μικροβιακών λιπιδίων (SCO), θα ήταν περίπου 0,32 g λιπιδίων/ g γλυκόζης και 0,34 g λιπιδίων/ g ξυλόζης. Βέβαια στην πράξη απόδοση που επιτυγχάνεται δεν έχει βρεθεί να ξεπερνάει 0,22 g λιπιδίων/ g γλυκόζης. (66)

Ο περιορισμός του αζώτου δεν είναι ο μόνος παράγοντας για την έναρξη της συσσώρευσης αποθηκευτικών λιπιδίων στην περίπτωση των ελαιογόνων μικροοργανισμών αναπτυσσόμενων σε σάκχαρα. Σύμφωνα με πρόσφατες έρευνες, η ελαιογόνος ζύμη *Rhodosporidium toruloides* παρουσίασε αξιόλογη ανάπτυξη βιομάζας και συσσώρευσης αποθήκευτικών λιπιδίων σε μέσο πλούσιο σε άζωτο και με περιοριστικό παράγοντα

ανάπτυξης το συστατικό φώσφορο ή θείο. Σε κάθε περίπτωση η σύσταση των παραγόμενων λιπιδίων είναι διαφορετική. (66)

Μετά από εξάντληση της πηγής άνθρακα ή μείωση του ρυθμού κατανάλωσής της, οι ελαιογόνοι μικροοργανισμοί, σε ένα γενικότερο κανόνα, καταναλώνουν τα δικά τους αποθέματα λιπιδίων. Διάφορες μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί σε ελαιογόνες ζύμες, μύκητες και βακτήρια και σε διάφορες συνθήκες καλλιέργειας, παρατηρήθηκε (breakdown) κατανάλωση των παραγόμενων λιπιδίων και ταυτόχρονη βιοσύνθεση βιομάζας ελεύθερης λίπους. (66)

Έχει αποδειχθεί ότι το φαινόμενο της αποικοδόμησης (turnover) των λιπιδίων στους ελαιογόνους μικροοργανισμούς είναι ανεξάρτητο από τον τύπο της πηγής άνθρακα που καταναλώνεται από το μικροοργανισμό (είτε de novo ή ex novo μηχανισμός). Σε κάθε περίπτωση, τα απελευθερωμένα κυτταρικά λιπαρά οξέα καταβολίζεται μέσω της διαδικασίας της β-οξειδωσης και το παραγόμενο ακετυλ-CoA, θα μετατραπεί περαιτέρω μέσω του κύκλου του Krebs. Στην περίπτωση της de novo συσσώρευσης λιπιδίων, κατά τη διάρκεια της αποικοδόμησης των λιπιδίων, σταματάει η αφομοίωση των σακχάρων που δυνητικά υπάρχουν στο μέσο καλλιέργειας και η λειτουργία του κύκλου του Krebs έχει ήδη περιοριστεί λόγω του εξωκυτταρικού περιορισμού του αζώτου. (66)

4.6 Λειτουργικότητα των παραγόμενων λιπιδίων

Τα μικροβιακά λιπίδια αποτελούνται κυρίως από τριγλυκερίδια (TAG). Άλλα στοιχεία που παρουσιάζονται σε μη αμελητέες ποσότητες είναι ελεύθερα λιπαρά οξέα, άλλα ουδέτερα λιπίδια (όπως μονοακυλγλυκερίνες, διακυλγλυκερίνες και στερυλο-εστέρες), στερόλες (δομικό συστατικό μεμβρανών μυκήτων) και πολικά κλάσματα (π.χ. φωσφολιπίδια, σφιγγολιπίδια, γλυκολιπίδια). (66), (53)

Τα λιπαρά ακυλ - CoA που παρήχθησαν θα εστεροποιηθούν με γλυκερόλη προς το σχηματισμό είτε τριακυλ - γλυκερόλης (TAG) είτε στερυλ - εστέρων (SE). Στους ελαιογόνους μύκητες, τα ουδέτερα λιπίδια TAG και SE αποθηκεύονται στο εσωτερικό των λιπιδιακών σωματιδίων (lipid bodies- LB). Αυτά δημιουργούνται στο ενδοπλασματικό δίκτυο των κυττάρων όπου και εντοπίζονται τα περισσότερα βιοσυνθετικά ένζυμα καθώς και δομικές πρωτεΐνες. Τα ουδέτερα λιπίδια, στη συνέχεια εναποτίθενται μεταξύ των δυο στιβάδων της διπλής μεμβράνης του ενδοπλασματικού δικτύου, σε αντίθεση με τα φωσφολιπίδια τα οποία τη διαπερνούν κάθετα και μέρος τους εξέρχεται από αυτή. Όμως καθώς αυξάνεται η ποσότητα των παραγόμενων λιπιδίων, δεν «χωράνε» πλέον στο χώρο αυτό και έτσι δημιουργείται κάτι σαν προεκβολή στη μεμβράνη του ενδοπλασματικού δικτύου και όταν ξεπεράσει ένα κρίσιμο μέγεθος, αυτό αποχωρίζεται από τη μεμβράνη και περικλειόμενο από μέρος της, αποτελεί πλέον ένα 'ωριμο λιπιδιακό σωματίδιο'. Επομένως, ο πυρήνας του σωματιδίου αυτού, αποτελείται από ουδέτερα λιπίδια και περιβάλλεται από ένα μονό στρώμα φωσφολιπιδίων, πάνω στο οποίο είναι προσαρτημένες αρκετές πρωτεΐνες με βασικό ρόλο στη σύνθεση και μεταβολισμό λιπιδίων και μεταφορά ουσιών. Σε περίπτωση που το κύτταρο χρειαστεί ενέργεια, θα τα χρησιμοποιήσει σαν αποθεματικά λιπίδια, τα

οποία θα διασπάσει με τα κατάλληλα ένζυμα (λιπάσες τριακυλ-γλυκερόλης ή υδρολάσες στέρυλ-εστέρων). (69)

Η σύνθεση των λιπιδίων γενικά, συσχετίζεται έντονα με την φάση ανάπτυξης του μικροοργανισμού. Από σχετικές μελέτες που έχουν γίνει σε μικροοργανισμούς (*C. echinulata*) σε συνθήκες περιορισμού αζώτου, προέκυψε ότι η συγκέντρωση των ουδετέρων λιπιδίων αυξάνεται μετά την έναρξη της συσσώρευσης λιπιδίων, γεγονός που υποδεικνύει ότι τα ουδέτερα λιπίδια είναι η βασική μορφή αποθηκευτικών λιπιδίων στους μικροοργανισμούς σε συνθήκες μη κανονικής ανάπτυξης (με περιορισμό κάποιου συστατικού). Τα πολικά λιπίδια αποτελούν συστατικό των μεμβρανών των κυττάρων και η ποσότητα τους αυξάνεται στη φάση ανάπτυξης των μικροοργανισμών, αλλά, σύμφωνα με μελέτες, συνδέονται και με την παραγωγή των PUFAs. (53)

4.7 Χρήσεις μικροβιακού λίπους

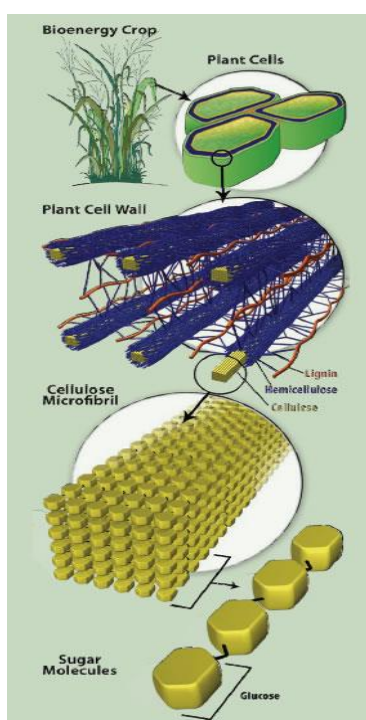
Οι χρήσεις του μικροβιακού λίπους εξαρτώνται από τα χαρακτηριστικά του και μια βασική παράμετρος που τις καθορίζει είναι η ύπαρξη διπλών δεσμών στην ανθρακική αλυσίδα καθώς και ο αριθμός τους. Για παράδειγμα το έλαιο που παράγεται από μικροφύκη είναι ιδιαίτερα πλούσιο σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα με τέσσερις ή και παραπάνω διπλούς δεσμούς, χαρακτηριστικό που καθιστά το έλαιο επιδεικτικό στην οξείδωση του κατά την αποθήκευση του και συνακόλουθα μειώνει τις πιθανότητες αποδοχής του για χρήση για την παραγωγή βιοντίζελ. (52), (56)

Επιπλέον, το λίπος που προέρχεται από ελαιογόνους μύκητες παρουσιάζει μεγαλύτερο βαθμό ακορεστότητας σε σχέση με εκείνο που προέρχεται από ζύμες. Για το λόγο αυτό, οι ελαιογόνοι μύκητες χρησιμοποιούνται προκειμένου να παραχθούν λιπίδια πλούσια σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFAs), όπως γ-λινολενικό οξύ, ελαικό οξύ, αραχιδονικό οξύ, δοκοσαεξανοϊκό οξύ, εικοσαπεντανοϊκό οξύ, κλπ, τα οποία παρουσιάζουν ιατρικό ενδιαφέρον για εφαρμογές διατροφικού περιεχομένου. Να σημειωθεί ότι η μέθοδος της μικροβιακής παραγωγής λίπους αποτελεί τη μοναδική μέθοδο παραλαβής πολυακόρεστων λιπαρών οξέων με μήκος αλυσίδας μεγαλύτερο από 18 άνθρακες (πέρα από την παραλαβή τους από το λίπος ιχθυοκαλλιεργειών). Σαν παράδειγμα αναφέρεται το δοκοσαεξανοϊκό οξύ, το οποίο παρουσιάζει ενδιαφέρον από ιατρική άποψη λόγω των θεραπευτικών του ιδιοτήτων. (66), (68)

Τέλος, μέσω της χρήσης της παραγωγής λίπους μικροβιακής προέλευσης (SCO), μπορεί να γίνει και βιομετατροπή λιπαρών οξέων, παρέχοντας σαν υπόστρωμα στους μικροοργανισμούς υδρόφοβα υποστρώματα π.χ. ελεύθερα λιπαρά οξέα (επαγωγή ex novo μηχανισμού). Έτσι, μέσω της ζύμωσης, θα παραχθεί ένα νέο προφίλ λιπαρών οξέων που δεν υπήρχε στο μέσο καλλιέργειας. Αυτή η μέθοδος χρησιμοποιείται για «αναβάθμιση» φυτικών ή ζωικών ελαίων. (54), (66)

5 Βιομάζα-γενικά

Η χρήση της κυτταρινούχας βιομάζας θεωρείται μια πολλά υποσχόμενη πρώτη ύλη τόσο για παραγωγή βιοκαυσίμων όσο και άλλων υψηλής προστιθέμενης αξίας χημικών προϊόντων. Συγκεντρώνει πολλά πλεονεκτήματα μεταξύ των οποίων, η μεγάλη διαθεσιμότητά της, το χαμηλότερο κόστος σε σύγκριση με άλλα υποστρώματα, λιγότερες ανταγωνιστικές χρήσεις, λιγότερες παρεμβάσεις στην οικονομία των τροφίμων και λιγότερη πίεση επί των περιβαλλοντικών πόρων. Εκτιμάται ότι παράγεται περίπου πάνω 1,3 δις τόνοι ξηρής λιγνινοκυτταρινούχας βιομάζας στις ΗΠΑ κάθε χρόνο, ποσότητα η οποία θα καταλήξει για την παραγωγή βιοκαυσίμων. Το ενεργειακό περιεχόμενο αυτής της ποσότητας ισοδυναμεί με 3,8 δις βαρέλια πετρελαίου, η οποία είναι περίπου πάνω από το ήμισυ της ετήσιας κατανάλωσης ενέργειας των ΗΠΑ. (51), (47)



Η λιγνοκυτταρινούχα βιομάζα αποτελείται από τρία κύρια συστατικά: την κυτταρίνη, την ημικυτταρίνη, και τη λιγνίνη και, και η σχετική αναλογία των συστατικών αυτών ποικίλει ανάλογα την πηγή του υλικού. (51)

Η **κυτταρίνη** αποτελεί το σημαντικότερο συστατικό των πολυσακχαριτών των κυτταρικών τοιχωμάτων. Αποτελείται από ένα γραμμικό πολυμερές μονάδων D-γλυκόζης, συνδεδεμένων μεταξύ τους με β-1,4 γλυκοζιτικό δεσμό. Τα πολυμερή κυτταρίνης παρουσιάζονται ως διατεταγμένες δομές (μικροϊνίδια) και η λειτουργία τους είναι να εξασφαλίσουν την ακαμψία του κυτταρικού τοιχώματος των φυτών. Η κυτταρίνη είναι ένας αδιάλυτος πολυσακχαρίτης που σχηματίζει κρυσταλλικές περιοχές, οι άμορφες περιοχές της είναι πολύ υγροσκοπικές, διογκώνεται απεριόριστα και διαλύεται πλήρως από θειικό οξύ, υδροχλωρικό οξύ και φωσφορικό οξύ.

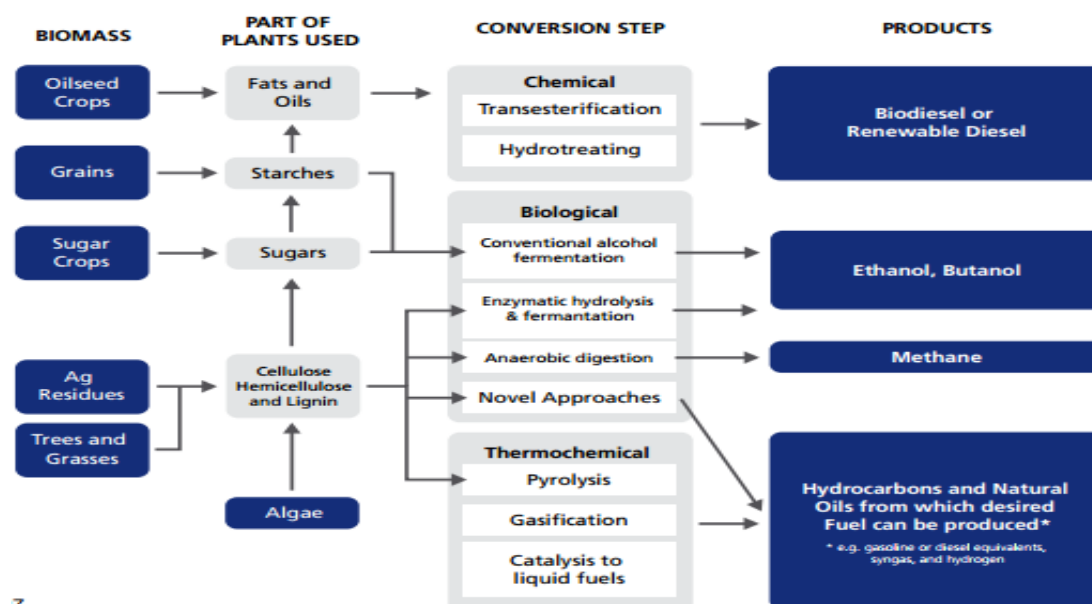
Εικόνα 6: Δομή της φυτικής βιομάζας (95)

Η **ημικυτταρίνη** στην πραγματικότητα δεν είναι μία, αλλά υπάρχουν πολλά είδη ημικυτταρινών. Θα μπορούσε να οριστεί σαν το μίγμα συμπολυμερών ουσιών που μαζί με την κυτταρίνη και τη λιγνίνη συγκροτούν τα κυτταρικά τοιχώματα των ξύλινων ιστών. Οι ημικυτταρίνες είναι άμορφες (όχι κρυσταλλικές), έχουν χαμηλό βαθμό πολυμερισμού, είναι έντονα υγροσκοπικές και παρουσιάζουν υψηλή χημική δραστηριότητα. Το κυριότερο συστατικό της ημικυτταρίνης αποτελεί η ξυλάνη.

Η **λιγνίνη** αποτελεί ένα από τα σπουδαιότερα και πιο άφθονα συστατικά της φυτικής βιομάζας, ωστόσο δε βρίσκεται σε όλα τα φυτικά είδη. Είναι άμορφη, έχει πολύ υψηλό βαθμό πολυμερισμού, έντονα υδρόφοβη ουσία αδιάλυτη στο νερό και με χαμηλή διόγκωση. Η λιγνίνη ενώνεται με χημικούς δεσμούς με τις ημικυτταρίνες και με την κυτταρίνη και προσδίδει υψηλή αντοχή σε κάμψη, θλίψη και κρούση. (5)

Υπάρχουν δύο είδη βιομάζας : i) οι υπολειμματικές μορφές (φυτικά υπολείμματα, ζωικά απόβλητα και απορρίμματα) και ii) η βιομάζα που παράγεται από ενεργειακές καλλιέργειες, οι οποίες είτε αφορούν παραδοσιακές καλλιέργειες που μπορούν να χρησιμοποιηθούν και για την παραγωγή βιοκαυσίμων (π.χ. ζαχαροκάλαμο και καλαμπόκι για βιοαιθανόλη, ηλιάνθος για βιοντίζελ, κλπ.), είτε νέες καλλιέργειες που δεν καλλιεργούνται προς το παρόν εμπορικά (μίσχανθος, η αγριαγκινάρα, καλάμι) των οποίων το τελικό προϊόν προορίζεται για την παραγωγή ενέργειας.

Η παραγωγή ενέργειας από βιομάζα μπορεί να γίνει με διάφορους τρόπους: με καύση, με πυρόλυση, με αεριοποίηση, με αλκοολική ζύμωση, με αερόβια ζύμωση. (5), (70)



7
Εικόνα 7: Διάγραμμα ροής που αναπαριστά τις πηγές και τους βασικούς τρόπους χρήσης της βιομάζας (70)

Γενικώς, η χρησιμοποίηση λιγνοκυτταρινούχας βιομάζας περιλαμβάνει τη διαδικασία της αποικοδόμησης της αρχικά και την επακόλουθη ζύμωση ή βιομετατροπή της. Από την αποικοδόμηση της παράγονται πολυσακχαρίτες μακρών αλυσίδων, οι οποίοι στη συνέχεια μετατρέπονται στους αντίστοιχους μονοσακχαρίτες τους. Χημικές διαδικασίες για την αποικοδόμηση της κυτταρίνης συνήθως περιλαμβάνουν επεξεργασία με οξύ ή/και θερμική επεξεργασία με αργούς ρυθμούς και χαμηλές συνήθως αποδόσεις. Επιπλέον, μετά από όξινη υδρόλυση παράγονται αναστολείς/παρεμποδιστές όπως ασθενή οξέα, αλδεΐδες, και αρωματικές ενώσεις, συστατικά τα οποία μειώνουν κατά πολύ τις αποδόσεις των ζυμώσεων. Μια μέθοδος που κερδίζει όλο και περισσότερο έδαφος, είναι η βιολογική επεξεργασία που περιλαμβάνει τη χρήση ενζύμων. Συγκεκριμένα οι κυτταρινάσες προσφέρουν μια πολύ καλή πιθανή εναλλακτική μέθοδο για την ανάκτηση απλών σακχάρων, ωστόσο αυτή η μέθοδος απαιτεί προεπεξεργασία για την αύξηση του ρυθμού υδρόλυσης της. Νέα ένζυμα και νέα ενζυμικά συστήματα μικροοργανισμών ικανών να διασπούν τη βιομάζα έχουν ανακαλυφθεί επίσης και, απ' ό,τι φαίνεται, οι μικροβιακές στρατηγικές έχουν μεγαλύτερες δυνατότητες από τις παραδοσιακές φυσικοχημικές μεθόδους λόγω της μεγαλύτερης τους αποτελεσματικότητας. (51)

Πλήρης υδρόλυση των λιγνοκυτταρινικών υλικών παράγουν μια ποικιλία διαλυτών και ζυμώσιμων σάκχαρα που αποτελούνται κυρίως από πεντόζες (π.χ. αραβινόζη και ξυλόζη) και εξόζες (π.χ. γλυκόζη και μαννόζη) , και η αναλογία των εξοζών έναντι των πεντοζών τυπικά κυμαίνεται από 1.5:1 έως 3 : 1. Μεταξύ αυτών των σακχάρων , η γλυκόζη βρίσκεται συνήθως στην υψηλότερη συγκέντρωση, και ακολουθεί η ξυλόζη (από ξύλο ή γεωργικά υπολείμματα) και η μαννόζη (από κωνοφόρα) . Ως αποτέλεσμα , οι μικροοργανισμοί που θα χρησιμοποιούνται για την βιομετατροπή πρέπει να είναι σε θέση να χρησιμοποιούν και εξόζες και πεντόζες. Μάλιστα, για την αποτελεσματική αξιοποίηση της λιγνοκυτταρινούχας βιομάζας είναι εξαιρετικά κρίσιμη η εύρεση μικροοργανισμών ικανών να μεταβολίσουν πεντόζες ως πηγή άνθρακα, είτε με διαλογή από το φυσικό τους περιβάλλον ή με μεταλλαξογένεση. (51)

Στα πλεονεκτήματα της χρήσης της βιομάζας συγκαταλέγονται τα εξής:

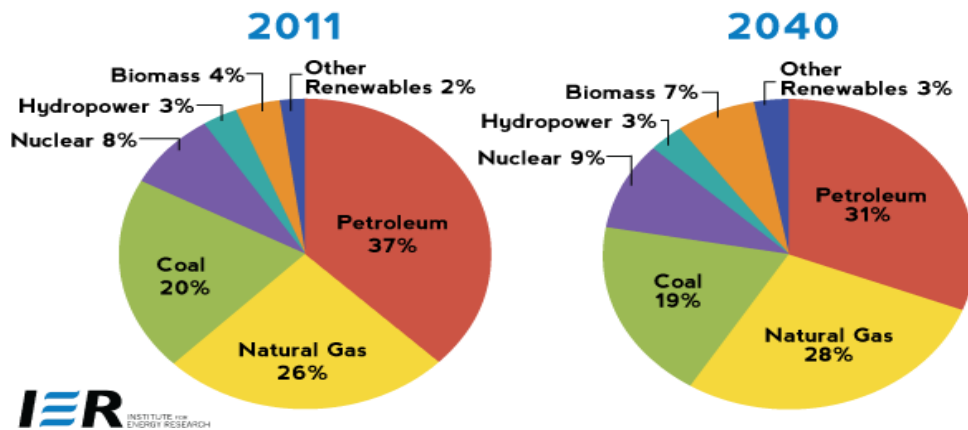
1. Το μηδενικό ισοζύγιο διοξειδίου του άνθρακα (CO₂) κατά την καύση της και η μη συνεισφορά της χρήσης της στο φαινόμενο του θερμοκηπίου - επειδή οι ποσότητες του διοξειδίου του άνθρακα που απελευθερώνονται κατά την καύση δεσμεύονται πάλι από τα φυτά για τη δημιουργία της βιομάζας.
2. Η απουσία του θείου που συμβάλλει σημαντικά στον περιορισμό των εκπομπών του διοξειδίου του θείου (SO₂) που είναι υπεύθυνο για την όξινη βροχή.
3. Η μείωση της ενεργειακής εξάρτησης, που είναι αποτέλεσμα της εισαγωγής καυσίμων από τρίτες χώρες, με αντίστοιχη εξοικονόμηση συναλλάγματος.
4. Η ενεργειακή αξιοποίηση της βιομάζας σε μια περιοχή, αυξάνει την απασχόληση στις αγροτικές περιοχές λόγω των καλλιεργειών (διάφορα είδη ελαιοκράμβης, σόργο,καλάμι, κενάφ), τη δημιουργία εναλλακτικών αγορών για τις παραδοσιακές καλλιέργειες (ηλίανθος κ.ά.), και συμβάλλει έτσι στη κοινωνικο-οικονομική ανάπτυξη της περιοχής.

Τα βασικά της μειονεκτήματα από την άλλη είναι :

1. Ο μεγάλος όγκος της και η μεγάλη περιεκτικότητά της σε υγρασία, ανά μονάδα παραγόμενης ενέργειας.
2. Η δυσκολία στη συλλογή, μεταποίηση, μεταφορά και αποθήκευσή της, έναντι των ορυκτών καυσίμων.
3. Οι δαπανηρότερες εγκαταστάσεις και εξοπλισμός που απαιτούνται για την αξιοποίηση της βιομάζας, σε σχέση με τις συμβατικές πηγές ενέργειας.
4. Η μεγάλη διασπορά και η εποχιακή παραγωγή της.

(71)

Παρατηρείται ότι ελπιδοφόρα στον τομέα της παραγωγής ενέργειας είναι η βιομάζα, η οποία μέχρι το 2040 σύμφωνα με προβλέψεις αναμένεται να έχει σχεδόν διπλασιάσει τη χρήση της. (72)



Διάγραμμα 8: Το μερίδιο καθεμίας από τις ανανεώσιμες πηγές ενέργειας στην παγκόσμια κατανομή της ενέργειας και η αναμενόμενη πορεία της στα επόμενα χρόνια (72)

5.1 Ανανεώσιμα υποστρώματα κατάλληλα για παραγωγή λίπους

Η επιλογή των υποστρωμάτων προς ζύμωση είναι κρίσιμη, πρώτον για το κόστος τους το οποίο πρέπει να είναι αρκετά χαμηλό ώστε το προϊόν να είναι ανταγωνιστικό στην αγορά και δεύτερον, να μην επηρεάζει την ποιότητα του μικροβιακού ελαίου (ειδικότερα μάλιστα όταν πρόκειται για συγκεκριμένη χρήση όπως π.χ. DHA, EPA, ARA, GLA, υποκατάστατα του βουτύρου κακάο ή τη λιπιδική σύνθεση για την παραγωγή βιοντίζελ).

Δύο τύποι σύνθεσης λιπιδίων συναντώνται στους ελαιογόνους μικροοργανισμούς: η "de novo" και η "ex novo". Ιδίων. Η πρώτη διαδικασία διεξάγεται σε υδρόφιλα υποστρώματα και συνήθως απαιτεί συνθήκες καλλιέργειας με περιορισμό αζώτου. Η "ex novo" παραγωγή λιπιδίων διεξάγεται μέσω της ζύμωσης σε υδρόφοβα υλικά. (51)

Πίνακας 7: Συνοπτική παρουσίαση κάποιων υποστρωμάτων μαζί με τα αντίστοιχα στελέχη μικροοργανισμών που έχουν χρησιμοποιηθεί από ερευνητές για μικροβιακή παραγωγή λίπους (51)

| Υπότρωμα | Είδος μικροοργανισμού | Αναφορά |
|---------------------------------|----------------------------------|--|
| <u>Υδρόφιλα</u> | | |
| Μελάσα | <i>Trichosporon fermentans</i> | (Zhu et al., 2008) |
| | <i>Candida curvata</i> | (Bednarski et al., 1986) |
| | <i>Cunninghamella echinulata</i> | (Chatzifragkou et al., 2010) |
| Starch hydrolysates | <i>Mortierella alpine</i> | (Zhu et al., 2003) |
| Banana juice | <i>Apiotrichum curvatum</i> | (Vega et al., 1988) |
| Tomato waste hydrolysate | <i>Cunninghamella echinulata</i> | (Fakas et al., 2008) |
| N-acetylglucosamine hydrolysate | <i>Cryptococcus curvatus</i> | (Wu et al., 2011 and Zhang et al., 2011) |
| Sweet sorghum extracts | <i>Mortierella isabellina</i> | (Economou et al., 2011a) |
| Wastewaters | | |

| | | |
|---------------------------------|--|---|
| Sewage sludge | <i>Lipomyces starkeyi</i> | (Angerbauer et al., 2008) |
| Olive oil mill wastewaters | <i>Lipomyces starkeyi</i> | (Yousuf et al., 2010) |
| Monosodium glutamate wastewater | <i>Rhodotorula glutinis</i> | (Xue et al., 2006, Xue et al., 2008 and Xue et al., 2010) |
| Glycerol | <i>Yarrowia lipolytica</i> | (Papanikolaou et al., 2002 and Papanikolaou et al., 2003) |
| | <i>Mortierella isabellina</i> | (Papanikolaou et al., 2008) |
| | <i>Schizochytrium limacinum</i> | (Chi et al., 2007) |
| | | (Pyle et al., 2008) |
| | | (Ethier et al., 2011) |
| Monosodium glutamate wastewater | <i>Rhodotorula glutinis</i> | (Xue et al., 2006, Xue et al., 2008 and Xue et al., 2010) |
| Glycerol | <i>Yarrowia lipolytica</i> | (Papanikolaou et al., 2002 and Papanikolaou et al., 2003) |
| | <i>Mortierella isabellina</i> | (Papanikolaou et al., 2008) |
| | <i>Schizochytrium limacinum</i> | (Chi et al., 2007) |
| | | (Pyle et al., 2008) |
| | | (Ethier et al., 2011) |
| Whey | <i>Apiotrichum curvatum</i> | (Davies and Holdsworth, 1992, Davies et al., 1990, Ykema et al., 1988, Ykema et al., 1989 and Ykema et al., 1990) |
| | <i>Apiotrichum curvatum</i> , <i>Cryptococcus albidus</i> , <i>Lipomyces starkeyi</i> , and <i>Rhodospordium toruloides</i> | (Akhtar et al., 1998) |
| | <i>Cryptococcus curvatus</i> , <i>Candida bombicola</i> | (Daniel et al., 1999) |
| | <i>Mortierella isabellina</i> | (Vamvakaki et al., 2010) |
| Whey | <i>Apiotrichum curvatum</i> | (Davies and Holdsworth, 1992, Davies et al., 1990, Ykema et al., 1988, Ykema et al., 1989 and Ykema et al., 1990) |
| | <i>Apiotrichum curvatum</i> , <i>Cryptococcus albidus</i> , <i>Lipomyces starkeyi</i> , and <i>Rhodospordium toruloides</i> | (Akhtar et al., 1998) |
| | <i>Cryptococcus curvatus</i> , <i>Candida bombicola</i> | (Daniel et al., 1999) |
| <u>Υδροφόβα</u> | | |
| Vegetable oils | Different oleaginous yeasts and moulds | (Aggelis and Sourdis, 1997) |
| Industrial fats | <i>Yarrowia lipolytica</i> | (Papanikolaou and Aggelis, 2003 and Papanikolaou et al., 2001) |

5.2 Γλυκό σόργο

Το γλυκό σόργο (*Sorghum bicolor* {L.} Moench) είναι ένα μονοετές C4 (φωτοσυνθετικό μονοπάτι) φυτό, με μεγάλη φωτοσυνθετική ικανότητα, υψηλές αποδόσεις και με ικανότητα προσαρμογής σε διάφορα είδη εδαφών με ποικίλες κλιματικές συνθήκες. Ανήκει στο γένος των αγγειόσπερμων Μονοκότυλων φυτών της οικογένειας Αγρωστώδη ή Αγρωστίδες (Graminae) που ανήκει στην ομάδα των σιτηρών. (5), (73)



Εικόνα 8: Το ενεργειακό φυτό σόργο (74)

Είναι κατάλληλο ως πρώτη ύλη για μία ποικιλία βιολογικών διεργασιών, λόγω των υψηλών αποδόσεων του τόσο σε λιγνοκυτταρινούχα βιομάζα αλλά και ζυμώσιμα σάκχαρα. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί το την παραγωγή βιοκαυσίμων με δύο τρόπους: ο μίσχος και οι σπόροι χρησιμοποιούνται άμεσα για παραγωγή ενέργεια (πυρόλυση, αεριοποίηση) ή μέσω ζύμωσης. Χαρακτηρίζεται από υψηλή περιεκτικότητα σε ζυμώσιμα σάκχαρα της (από 25% μέχρι 50% του ξηρού βάρους της βιομάζας του), τα οποία είναι κυρίως οι μονοσακχαρίτες γλυκόζη (20%) και φρουκτόζη (10%) και ο δισακχαρίτης σακχαρόζη (70%) και αποτελούν το μεγαλύτερο μέρος των διαλυτών υδατανθράκων στο χυμό του μίσχου σόργου. Η αναλογία βέβαια των σακχάρων διαφέρει από καλλιέργεια σε καλλιέργεια. Επίσης, η βαγιάση που προκύπτει από το εκχύλισμα του, περιέχει υψηλά επίπεδα σχετικά χαμηλής κρυσταλλικότητας κυτταρίνης, μαζί με λιγνίνη, και έτσι είναι το ίδιο ενδιαφέρον ως πρώτη ύλη ζύμωσης. (75), (76), (77)

Ολόκληρο το στέλεχος σόργου, και η βαγιάση του, έχουν αποτελέσει αντικείμενο μελετών που περιλαμβάνουν διαδικασίες προκατεργασίας, ενζυμική υδρόλυση, και διεργασίες ζύμωσης. Τα πιθανά προϊόντα από ζύμωση του γλυκού σόργου είναι πολλά: αιθανόλη, ακετόνη, βουτανόλη, διάφορα λιπίδια, γαλακτικό οξύ, υδρογόνο και μεθάνιο. Τα παραπροϊόντα από τις βιοδιεργασίες του σόργου, μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως ζωοτροφή, παραγωγή κηρών και χαρτιού. (75)

Το γλυκό σόργο αποδίδει καλά ακόμη και κάτω από αντίξοες συνθήκες, και απαιτεί μικρές εισροές για να επιτευχθεί η μέγιστη παραγωγή του. Οι απαιτήσεις του σε θρεπτικά συστατικά, λίπασμα και νερό είναι χαμηλές και , και όσο για τα επίπεδα υγρασίας γενικώς δείχνουν θετική συσχέτιση με τη συνολική βιομάζα, αλλά το σόργο χρησιμοποιεί λιγότερο νερό ανά μονάδα βιομάζας που παράγεται από πολλά άλλα φυτά C4. Μπορεί να ανεχθεί ένα ευρύ φάσμα των συνθηκών του εδάφους και σε pH που κυμαίνεται από 5,0 - 8,5. Αυτά τα χαρακτηριστικά το καθιστούν κατάλληλο για καλλιέργεια ακόμη και σε περιθωριακά εδάφη. Τέλος, το γλυκό σόργο έχει σύντομη περίοδο ανάπτυξης (3-5 μήνες), η οποία το καθιστά κατάλληλο για την ανάπτυξή του μεταξύ κυρίων καλλιεργειών. (75), (77),

Καλλιεργείται συνήθως στις εξής χώρες: Ινδία, Νιγηρία, ΗΠΑ, Σουδάν, Αργεντινή και Κίνα ενώ στη χώρα μας η καλλιέργειες του, προ το παρόν είναι περιορισμένες. Η απόδοση σε βιομάζα εξαρτάται από τις κλιματικές συνθήκες, την ποικιλία, την γονιμότητα του εδάφους και τις καλλιεργητικές πρακτικές. Οι πειραματικές αποδόσεις σε διάφορες χώρες της Νότιας Ευρώπης κυμάνθηκαν περί τους 8-10 τον στελεχών/στρ. Στην Ελλάδα, η απόδοση σε χλωρή βιομάζα κυμαίνεται μεταξύ 7 και 12 τον/στρ ή και μεγαλύτερη υπό ιδανικές συνθήκες με αντίστοιχη απόδοση σε ξηρή βιομάζα της τάξης των 2-3.5 τον/στρ. (78), (74)

Η ψίχα και ο φλοιός του βλαστού περιέχουν περίπου ίσες μάζες ξηράς ύλης, αλλά τα περισσότερα από τα ζυμώσιμα σάκχαρα εντοπίζονται στην ψίχα. Η κυτταρίνη και η ημικυτταρίνη είναι παρούσες σε παρόμοιες αναλογίες στη ψίχα και το φλοιό, αλλά σχεδόν όλη η λιγνίνη εντοπίζεται στο φλοιό. Τα φύλλα αποτελούν το 10 έως 30% της ξηράς μάζας των φυτών, ανάλογα με την ποικιλία και περιέχουν σχετικά μικρό ζάχαρης, το οποίο μειώνεται καθώς το φυτό αναπτύσσεται. Το άμυλο εντοπίζεται σε χαμηλά επίπεδα αμύλου στα φύλλα και στο βλαστό. (75)

Πολλές μελέτες έχουν δημοσιευτεί για τη χρήση του σόργου σαν υπόστρωμα για παραγωγή αιθανόλης αλλά πρόσφατα το ενδιαφέρον έχει στραφεί και στη χρήση του για παραγωγή μικροβιακού λίπους για παραγωγή βιοντίζελ. Για παράδειγμα το μικροάλγος *Schizochytrium limacinum* έχει χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή λιπαρών οξέων κυρίως παλμιτικού (C16:0) και δοκοσαεξανοϊκού οξέος (C22:6) από χυμό/εκχύλισμα σόργου (Liang et al., 2010), ο μύκητας *Mortierella isabellina*, για την παραγωγή παλμιτικού (C16: 0) και στεατικού οξέος (C18: 0) από εκχύλισμα (semi-solid state) σόργου (Economou et al., 2010) και το μικροάλγος *Chlorella protothecoides*, για παραγωγή ολεϊκού (C18: 1), λινολεϊκού (C18: 2) και παλμιτολεϊκού (C16: 1) λιπαρού οξέος (Gao et al., 2010). (75)

5.3 Liquid Fraction

Το Liquid fraction αποτελεί το υγρό κλάσμα που προκύπτει από την παραγωγή υδροθερμικά προκατεργασμένου άχυρου σίτου, που γίνεται στα πλαίσια του προγράμματος IBUS (Integrated Biomass Utilization System) της ΕΕ, με στόχο την ανάπτυξη οικονομικών διαδικασιών για τη συμπαραγωγή βιοαιθανόλης και ηλεκτρισμού.

Το υγρό που λαμβάνεται από την κατεργασία (εκχύλισμα), περιέχει ημικυτταρίνη και μπορεί να χρησιμεύσει σε ζυμώσεις είτε για την παραγωγή αιθανόλης είτε για την παραγωγή μικροβιακού λίπους. Μειονέκτημα αποτελεί ο σχηματισμός παρεμποδιστών, όπως καρβοξυλικά οξέα και φουρφουράλες, που σε κάποιες περιπτώσεις δυσκολεύουν, ή ακόμα και αποκλείουν τη δυνατότητα ζύμωσης.

Το στερεό υλικό, που προκύπτει από την παραπάνω διαδικασία, είναι πλούσιο σε κυτταρίνη και δίνει μεγάλες αποδόσεις σε γλυκόζη μετά από ενζυμική υδρόλυσή του. Έχει χαμηλή περιεκτικότητα σε ημικυτταρίνη λόγω της θερμικής της διάσπασης, ενώ το περιεχόμενό του σε λιγνίνη παρουσιάζει αύξηση σε σχέση με το ακατέργαστο υλικό. (79)

Το άχυρο αποτελεί μια από τις πιο άφθονες ανανεώσιμες πηγές του πλανήτη. Σύμφωνα με στατιστικά στοιχεία (FAO), η ετήσια παραγωγή του άχυρου στην παγκόσμια είναι περίπου 20-30 εκατομμύρια τόνους. Αποτελείται κατά βάση από στελέχη καλαμποκιού, σίτου και ρυζιού σε ποσοστό πάνω από 75%. Το ποσοστό χρησιμοποίησης του άχυρου, προς το παρόν, είναι μικρότερο από το 60% του συνόλου του ενώ υπάρχει ενδιαφέρον για γενίκευση της χρήσης του και για μικροβιακή παραγωγή λίπους πέρα από τη ζύμωση προς αιθανόλη. (80)

Μέχρι στιγμής, διάφορα στελέχη ζυμομυκήτων έχουν δοκιμαστεί για την ανάπτυξης και παραγωγή μικροβιακού λίπους σε μέσα καλλιέργειας που περιέχουν σάκχαρα που προέρχονται από υδρόλυση ημικυτταρίνης. Ωστόσο, είναι γνωστό ότι τα υδρολύματα λιγνινοκυτταρινούχας βιομάζας, περιέχουν και διάφορα άλλα υποπροϊόντα τα οποία μπορεί να έχουν αρνητική επίδραση στην παραγωγή μικροβιακού λίπους. Παραδείγματα τέτοιων ουσιών είναι το οξικό οξύ, βανιλίνη, φουρφουράλη, κλπ. Γενικά η επίδραση αυτών στη μικροβιακή ανάπτυξη και παραγωγή λίπους, δεν είναι γνωστή και το μέγεθος της αρνητικής επίδρασης ποικίλει και εξαρτάται από τον ίδιο το μικροοργανισμό. (48)

Η ξυλόζη είναι το σάκχαρο που μπορεί να απελευθερωθεί σε μεγάλο ποσοστό, εύκολα από βιομάζα με υδρόλυση, και μπορεί να αποτελέσει μια πιθανή πρώτη ύλη για την παραγωγή βιοκαυσίμων. Σε σύγκριση με τη γλυκόζη (το προτιμότερο υπόστρωμα για τους περισσότερους μικροοργανισμούς), υπάρχουν και μικροοργανισμοί, οι οποίοι δεν διαθέτουν τις συγκεκριμένες μεταβολικές οδούς που απαιτούνται για την αξιοποίηση της, λόγω έλλειψης ενζύμων. Ως εκ τούτου, η δυνατότητα αξιοποίησης της ξυλόζης σαν υπόστρωμα για την παραγωγή λιπιδίων είναι ένα κρίσιμο κριτήριο για την επιλογή στελεχών στον τομέα παραγωγής βιοντίζελ. Σύμφωνα με πρόσφατη μελέτη, έχουν βρεθεί μύκητες (*Aspergillus terreus*, *Cunninghamella Elegans*, *M. isabellina*), οι οποίοι μπορούν να συσσωρεύσουν λιπίδια πάνω από 20% επί ξηρής βιομάζας σε ξυλόζη που προέρχεται από υδρόλυμα άχυρο σίτου. (47)

II. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1. ΥΛΙΚΑ

1.1 Σόργο

Το γλυκό σόργο που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα διπλωματική εργασία άνηκε στην ποικιλία Keller και παραχωρήθηκε ευγενικά από τον καθηγητή Γιώργο Σκαράκη από το Τμήμα Επιστήμης Φυτικής Παραγωγής του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών.

Οι σπόροι και τα φύλλα απομακρύνθηκαν από τους φρέσκους μίσχους με το χέρι και αποθηκεύτηκαν σε καταψύκτη στους $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ μέχρι να γίνει χρήση του. Μετά την απόψυξη σε θερμοκρασία δωματίου, οι μίσχοι αφού αρχικά υπέστησαν ξήρανση (80°C για μέχρι σταθερού βάρους), αλέσθηκαν σε κομμάτια των $0,75$ χιλιοστών χρησιμοποιώντας εργαστηριακό μύλο. (81)

Η σύσταση του ξηρού γλυκού σόργου ήταν η ακόλουθη: σακχαρόζη $34,4\%$ w/w , γλυκόζη $8,3\%$ w/w, φρουκτόζη $8,06\%$ w/w, κυτταρίνη και ημικυτταρίνη 19.6% w/w και 15.2%

1.2 Liquid Fraction

Η προκατεργασία του Liquid Fraction έγινε στους 190°C για 12 λεπτά.

Η σύσταση του Liquid Fraction που χρησιμοποιήθηκε είναι η ακόλουθη:

Πίνακας 8: Η σύσταση του Liquid Fraction

| Free sugars | (g/l) | Total sugars | (g/l) |
|--------------------|-------------------|---------------------|--------------|
| Glucose | 0.4 | Glucose | 3.4 |
| Xylose | 2.6 | Xylose | 11.36 |
| Arabinose | 0.93 | Arabinose | 1.69 |
| Acetate | 1.1 (5.46) | | |

1.3 Μικροοργανισμός

Το στέλεχος F3 του μύκητα *F. Oxysporum*, που χρησιμοποιείται στα πλαίσια της παρούσας διπλωματικής, έχει απομονωθεί από το κύμινο. (82)

2. ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ

2.1 Στερεό υπόστρωμα για sland

Ο μικροοργανισμός επωαζόταν σε θερμοστατούμενο κλίβανο (GALLENKAMP Plus II, Αγγλία & WTBbinder B34, Γερμανία) στους 30°C σε δοκιμαστικούς σωλήνες (sland tubes) με κεκλιμένο στερεό υπόστρωμα, του οποίου η σύσταση είναι η εξής:

Πίνακας 9: Τα συστατικά του στερεού υπόστρωματος για το sland

| Συστατικό | Συγκέντρωση (g/L) |
|----------------------------|-------------------|
| Potato Dextrose Agar (PDA) | 39 |
| Yeast Extract | 2 |

Αφού παρασκευαστεί διάλυμα με τα παραπάνω συστατικά, αυτό μοιράζεται σε δοκιμαστικούς σωλήνες (περίπου 5 mL στον καθένα). Το pH του διαλύματος κυμαίνεται στις τιμές 5-5,5 και δεν γίνεται περεταίρω διόρθωση του. Οι δοκιμαστικοί σωλήνες στη συνέχεια πωματίζονται ερμητικά με βαμβάκι και ακολουθεί αποστείρωση τους στους 121 °C για 20 λεπτά. Οι δοκιμαστικοί αφήνονται να ψυχθούν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος ακουμπισμένοι με κλίση ώστε να επιτευχθεί μέγιστη διαθέσιμη επιφάνεια του υποστρώματος καθώς αυτό στερεοποιείται.

Ακολουθούσε ο εμβολιασμός του μικροοργανισμού, υπό ασηπτικές συνθήκες, από άλλο sland με τη χρήση βακτηριολογικού κρίκου. Με τη βοήθεια του κρίκου γινόταν απόξεση ποσότητας/ αποικιών του μύκητα και μεταφερόταν στο νέο sland, όπου και απλωνόταν σε όλη την επιφάνεια του στερεού υποστρώματος.

Η επώαση του μικροοργανισμού στον κλίβανο κρατούσε 3 ημέρες. Μετά το πέρας των τριών ημερών τα sland διατηρούνταν σε θερμοκρασία 4°C.

2.2 Υγρό υπόστρωμα προκαλλιέργειας

Πριν από κάθε εμβολιασμό στο υγρό υπόστρωμα της προκαλλιέργειας, το στέλεχος ανανεώνεται με την παραπάνω μέθοδο, ώστε το εμβόλιο να είναι ηλικίας περίπου τριών ημερών.

Το υγρό της προκαλλιέργειας περιέχει τα παρακάτω θρεπτικά συστατικά:

Πίνακας 10: Τα συστατικά για το υπόστρωμα της προκαλλιέργειας

| Συστατικά | Συγκέντρωση (g/L) |
|---|-------------------|
| NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O | 6,94 |
| Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O | 9,52 |
| KH ₂ PO ₄ | 1 |
| MgSO ₄ ·7H ₂ O | 0,3 |
| (NH ₄) ₂ PO ₄ | 10 |
| Γλυκόζη | 20 |

Αφού παρασκευαζόταν το διάλυμα με τα παραπάνω συστατικά, ακολουθούσε διόρθωση του pH στην τιμή 6 με προσθήκη βασικού ή όξινου διαλύματος ανάλογα. Στη συνέχεια λαμβάνονταν 2 γυάλινες κωνικές φιάλες των 250 mL και σε καθεμία από αυτές μεταφέρονταν 100 mL από το διάλυμα, οι οποίες πωματίζονταν και αποστειρώνονταν στους 110 °C για 40 λεπτά. Μετά την αποστείρωση και την ψύξη των κωνικών σε θερμοκρασία δωματίου γινόταν ο εμβολιασμός από το sland. Κατά τον εμβολιασμό μικρή ποσότητα διαλύματος από την κωνική φιάλη μεταφερόταν στο sland μέχρι την πλήρωση του και με την χρήση του βακτηριακού κρίκου γινόταν απόξεση του μύκητα από το στερεό υπόστρωμα για να διαλυθούν αποικίες του στο υγρό που προστέθηκε. Τελικά, το υγρό που περιείχε τον μύκητα μοιραζόταν, υπό ασηπτικές συνθήκες, σε καθεμία από τις κωνικές.

Έπειτα, η προκαλλιέργεια τοποθετούνταν σε ανακινούμενη τράπεζα προς επώαση (shaker) (ZHWY-211C, Incubator Shaker) σε θερμοκρασία 30°C και 200 rpm για 48 ώρες.

2.3 Υγρό υπόστρωμα καλλιέργειας

Μετά την προκαλλιέργεια σειρά έχει η καλλιέργεια, τα συστατικά για το υγρό υπόστρωμα της οποίας παρουσιάζονται παρακάτω:

Πίνακας 11: Τα συστατικά για το υπόστρωμα της κυρίως καλλιέργειας

| Συστατικά | Συγκέντρωση (g/L) |
|---|--|
| NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O | 6,94 |
| Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O | 9,52 |
| KH ₂ PO ₄ | 1 |
| MgSO ₄ ·7H ₂ O | 0,3 |
| Πηγή Αζώτου | Σε συγκεκριμένη αναλογία για τη διερεύνηση συγκεκριμένου στόχου τη φορά, ή διαφορετικά προέρχονται ή/και από το σόργο ή το Liquid Fraction |
| Πηγή Άνθρακα | |

Πιο συγκεκριμένα, οι πηγές άνθρακα που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων ήταν: η γλυκόζη, η φρουκτόζη, η σακχαρόζη, καθώς και μίγμα των τριών αυτών σακχάρων (στις αναλογίες στις οποίες απαντώνται στο γλυκό σόργο), ενώ οι πηγές αζώτου που μελετήθηκαν ήταν από οργανικές: ουρία, πεπτόνη και yeast extract, και από ανόργανες: χλωριούχο αμμώνιο (NH₄Cl), θειικό αμμώνιο ((NH₄)₂SO₄) και όξινο φωσφορικό αμμώνιο ((NH₄)₂HPO₄).

Αφού παρασκευαζόταν το διάλυμα με τα παραπάνω συστατικά, ακολουθούσε διόρθωση του pH στην τιμή 6. Στη συνέχεια λαμβάνονταν 2 γυάλινες κωνικές φιάλες των 1000 mL και σε καθεμία από αυτές μεταφέρονταν 200 mL από το διάλυμα, οι οποίες πωματίζονταν και αποστειρώνονταν στους 110 °C για 40 λεπτά στην περίπτωση των καθαρών πηγών και στους 121 °C για 20 λεπτά στην περίπτωση του σόργου. Μετά την αποστείρωση και την

ψύξη των κωνικών σε θερμοκρασία δωματίου γινόταν ο εμβολιασμός από την προκαλλιέργεια. Συγκεκριμένα, μετά το πέρας της επώασης της προκαλλιέργειας, από τις 2 διαθέσιμες κωνικές επιλεγόταν εκείνη στην οποία ο μύκητας είχε αναπτυχθεί περισσότερο και οπτικά φαινόταν ως πιο θολό το υγρό.

Το εμβόλιο ήταν 5% επί του συνολικού όγκου της κύριας καλλιέργειας (200 mL), δηλαδή 10 mL και μεταφερόταν από την προκαλλιέργεια με τη χρήση αποστειρωμένου ογκομετρικού κυλίνδρου σε κάθε κωνική φιάλη της καλλιέργειας με το θρεπτικό μέσο, υπό ασηπτικές συνθήκες.

Οι κωνικές φιάλες της κυρίως καλλιέργειας τοποθετούνταν στον ανακινούμενο επωαστήρα στους 30°C και 200 rpm μέχρι σταθεροποίησης της κατανάλωσης των σακχάρων.

Η ανάπτυξη του μικροοργανισμού με αυτή τη μέθοδο αποτελεί παράδειγμα κλειστού τύπου καλλιέργειας και ασυνεχούς λειτουργίας.

3. ΑΝΑΛΥΣΕΙΣ

3.1 Δειγματοληψία

Ανά 24 ώρες περίπου, παραλαμβάνονταν δείγμα 10 mL από την καλλιέργεια υπό στείρες συνθήκες με αποστειρωμένους ογκομετρικούς κυλίνδρους και τοποθετούνταν σε πλαστικό δοχείο (falcon). Προηγείτο ανάδευση της κωνικής για την παραλαβή του περισσότερο αντιπροσωπευτικού δείγματος. Ακολουθούσαν αναλύσεις οι οποίες θα περιγραφτούν στη συνέχεια της εργασίας. Στην περίπτωση του σόργου, το δείγμα λαμβανόταν σε προζυγισμένα falcon, και η συγκεκριμένη ποσότητα του δείγματος, προέκυπτε με την αφαίρεση του απόβαρου από το μεικτό βάρους του falcon.

3.2 Προσδιορισμός pH

Σε κάθε δείγμα, το pH της καλλιέργειας μετριοταν με pH-μετρο τύπου 537 (WTW Γερμανία) και ακρίβεια 2 δεκαδικών ψηφίων. Συνήθως το pH της αρχικής καλλιέργειας ήταν κοντά στο 6,00 με πτωτική τάση προς το τέλος της καλλιέργειας.

3.3 Προσδιορισμός βιομάζας στις καθαρές πηγές

Ο προσδιορισμός της βιομάζας πραγματοποιείται μέσω της μέτρησης του ξηρού βάρους. Τα δείγματα της κάθε μέρας, μετά τον προσδιορισμό του pH, υφίστανται διήθηση υπό κενό με χρήση της συσκευής (Heto Master Jet) και διηθητικά χαρτιά τύπου (Cellulose Nitrate και μέγεθος πόρων 0,45μm της εταιρίας Sartorius stedim). Μετά την απόχυση όλου του δείγματος προς διήθηση, συλλεγόταν το διήθημα για περαιτέρω ανάλυση (προσδιορισμό αναγωγικών σακχάρων). Στη συνέχεια, ακολουθούσε έκπλυση με απιονισμένο νερό του δοχείου του δείγματος προς διήθηση, έτσι ώστε να απομακρυνθεί όλη η βιομάζα από το δοχείο τύπου falcon. Η βιομάζα παρέμενε και συσσωρευόταν στο διηθητικό χαρτί και από αυτό μεταφερόταν σε γυάλινο προζυγισμένο δοχείο τύπου vial (φιαλίδιο McCartney) με τη

βοήθεια μικρής σπάτουλας. Το κάθε δοχείο vial είχε παραμείνει για τουλάχιστον 24 ώρες σε φούρνο θερμοκρασίας 100 °C για απομάκρυνση της συνολικής υγρασίας του γυαλιού έτσι ώστε να μην υπάρχουν σφάλματα κατά τη ζύγιση του απόβαρου του δοχείου. Στη συνέχεια μεταφερόταν σε γυάλινο ξηραντήρα για να ψυχθεί στη θερμοκρασία δωματίου και έπειτα ζυγίζοταν. Επιπρόσθετα, το διηθητικό χαρτί ξεπλενόταν με απιονισμένο νερό, έτσι ώστε όλη η ποσότητα των κυττάρων να μεταφερθεί στο γυάλινο vial. Στη συνέχεια, το vial τοποθετείτο σε φούρνο για ξήρανση στους 60 °C μέχρι σταθεροποίησης του βάρους τους. Το ξηρό υπόλειμμα ζυγίζοταν σε αναλυτικό ζυγό (Kern Abs) με ακρίβεια 4 δεκαδικών ψηφίων. Η διαφορά βάρους απόβαρου –μεικτού βάρους δίνει την ξηρή βιομάζα.

Η βιομάζα φραζόταν σε {g} βιομάζας / {L} καλλιέργειας.

3.4 Προσδιορισμός βιομάζας στο σόργο και στο Liquid Fraction

Στις περιπτώσεις που χρησιμοποιήθηκε το γλυκό σόργο είτε το LF σαν υπόστρωμα, λόγω της παρουσίας στερεών στο μέσο καλλιέργειας, δεν ήταν δυνατή η μέτρηση της βιομάζας με ξήρανση και ζύγιση, όπως περιγράφηκε παραπάνω.

Για το λόγο αυτό, ο προσδιορισμός της βιομάζας πραγματοποιούνταν με τη μέθοδο της γλυκοζαμίνης, η οποία αποτελεί συστατικό της μεμβράνης των κυττάρων του μύκητα.

Αρχικά παρασκευάζονται τα εξής αντιδραστήρια:

-Διάλυμα 2 M Na_2CO_3 προσθέτοντας σε 50 mL απιονισμένου νερού 10,6 g του άλατος.

-Διάλυμα Acetyl Acetone 2% σε Na_2CO_3 προσθέτοντας σε 100 mL απιονισμένου νερού 15,9 g Na_2CO_3 και στη συνέχεια 2 mL Acetyl Acetone.

-Διάλυμα Ehrlichs προσθέτοντας 1 g p-dimethyl-amino-benzaldehyde σε 15 mL αιθανόλης και 15 mL διαλύματος HCl 37% w/w.

Σύμφωνα με τη μέθοδο της γλυκοζαμίνης, λαμβάνονται 0,3 mL κατάλληλα αραιωμένου δείγματος σε βιδωτούς δοκιμαστικούς σωλήνες και προστίθενται 0,3 mL διαλύματος HCl 4 N. Οι δοκιμαστικοί πωματίζονται και τοποθετούνται σε αυτόκλειστο θερμοκρασίας 121 °C για 1 ώρα για να πραγματοποιηθεί όξινη υδρόλυση.

Μετά το πέρας της υδρόλυσης στους δοκιμαστικούς προστίθεται 0,4 mL Na_2CO_3 2 M και το διάλυμα φιλτράρεται με φίλτρα (whatman και μέγεθος πόρων 0,2 μm). Στη συνέχεια συλλέγεται το διήθημα σε άλλους δοκιμαστικούς σωλήνες και σε αυτό προστίθεται 0,5 mL του διαλύματος Acetyl Acetone σε Na_2CO_3 . Ακολουθεί μεταφορά των δοκιμαστικών σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 100°C και παραμονή τους για 20 λεπτά. Έπειτα, αφήνονται να ψυχθούν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και προστίθεται 1 mL αιθανόλης και 0,5 mL διαλύματος Ehrlichs υπό αργή ανάδευση λόγω της έκλυσης CO_2 . Τελικά τα δείγματα φωτομετρούνται αμέσως στο φωτόμετρο στα 530 nm.

Η καμπύλη αναφοράς η οποία μετατρέπει την απορρόφηση (ABS) που λαμβάνεται σε συγκέντρωση γλυκοζαμίνης είναι:

$ABS * 0,8072 \rightarrow [mg/mL]$ γλυκοζαμίνη

Έπειτα για να μετατραπεί η παραπάνω συγκέντρωση της γλυκοζαμίνης σε βιομάζα [g/L] του μύκητα *Fusarium oxysporum*, γίνεται χρήση της παρακάτω καμπύλης αναφοράς:

$[mg/mL]$ γλυκοζαμίνη * 4,628 \rightarrow βιομάζα [g/L] *Fusarium oxysporum*

Η βιομάζα στην περίπτωση αυτή εκφραζόταν σε {g} βιομάζας / L καλλιέργειας.

3.5 Προσδιορισμός αναγωγικών σακχάρων

Ο προσδιορισμός των αναγωγικών σακχάρων με τη φωτομετρική μέθοδο του δινιτροσαλικυλικού οξέος (DNS) (Miller, 1959).

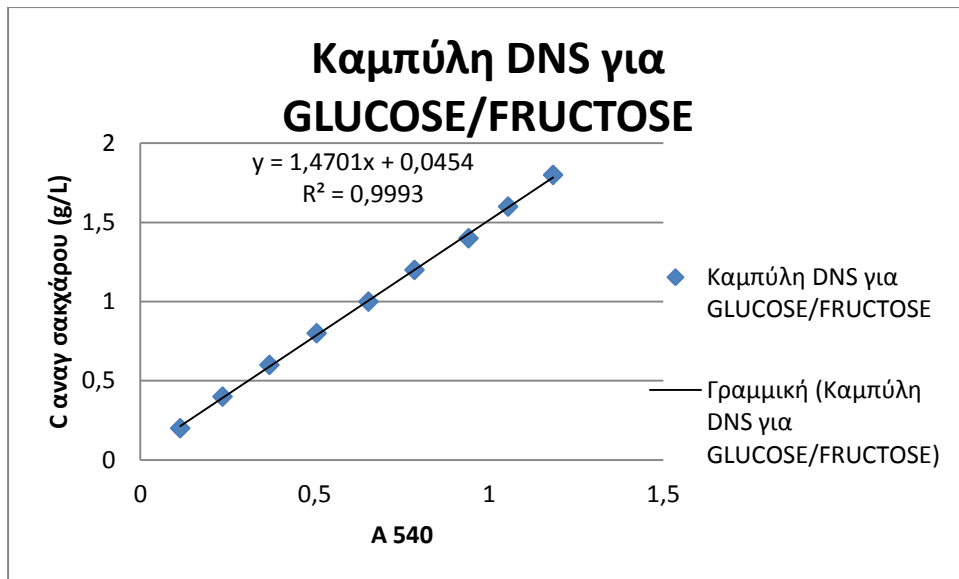
Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στην αναγωγή του 3,4-δινιτροσαλικυλικού οξέος προς 3-αμινο-5-νιτροσαλικυλικό οξύ παρουσία καυστικού νατρίου (NaOH) και την ταυτόχρονη οξειδωση της γλυκόζης προς γλυκονικό οξύ. (83)

Αρχικά παρασκευάστηκε το αντιδραστήριο. Συγκεκριμένα σε γυάλινο ποτήρι ζέσεως (1000 mL) τοποθετήθηκαν 200 mL διαλύματος NaOH 8% w/v, 500 mL απιονισμένο νερό και 10 g άνυδρο DNS ($C_7H_4N_2O_7$). Στο παραπάνω διάλυμα προστέθηκαν υπό θέρμανση και ανάδευση 402,7 g potassium sodium tartate ($4 \cdot H_4KNa_2O_6$). Τελικά ογκομετρήθηκε και προστέθηκε απιονισμένο νερό μέχρι όγκο 1 L. Το αντιδραστήριο διατηρήθηκε για όλη τη διάρκεια των πειραμάτων σε σκούρο γυάλινο μπουκάλι και μακριά από φως.

-Στην περίπτωση υποστρωμάτων με πηγή άνθρακα γλυκόζη ή φρουκτόζη ακολουθούταν η εξής διαδικασία:

Σύμφωνα με τη μέθοδο του DNS σε 250 μ L του κατάλληλα αραιωμένου δείγματος σε δοκιμαστικό σωλήνα προστίθενται 250 μ L αντιδραστηρίου DNS και κατόπιν ανάδευσης (συσκευή Vortex) μεταφέρεται σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 100°C για 5 λεπτά. Στη συνέχεια, γινόταν προσθήκη 2mL απιονισμένου νερού και μετά από ανάδευση μετρούνταν η απορρόφηση του δείγματος με φωτομέτρηση στα 540nm. Το φασματοφωτόμετρο που χρησιμοποιήθηκε ήταν τύπου Boeco S-20 Spectrophotometer (Γερμανία). Ο μηδενισμός του φωτομέτρου πραγματοποιούνταν με τη χρήση τυφλού δείγματος, το οποίο παρασκευαζόταν με την παραπάνω διαδικασία μόνο που αντί για δείγμα καλλιέργειας περιέχονταν ίση ποσότητα απιονισμένου νερού.

Για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης του δείγματος σε ανάγοντα σάκχαρα και συγκεκριμένα γλυκόζη ή φρουκτόζη, χρησιμοποιήθηκε η καμπύλη αναφοράς που παρουσιάζεται παρακάτω.



Διάγραμμα 9: Πρότυπη καμπύλη γλυκόζης για τη μέθοδο DNS

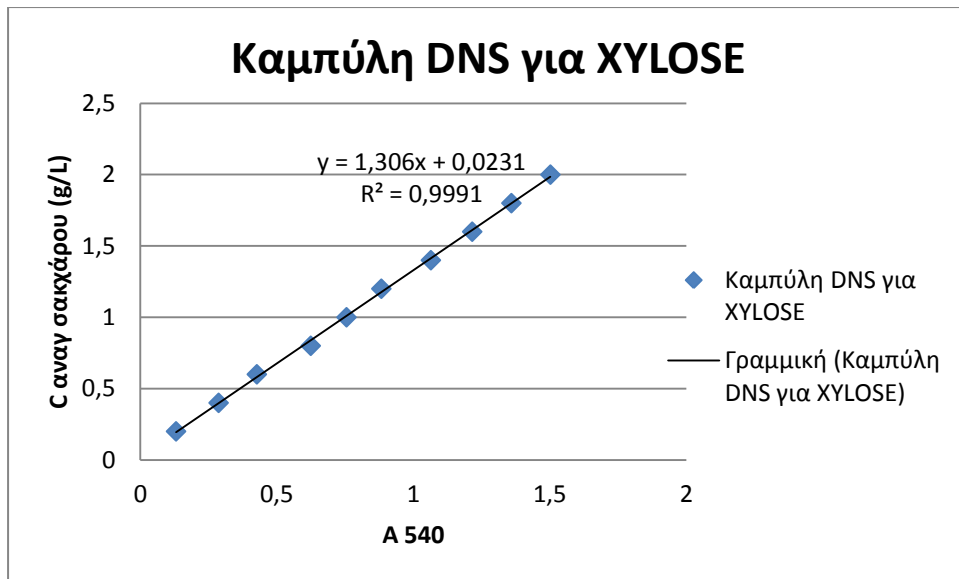
-Στην περίπτωση υποστρωμάτων με πηγή άνθρακα τον διασαχαρίτη σακχαρόζη (είτε από καθαρές πηγές είτε από το γλυκό σόργο) ακολουθούνταν επιπλέον μια προεργασία του δείγματος που περιελάμβανε την όξινη υδρόλυση του.

Συγκεκριμένα, λαμβάνονταν 4,5 mL κατάλληλα αραιωμένου δείγματος και τοποθετούνταν σε δοκιμαστικό σωλήνα. Ακολουθούσε προσθήκη 0,5 mL πυκνού διαλύματος HCl 12N, ανάδευση σε vortex και τοποθέτηση σε υδατόλουτρο στους 70°C για 15 λεπτά. Κατόπιν γινόταν εξουδετέρωση με προσθήκη 0,5 mL NaOH 12N και το δείγμα αναδευόταν ξανά.

Τελικά ακολουθούσε ο προσδιορισμός των αναγωγικών σακχάρων με τη φωτομετρική μέθοδο του δινιτροσαλικυλικού οξέος (DNS), όπως περιγράφηκε παραπάνω.

-Στην περίπτωση όπου σαν υπόστρωμα χρησιμοποιήθηκε το κλάσμα Liquid Fraction, το οποίο περιέχει στο μεγαλύτερο ποσοστό το σάκχαρο ξυλόζη, ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία με την περίπτωση της ανάλυσης για γλυκόζη ή φρουκτόζη.

Για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης του δείγματος σε ξυλόζη, χρησιμοποιήθηκε η καμπύλη αναφοράς που παρουσιάζεται παρακάτω.



Διάγραμμα 10: Πρότυπη καμπύλη ξυλόζης για τη μέθοδο DNS

3.6 Εκχύλιση λιπαρών

Στη βιβλιογραφία (84), (56) περιγράφονται αναλυτικά αρκετές μέθοδοι παραλαβής λιπαρών από την κυτταρική μάζα των μικροοργανισμών. Στα πλαίσια της συγκεκριμένης διπλωματικής ακολουθήθηκε η μέθοδος του Folch, η οποία και περιγράφεται παρακάτω. Όπως φαίνεται και παρόμοιες μελέτες παραγωγής μικροβιακού λίπους (34), με τη μέθοδο αυτή επιτυγχάνεται η μεγαλύτερη ανάκτηση λιπαρών από τα κύτταρα.

Για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης του παραγόμενου ενδοκυτταρικού λίπους που παράγεται από το μύκητα, αφού ζυγιστεί η ελεύθερη από υγρασία βιομάζα που περιέχεται στο φιαλίδιο McCartney (για τον υπολογισμό της βιομάζας), προστίθεται ποσότητα διαλύματος folch και ακολουθεί απόξεση της βιομάζας από τα τοιχώματα του φιαλιδίου με χρήση μικρής σπάτουλας (για αποτελεσματικότερη μεταφορά του λιπαρού από τα κύτταρα στο διάλυτη). Το συγκεκριμένο διάλυμα είναι ένα μίγμα των διαλυτών χλωροφορμίου (CHCl_3) – μεθανόλης (CH_3OH) σε αναλογία 2:1 v/v. Στη συνέχεια τα φιαλίδια φυλάσσονται σε σκοτεινό μέρος, για να αποφευχθεί η οξείδωση των λιπαρών, για τουλάχιστον 3 ημέρες. Με το διάλυμα folch πραγματοποιείται εκχύλιση του συνολικού μικροβιακού λίπους (85)

Μετά το πέρας των 3 (ή και παραπάνω) ημερών το περιεχόμενο του φιαλιδίου δηλαδή το διάλυμα folch μαζί με τη διαλυμένη βιομάζα υφίστατο διήθηση με ηθμό. Το διήθημα συλλέγονταν σε προζυγισμένη φιάλη εξάτμισης, η οποία προηγουμένως ήταν τοποθετημένη σε φούρνο στους $100\text{ }^\circ\text{C}$, για να είναι πλήρως απαλλαγμένη από υγρασία και στη συνέχεια ακολουθούσε εξάτμιση σε περιστροφικό εξατμιστήρα (rotary evaporator) για την απομάκρυνση του διαλύτη. Ο εξατμιστήρας που χρησιμοποιήθηκε ήταν τύπου Büchi, RE 111, Rotanapor. Η θερμοκρασία στον εξατμιστήρα καθοριζόταν στους $60\text{ }^\circ\text{C}$, για να καλύπτει τη θερμοκρασία εξάτμισης της μεθανόλης που είναι $64,3\text{ }^\circ\text{C}$ και του

χλωροφορμίου που είναι 61 °C. (86), (87) Στη φιάλη εξάτμισης παρέμενε τελικά το μικροβιακό λίπος. Η φιάλη τοποθετούνταν ξανά για ξήρανση για 20-30 λεπτά σε φούρνο θερμοκρασίας 100 °C, ώστε να εξατμιστεί υπόλειμμα διαλύτη και στη συνέχεια αφού μεταφερόταν σε ξηραντήρα μέχρι να αποκτήσει θερμοκρασία δωματίου, ζυγίζονταν.

Τελικά, υπολογιζόταν η συγκέντρωση του μικροβιακού λίπους σε {g} / L καλλιέργειας .

3.7 Προσδιορισμός Αζώτου Ελεύθερων Αμινομάδων (FAN)

Η αναλυτική μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό του αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων (FAN, Free Amino Nitrogen) είναι η φωτομετρική μέθοδος της νινυδρίνης. (88)

Παρασκευάστηκαν τα εξής αντιδραστήρια:

-Αντιδραστήριο χρώσης (Color reagent):

Το αντιδραστήριο αυτό αποτελείται από: 49,71 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 5 g νινυδρίνη, 3 g φρουκτόζη και περίπου 60g KH_2PO_4 , διαλυμένα σε 1L απιονισμένου νερού. Κατά τη διάρκεια της παρασκευής του αντιδραστήριου το pH του διαλύματος πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ των τιμών 6,60 και 6,80. Ως εκ τούτου, όποτε κρίνεται αναγκαίο το pH διορθώνεται, ώστε να κυμαίνεται εντός του προαναφερθέντος εύρους. Η διόρθωση γίνεται με προσθήκη κατάλληλης ποσότητας KH_2PO_4 στο διάλυμα. Το αντιδραστήριο χρώσης αποθηκεύεται σε μπουκάλι Duran σε θερμοκρασία 4 °C.

-Αντιδραστήριο αραίωσης (Dilution reagent):

Αρχικά 2 g KIO_3 διαλύονται σε 616 mL απιονισμένου νερού. Ακολούθως, 384 mL καθαρής αιθανόλης προστίθενται στο διάλυμα, το οποίο έχει τελικό όγκο 1L.

-Αποθεματικό διάλυμα γλυκίνης (Glycine stock solution):

Διαλύονται 0,1072 g γλυκίνης σε 100 mL απιονισμένου νερού και αποθηκεύεται σε θερμοκρασία 4 °C.

-Πρότυπο διάλυμα γλυκίνης (Glycine standard solution):

Για να εξασφαλιστεί συγκέντρωση FAN 2 mg/L, διαλύεται 1mL αποθεματικού διαλύματος γλυκίνης σε 100 mL απιονισμένου νερού. Το διάλυμα αποθηκεύεται σε θερμοκρασία 4°C.

Η μέθοδος εφαρμόζεται ως εξής: Αρχικά 2 mL κατάλληλα αραιωμένου δείγματος μεταφέρονται σε δοκιμαστικό σωλήνα με βιδωτό πλαστικό καπάκι. Παρασκευάζονται επίσης ένα πρότυπο δείγμα, με προσθήκη 2 mL πρότυπου διαλύματος γλυκίνης σε δοκιμαστικό σωλήνα και ένα τυφλό δείγμα με προσθήκη 2 mL απιονισμένου νερού σε ένα δεύτερο δοκιμαστικό σωλήνα. Έπειτα 1 mL του αντιδραστήριου χρώσης μεταφέρεται σε κάθε έναν από τους παραπάνω δοκιμαστικούς σωλήνες. Οι δοκιμαστικοί σωλήνες πωματίζονται και τοποθετούνται σε υδατόλουτρο στους 100°C για 16 min ακριβώς. Στη

συνέχεια, οι δοκιμαστικοί σωλήνες ψύχονται σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 20 °C για περίπου 20 min. Ακολούθως, σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα προστίθενται 5 mL αντιδραστήριου αραιώσης και τέλος μετράται η απορρόφηση τους στα 570nm με φασματοφωτόμετρο, αφού προηγηθεί μηδενισμός με το τυφλό διάλυμα.

Η συγκέντρωση του δείγματος σε υπολογίστηκε με βάση την ακόλουθη πρότυπη καμπύλη αναφοράς εκφρασμένη σε mg FAN.

Η συγκέντρωση σε άζωτο ελεύθερων αμινομάδων (FAN) σε mg/L, για κάθε δείγμα, γινόταν με αναλογία, χρησιμοποιώντας σαν εσωτερικό πρότυπο την απορρόφηση του πρότυπου διαλύματος γλυκίνης, το οποίο είχε γνωστή συγκέντρωση : 2 FAN 2 mg/L.

3.8 Προσδιορισμός Ολικών Πρωτεϊνών (Lowry)

Η αναλυτική μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό της ποσότητας των ολικών πρωτεϊνών, είναι η φωτομετρική μέθοδο με το αντιδραστήριο Folin Phenol (Lowry protein measurement). (89)

Παρασκευάστηκαν τα εξής αντιδραστήρια:

-Το αντιδραστήριο A είναι διάλυμα 1% w/v $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ και παρασκευάζεται προσθέτοντας σε 5 mL απιονισμένο νερό 0,032 g της ουσίας αυτής.

- Το αντιδραστήριο B είναι διάλυμα 2% w/v sodium potassium tartrate και παρασκευάζεται προσθέτοντας σε 5 mL απιονισμένο νερό 0,1 g της ουσίας αυτής.

-Το αντιδραστήριο C είναι διάλυμα 0,2 M NaOH και από αυτό λαμβάνονται 10 mL.

- Το αντιδραστήριο D είναι διάλυμα 4% w/v Na_2CO_3 και παρασκευάζεται προσθέτοντας σε 50 mL απιονισμένο νερό 2 g της ουσίας αυτής.

-Στη συνέχεια παρασκευάζεται το διάλυμα E παραλαμβάνοντας 49 mL από το διάλυμα D και προσθέτοντας τα σε 49 mL από το διάλυμα C. Έπειτα στο ίδιο ποτήρι ζέσεως μαζί με τα προηγούμενα προστίθενται 1 mL από το διάλυμα A και 1 mL από το διάλυμα B. Το διάλυμα αυτό παρασκευαζόταν φρέσκο κάθε φορά και δεν αποθηκευόταν.

-Το αντιδραστήριο F αποτελείται από 10 mL διαλύματος Folin Ciocalteu και 10 mL απιονισμένου νερού.

Η μέθοδος εφαρμόζεται ως εξής: Λαμβάνονται 0,9 mL κατάλληλα αραιωμένου δείγματος σε δοκιμαστικό σωλήνα και σε αυτό προστίθενται 2,5 mL από το αντιδραστήριο E. Ακολουθεί ανάδευση στο vortex και έπειτα αφήνεται σε ηρεμία για 10 λεπτά. Στη συνέχεια προστίθεται 0,25 mL από το αντιδραστήριο F, αναδεύονται στο vortex και ο δοκιμαστικός σωλήνας αφήνεται σε ηρεμία για 30 λεπτά. Τέλος μετράται η απορρόφηση τους στα 750nm με φασματοφωτόμετρο, αφού προηγηθεί μηδενισμός με το τυφλό διάλυμα.

Η καμπύλη αναφοράς για τον υπολογισμό της ποσότητας ολικού αζώτου σε mg/mL από την απορρόφηση είναι :

ABS* 0,4854 → [mg/mL] ολικών πρωτεϊνών

3.9 Ενζυμική υδρόλυση σόργου

Για να μπορέσει να χρησιμοποιηθεί το γλυκό σόργο ως υπόστρωμα για την ανάπτυξη του μύκητα *F. Oxysporum*, προηγήθηκε το στάδιο της ενζυμικής υδρόλυσης . (81)

Συγκεκριμένα, ο βέλτιστος χρόνος της υδρόλυσης είναι 8 ώρες και 36 λεπτά, ενώ ο όγκος ενζύμων που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τέτοιος ώστε να επιτευχθεί ενεργότητα ίση με 8,32 FPU/g στερεού. Βέλτιστη θερμοκρασία 50 °C και pH ίσο με 5.

Για την υδρόλυση χρησιμοποιήθηκαν τα ενζυμικά σκευάσματα της εταιρίας Novozymes, Celluclast 1.5L (από τον μύκητα *Trichoderma reesei*) και το Novozym 188 (από τον μύκητα *Aspergillus niger*) σε μίγμα 5:1 v/v.

Το σκεύασμα Celluclast 1.5L προστέθηκε στην αρχή της υδρόλυσης και αποτελείται από μείγμα κυτταρινασών. Το σκεύασμα Novozym 188 προστίθεται πριν τον εμβολιασμό και την έναρξη της ζύμωσης. Αυτό γίνεται διότι περιέχει και ινβεργάση (0.83 Unit/mg πρωτεΐνης), η οποία υδρολύει την σακχαρόζη, η οποία μπορεί να αυξήσει την παρεμπόδιση στις κυτταρινάσες.

Να σημειωθεί ότι ακολουθήθηκε η διαδικασία παρασκευής της καλλιέργειας όπως περιγράφηκε παραπάνω. Δηλαδή σε κάθε κωνική παρασκευάστηκε το διάλυμα με τα απαραίτητα θρεπτικά στοιχεία (άλατα), στη συνέχεια προστέθηκε το γλυκό σόργο και διορθώθηκε το pH του υποστρώματος στην 6.0 και ακολούθησε η αποστείρωση.

Η προσθήκη των ενζύμων έγινε υπό ασηπτικές συνθήκες καθώς είχε προηγηθεί η αποστείρωση.

III. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Σε γενικότερο πλαίσιο τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν με σκοπό να ελεγχθεί η ικανότητα ανάπτυξης και παραγωγής ενδοκυτταρικού λίπους του μικροοργανισμού με υπόστρωμα ρευστοποιημένα στελέχη σόργου. Πρώτα όμως χρησιμοποιήθηκαν καθαρές πηγές και μέσω αυτών έγινε η βελτιστοποίηση των παραμέτρων: πηγής άνθρακα, πηγής αζώτου και λόγου άνθρακα/αζώτου. Τα υπόλοιπα χαρακτηριστικά της καλλιέργειας όπως pH, θερμοκρασία ανάπτυξης, ρυθμός ανάδευσης, υπόλοιπα θρεπτικά άλατα δεν μεταβλήθηκαν.

Ξεκινώντας με την πηγή άνθρακα, πραγματοποιήθηκαν πειράματα με αρχική συγκέντρωση σακχάρων 40g/L και λόγο άνθρακα/αζώτου ίσο με 100, για καθένα από τα 3 σάκχαρα που περιέχονται και στο γλυκό σόργο: σακχαρόζη, γλυκόζη και φρουκτόζη ξεχωριστά. Επίσης, πραγματοποιήθηκε ένα πείραμα με το συνδυασμό των τριών παραπάνω σακχάρων στα αντίστοιχα ποσοστά που αυτά βρίσκονται στο σόργο -συγκεκριμένα: 68% σακχαρόζη, 16% γλυκόζη και 16% φρουκτόζη.

Στη συνέχεια έγινε έλεγχος της επίδρασης της πηγής αζώτου στην περίπτωση του μείγματος των 3 σακχάρων, κρατώντας σταθερές τις υπόλοιπες συνθήκες (αρχική συγκέντρωση των συνολικών σακχάρων 40g/L και το λόγο άνθρακα/αζώτου ίσο με 100). Συγκεκριμένα στα πειράματα δοκιμάστηκαν τόσο οργανικές πηγές αζώτου: ουρία, πεπτόνη, yeast extract , όσο και ανόργανες: χλωριούχο αμμώνιο (NH_4Cl), θειικό αμμώνιο [$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$], όξινο φωσφορικό αμμώνιο [$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$].

Ακολούθησε ο έλεγχος της επίδρασης του λόγου άνθρακα/αζώτου. Διεξήχθησαν πειράματα με λόγο άνθρακα/αζώτου 50, 100 και 150. Οι υπόλοιπες συνθήκες δεν άλλαζαν. Να διευκρινιστεί ότι για τη μεταβολή του λόγου κάθε φορά μειωνόταν ή αυξανόταν αντίστοιχα η πηγή αζώτου. Συγκριμένα η πηγή αζώτου που χρησιμοποιήθηκε σε αυτό τον κύκλο πειραμάτων ήταν εκείνη η οποία έδωσε τα καλύτερα αποτελέσματα στη συγκέντρωση ενδοκυτταρικού λίπους σύμφωνα με τον προηγούμενο κύκλο πειραμάτων. Αυτή είναι το yeast extract.

Τέλος, μετά την διερεύνηση των συνθηκών που επηρεάζουν την ανάπτυξη του μικροοργανισμού και την ικανότητα συσσώρευσης ενδοκυτταρικού λίπους, πραγματοποιήθηκε ανάπτυξη του μικροοργανισμού σε γλυκό σόργο. Στον 1^ο κύκλο πειραμάτων, και σε συγκέντρωση στερεών 8,69%, διερευνήθηκε η επίδραση προσθήκης επιπλέον πηγής αζώτου (πέρα από το πρωτεϊνικό άζωτο που περιέχεται στο σόργο), προσθέτοντας σαν πηγή αζώτου το yeast extract καθώς αυτό είχε βγάλει τα καλύτερα ποσοτικά αποτελέσματα λίπους στις καθαρές πηγές. Στη συνέχεια, και στην ίδια συγκέντρωση στερεών μελετήθηκε η επίδραση της ενζυμικής υδρόλυσης της κυτταρίνης του σόργου στη ζύμωση προς παραγωγή λίπους. Τέλος, ερευνήθηκε η επίδραση της αύξησης της ποσότητας των στερεών στο μέσο της καλλιέργειας για συγκεντρώσεις στερεών 12% και 16%.

Να σημειωθεί ότι όλα τα πειράματα έγιναν διπλά και ότι στα αποτελέσματα παρουσιάζεται ο μέσος όρος και των 2. Αυτό έγινε με στόχο την ελαχιστοποίηση των σφαλμάτων και για μεγαλύτερη αξιοπιστία των πειραμάτων.

Επίσης σε όλα τα διαγράμματα που παρουσιάζονται στο κεφάλαιο των αποτελεσμάτων αποτυπώνεται η τυπική απόκλιση των μετρήσεων.

4.1 Καθαρές Πηγές

Η πρώτη σειρά πειραμάτων αφορούσε την επίδραση της πηγής άνθρακα και συγκεκριμένα ελέγχθηκε αν ο μικροοργανισμός *Fusarium oxysporum* μπορεί να αναπτυχθεί στα σάκχαρα του σόργου ξεχωριστά αλλά και σε μείγμα τους με την αναλογία που εντοπίζονται στο σόργο.

Η αρχική συγκέντρωση σακχάρων καθορίστηκε σε όλες τις περιπτώσεις στα 40 g/L, και ο λόγος άνθρακα/αζώτου στην τιμή 100 με την προσθήκη 0,5 g/L yeast extract και 0,5 g/L θειικού αμμωνίου.

Για να υπολογιστούν οι λόγοι άνθρακα και αζώτου που χρησιμοποιήθηκαν τόσο κατά την διάρκεια αυτής της σειράς πειραμάτων, όσο και τον ακόλουθων, υπολογίστηκε το ποσοστό του άνθρακα και του αζώτου στα διάφορα συστατικά που προστέθηκαν. Έτσι, για τα σάκχαρα το ποσοστό του άνθρακα είναι 42% στην σακχαρόζη, και 40% στην γλυκόζη, φρουκτόζη, ξυλόζη και αραβιμόζη (τα 2 τελευταία αφορούν τη μελέτη με το Liquid Fraction). Για τις πηγές αζώτου το ποσοστό του αζώτου είναι: 21% στο θειικό αμμώνιο και το όξινο φωσφορικό αμμώνιο, 26% στο χλωριούχο αμμώνιο και 46% στην ουρία. Όσον αφορά τις πιο σύνθετες πηγές αζώτου (πεπτόνη και yeast extract) που περιέχουν και ποσότητα άνθρακα (λόγω της παρουσίας αμινοξέων), η συγκέντρωση ήταν η εξής: η πεπτόνη περιείχε 30% άνθρακα και 14% άζωτο, ενώ το yeast extract 12% άνθρακα και 11% άζωτο. Σε κάθε περίπτωση ο επιθυμητός λόγος άνθρακα προς άζωτο επιτυγχάνονταν με την προσθαφαίρεση κατάλληλης ποσότητας πηγής αζώτου.

4.1.1 Επίδραση πηγής Άνθρακα

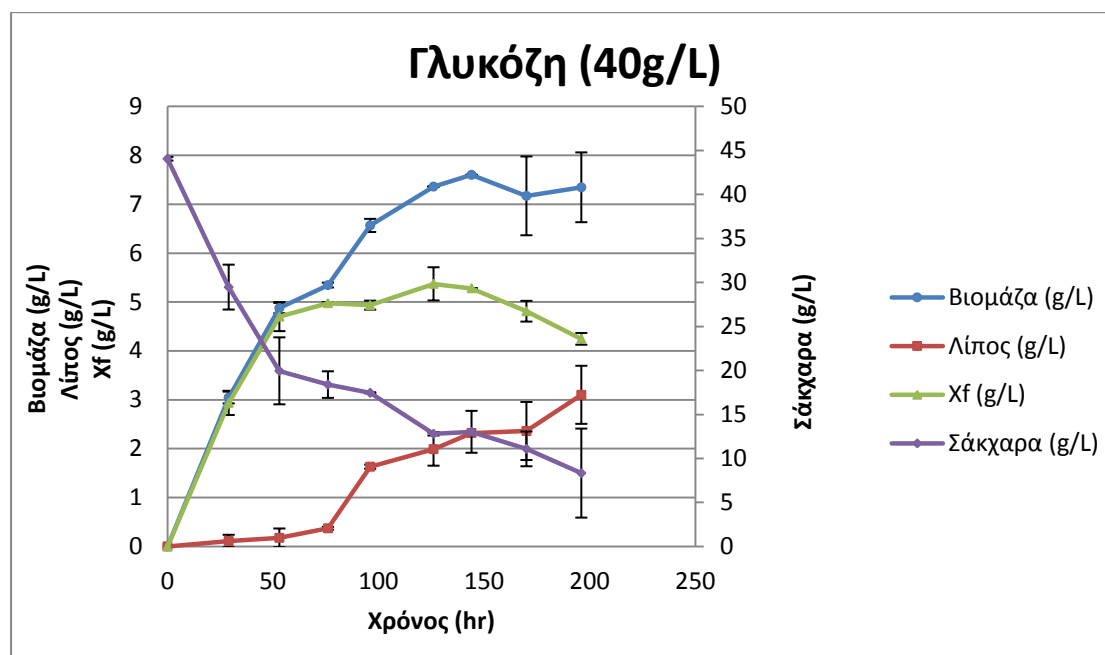
Πείραμα A1: Καλλιέργεια του μύκητα σε υπόστρωμα με πηγή άνθρακα τη γλυκόζη (σε αρχική συγκέντρωση 40 g/L)

Η ζύμωση ήταν ασυνεχούς τύπου σε ανακινούμενο επωαστήριο, με ανάδευση (200rpm) και σε θερμοκρασία 30°C, κάτω από αερόβιες συνθήκες. Το αρχικό pH των καλλιεργειών είχε ρυθμιστεί στο 6,00.

Η ζύμωση στην περίπτωση της γλυκόζης, κράτησε 8 ημέρες. Να διευκρινιστεί ότι η διάρκεια των καλλιεργειών, σε όλα τα πειράματα, καθοριζόταν από την κατανάλωση των σακχάρων.

Όταν αυτή (μετά την αύξηση της) έτεινε σε μια σταθερή τιμή, τότε οριζόταν η ολοκλήρωση της ζύμωσης. Όπως βρέθηκε και στη βιβλιογραφία (60), γενικά οι ζυμώσεις σε αυτό τον μύκητα κρατούν αρκετές ημέρες, σε αντίθεση με κάποιους άλλους μικροοργανισμούς (π.χ. ζύμες), οι ζυμώσεις των οποίων έχουν μικρότερη διάρκεια.

Στο διάγραμμα που ακολουθεί παρουσιάζονται η αύξηση της βιομάζας (X), η ελεύθερη λίπους βιομάζα (X_f), η παραγωγή ενδοκυτταρικού λίπους και η κατανάλωση του υποστρώματος από τον μύκητα κατά την ανάπτυξή του σε μέσο καλλιέργειας που περιέχει γλυκόζη 40 g/L ως πηγή άνθρακα.



Διάγραμμα 11: Κινητική της εξέλιξης της βιομάζας, της παραγωγής ενδοκυτταρικού λίπους, της ελεύθερης λίπους βιομάζας και της κατανάλωσης υποστρώματος συναρτήσει του χρόνου κατά την καλλιέργεια του μύκητα *F. Oxysporum* σε γλυκόζη, ως μόνη πηγή άνθρακα.

Από το διάγραμμα, παρατηρείται ότι για τις 2 πρώτες ημέρες, η κατανάλωση της γλυκόζης είναι γραμμική και μάλιστα με έντονο ρυθμό, αφού μέχρι το τέλος της 2^{ης} ημέρας έχει καταναλωθεί το 54,71% του υποστρώματος. Στη συνέχεια ο μύκητας καταναλώνει τη γλυκόζη με μικρότερο ρυθμό, μέχρι σταθεροποίηση της κατανάλωσης, η οποία αντιστοιχεί σε ποσοστό 81% της αρχικής ποσότητας υποστρώματος την 8^η και τελευταία ημέρα ζύμωσης.

Όσον αφορά στην παραγωγή βιομάζας, αυτή είναι ιδιαίτερα έντονη για τις 2 πρώτες ημέρες, φτάνοντας την τιμή 4,86 g/L, κατά αντιστοιχία με τον έντονο ρυθμό κατανάλωσης του υποστρώματος. Φτάνει τη μέγιστη τιμή της την 6^η ημέρα με τιμή 7,8 g/L και από εκεί και έπειτα παύει να αυξάνεται.

Η παραγωγή του ενδοκυτταρικού λίπους ξεκινάει με αργό ρυθμό ειδικά για τις πρώτες 3 ημέρες, με τιμές <1 g λίπους/L. Όπως έχει αναφερθεί, στο διάστημα αυτό, ο μύκητας αφομοιώνει τη γλυκόζη με έντονο ρυθμό προς παραγωγή βιομάζας. Από την 4^η ημέρα, οπότε και παρήχθησαν 1,63 g λίπους/L, και μετά το λίπος αυξάνεται και φτάνει τη μέγιστη τιμή του την 8^η και τελευταία ημέρα ζύμωσης με τιμή 3,1. Ταυτόχρονα όμως, αυξάνεται και

το ποσοστό των λιπιδίων επί ξηράς μάζας κυττάρων, το οποίο ξεκίνησε με την τιμή 3,6% για την πρώτη ημέρα ζύμωσης, και με αυξητική τάση έφτασε μέχρι την τιμή 42%, η οποία είναι και η μέγιστη για την τελευταία ημέρα ζύμωσης. Επίσης, να σχολιαστεί ότι την από την 4^η ημέρα και μετά, οπότε και έχει αρχίσει η σύνθεση μεγαλύτερης ποσότητας λιπιδίων σε βάρος της παραγωγής βιομάζας, η παράμετρος αυτή αυξάνεται με εντονότερο ρυθμό.

Όσον αφορά στην πορεία της παραμέτρου X_f , η οποία αναπαριστά την ελεύθερη λίπους βιομάζα, παρατηρείται ότι γενικά αυξάνεται σχεδόν ανάλογα με τη βιομάζα μέχρι την τρίτη ημέρα, έπειτα μειώνεται ο ρυθμός αύξησης της και από την 7^η ημέρα και μετά αρχίζει να μειώνεται. Αυτή η συμπεριφορά είναι αναμενόμενη καθώς από την 4^η ημέρα και μετά ξεκινάει η μεγαλύτερη παραγωγή λίπους.

Τέλος, για την ημέρα που παρατηρήθηκε η μέγιστη παραγωγή λίπους (και από άποψη ποσότητας g/L και από άποψη % λιπιδίων επί ξηράς βιομάζας), η οποία είναι και η τελευταία ημέρα της ζύμωσης, αναφέρονται ενδεικτικά οι παρακάτω συντελεστές:

-ο συντελεστής παραγωγής βιομάζας $Y_{x/s}$: 0,21 g/g (δηλαδή παρήχθησαν 0,21g βιομάζας ανά g καταναλωθέντων σακχάρων)

-ο συντελεστής απόδοσης λίπους, $Y_{l/s}$: 0,087 g/g (δηλαδή 0,087g λίπους ανά g καταναλωθέντων σακχάρων)

-ο συντελεστής παραγωγής ελεύθερης λίπους βιομάζας, $Y_{xf/s}$: 0,12 g/g (δηλαδή 0,12 g ελεύθερη λίπους βιομάζα ανά g καταναλωθέντων σακχάρων).

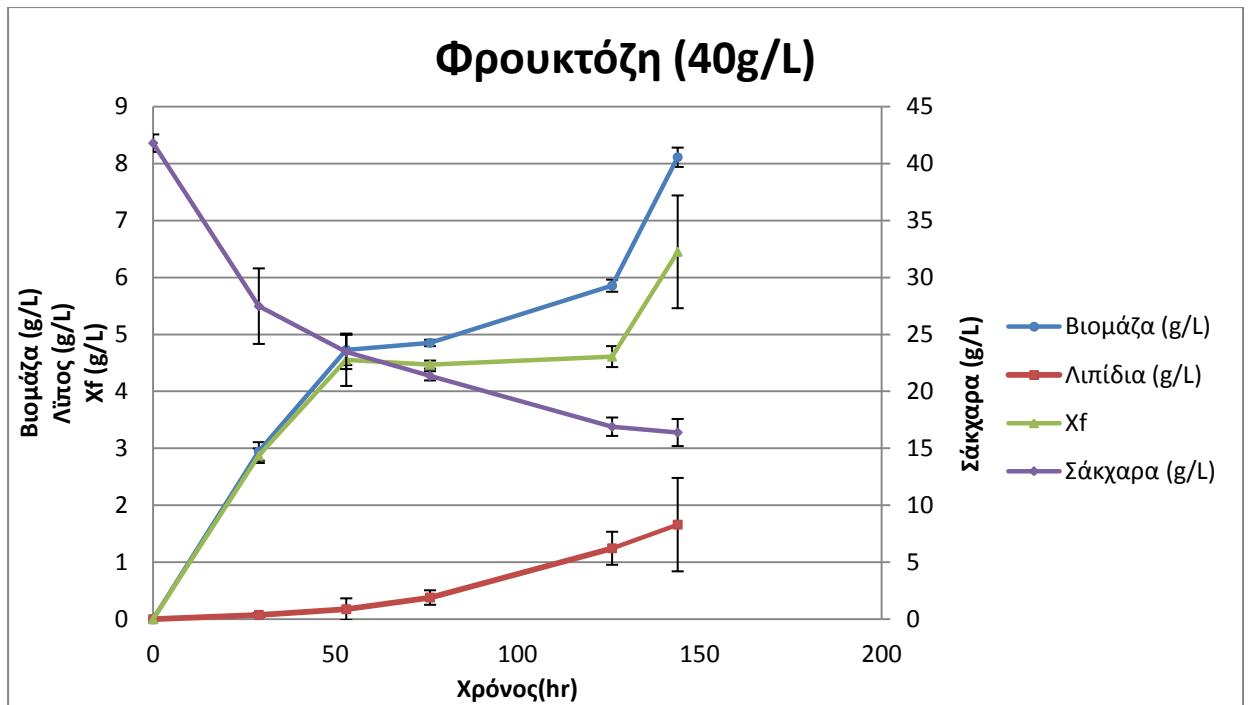
Αναφέρεται επίσης ότι για τις τιμές του pH της καλλιέργειας που μετρήθηκαν για όλες τις ημέρες της καλλιέργειας καταγράφηκε μια μικρή πτώση από την 2^η ημέρα στην τιμή περίπου 5,2 και έπειτα σταθεροποίηση της. Αυτό πιθανότατα οφείλεται στην παραγωγή κάποιων οργανικών οξέων από τον μικροοργανισμό.

Πείραμα A2: Καλλιέργεια του μύκητα σε υπόστρωμα με πηγή άνθρακα τη φρουκτόζη (σε αρχική συγκέντρωση 40 g/L)

Στο διάγραμμα που ακολουθεί παρουσιάζονται η αύξηση της βιομάζας (X), η ελεύθερη λίπους βιομάζα (X_f), η παραγωγή ενδοκυτταρικού λίπους και η κατανάλωση του υποστρώματος από τον μύκητα κατά την ανάπτυξή του σε μέσο καλλιέργειας που περιέχει φρουκτόζη 40 g/L ως πηγή άνθρακα.

Η ζύμωση ήταν ασυνεχούς τύπου σε ανακινούμενο επωαστήριο, με ανάδευση (200rpm) και σε θερμοκρασία 30°C, κάτω από αερόβιες συνθήκες. Το αρχικό pH των καλλιεργειών είχε ρυθμιστεί στο 6,00.

Η ζύμωση στην περίπτωση της φρουκτόζης κράτησε 6 ημέρες, αφού ήδη από την 5^η ημέρα και μετά παρατηρείται σταθεροποίηση της κατανάλωσης υποστρώματος από τον μύκητα.



Διάγραμμα 12: Κινητική της εξέλιξης της βιομάζας, της παραγωγής ενδοκυτταρικού λίπους, της ελεύθερης λίπους βιομάζας και της κατανάλωσης υποστρώματος συναρτήσει του χρόνου κατά την καλλιέργεια του μύκητα *F. Oxysporum* σε φρουκτόζη, ως μόνη πηγή άνθρακα.

Όπως παρατηρείται από το διάγραμμα, η κατανάλωση της φρουκτόζης από το μύκητα γίνεται με έντονο ρυθμό μέχρι τις 3 πρώτες ημέρες, ενώ από την 4^η ημέρα και μετά ο ρυθμός αύξησης της είναι μικρότερος. Μάλιστα ήδη από την 5^η ημέρα και μετά δείχνει σταθεροποίηση. Φτάνει τη μέγιστη τιμή, η οποία είναι 60,7% κατανάλωση της στο τέλος της ζύμωσης.

Η παραγωγή της βιομάζας, γίνεται με έντονο ρυθμό τις 2 πρώτες ημέρες της ζύμωσης, ακολουθεί μια μικρού ρυθμού αύξηση της μέχρι και την 4^η ημέρα. Αυτή η συμπεριφορά, είναι λογική και ακολουθεί τον τρόπο κατανάλωσης του υποστρώματος, καθώς όπως αναφέρθηκε παραπάνω, τις ημέρες που αυξάνεται γρήγορα το υπόστρωμα, αυξάνεται και η βιομάζα γρήγορα και τις ημέρες που μειώνεται η κατανάλωση του, η βιομάζα αυξάνεται με μικρότερο ρυθμό. Τέλος, μέχρι την 6^η αυξάνεται παρατηρείται μια αύξηση του ρυθμού, παρά τη σταθεροποιημένη τιμή κατανάλωσης υποστρώματος. Φτάνει τη μέγιστη τιμή της, η οποία είναι 8,11 g/L την 6^η και τελευταία ημέρα της ζύμωσης.

Η παραγωγή του ενδοκυτταρικού λίπους ξεκινάει με αργό ρυθμό ειδικά για τις πρώτες 3 ημέρες, με τιμές <1 g λίπους/L, γεγονός αναμενόμενο καθώς ο μύκητας αφομοιώνει τη φρουκτόζη προς παραγωγή βιομάζας, Από την 4^η ημέρα και μέχρι το τέλος της ζύμωσης η παραγωγή ενδοκυτταρικού λίπους αυξάνεται και φτάνει μέχρι την τιμή 1,66 g λίπους/L την 6^η και τελευταία ημέρα. Ταυτόχρονα και αναμενόμενα, αυξάνεται και το ποσοστό των λιπιδίων επί ξηράς μάζας κυττάρων, το οποίο ξεκίνησε με την τιμή 2,54% για την πρώτη ημέρα ζύμωσης, και με αυξητική τάση έφτασε μέχρι την τιμή 21,26%, η οποία είναι και η

μέγιστη για το τέλος ζύμωσης. Η παράμετρος αυτή αυξάνεται με εντονότερο ρυθμό τις δυο τελευταίες οπότε και έχει αρχίσει η σύνθεση μεγαλύτερης ποσότητας λιπιδίων.

Όσον αφορά στην πορεία της παραμέτρου X_f , παρατηρείται ότι γενικά αυξάνεται σχεδόν ανάλογα με τη βιομάζα. Όπως είναι αναμενόμενο, μετά τη σταθεροποίηση της από την 3^η μέχρι την 5^η ημέρα, και συγκεκριμένα για την 6^η ημέρα αυξάνεται καθώς αυξάνει και η βιομάζα με την ταυτόχρονη όμως μεγαλύτερη παραγωγή λίπους.

Τέλος, για την ημέρα που παρατηρήθηκε η μέγιστη παραγωγή λίπους (από άποψη ποσότητας g/L), η οποία είναι και η τελευταία ημέρα της ζύμωσης, αναφέρονται ενδεικτικά οι παρακάτω συντελεστές:

-ο συντελεστής παραγωγής βιομάζας $Y_{x/s}$: 0,32 g/g

-ο συντελεστής απόδοσης λίπους, $Y_{L/s}$: 0,065 g/g

-ο συντελεστής παραγωγής ελεύθερης λίπους βιομάζας, $Y_{xf/s}$: 0,25 g/g

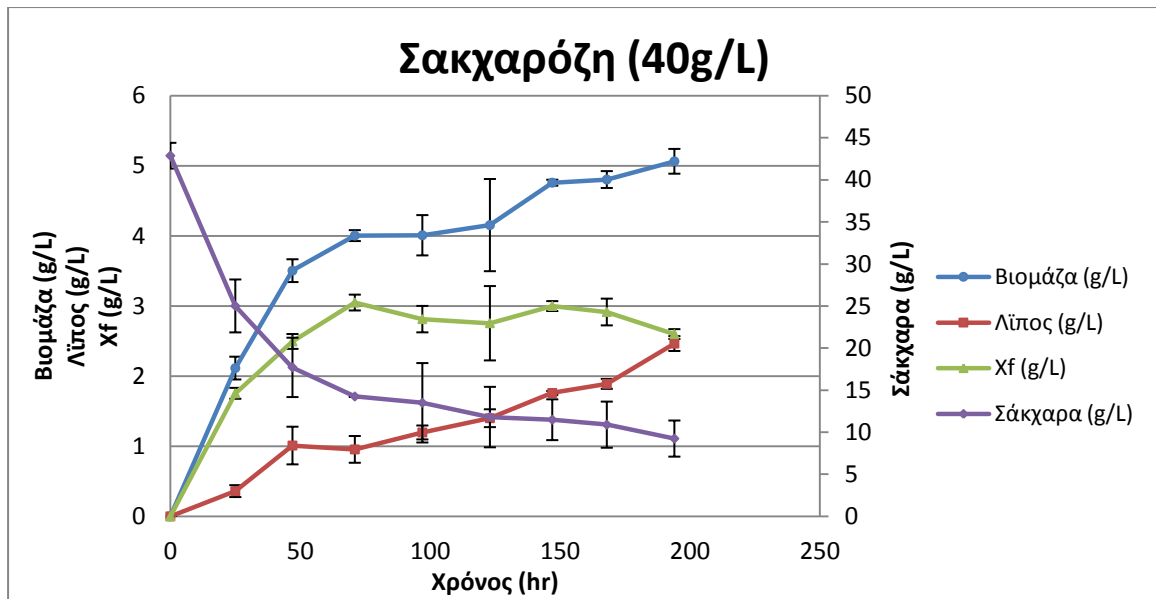
Οι τιμές του pH της καλλιέργειας που μετρήθηκαν για όλες τις ημέρες της καλλιέργειας, παρατηρήθηκε ότι σημείωσαν μια μικρή πτώση από την 2^η ημέρα στην τιμή περίπου 5,0 και έπειτα σταθεροποίηση της στην τιμή 5,2. Αυτό πιθανότατα οφείλεται στην παραγωγή κάποιων οργανικών οξέων από τον μικροοργανισμό.

Πείραμα A3: Καλλιέργεια του μύκητα σε υπόστρωμα με πηγή άνθρακα τη σακχαρόζη (σε αρχική συγκέντρωση 40 g/L)

Στο διάγραμμα που ακολουθεί παρουσιάζονται η αύξηση της βιομάζας (X), η ελεύθερη λίπους βιομάζα (X_f), η παραγωγή ενδοκυτταρικού λίπους και η κατανάλωση του υποστρώματος από τον μύκητα κατά την ανάπτυξή του σε μέσο καλλιέργειας που περιέχει σακχαρόζη 40 g/L ως πηγή άνθρακα.

Η ζύμωση ήταν ασυνεχούς τύπου σε ανακινούμενο επωαστήρα, με ανάδευση (200rpm) και σε θερμοκρασία 30°C, κάτω από αερόβιες συνθήκες. Το αρχικό pH των καλλιέργειών είχε ρυθμιστεί στο 6,00.

Η ζύμωση στην περίπτωση της σακχαρόζης κράτησε 8 ημέρες, αφού από την 8^η ημέρα και μετά σταθεροποιήθηκε η κατανάλωση υποστρώματος.



Διάγραμμα 13: Κινητική της εξέλιξης της βιομάζας, της παραγωγής ενδοκυτταρικού λίπους, της ελεύθερης λίπους βιομάζας και της κατανάλωσης υποστρώματος συναρτήσει του χρόνου κατά την καλλιέργεια του μύκητα *F. Oxysporum* σε σακχαρόζη, ως μόνη πηγή άνθρακα.

Όπως παρατηρείται από το διάγραμμα, η κατανάλωση της σουκρόζης από το μύκητα γίνεται με έντονο ρυθμό μέχρι τις 3 πρώτες ημέρες φτάνοντας στο 66,8 της κατανάλωσης, ενώ από την 4^η ημέρα και μετά ο ρυθμός αύξησης της είναι μικρότερος. Φτάνει τη μέγιστη τιμή, η οποία είναι 78,4% κατανάλωση την 8^η και τελευταία ημέρα της ζύμωσης.

Η παραγωγή της βιομάζας, γίνεται με έντονο ρυθμό τις 3 πρώτες ημέρες της ζύμωσης, φτάνοντας τα 4,0 g βιομάζας/L, ακολουθεί μια σταθεροποίηση της μέχρι και την 5^η ημέρα. Από την 5^η μέχρι την 8^η ημέρα αυξάνεται με ένα σχετικά μικρό ρυθμό αύξησης. Αυτή η συμπεριφορά, είναι λογική και ακολουθεί τον τρόπο κατανάλωσης του υποστρώματος, όπως έχει σχολιαστεί αναλυτικά στο προηγούμενο πείραμα. Φτάνει τη μέγιστη τιμή της, η οποία είναι 5,07 g/L την 8^η και τελευταία ημέρα της ζύμωσης.

Η παραγωγή του ενδοκυτταρικού λίπους στην περίπτωση της σακχαρόζης ξεκινάει ταχύτερα σε σχέση με τη γλυκόζη και τη φρουκτόζη. Ειδικότερα, μόνο για την 1^η παράγεται ποσότητα λίπους <1 g λίπους/L. Από τη 2^η ημέρα και μέχρι την 4^η το παραγόμενο λίπος αυξάνεται και κυμαίνεται κοντά στην τιμή 1 g /L. Αυτή η συμπεριφορά, μπορεί να συσχετιστεί με την μείωση του ρυθμού αύξησης της βιομάζας, δηλαδή ότι ο μύκητας παράγει και συσσωρεύει ενδοκυτταρικό λίπος ενώ έχει μειωθεί ο ρυθμός πολλαπλασιασμού των κυττάρων. Από την 6^η και μέχρι την 8^η ημέρα η ποσότητα του λίπους αυξάνεται, η κατανάλωση υποστρώματος αυξάνεται επίσης αλλά με πολύ μικρό ρυθμό πλέον, ενώ η βιομάζα παραμένει σταθερή, γεγονός που υποδηλώνει ότι διαδραματίζεται συσσώρευση λίπους. Την 8^η και τελευταία ημέρα της ζύμωσης η παραγωγή ενδοκυτταρικού λίπους φτάνει μέχρι την τιμή 2,45 g λίπους/L. Ταυτόχρονα και αναμενόμενα, αυξάνεται και το ποσοστό των λιπιδίων επί ξηράς μάζας κυττάρων, το οποίο ξεκίνησε με την τιμή 17,0% για την πρώτη ημέρα ζύμωσης, τιμή η οποία είναι υψηλή αλλά ωστόσο δικαιολογείται από την ιδιαίτερα μεγάλη τιμή για την ποσότητα του λίπους που

συντέθηκε εκείνη την ημέρα και γενικότερα με την μεγαλύτερη ταχύτητα παραγωγής λίπους τις πρώτες ημέρες για το πείραμα αυτό. Στη συνέχεια, το ποσοστό αυτό αυξάνει και φτάνει στην τιμή 48,67%, η οποία είναι και η μέγιστη για την τελευταία ημέρα της ζύμωσης.

Όσον αφορά στην πορεία της παραμέτρου X_f , παρατηρείται ότι γενικά αυξάνεται σχεδόν ανάλογα με τη βιομάζα, γεγονός αναμενόμενο. Μετά τη σταθεροποίηση της παραμέτρου αυτής από την 3^η μέχρι την 5^η ημέρα, και συγκεκριμένα για την 6^η και 7^η ημέρα, παρατηρείται μείωση της, μιας και αυτές τις μέρες γίνεται μεγαλύτερη παραγωγή λίπους και η βιομάζα παραμένει στάσιμη.

Τέλος, για την ημέρα που παρατηρήθηκε η μέγιστη παραγωγή λίπους (και από άποψη ποσότητας g/L και από άποψη % λιπιδίων επί ξηράς βιομάζας), η οποία είναι και η τελευταία ημέρα της ζύμωσης, αναφέρονται ενδεικτικά οι παρακάτω συντελεστές:

-ο συντελεστής παραγωγής βιομάζας $Y_{x/s}$: 0,15 g/g

-ο συντελεστής απόδοσης λίπους, $Y_{l/s}$: 0,073 g/g

-ο συντελεστής παραγωγής ελεύθερης λίπους βιομάζας, $Y_{xf/s}$: 0,077 g/g

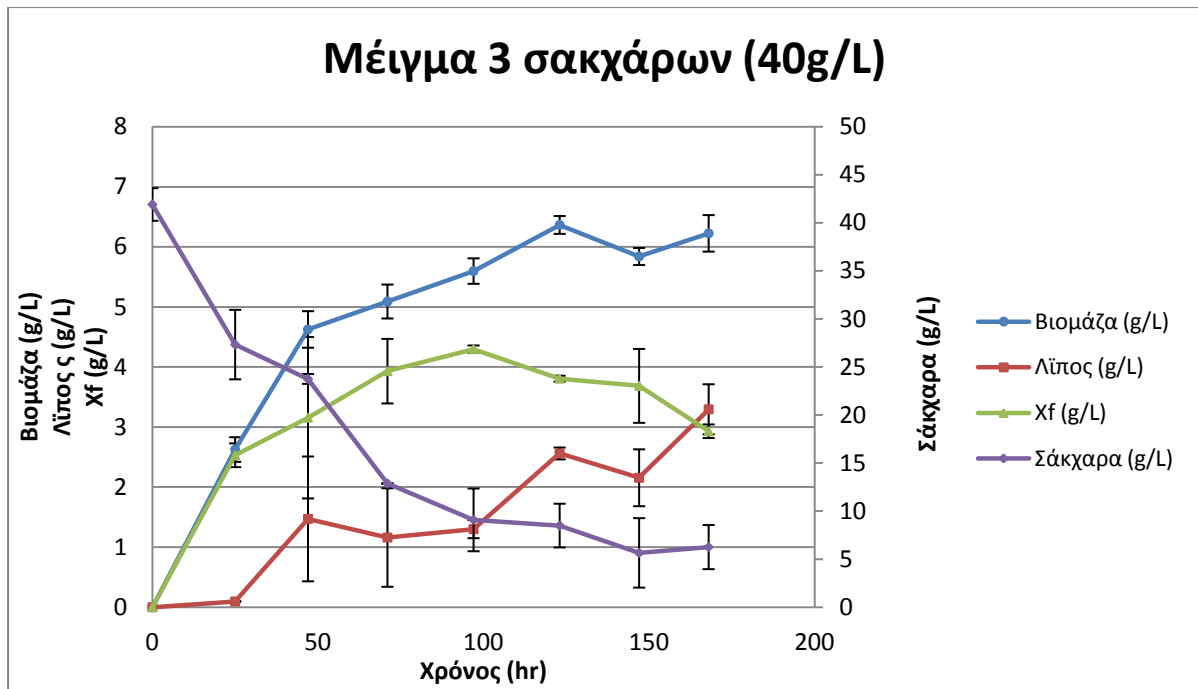
Οι τιμές του pH της καλλιέργειας που μετρήθηκαν για όλες τις ημέρες της καλλιέργειας, παρατηρήθηκε ότι σημείωσαν μια μικρή πτώση και σταθεροποίηση της στην τιμή 5,5 περίπου. Αυτό πιθανότατα οφείλεται στην παραγωγή κάποιων οργανικών οξέων από τον μικροοργανισμό.

Πείραμα A4: Καλλιέργεια του μύκητα σε υπόστρωμα με πηγή άνθρακα το μείγμα σακχαρόζης-γλυκόζης-φρουκτόζης (σε αρχικές συγκεντρώσεις 27,27g/L-6,4 g/L-6,4 g/L αντίστοιχα)

Στο διάγραμμα που ακολουθεί παρουσιάζονται η αύξηση της βιομάζας (X), η ελεύθερη λίπους βιομάζα (X_f), η παραγωγή ενδοκυτταρικού λίπους και η κατανάλωση του υποστρώματος από τον μύκητα κατά την ανάπτυξή του σε μέσο καλλιέργειας που περιέχει μείγμα των 3 παραπάνω σακχάρων σε συγκέντρωση 40 g/L ως πηγή άνθρακα.

Η ζύμωση ήταν ασυνεχούς τύπου σε ανακινούμενο επωαστήρα, με ανάδευση (200rpm) και σε θερμοκρασία 30°C, κάτω από αερόβιες συνθήκες. Το αρχικό pH των καλλιέργειών είχε ρυθμιστεί στο 6,00.

Η ζύμωση στην περίπτωση του μείγματος σακχάρων κράτησε 7 ημέρες, μιας και ήδη από την 6^η ημέρα και μετά σταθεροποιήθηκε η κατανάλωση υποστρώματος.



Διάγραμμα 14: Κινητική της εξέλιξης της βιομάζας, της παραγωγής ενδοκυτταρικού λίπους, της ελεύθερης λίπους βιομάζας και της κατανάλωσης υποστρώματος συναρτήσει του χρόνου κατά την καλλιέργεια του μύκητα *F. Oxysporum* σε μείγμα σακχαρόζης-γλυκόζης-φρουκτόζης.

Όπως παρατηρείται από το διάγραμμα, η κατανάλωση του μείγματος των 3 σακχάρων από το μύκητα γίνεται με έντονο ρυθμό μέχρι τις 4 πρώτες ημέρες φτάνοντας στο 79,73% της κατανάλωσης, ενώ από την 5^η ημέρα και μετά ο ρυθμός αύξησης της είναι μικρότερος και ακολουθεί στασιμότητα μέχρι και την τελευταία ημέρα της ζύμωσης. Φτάνει τη μέγιστη τιμή, η οποία είναι 85,07% κατανάλωση την 7^η και τελευταία ημέρα της ζύμωσης.

Η παραγωγή της βιομάζας, γίνεται με έντονο ρυθμό τις 3 πρώτες ημέρες της ζύμωσης, φτάνοντας τα 5,09 g βιομάζας/L, και από την 4^η ημέρα και έπειτα ακολουθεί αύξησή της αλλά με μικρότερο πλέον ρυθμό. Αυτή η συμπεριφορά, είναι λογική και συμφωνεί με τον τρόπο κατανάλωσης του υποστρώματος. Φτάνει τη μέγιστη τιμή της, η οποία είναι 6,23 g/L την 7^η και τελευταία ημέρα της ζύμωσης.

Η παραγωγή του ενδοκυτταρικού λίπους στην περίπτωση του μείγματος των σακχάρων ξεκινάει σχετικά γρήγορα όπως και στην περίπτωση της σακχαρόζης. Ήδη από τη 2^η ημέρα και μετά παράγεται ποσότητα λίπους >1 g λίπους/L. Από την 5^η ημέρα και μετά, οπότε και έχει σταθεροποιηθεί η βιομάζα, παρατηρείται, ότι το παραγόμενο λίπος αυξάνεται και φτάνει μέχρι την τιμή 3,3 g λίπους/L. Αυτή η συμπεριφορά, είναι αναμενόμενη και λογική δεδομένου ότι η σταθεροποίηση της βιομάζας, οδηγεί σε συσσώρευση του παραγόμενου λίπους το οποίο όλο και αυξάνεται σε κύτταρα τα οποία δεν αναπτύσσονται πλέον. Ταυτόχρονα και αναμενόμενα, αυξάνεται και το ποσοστό των λιπιδίων επί ξηράς μάζας κυττάρων, το οποίο ξεκίνησε με την τιμή 3,61% για την πρώτη ημέρα ζύμωσης, και με αυξητική τάση έφτασε μέχρι την τιμή 52,94%, η οποία είναι και η μέγιστη για το τέλος ζύμωσης.

Όσον αφορά στην πορεία της παραμέτρου X_t , γενικά αυξάνεται σχεδόν ανάλογα με τη βιομάζα, γεγονός αναμενόμενο. Από την 4^η ημέρα και μετά, παρατηρείται μείωση αυτής για την 5^η μέχρι την 7^η ημέρα, γεγονός αναμενόμενο, καθώς αυτές τις μέρες γίνεται μεγαλύτερη παραγωγή λίπους στη βιομάζα η οποία παραμένει στάσιμη.

Τέλος, για την ημέρα που παρατηρήθηκε η μέγιστη παραγωγή λίπους (και από άποψη ποσότητα g/L και από άποψη % λιπιδίων επί ξηράς βιομάζας), η οποία είναι και η τελευταία ημέρα της ζύμωσης, αναφέρονται ενδεικτικά οι παρακάτω συντελεστές:

-ο συντελεστής παραγωγής βιομάζας $Y_{x/s}$: 0,17 g/g

-ο συντελεστής απόδοσης λίπους, $Y_{L/s}$: 0,092 g/g

-ο συντελεστής παραγωγής ελεύθερης λίπους βιομάζας, $Y_{xf/s}$: 0,082 g/g

Οι τιμές του pH της καλλιέργειας που μετρήθηκαν για όλες τις ημέρες της καλλιέργειας, παρατηρήθηκε ότι σημείωσαν μια μικρή πτώση και σταθεροποίηση της στην τιμή 5,25 περίπου. Αυτό πιθανότατα οφείλεται στην παραγωγή κάποιων οργανικών οξέων από τον μικροοργανισμό.

4.1.2 Συζήτηση αποτελεσμάτων για την επίδραση της πηγής Άνθρακα

Όπως φαίνεται από τον παρακάτω πίνακα, το μείγμα σακχάρων αποτελεί την καλύτερη πηγή άνθρακα για το μύκητα στις δεδομένες συνθήκες τόσο από άποψη ποσότητας λιπαρών και % λιπιδίων επί ξηρής βιομάζας. Η απόδοση σε λιπαρά προέκυψε 3,3 g/L και το ποσοστό λιπιδίων επί ξηρής βιομάζας, 52,93%. Όσον αφορά στην απόδοση λιπαρών σε g/L, ακολουθείται με μικρή διαφορά από το σάκχαρο γλυκόζη και απόδοση 3,1 g/L. Όσον αφορά στην απόδοση λιπαρών σε %λιπιδίων επί ξηρής βιομάζας, ακολουθείται από τη σακχαρόζη. Στον πίνακα, οι τιμές που αντιστοιχούν σε δεδομένα για τη βιομάζα και την παραγωγή λίπους αναφέρονται στην ημέρα καλλιέργειας που παρατηρήθηκε η μεγαλύτερη ποσότητα παραγόμενου λίπους σε g/L, ενώ ο χρόνος ζύμωσης και η κατανάλωση των σακχάρων αφορούν το συνολικό χρόνο που κράτησε η καλλιέργεια.

Να σχολιαστεί ότι στόχος αυτής της σειράς πειραμάτων, ήταν να διερευνηθεί κατά πόσο ο μύκητας αυτός μπορεί να αναπτυχθεί και να παράξει ενδοκυτταρικό λίπος σε υπόστρωμα αποτελούμενο από μείγμα των 3 σακχάρων στην αναλογία που εντοπίζονται στο σόργο έτσι ώστε να διαπιστωθεί αν το σόργο μπορεί να αποτελέσει κατάλληλο υπόστρωμα για τους ίδιους λόγους σε επόμενο στάδιο.

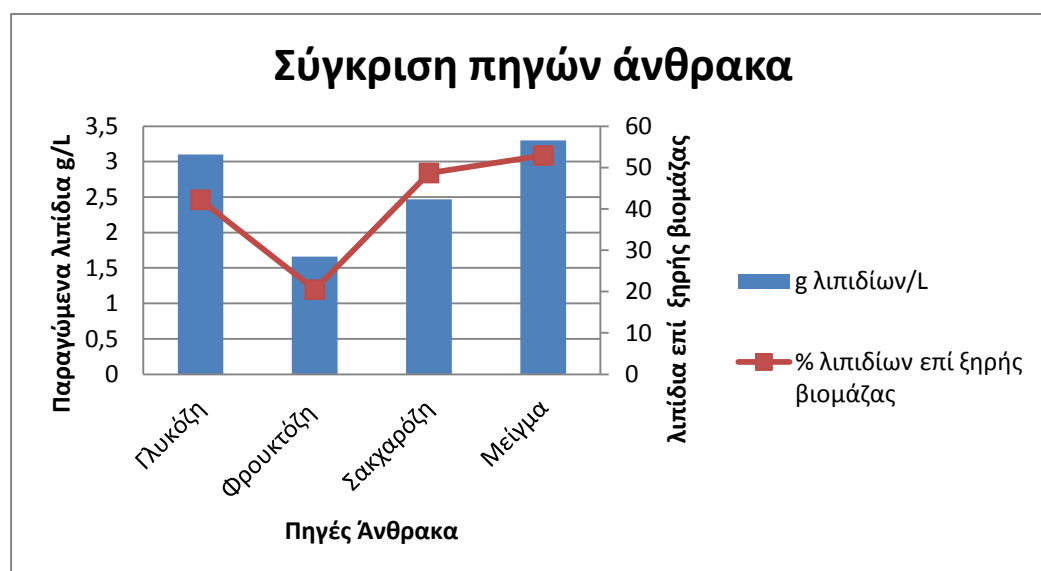
Σε σύγκριση με δεδομένα από τη βιβλιογραφία (66), (53), γενικά φαίνεται πως η γλυκόζη αποτελεί ένα πολύ καλό υπόστρωμα για την παραγωγή μικροβιακού λίπους για αρκετούς ελαιογόνους μύκητες με αξιόλογες αποδόσεις σε λίπος. Για το συγκεκριμένο μύκητα, όπως προκύπτει και από άλλη μελέτη (60) και με βάση τα δεδομένα της παρούσας μελέτης

φαίνεται πως η γλυκόζη δεν αποτελεί το υπόστρωμα για τη μεγαλύτερη απόδοση σε λίπος. Γενικά μπορεί να σχολιαστεί ότι η παρουσία της σακχαρόζης έχει θετική επίδραση σαν πηγή άνθρακα για τον μύκητα αυτό, στοιχείο που επαληθεύεται και από την προηγούμενη μελέτη (60). Βασικό και κρίσιμο στοιχείο για το δεδομένο αυτό, αποτελεί η δυνατότητα του μύκητα αυτού να παράγει τα κατάλληλα ένζυμα (ιμβερτάση) για την υδρόλυση του δισακχαρίτη.

Τέλος, η φρουκτόζη, η οποία σημείωσε την χαμηλότερη απόδοση λιπαρών (και σε ποσότητα και % επί ξηρής βιομάζας), φαίνεται ότι δεν αποτελεί κατάλληλο υπόστρωμα για το μύκητα αυτό. Όπως φαίνεται από τον πίνακα, αφομοιώθηκε σε μικρό ποσοστό και η ανάπτυξη του σταμάτησε πιο γρήγορα σε σχέση με τα υπόλοιπα σάκχαρα. Για τους λόγους αυτούς, και όπως προκύπτει από δεδομένα της βιβλιογραφίας δεν χρησιμοποιείται συχνά για την παραγωγή μικροβιακού λίπους.

Πίνακας 12: Συνοπτικός πίνακας των εναπομεινάντων σακχάρων (g/L), της βιομάζας (g/L), του λίπους (g/L), της ελεύθερης λίπους βιομάζας (g/L) και του συντελεστή απόδοσης λίπους (%) για τις πηγές άνθρακα που χρησιμοποιήθηκαν

| | Χρόνος Ζύμωσης (days) | Κατανάλωση υποστρώματος (%) | Βιομάζα (g/L) | Λίπος (g/L) | X _f (g/L) | % λίπους επί ξηρής βιομάζας |
|-----------|-----------------------|-----------------------------|---------------|-------------|----------------------|-----------------------------|
| Γλυκόζη | 8 | 81,09 | 7,60 | 3,10 | 4,25 | 42,20 |
| Φρουκτόζη | 6 | 60,79 | 8,11 | 1,66 | 6,45 | 20,47 |
| Σακχαρόζη | 8 | 78,43 | 5,07 | 2,47 | 2,60 | 48,67 |
| Μείγμα | 8 | 86,51 | 6,36 | 3,30 | 2,93 | 52,93 |



Διάγραμμα 15: Συγκεντρωτικά αποτελέσματα για τη σύγκριση των πηγών άνθρακα.

Στα ίδια αποτελέσματα, θα οδηγηθούμε και στην περίπτωση που χρησιμοποιηθούν σαν κριτήριο οι συντελεστές απόδοσης λίπους $Y_{L/S}$. Ειδικότερα για το μείγμα 3 σακχάρων ο συντελεστής αυτός ανέρχεται στην τιμή 0,092 g λίπους/g καταναλωθέντων σακχάρων,

ακολουθούμενος από τη γλυκόζη με τιμή 0,087 g/g, τη σακχαρόζη με τιμή 0,073 g/g και τέλος τη φρουκτόζη με τιμή 0,065 g/g.

4.1.3 Επίδραση πηγής Αζώτου

Η δεύτερη σειρά πειραμάτων αφορούσε την επίδραση της πηγής αζώτου στην ανάπτυξη και ικανότητα συσσώρευσης λίπους του μύκητα *Fusarium oxysporum*.

Εξετάστηκαν τόσο οργανικές όσο και ανόργανες πηγές αζώτου. Οι οργανικές πηγές αζώτου που χρησιμοποιήθηκαν ήταν: ουρία, πεπτόνη, και yeast extract, ενώ οι ανόργανες ήταν: χλωριούχο αμμώνιο (NH_4Cl), θειικό αμμώνιο ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) και όξινο φωσφορικό αμμώνιο $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$.

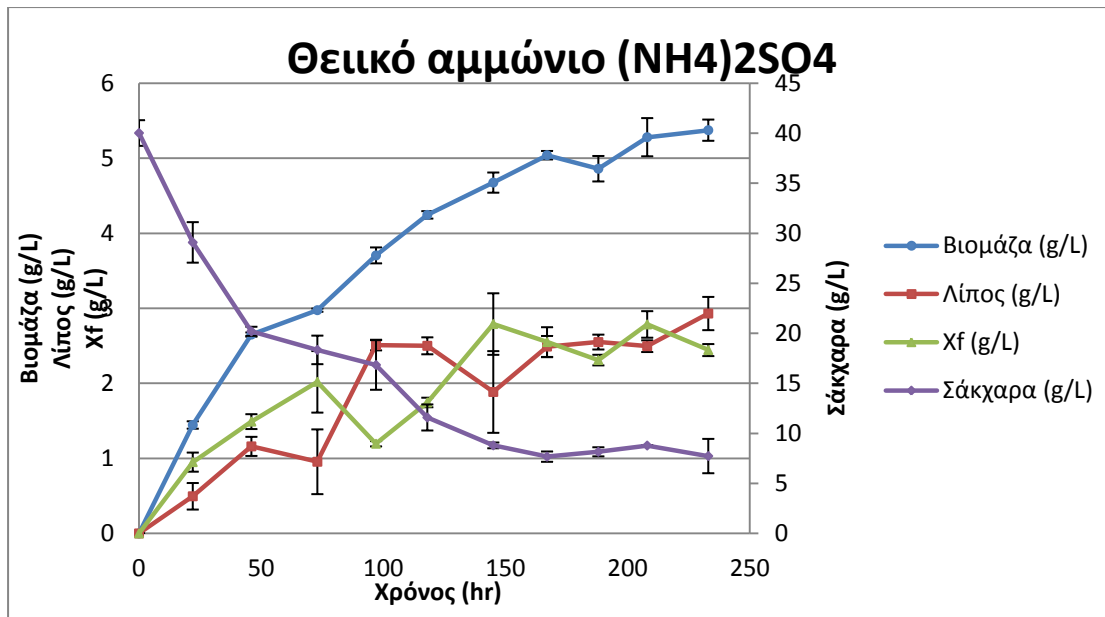
Ο λόγος άνθρακα/αζώτου ήταν σταθερός σε όλα τα πειράματα και ίσος με 100 και η αρχική συγκέντρωση σακχάρων ήταν και αυτή σταθερή και ίση με 40 g/L. Ως σάκχαρα χρησιμοποιήθηκε το μίγμα σακχαρόζης, γλυκόζης, φρουκτόζης (mix) στις αναλογίες που αναφέρθηκαν και προηγουμένως.

Πείραμα Β1: Καλλιέργεια του μύκητα σε υπόστρωμα με πηγή αζώτου το θειικό αμμώνιο, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (σε αρχική συγκέντρωση 0,770 g/L)

Η αρχική συγκέντρωση των σακχάρων (μείγμα) ήταν 40 g/L και ο λόγος C/N ίσος με 100. Πραγματοποιήθηκε ζύμωση ασυνεχούς τύπου σε ανακινούμενο επωαστήρα με ανάδευση (200rpm) και σε θερμοκρασία 30°C κάτω από αερόβιες συνθήκες. Το αρχικό pH των καλλιεργειών είχε ρυθμιστεί στο 6,00.

Η ζύμωση στην περίπτωση του θειικού αμμώνιου κράτησε 10 ημέρες, αφού ήδη από την 9^η ημέρα και μετά παρατηρείται σταθεροποίηση της κατανάλωσης υποστρώματος από τον μύκητα.

Στο παρακάτω διάγραμμα απεικονίζονται η αύξηση της βιομάζας (X), η ελεύθερη λίπους βιομάζα (X_f), η παραγωγή ενδοκυτταρικού λίπους και η κατανάλωση του υποστρώματος από το μύκητα *Fusarium Oxysporum* σε θρεπτικό μέσο το οποίο περιείχε ως πηγή αζώτου θειικό αμμώνιο, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (0,770 g/L).



Διάγραμμα 16: Κινητική της εξέλιξης της βιομάζας, της παραγωγής ενδοκυτταρικού λίπους, της ελεύθερης λίπους βιομάζας και της κατανάλωσης υποστρώματος συναρτήσει του χρόνου κατά την καλλιέργεια του μύκητα *F. Oxysporum* σε θεικό αμμώνιο σαν πηγή αζώτου.

Από το διάγραμμα, παρατηρείται ότι για τις 2 πρώτες ημέρες, η κατανάλωση των σακχάρων είναι γραμμική και μάλιστα με έντονο ρυθμό, αφού μέχρι το τέλος της 2^{ης} ημέρας έχει καταναλωθεί το 49,53% του υποστρώματος. Στη συνέχεια ο μύκητας καταναλώνει τα σάκχαρα με πιο αργό ρυθμό, μέχρι σταθεροποίηση της κατανάλωσης ήδη από τις 4 τελευταίες ημέρες, η οποία αντιστοιχεί σε ποσοστό περίπου 80% της αρχικής ποσότητας υποστρώματος την 8^η και τελευταία ημέρα ζύμωσης.

Όσον αφορά στην παραγωγή βιομάζας, αυτή εξελίσσεται με αρκετά έντονο ρυθμό μέχρι και την 7^η ημέρα ζύμωσης, φτάνοντας την τιμή 5,04 g/L, κατά αντιστοιχία με τον έντονο ρυθμό κατανάλωσης του υποστρώματος, η οποία αρχίζει να σταθεροποιείται την ίδια ημέρα. Φτάνει τη μέγιστη τιμή της την 10^η και τελευταία ημέρα της καλλιέργειας με τιμή 5,37 g/L. Να σχολιαστεί ότι η τιμή αυτή είναι θεωρητικά αποδεκτή, παρά τη σταθεροποιημένη κατανάλωση σακχάρων, αν ληφθεί υπόψη ο θεωρητικός συντελεστής παραγωγής βιομάζας σε g ανά g καταναλισκόμενων σακχάρων είναι 0,5. (Συγκεκριμένα, μέχρι την 10^η ημέρα έχουν καταναλωθεί 32,29 g σακχάρων, οπότε λαμβάνοντας υπόψη τον θεωρητικό συντελεστή, η μέγιστη ποσότητα της βιομάζας που αναμένεται είναι 16,14 g/L)

Η παραγωγή του ενδοκυτταρικού λίπους στην περίπτωση του θεικού αμμωνίου ξεκινάει σχετικά γρήγορα. Μόνο για την 1^η παράγεται ποσότητα λίπους <1 g λίπους/L. Από τη 2^η και 3^η ημέρα το παραγόμενο λίπος αυξάνεται και κυμαίνεται κοντά στην τιμή 1 g /L. Από την 4^η και μέχρι την 10^η ημέρα η ποσότητα του λίπους αυξάνεται, και για το υπόστρωμα σημειώνεται μια αύξηση του ρυθμού κατανάλωσης του και η βιομάζα συνεχίζει να αυξάνεται με πιο αργούς ρυθμούς. Την 10^η και τελευταία ημέρα της ζύμωσης η παραγωγή ενδοκυτταρικού λίπους φτάνει μέχρι την τιμή 2,93 g λίπους/L, ταυτόχρονα με μια μικρή κατανάλωση υποστρώματος της τάξης του 2%, αν και αυτή είναι ήδη σταθεροποιημένη. Ταυτόχρονα και αναμενόμενα, αυξάνεται και το ποσοστό των λιπιδίων επί ξηράς μάζας

κυττάρων, το οποίο ξεκίνησε με την τιμή 34,25% για την πρώτη ημέρα ζύμωσης, τιμή η οποία είναι υψηλή αλλά ωστόσο δικαιολογείται από την ιδιαίτερα μεγάλη τιμή για την ποσότητα του λίπους που συντέθηκε εκείνη την ημέρα και γενικότερα με την μεγαλύτερη ταχύτητα παραγωγής λίπους. Στη συνέχεια, το ποσοστό αυτό αυξάνει και φτάνει στην τιμή 54,53%, η οποία είναι και η μέγιστη για την τελευταία ημέρα της ζύμωσης.

Όσον αφορά στην πορεία της παραμέτρου X_f , η οποία αναπαριστά την ελεύθερη λίπους βιομάζα, παρατηρείται ότι γενικά αυξάνεται σχεδόν ανάλογα με τη βιομάζα μέχρι την 6^η ημέρα και έπειτα μειώνεται ο ρυθμός αύξησης. Αυτή η συμπεριφορά είναι αναμενόμενη καθώς από την 6^η ημέρα και μετά ξεκινάει η μεγαλύτερη παραγωγή λίπους, ενώ η βιομάζα αναπτύσσεται με αργούς ρυθμούς.

Τέλος, για την ημέρα που παρατηρήθηκε η μέγιστη παραγωγή λίπους (και από άποψη ποσότητας g/L και από άποψη %λιπιδίων επί ξηράς βιομάζας), η οποία είναι και η τελευταία ημέρα της ζύμωσης, αναφέρονται ενδεικτικά οι παρακάτω συντελεστές:

-ο συντελεστής παραγωγής βιομάζας $Y_{x/s}$: 0,17 g/g (δηλαδή παρήχθησαν 0,17g βιομάζας ανά g καταναλωθέντων σακχάρων)

-ο συντελεστής απόδοσης λίπους, $Y_{l/s}$: 0,091 g/g (δηλαδή 0,091 g λίπους ανά g καταναλωθέντων σακχάρων)

-ο συντελεστής παραγωγής ελεύθερης λίπους βιομάζας, $Y_{xf/s}$: 0,076 g/g (δηλαδή 0,075 g ελεύθερη λίπους βιομάζα ανά g καταναλωθέντων σακχάρων).

Αναφέρεται επίσης ότι για τις τιμές του pH της καλλιέργειας που μετρήθηκαν για όλες τις ημέρες της καλλιέργειας καταγράφηκε μια μικρή πτώση και έπειτα σταθεροποίηση της στην τιμή 5. Αυτό πιθανότατα οφείλεται στην παραγωγή κάποιων οργανικών οξέων από τον μικροοργανισμό.

Πείραμα B2: Καλλιέργεια του μύκητα σε υπόστρωμα με πηγή αζώτου το χλωριούχο αμμώνιο, NH_4Cl (σε αρχική συγκέντρωση 0,620 g/L)

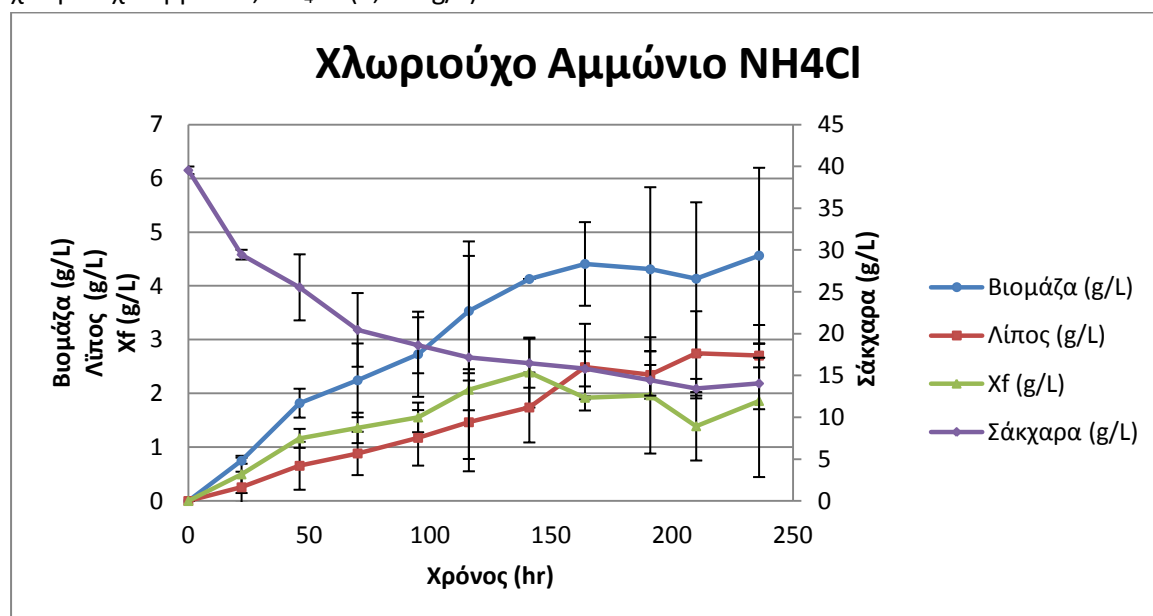
Η αρχική συγκέντρωση των σακχάρων (μείγμα) ήταν 40 g/L και ο λόγος C/N ίσος με 100.

Πραγματοποιήθηκε ζύμωση ασυνεχούς τύπου σε ανακινούμενο επωαστήρα με ανάδευση (200rpm) και σε θερμοκρασία 30°C κάτω από αερόβιες συνθήκες. Το αρχικό pH των καλλιεργειών είχε ρυθμιστεί στο 6,00.

Η ζύμωση στην περίπτωση του χλωριούχου αμμωνίου κράτησε 10 ημέρες, ενώ ήδη από την 8^η ημέρα και μετά παρατηρείται σταθεροποίηση της κατανάλωσης υποστρώματος από τον μύκητα.

Στο παρακάτω διάγραμμα απεικονίζονται η αύξηση της βιομάζας (X), η ελεύθερη λίπους βιομάζα (X_f), η παραγωγή ενδοκυτταρικού λίπους και η κατανάλωση του υποστρώματος

από το μύκητα *Fusarium oxysporum* σε θρεπτικό μέσο το οποίο περιείχε ως πηγή αζώτου χλωριούχο αμμώνιο, NH_4Cl (0,620 g/L).



Διάγραμμα 17: Κινητική της εξέλιξης της βιομάζας, της παραγωγής ενδοκυτταρικού λίπους, της ελεύθερης λίπους βιομάζας και της κατανάλωσης υποστρώματος συναρτήσεως του χρόνου κατά την καλλιέργεια του μύκητα *F. Oxysporum* σε χλωριούχο αμμώνιο σαν πηγή αζώτου.

Από το διάγραμμα, παρατηρείται ότι για τις 4 πρώτες ημέρες, η κατανάλωση των σακχάρων είναι γραμμική και μάλιστα με έντονο ρυθμό, αφού μέχρι το τέλος της 4^{ης} ημέρας έχει καταναλωθεί το 52,90% του υποστρώματος. Στη συνέχεια ο μύκητας καταναλώνει τα σάκχαρα με πιο αργό ρυθμό, μέχρι σταθεροποίηση της κατανάλωσης ήδη από τις 3 τελευταίες ημέρες, η οποία αντιστοιχεί σε ποσοστό περίπου 64% της αρχικής ποσότητας υποστρώματος.

Όσον αφορά στην παραγωγή βιομάζας, αυτή εξελίσσεται με αρκετά έντονο ρυθμό μέχρι και την 6^η ημέρα ζύμωσης, φτάνοντας την τιμή 4,13 g/L, κατά αντιστοιχία με τον έντονο ρυθμό κατανάλωσης του υποστρώματος, η οποία αρχίζει σιγά σιγά να σταθεροποιείται. Φτάνει τη μέγιστη τιμή της την 10^η και τελευταία ημέρα της καλλιέργειας με τιμή 4,56 g/L. Να σχολιαστεί ότι η τιμή αυτή είναι θεωρητικά αποδεκτή, παρά τη σταθεροποιημένη κατανάλωση σακχάρων, αν ληφθεί υπόψη ο θεωρητικός συντελεστής παραγωγής βιομάζας σε g ανά g καταναλισκόμενων σακχάρων είναι 0,5. (Συγκεκριμένα, μέχρι την 10^η ημέρα έχουν καταναλωθεί 23,43 g σακχάρων, οπότε λαμβάνοντας υπόψη τον θεωρητικό συντελεστή, η μέγιστη ποσότητα της βιομάζας που αναμένεται είναι 11,72 g/L)

Η παραγωγή του ενδοκυτταρικού λίπους ξεκινάει με αργό ρυθμό ειδικά για τις πρώτες 3 ημέρες, με τιμές <1 g λίπους/L, καθώς στο διάστημα αυτό, ο μύκητας αφομοιώνει τα σάκχαρα προς παραγωγή βιομάζας. Από την 4^η ημέρα, οπότε και παρήχθησαν 1,18 g λίπους/L, και μετά το λίπος αυξάνεται και φτάνει τη μέγιστη τιμή του την 9^η ημέρα ζύμωσης με τιμή 2,75. Ταυτόχρονα όμως, αυξάνεται και το ποσοστό των λιπιδίων επί ξηράς μάζας κυττάρων, το οποίο ξεκίνησε με την τιμή 34% για την πρώτη ημέρα ζύμωσης, η οποία αν και είναι ιδιαίτερα υψηλή δικαιολογείται από την χαμηλή ανάπτυξη βιομάζας. Με αυξητική τάση έφτασε μέχρι την τιμή 66,38%, η οποία είναι και η μέγιστη για την 9^η ημέρα ζύμωσης.

Επίσης, να σχολιαστεί ότι την από την 6^η ημέρα και μετά, οπότε και έχει αρχίσει η σύνθεση μεγαλύτερης ποσότητας λιπιδίων σε βάρος της παραγωγής βιομάζας, η παράμετρος αυτή αυξάνεται με εντονότερο ρυθμό.

Όσον αφορά στην πορεία της παραμέτρου X_f , παρατηρείται ότι γενικά αυξάνεται σχεδόν ανάλογα με τη βιομάζα μέχρι την 6^η ημέρα και έπειτα μειώνεται ο ρυθμός αύξησης. Αυτή η συμπεριφορά είναι αναμενόμενη καθώς από την 6^η ημέρα και μετά ξεκινάει η μεγαλύτερη παραγωγή λίπους, ενώ η βιομάζα αναπτύσσεται με αργούς ρυθμούς.

Τέλος, για την ημέρα που παρατηρήθηκε η μέγιστη παραγωγή λίπους (και από άποψη ποσότητας g/L και από άποψη %λιπιδίων επί ξηράς βιομάζας), η οποία είναι η 9^η ημέρα της ζύμωσης, αναφέρονται ενδεικτικά οι παρακάτω συντελεστές:

-ο συντελεστής παραγωγής βιομάζας $Y_{x/s}$: 0,16 g/g

-ο συντελεστής απόδοσης λίπους, $Y_{l/s}$: 0,11 g/g

-ο συντελεστής παραγωγής ελεύθερης λίπους βιομάζας, $Y_{x/l/s}$: 0,053 g/g

Αναφέρεται επίσης ότι για τις τιμές του pH της καλλιέργειας που μετρήθηκαν για όλες τις ημέρες της καλλιέργειας καταγράφηκε μια σχετικά έντονη πτώση και έπειτα σταθεροποίηση της στην τιμή 4. Αυτό πιθανότατα οφείλεται στην παραγωγή κάποιων οργανικών οξέων από τον μικροοργανισμό, το οποίο μπορεί να συσχετιστεί και με τη χαμηλή παραγωγή βιομάζας, καθώς ο μικροοργανισμός μπορεί να κατεύθυνε το μεταβολισμό του στη σύνθεση οργανικών οξέων, εις βάρος της ανάπτυξής του.

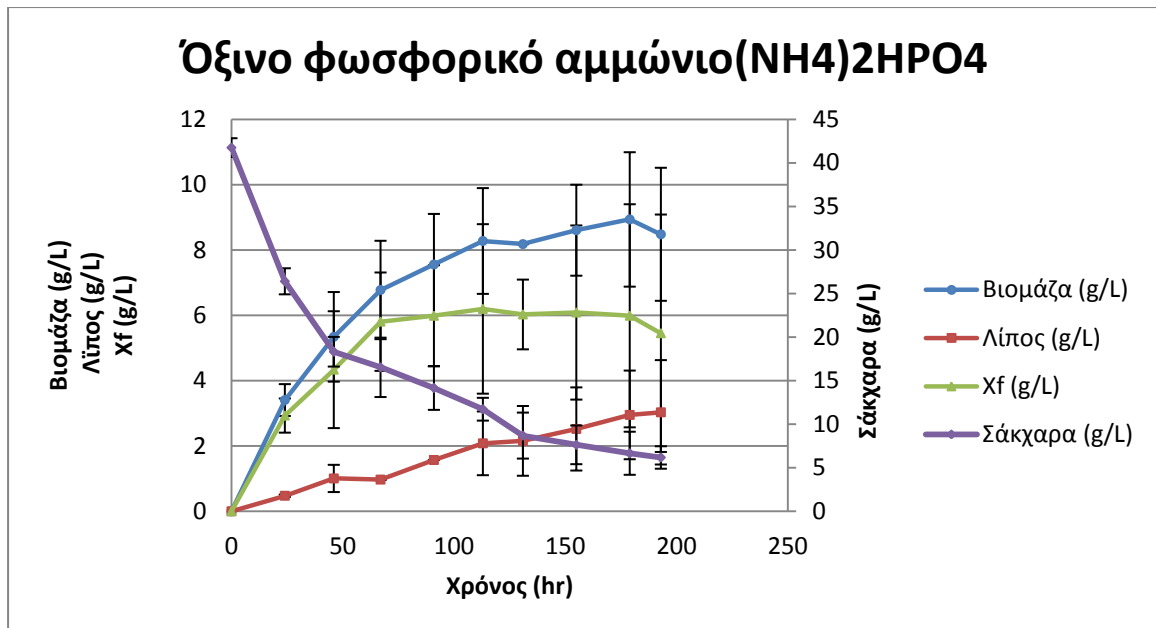
Πείραμα B3: Καλλιέργεια του μύκητα σε υπόστρωμα με πηγή αζώτου το όξινο φωσφορικό αμμώνιο, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (σε αρχική συγκέντρωση 0,770 g/L)

Η αρχική συγκέντρωση των σακχάρων (μείγμα) ήταν 40 g/L και ο λόγος C/N ίσος με 100.

Πραγματοποιήθηκε ζύμωση ασυνεχούς τύπου σε ανακινούμενο επωαστήρα με ανάδευση (200rpm) και σε θερμοκρασία 30°C κάτω από αερόβιες συνθήκες. Το αρχικό pH των καλλιεργειών είχε ρυθμιστεί στο 6,00.

Η ζύμωση στην περίπτωση του όξινου φωσφορικού αμμώνιου κράτησε 9 ημέρες, ενώ ήδη από την 8^η ημέρα και μετά παρατηρείται σταθεροποίηση της κατανάλωσης υποστρώματος από τον μύκητα.

Στο παρακάτω διάγραμμα απεικονίζονται η αύξηση της βιομάζας (X), η ελεύθερη λίπους βιομάζα (X_f), η παραγωγή ενδοκυτταρικού λίπους και η κατανάλωση του υποστρώματος από το μύκητα *Fusarium oxysporum* σε θρεπτικό μέσο το οποίο περιείχε ως πηγή αζώτου όξινο φωσφορικό αμμώνιο, $(\text{NH}_4)_2\text{PO}_4$ (0,770 g/L).



Διάγραμμα 18: Κινητική της εξέλιξης της βιομάζας, της παραγωγής ενδοκυτταρικού λίπους, της ελεύθερης λίπους βιομάζας και της κατανάλωσης υποστρώματος συναρτήσει του χρόνου κατά την καλλιέργεια του μύκητα *F. Oxysporum* σε όξινο φωσφορικό αμμώνιο σαν πηγή αζώτου.

Από το διάγραμμα, παρατηρείται ότι για τις 2 πρώτες ημέρες, η κατανάλωση των σακχάρων είναι γραμμική και μάλιστα με έντονο ρυθμό, αφού μέχρι το τέλος της 2^{ης} ημέρας έχει καταναλωθεί το 56,13% του υποστρώματος. Στη συνέχεια ο μύκητας καταναλώνει τα σάκχαρα με λίγο πιο μειωμένο ρυθμό, μέχρι σταθεροποίηση της κατανάλωσης ειδικά τις 2 τελευταίες ημέρες, η οποία αντιστοιχεί σε ποσοστό περίπου 85% της αρχικής ποσότητας υποστρώματος.

Όσον αφορά στην παραγωγή βιομάζας, αυτή εξελίσσεται με αρκετά έντονο ρυθμό μέχρι και την 5^η ημέρα ζύμωσης, φτάνοντας την τιμή 8,28 g/L, κατά αντιστοιχία με τον έντονο ρυθμό κατανάλωσης του υποστρώματος. Φτάνει τη μέγιστη τιμή της την 8^η ημέρα της καλλιέργειας με τιμή 8,94 g/L και παύει να αυξάνεται.

Η παραγωγή του ενδοκυτταρικού λίπους στην περίπτωση της όξινης φωσφορικής αμμωνίας, ξεκινάει σχετικά γρήγορα. Ειδικότερα, μόνο για την 1^η παράγεται ποσότητα λίπους <1 g λίπους/L. Από τη 2^η ημέρα και μέχρι την 4^η το παραγόμενο λίπος αυξάνεται και κυμαίνεται κοντά στην τιμή 1 g /L. Από την 5^η μέχρι και την 9^η ημέρα το λίπος αυξάνεται και φτάνει στη μέγιστη τιμή του 3,03 g /L για την 9 η και τελευταία ημέρα ζύμωσης. Αυτή η συμπεριφορά, μπορεί να συσχετιστεί με την μείωση του ρυθμού αύξησης της βιομάζας, δηλαδή ότι ο μύκητας παράγει και συσσωρεύει ενδοκυτταρικό λίπος ενώ έχει μειωθεί ο ρυθμός πολλαπλασιασμού των κυττάρων. Ταυτόχρονα και αναμενόμενα, αυξάνεται και το ποσοστό των λιπιδίων επί ξηράς μάζας κυττάρων, το οποίο ξεκίνησε με την τιμή 13,95% για την πρώτη ημέρα ζύμωσης. Στη συνέχεια, το ποσοστό αυτό αυξάνει και φτάνει στην την τιμή 35,73%, η οποία είναι και η μέγιστη για την 9^η και τελευταία ημέρα της ζύμωσης.

Για την πορεία της παραμέτρου X_f , παρατηρείται ότι γενικά αυξάνεται σχεδόν ανάλογα με τη βιομάζα μέχρι την 3^η ημέρα και έπειτα σταθεροποιείται. Αυτή η συμπεριφορά είναι λογική καθώς από την 3^η ημέρα και μετά μειώνεται ο ρυθμός αύξησης της βιομάζας και ξεκινάει η μεγαλύτερη παραγωγή λίπους. Η μείωση της για την τελευταία ημέρα συσχετίζεται με την μεγαλύτερη παραγωγή λίπους σε βάρος της βιομάζας

Τέλος, για την ημέρα που παρατηρήθηκε η μέγιστη παραγωγή λίπους (και από άποψη ποσότητας g/L και από άποψη %λιπιδίων επί ξηράς βιομάζας), η οποία είναι η 9^η ημέρα της ζύμωσης, αναφέρονται ενδεικτικά οι παρακάτω συντελεστές:

- ο συντελεστής παραγωγής βιομάζας $Y_{x/s}$: 0,24 g/g
- ο συντελεστής απόδοσης λίπους, $Y_{L/s}$: 0,085 g/g
- ο συντελεστής παραγωγής ελεύθερης λίπους βιομάζας, $Y_{xf/s}$: 0,15 g/g

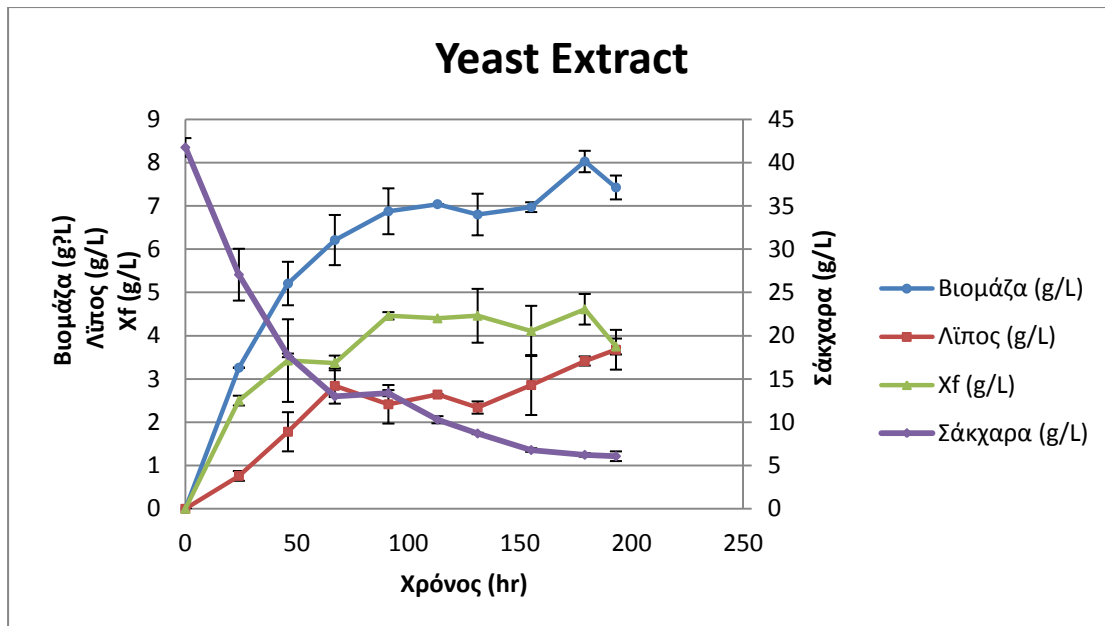
Αναφέρεται επίσης ότι για τις τιμές του pH της καλλιέργειας που μετρήθηκαν για όλες τις ημέρες της καλλιέργειας καταγράφηκε μια σχετικά έντονη πτώση και έπειτα σταθεροποίηση της στην τιμή 5. Αυτό πιθανότατα οφείλεται στην παραγωγή κάποιων οργανικών οξέων από τον μικροοργανισμό.

Πείραμα Β4: Καλλιέργεια του μύκητα σε υπόστρωμα με πηγή αζώτου το yeast extract (εκχύλισμα ζύμης), (σε αρχική συγκέντρωση 1,460 g/L)

Η αρχική συγκέντρωση των σακχάρων (μείγμα) ήταν 40 g/L και ο λόγος C/N ίσος με 100. Πραγματοποιήθηκε ζύμωση ασυνεχούς τύπου σε ανακινούμενο επωαστήρα με ανάδευση (200rpm) και σε θερμοκρασία 30°C κάτω από αερόβιες συνθήκες. Το αρχικό pH των καλλιεργειών είχε ρυθμιστεί στο 6,00.

Η ζύμωση στην περίπτωση του yeast extract κράτησε 9 ημέρες, ενώ ήδη από την 7^η ημέρα παρατηρείται σταθεροποίηση της κατανάλωσης υποστρώματος από τον μύκητα.

Στο παρακάτω διάγραμμα απεικονίζονται η αύξηση της βιομάζας (X), η ελεύθερη λίπους βιομάζα (X_f), η παραγωγή ενδοκυτταρικού λίπους και η κατανάλωση του υποστρώματος από το μύκητα *Fusarium oxysporum* σε θρεπτικό μέσο το οποίο περιείχε ως πηγή αζώτου yeast extract (1,460 g/L).



Διάγραμμα 19: Κινητική της εξέλιξης της βιομάζας, της παραγωγής ενδοκυτταρικού λίπους, της ελεύθερης λίπους βιομάζας και της κατανάλωσης υποστρώματος συναρτήσει του χρόνου κατά την καλλιέργεια του μύκητα *F. Oxysporum* σε εκχύλισμα ζύμης σαν πηγή αζώτου.

Από το διάγραμμα, παρατηρείται ότι για τις 3 πρώτες ημέρες, η κατανάλωση των σακχάρων είναι γραμμική και μάλιστα με έντονο ρυθμό, αφού μέχρι το τέλος της 3^{ης} ημέρας έχει καταναλωθεί το 69% του υποστρώματος. Στη συνέχεια ο μύκητας καταναλώνει τα σάκχαρα με πιο μειωμένο ρυθμό, μέχρι σταθεροποίηση της κατανάλωσης ειδικά τις 2 τελευταίες ημέρες, η οποία αντιστοιχεί σε ποσοστό περίπου 85% της αρχικής ποσότητας υποστρώματος.

Η παραγωγή βιομάζας εξελίσσεται με αρκετά έντονο ρυθμό μέχρι και την 4^η ημέρα ύμωσης, φτάνοντας την τιμή 6,86 g/L, κατά αντιστοιχία με τον έντονο ρυθμό κατανάλωσης του υποστρώματος. Φτάνει τη μέγιστη τιμή της την 8^η ημέρα της καλλιέργειας με τιμή 8,03 g/L και παύει να αυξάνεται.

Η παραγωγή του ενδοκυτταρικού λίπους στην περίπτωση του yeast extract, ξεκινάει σχετικά γρήγορα. Ειδικότερα, μόνο για την 1^η παράγεται ποσότητα λίπους <1 g λίπους/L. Από τη 3^η ημέρα και μέχρι την 7^η το παραγόμενο λίπος αυξάνεται και φτάνει μέχρι την τιμή 2,86 g /L. Αυτή η συμπεριφορά, μπορεί να συσχετιστεί με την μείωση του ρυθμού αύξησης της βιομάζας, δηλαδή ότι ο μύκητας παράγει και συσσωρεύει ενδοκυτταρικό λίπος ενώ έχει μειωθεί ο ρυθμός πολλαπλασιασμού των κυττάρων. Τέλος, τις 2 τελευταίες ημέρες, το λίπος εξακολουθεί να αυξάνεται με μικρή αύξηση της κατανάλωσης σακχάρων και σταθεροποίηση της βιομάζας, γεγονός αναμενόμενο, και φτάνει τη μέγιστη τιμή του την 9^η και τελευταία ημέρα στα 3,68 g/L. Ταυτόχρονα και αναμενόμενα, αυξάνεται και το ποσοστό των λιπιδίων επί ξηράς μάζας κυττάρων, το οποίο ξεκίνησε με την τιμή 23,31% για την πρώτη ημέρα ζύμωσης. Στη συνέχεια, το ποσοστό αυτό αυξάνει και φτάνει στην την τιμή 49,5%, η οποία είναι και η μέγιστη για την 9^η και τελευταία ημέρα της ζύμωσης.

Όσον αφορά στην πορεία της παραμέτρου X_t , αυξάνεται σχεδόν ανάλογα με τη βιομάζα μέχρι την 4^η ημέρα και έπειτα σταθεροποιείται. Αυτή η συμπεριφορά είναι αναμενόμενη καθώς από την 4^η ημέρα και μετά μειώνεται ο ρυθμός αύξησης της βιομάζας και ξεκινάει η μεγαλύτερη παραγωγή λίπους. Η μείωση της για την τελευταία ημέρα συσχετίζεται με την μεγαλύτερη παραγωγή λίπους σε βάρος της βιομάζας

Τέλος, για την ημέρα που παρατηρήθηκε η μέγιστη παραγωγή λίπους (και από άποψη ποσότητας g/L και από άποψη% λιπιδίων επί ξηράς βιομάζας), η οποία είναι η 9^η ημέρα της ζύμωσης, αναφέρονται ενδεικτικά οι παρακάτω συντελεστές:

- ο συντελεστής παραγωγής βιομάζας $Y_{x/s}$: 0,21 g/g
- ο συντελεστής απόδοσης λίπους, $Y_{L/s}$: 0,1 g/g
- ο συντελεστής παραγωγής ελεύθερης λίπους βιομάζας, $Y_{xf/s}$: 0,11 g/g

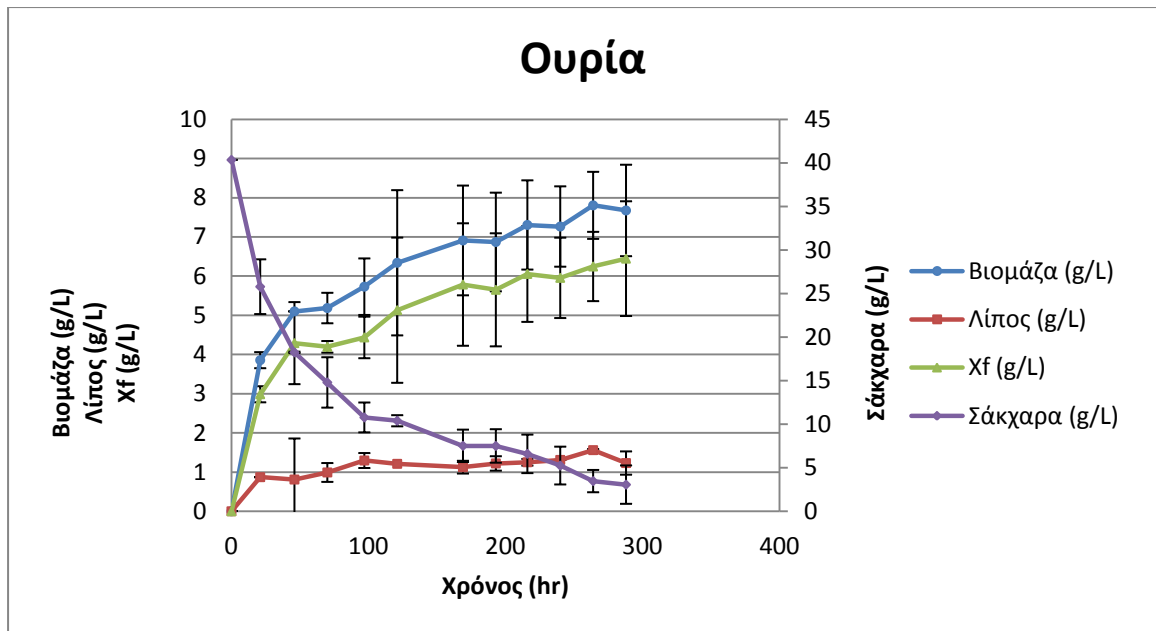
Αναφέρεται επίσης ότι για τις τιμές του pH της καλλιέργειας που μετρήθηκαν για όλες τις ημέρες της καλλιέργειας καταγράφηκε μια σχετικά έντονη πτώση και έπειτα σταθεροποίηση της στην τιμή 5,7 Αυτό πιθανότατα οφείλεται στην παραγωγή κάποιων οργανικών οξέων από τον μικροοργανισμό.

Πείραμα B5: Καλλιέργεια του μύκητα σε υπόστρωμα με πηγή αζώτου την ουρία (σε αρχική συγκέντρωση 0,360 g/L)

Η αρχική συγκέντρωση των σακχάρων (μείγμα) ήταν 40 g/L και ο λόγος C/N ίσος με 100. Πραγματοποιήθηκε ζύμωση ασυνεχούς τύπου σε ανακινούμενο επωαστήρα με ανάδευση (200rpm) και σε θερμοκρασία 30°C κάτω από αερόβιες συνθήκες. Το αρχικό pH των καλλιεργειών είχε ρυθμιστεί στο 6,00.

Στο παρακάτω διάγραμμα απεικονίζονται η αύξηση της βιομάζας (X), η ελεύθερη λίπους βιομάζα (X_f), η παραγωγή ενδοκυτταρικού λίπους και η κατανάλωση του υποστρώματος από το μύκητα *Fusarium oxysporum* σε θρεπτικό μέσο το οποίο περιείχε ως πηγή αζώτου ουρία (0,360 g/L).

Η ζύμωση στην περίπτωση της ουρίας κράτησε 12 ημέρες, ενώ ήδη από την 7^η ημέρα παρατηρείται σταθεροποίηση της κατανάλωσης υποστρώματος από τον μύκητα.



Διάγραμμα 20: Κινητική της εξέλιξης της βιομάζας, της παραγωγής ενδοκυτταρικού λίπους, της ελεύθερης λίπους βιομάζας και της κατανάλωσης υποστρώματος συναρτήσει του χρόνου κατά την καλλιέργεια του μύκητα *F. Oxyrosum* σε ουρία σαν πηγή αζώτου.

Αρχικά να σχολιαστεί ότι οι μεγάλες αποκλίσεις που εντοπίζονται στη βιομάζα κατά βάση, οφείλονται σε διαφορετική ανάπτυξη που ακολούθησαν οι 2 διαφορετικές καλλιέργειες. Αυτό είναι αποδεκτό, αφού υπάρχουν πολλοί αστάθμητοι και μη ελέγξιμοι παράγοντες οι οποίοι μπορούν να επηρεάσουν την ανάπτυξη του μικροοργανισμού παρόλο που περιέχονται τα ίδια θρεπτικά συστατικά.

Από το διάγραμμα, παρατηρείται ότι για τις 3 πρώτες ημέρες, η κατανάλωση των σακχάρων είναι γραμμική και μάλιστα με έντονο ρυθμό, αφού μέχρι το τέλος της 3^{ης} ημέρας έχει καταναλωθεί το 63,3% του υποστρώματος. Στη συνέχεια ο μύκητας καταναλώνει τα σάκχαρα με πιο μειωμένο ρυθμό, μέχρι σταθεροποίηση της κατανάλωσης ειδικά τις 2 τελευταίες ημέρες, η οποία αντιστοιχεί σε ποσοστό περίπου 92,4% της αρχικής ποσότητας υποστρώματος.

Όσον αφορά στην παραγωγή βιομάζας, αυτή εξελίσσεται με έντονο ρυθμό μέχρι και την 2^η ημέρα ζύμωσης, φτάνοντας την τιμή 5,1 g/L, κατά αντιστοιχία με τον έντονο ρυθμό κατανάλωσης του υποστρώματος. Φτάνει τη μέγιστη τιμή της την 11^η ημέρα της καλλιέργειας με τιμή 7,81 g/L και παύει να αυξάνεται.

Η παραγωγή του ενδοκυτταρικού λίπους ξεκινάει με αργό ρυθμό ειδικά για τις πρώτες 3 ημέρες, με τιμές <1 g λίπους/L, γεγονός αναμενόμενο καθώς ο μύκητας αφομοιώνει τα σάκχαρα προς παραγωγή βιομάζας, Από την 4^η ημέρα και μέχρι το τέλος της ζύμωσης η παραγωγή ενδοκυτταρικού λίπους αυξάνεται και φτάνει μέχρι την τιμή 1,56 g λίπους/L την 11^η ημέρα. Ταυτόχρονα και αναμενόμενα, αυξάνεται και το ποσοστό των λιπιδίων επί ξηράς μάζας κυττάρων, το οποίο ξεκίνησε με την τιμή 22,57% για την πρώτη ημέρα ζύμωσης, τιμή η οποία είναι υψηλή αλλά ωστόσο δικαιολογείται από την ιδιαίτερα μεγάλη τιμή για την ποσότητα του λίπους που συντέθηκε εκείνη την ημέρα σε βάρος της βιομάζας.

Στη συνέχεια, το ποσοστό αυτό αυξάνει και φτάνει στην τιμή 19,99%, η οποία είναι και η μέγιστη για την 11^η ημέρα της ζύμωσης.

Όσον αφορά στην πορεία της παραμέτρου X_f , παρατηρείται ότι γενικά αυξάνεται σχεδόν ανάλογα με τη βιομάζα. Όπως είναι αναμενόμενο, μετά τη σταθεροποίηση της από την 3^η μέχρι την 5^η ημέρα, και συγκεκριμένα για την 6^η ημέρα αυξάνεται καθώς αυξάνει και η βιομάζα με την ταυτόχρονη όμως μεγαλύτερη παραγωγή λίπους.

Τέλος, για την ημέρα που παρατηρήθηκε η μέγιστη παραγωγή λίπους (και από άποψη ποσότητας g/L και από άποψη %λιπιδίων επί ξηράς βιομάζας), η οποία είναι η προτελευταία ημέρα της ζύμωσης, αναφέρονται ενδεικτικά οι παρακάτω συντελεστές:

- ο συντελεστής παραγωγής βιομάζας $Y_{x/s}$: 0,21 g/g
- ο συντελεστής απόδοσης λίπους, $Y_{L/s}$: 0,042 g/g
- ο συντελεστής παραγωγής ελεύθερης λίπους βιομάζας, $Y_{xf/s}$: 0,17 g/g

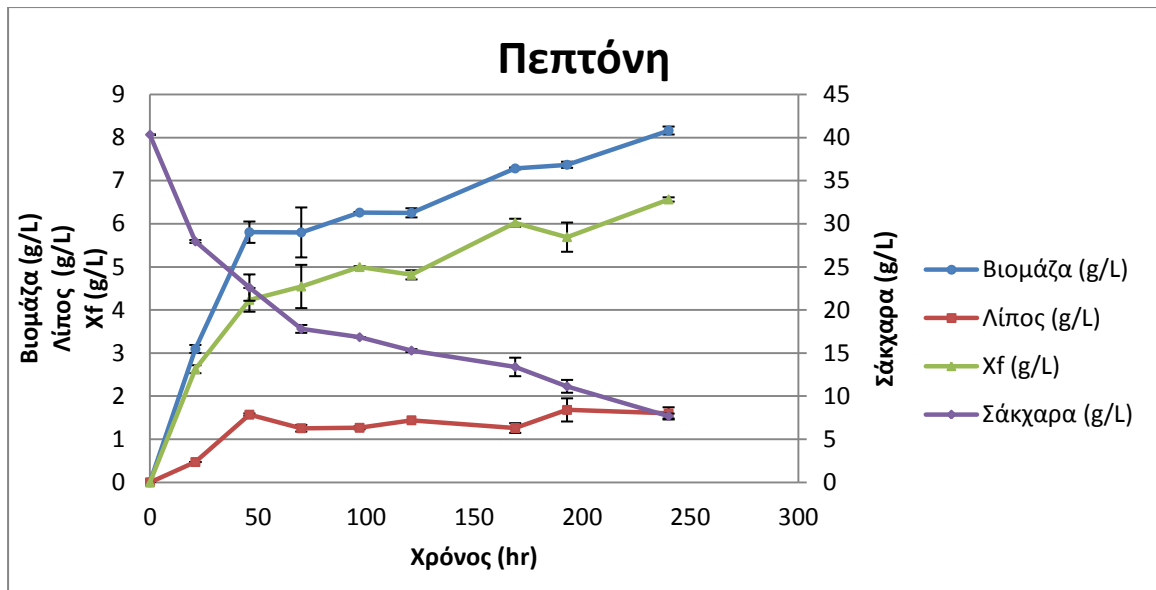
Οι τιμές του pH της καλλιέργειας που μετρήθηκαν για όλες τις ημέρες της καλλιέργειας, παρατηρήθηκε ότι σημείωσαν μια μικρή πτώση από την 2^η μέχρι την 5^η ημέρα στην τιμή περίπου 5,0 και έπειτα σταθεροποίηση της στην τιμή 5,7. Αυτό πιθανότατα οφείλεται στην παραγωγή κάποιων οργανικών οξέων από τον μικροοργανισμό.

Πείραμα Β6: Καλλιέργεια του μύκητα σε υπόστρωμα με πηγή αζώτου την πεπτόνη (σε αρχική συγκέντρωση 1,200 g/L)

Η αρχική συγκέντρωση των σακχάρων (μείγμα) ήταν 40 g/L και ο λόγος C/N ίσος με 100. Πραγματοποιήθηκε ζύμωση ασυνεχούς τύπου σε ανακινούμενο επωαστήρα με ανάδευση (200rpm) και σε θερμοκρασία 30°C κάτω από αερόβιες συνθήκες. Το αρχικό pH των καλλιεργειών είχε ρυθμιστεί στο 6,00.

Η ζύμωση στην περίπτωση της πεπτόνης κράτησε 10 ημέρες, μιας και από 10^η ημέρα παρατηρείται σταθεροποίηση της κατανάλωσης υποστρώματος από τον μύκητα.

Στο παρακάτω διάγραμμα απεικονίζονται η αύξηση της βιομάζας (X), η ελεύθερη λίπους βιομάζα (X_f), η παραγωγή ενδοκυτταρικού λίπους και η κατανάλωση του υποστρώματος από το μύκητα *Fusarium oxysporum* σε θρεπτικό μέσο το οποίο περιείχε ως πηγή αζώτου πεπτόνη (1,200 g/L).



Διάγραμμα 21: Κινητική της εξέλιξης της βιομάζας, της παραγωγής ενδοκυτταρικού λίπους, της ελεύθερης λίπους βιομάζας και της κατανάλωσης υποστρώματος συναρτήσει του χρόνου κατά την καλλιέργεια του μύκητα *F. Oxyroium* σε πεπτόνη σαν πηγή αζώτου.

Από το διάγραμμα, παρατηρείται ότι για τις 3 πρώτες ημέρες, η κατανάλωση των σακχάρων είναι γραμμική και μάλιστα με έντονο ρυθμό, αφού μέχρι το τέλος της 3^{ης} ημέρας έχει καταναλωθεί το 55,9% του υποστρώματος. Στη συνέχεια ο μύκητας καταναλώνει τα σάκχαρα με πιο μειωμένο ρυθμό, μέχρι σταθεροποίηση της κατανάλωσης, η οποία αντιστοιχεί σε ποσοστό περίπου 81% της αρχικής ποσότητας υποστρώματος, την 10^η και τελευταία ημέρα της ζύμωσης.

Όσον αφορά στην παραγωγή βιομάζας, αυτή εξελίσσεται με έντονο ρυθμό μέχρι και την 2^η ημέρα ζύμωσης, φτάνοντας την τιμή 5,8 g/L, κατά αντιστοιχία με τον έντονο ρυθμό κατανάλωσης του υποστρώματος. Φτάνει τη μέγιστη τιμή της την 10^η και τελευταία ημέρα της καλλιέργειας με τιμή 8,171 g/L.

Η παραγωγή του ενδοκυτταρικού λίπους στην περίπτωση της πεπτόνης, ξεκινάει σχετικά γρήγορα. Ειδικότερα, μόνο για την 1^η παράγεται ποσότητα λίπους <1 g λίπους/L. Από τη 2^η ημέρα και μέχρι την 10^η το παραγόμενο λίπος αυξάνεται. Αυτή η συμπεριφορά, μπορεί να συσχετιστεί με την μείωση του ρυθμού αύξησης της βιομάζας, δηλαδή ότι ο μύκητας παράγει και συσσωρεύει ενδοκυτταρικό λίπος ενώ έχει μειωθεί ο ρυθμός πολλαπλασιασμού των κυττάρων. Φτάνει τη μέγιστη τιμή του την 9^η ημέρα στα 1,68 g/L. Ταυτόχρονα και αναμενόμενα, αυξάνεται και το ποσοστό των λιπιδίων επί ξηράς μάζας κυττάρων, το οποίο ξεκίνησε με την τιμή 15,19% για την πρώτη ημέρα ζύμωσης. Στη συνέχεια, το ποσοστό αυτό αυξάνει και φτάνει στην τιμή 22,8%, η οποία είναι και η μέγιστη για την 9^η ημέρα της ζύμωσης.

Όσον αφορά στην πορεία της παραμέτρου X_f , παρατηρείται ότι γενικά αυξάνεται σχεδόν ανάλογα με τη βιομάζα. Στη συνέχεια σταθεροποιείται από την 3^η μέχρι την 5^η ημέρα, γεγονός αναμενόμενο καθώς τότε αρχίζει να παράγεται μεγαλύτερη ποσότητα ενδοκυτταρικού λίπους. Για τις επόμενες ημέρες, ενώ αναμενόταν σταθεροποίηση/ελαφριά πτώση της λόγω της έντονης παραγωγής λιπιδίων, αυτή αυξάνεται με σχετικά αργό ρυθμό,

γεγονός που μπορεί να αποδοθεί στη συνεχή αύξηση της βιομάζας σε βάρος της παραγωγής λιπιδίων.

Τέλος, για την ημέρα που παρατηρήθηκε η μέγιστη παραγωγή λίπους (και από άποψη ποσότητας g/L και από άποψη %λιπιδίων επί ξηράς βιομάζας), η οποία είναι η προτελευταία ημέρα της ζύμωσης, αναφέρονται ενδεικτικά οι παρακάτω συντελεστές:

-ο συντελεστής παραγωγής βιομάζας $Y_{x/s}$: 0,25 g/g

-ο συντελεστής απόδοσης λίπους, $Y_{L/s}$: 0,058 g/g

-ο συντελεστής παραγωγής ελεύθερης λίπους βιομάζας, $Y_{xf/s}$: 0,19 g/g

Οι τιμές του pH της καλλιέργειας που μετρήθηκαν για όλες τις ημέρες της καλλιέργειας, παρατηρήθηκε ότι σημείωσαν μια μικρή πτώση και έπειτα σταθεροποίηση της στην τιμή 5,6. Αυτό πιθανότατα οφείλεται στην παραγωγή κάποιων οργανικών οξέων από τον μικροοργανισμό.

Να σχολιαστεί ότι οι μεγάλες αποκλίσεις που εντοπίζονται στη βιομάζα κατά βάση των διαγραμμάτων της ουρίας χλωριούχου αμμώνιου, όξινου φωσφορικού αμμώνιου οφείλονται σε διαφορετική ανάπτυξη που ακολούθησαν οι 2 διαφορετικές καλλιέργειες. Αυτό είναι αποδεκτό, αφού υπάρχουν πολλοί αστάθμητοι και μη ελέγξιμοι παράγοντες οι οποίοι μπορούν να επηρεάσουν την ανάπτυξη του μικροοργανισμού παρόλο που περιέχονται τα ίδια θρεπτικά συστατικά.

4.1.4 Συζήτηση αποτελεσμάτων για την επίδραση της πηγής Αζώτου

Στόχος αυτής της σειράς πειραμάτων είναι η εύρεση εκείνης της πηγής αζώτου, η οποία θα προκαλέσει τη μεγαλύτερη παραγωγή ενδοκυτταρικού λίπους από το μύκητα *Fusarium oxysporum*.

Στη συνέχεια, ακολουθεί ο πίνακας ο οποίος παρουσιάζει συνοπτικά τα αποτελέσματα της δεύτερης σειράς πειραμάτων που αφορούσαν την πηγή αζώτου. Από τον πίνακα προκύπτει ότι τα καλύτερα αποτελέσματα από άποψη ποσότητας λιπιδίων σε g/L, τα έδωσε το εκχύλισμα ζύμης με τιμή 3,67 g/L, ακολουθούμενο από το όξινο φωσφορικό αμμώνιο με τιμή 3,03 g/L. Τα καλύτερα αποτελέσματα από άποψη % λιπιδίων επί ξηράς βιομάζας τα έδωσε το χλωριούχο αμμώνιο με τιμή 66,38% και το θειικό αμμώνιο με τιμή 54,53%. Ικανοποιητικό ποσοστό παρουσιάζει και το εκχύλισμα ζύμης με τιμή 49,50%. Σε συμφωνία με τα παραπάνω αποτελέσματα, αναφέρεται στη βιβλιογραφία πως από τις πηγές αζώτου, το χλωριούχο αμμώνιο και το εκχύλισμα ζύμης ασκούν επίδραση στην παραγωγή ενδοκυτταρικού λίπους στους μικροοργανισμούς. (90)

Στον πίνακα, οι τιμές που αντιστοιχούν σε δεδομένα για τη βιομάζα και την παραγωγή λίπους αναφέρονται στην ημέρα καλλιέργειας που παρατηρήθηκε η μεγαλύτερη ποσότητα παραγόμενου λίπους σε g/L, ενώ ο χρόνος ζύμωσης και η κατανάλωση υποστρώματος είναι αναφέρονται στο συνολικό χρόνο που κράτησε η καλλιέργεια.

Πίνακας 13: Συνοπτικός πίνακας των εναπομεινάντων σακχάρων (g/L), της βιομάζας (g/L), του λίπους (g/L), της ελεύθερης λίπους βιομάζας (g/L) και του συντελεστή απόδοσης λίπους (%) για τις πηγές αζώτου που χρησιμοποιήθηκαν.

| | Χρόνος Ζύμωσης (days) | Κατανάλωση υποστρώματος (%) | Βιομάζα (g/L) | Λίπος (g/L) | X _f (g/L) | % λίπους επί ξηρής βιομάζας |
|-------------------------|-----------------------|-----------------------------|---------------|-------------|----------------------|-----------------------------|
| Θειικό αμμώνιο | 10 | 80,68 | 5,37 | 2,93 | 2,44 | 54,53 |
| Χλωριούχο αμμώνιο | 10 | 66,02 | 4,14 | 2,75 | 1,39 | 66,38 |
| Όξινο φωσφορικό αμμώνιο | 9 | 85,21 | 8,48 | 3,03 | 5,45 | 35,79 |
| Εκχύλισμα ζύμης | 9 | 85,46 | 7,43 | 3,67 | 3,75 | 49,50 |
| Ουρία | 12 | 92,42 | 7,81 | 1,56 | 6,25 | 19,99 |
| Πεπτόνη | 10 | 80,94 | 7,37 | 1,68 | 5,69 | 22,80 |

Γενικά, παρατηρείται ότι στην περίπτωση χρήσης των οργανικών πηγών αζώτου, η κατανάλωση των σακχάρων είναι μεγαλύτερη και ότι η βιομάζα κυμαίνεται σε σχετικά υψηλές τιμές (~ 7,5 g/L). Ωστόσο, η ουρία και η πεπτόνη προκάλεσαν τη μικρότερη παραγωγή λίπους τόσο από άποψη ποσότητας λιπιδίων (<2 g λιπιδίων/L), όσο και από άποψη %λιπαρών επί ξηρής βιομάζας (~20%).

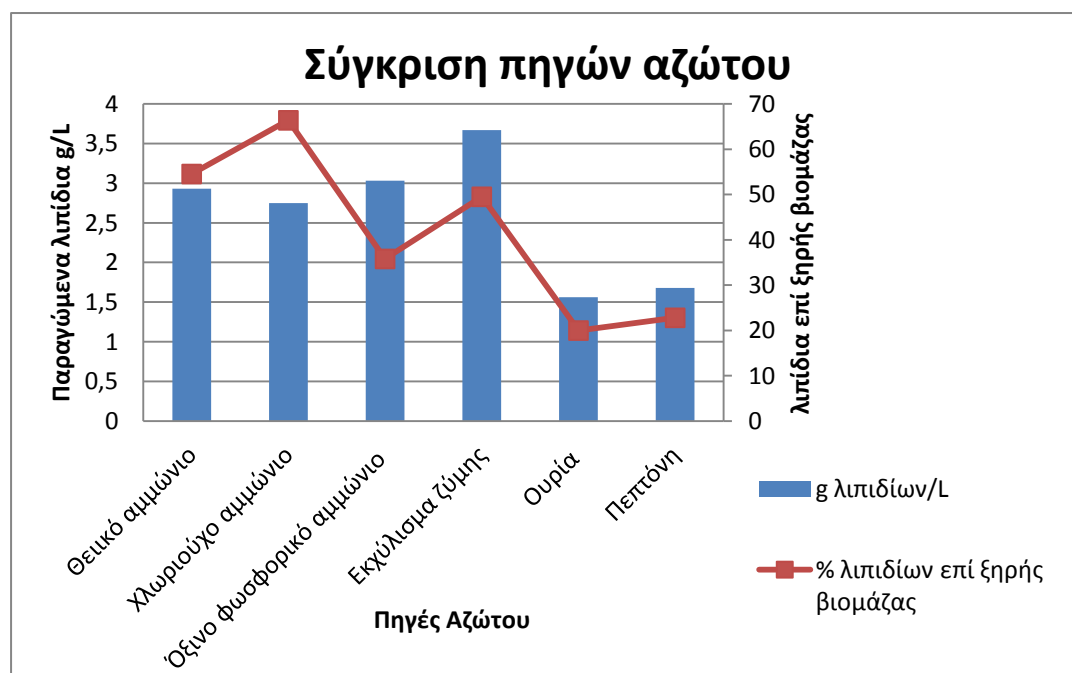
Όσον αφορά στις ανόργανες πηγές αζώτου, συνολικά στη χρήση τους σημειώθηκαν μικρότερες καταναλώσεις των σακχάρων, σε σχέση με τις οργανικές πηγές. Το θειικό αμμώνιο και το χλωριούχο αμμώνιο, δεν ευνόησαν μεγάλη ανάπτυξη της βιομάζας (~5 g/L), αλλά σε αυτά σημειώθηκε ικανοποιητική παραγωγή λιπιδίων (>2,5 g λιπιδίων/L). Το όξινο φωσφορικό αμμώνιο προκάλεσε τη μεγαλύτερη ανάπτυξη βιομάζας (8,48 g/L) και εξίσου καλή παραγωγή λίπους.

Με κριτήριο την ποσότητα παραγόμενων λιπιδίων σε g/L, σαν καλύτερη πηγή αζώτου επιλέγεται το εκχύλισμα ζύμης.

Σύμφωνα και με παρόμοιες μελέτες από τη βιβλιογραφία, η επιλογή της πηγής αζώτου αποτελεί σημαντική παράμετρο για τη βελτιστοποίηση της μικροβιακής παραγωγής λίπους, ωστόσο δεν υπάρχει κάποιος γενικός «κανόνας» που να χαρακτηρίζει τις οργανικές καλύτερες από τις ανόργανες πηγές ή το αντίστροφο. Η επιλογή τους εξαρτάται από τον ίδιο το μικροοργανισμό και σε συνδυασμό με τις υπόλοιπες συνθήκες καλλιέργειας. (48)

Σε ένα πολύ γενικό πλαίσιο, φαίνεται ότι στις οργανικές πηγές αζώτου η παρουσία πρωτεϊνών/αμινοξέων ευνοεί την αφομοίωση της πηγής άνθρακα και ταυτόχρονα επάγει και μεγαλύτερη παραγωγή λιπιδίων, όπως συνέβη στην περίπτωση της μελέτης του μικροοργανισμού *Cunninghamella echinulata*. (91) Αυτό το γεγονός, συσχετίζεται και με τη βιοχημεία συσσώρευσης λίπους, καθώς αναφέρεται ότι τα ιόντα αμμωνίου στην περίπτωση που προέρχονται από οργανικές πηγές αζώτου μειώνουν την παρεμπόδιση ενζύμων που συμμετέχουν στον κύκλο του Krebs ταχύτερα σε σχέση με τις ανόργανες πηγές. Έτσι, είναι λογικό πως στην περίπτωση των οργανικών πηγών ο κύκλος του Krebs, εξελίσσεται με μικρότερη παρεμπόδιση, παρέχοντας τις ενδιάμεσες ενώσεις που είναι απαραίτητες για τη συσσώρευση ενδοκυτταρικού λίπους. (54)

Επίσης θα παρουσιαστούν σαν κριτήριο οι συντελεστές απόδοσης λίπους $Y_{L/S}$. Ειδικότερα το χλωριούχο αμμώνιο παρουσίασε το μεγαλύτερο συντελεστή απόδοσης λίπους με τιμή 0,11 g λίπους/g καταναλωθέντων σακχάρων, ακολουθούμενο από το εκχύλισμα ζύμης με τιμή 0,10 g/g, και το θειικό αμμώνιο με τιμή 0,091 g/g.



Διάγραμμα 22: Συγκεντρωτικά αποτελέσματα για τη σύγκριση πηγών αζώτου.

Τέλος, το γεγονός ότι επιλέγη οργανική πηγή αζώτου, είναι ιδιαίτερα σημαντικό, καθώς σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν να αναπτυχθεί ο μικροοργανισμός σε ρευστοποιημένο ξηρό σόργο που περιέχει ποσότητα πρωτεϊνών, οι οποίες θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν και ως πηγή αζώτου.

4.1.5 Επίδραση λόγου Άνθρακα/Αζώτου

Στην τρίτη σειρά πειραμάτων ερευνάται η επίδραση του λόγου άνθρακα/αζώτου στην ανάπτυξη και ικανότητα βιοσύνθεσης ενδοκυτταρικού λίπους του μύκητα *F. Oxysporum*.

Όπως βρέθηκε και στη βιβλιογραφία, η παραγωγή λίπους απαιτεί σχετικά υψηλούς λόγους άνθρακα/αζώτου. Στα πλαίσια της παρούσας μελέτης δοκιμάστηκαν ο λόγοι 50, 100 και 150

Για την αύξηση/μείωση του λόγου C/N η συγκέντρωση της πηγής άνθρακα παρέμενε σταθερή, ενώ μειωνόταν/αυξανόταν αντίστοιχα η ποσότητα της πηγής αζώτου.

Ως πηγή αζώτου χρησιμοποιήθηκε το yeast extract, το οποίο σύμφωνα με την προηγούμενη σειρά πειραμάτων, έδωσε καλύτερα αποτελέσματα, όσον αφορά την παραγωγή ενδοκυτταρικού λίπους σε ποσότητα g/L αλλά και ικανοποιητικό %λιπιδίων επί ξηρής βιομάζας.

Ως πηγή άνθρακα χρησιμοποιήθηκε το μίγμα σακχαρόζης, γλυκόζης, φρουκτόζης στις αναλογίες που τα τρία αυτά σάκχαρα βρίσκονται στο σόργο (δηλαδή 68% σακχαρόζη, 16% γλυκόζη και 16% φρουκτόζη). Η αρχική συγκέντρωση σακχάρων ήταν σταθερή και ίση με 40 g/L.

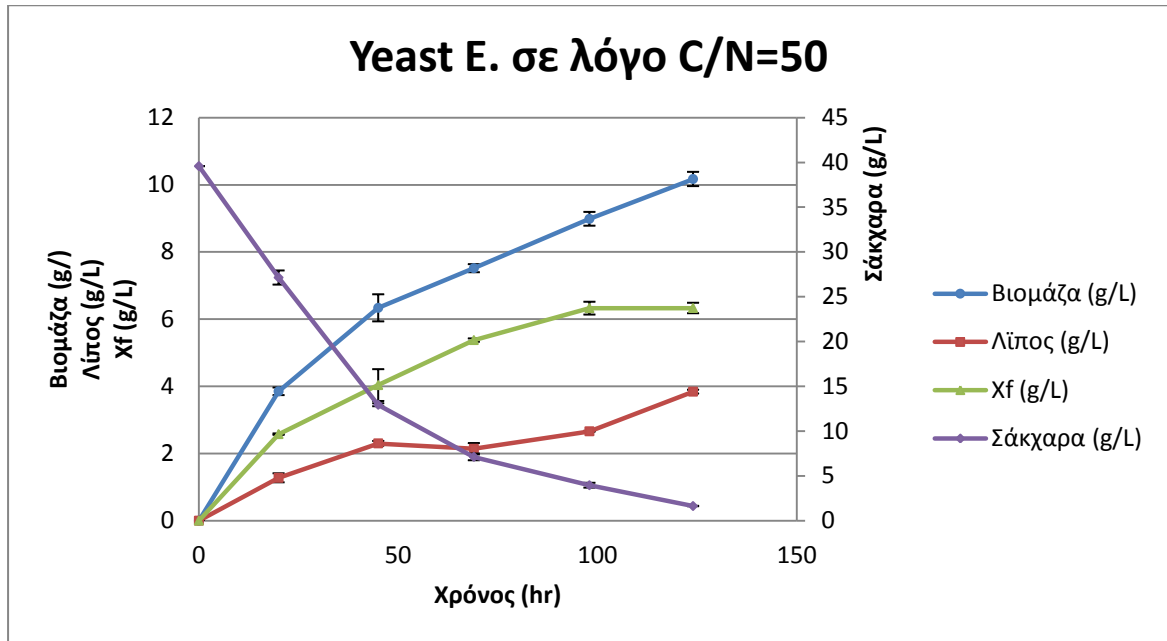
Πείραμα Γ1: Καλλιέργεια του μύκητα σε υπόστρωμα με πηγή αζώτου το yeast extract και λόγο C/N=50 (σε αρχική συγκέντρωση yeast extract 3,100 g/L)

Η αρχική συγκέντρωση των σακχάρων (μείγμα σακχαρόζη, γλυκόζη, φρουκτόζη) ήταν 40 g/L, ενώ ως πηγή αζώτου χρησιμοποιήθηκε το yeast extract σε συγκέντρωση 3,100g/L, για να επιτευχθεί ο ζητούμενος λόγος.

Η ζύμωση που πραγματοποιήθηκε ήταν ασυνεχούς τύπου σε ανακινούμενο επωαστήρα, με ανάδευση (200rpm) και σε θερμοκρασία 30°C κάτω από αερόβιες συνθήκες, και το αρχικό pH των καλλιεργειών είχε ρυθμιστεί στο 6,00.

Η ζύμωση στην περίπτωση του λόγου άνθρακα/αζώτου στην τιμή 50, κράτησε 5 ημέρες, αφού ήδη από την 5^η ημέρα και μετά παρατηρείται σταθεροποίηση της κατανάλωσης υποστρώματος.

Στο παρακάτω διάγραμμα απεικονίζονται η αύξηση της βιομάζας (X), η ελεύθερη λίπους βιομάζα (X_f), η παραγωγή ενδοκυτταρικού λίπους και η κατανάλωση του υποστρώματος από το μύκητα *Fusarium oxysporum* σε θρεπτικό μέσο το οποίο περιείχε ως πηγή αζώτου yeast extract (3,100 g/L).



Διάγραμμα 23: Κινητική της εξέλιξης της βιομάζας, της παραγωγής ενδοκυτταρικού λίπους, της ελεύθερης λίπους βιομάζας και της κατανάλωσης υποστρώματος συναρτήσει του χρόνου κατά την καλλιέργεια του μύκητα *F. Oxysporum* σε λόγο άνθρακα/αζώτου ίσο με 50.

Από το διάγραμμα, παρατηρείται ότι για τις 2 πρώτες ημέρες, η κατανάλωση των σακχάρων είναι γραμμική και μάλιστα με έντονο ρυθμό, αφού μέχρι το τέλος της 2^{ης} ημέρας έχει καταναλωθεί το 67,31% του υποστρώματος. Στη συνέχεια ο μύκητας καταναλώνει τα σάκχαρα με πιο αργό ρυθμό, μέχρι σταθεροποίηση της κατανάλωσης, η οποία αντιστοιχεί σε ποσοστό 95,88% της αρχικής ποσότητας υποστρώματος την 5^η και τελευταία ημέρα ζύμωσης.

Όσον αφορά στην παραγωγή βιομάζας, αυτή εξελίσσεται με έντονο ρυθμό ειδικά μέχρι τη 2^η ημέρα ζύμωσης, φτάνοντας την τιμή 6,34 g/L, κατά αντιστοιχία με τον έντονο ρυθμό κατανάλωσης του υποστρώματος, η οποία αρχίζει να σταθεροποιείται την ίδια ημέρα. Φτάνει τη μέγιστη τιμή της την 5^η και τελευταία ημέρα της καλλιέργειας με τιμή 10,17 g/L.

Η παραγωγή του ενδοκυτταρικού λίπους στην περίπτωση του χαμηλού λόγου άνθρακα/αζώτου, ξεκινάει γρήγορα, καθώς ήδη από την 1^η ημέρα ζύμωσης παράγεται ποσότητα λίπους >1 g λίπους/L. Από τη 2^η ημέρα και μετά το παραγόμενο λίπος αυξάνεται, συμβαδίζοντας με το ρυθμό κατανάλωσης του υποστρώματος. Την 5^η και τελευταία ημέρα της ζύμωσης η παραγωγή ενδοκυτταρικού λίπους φτάνει μέχρι την τιμή 3,84 g λίπους/L. Ταυτόχρονα και αναμενόμενα, αυξάνεται και το ποσοστό των λιπιδίων επί ξηράς μάζας κυττάρων, το οποίο ξεκίνησε με την τιμή 33,12% για την πρώτη ημέρα ζύμωσης, τιμή η οποία είναι υψηλή αλλά ωστόσο δικαιολογείται από την ιδιαίτερα μεγάλη τιμή για την ποσότητα του λίπους που συντέθηκε εκείνη την ημέρα και γενικότερα με την μεγαλύτερη ταχύτητα παραγωγής λίπους. Στη συνέχεια, το ποσοστό αυτό αυξάνει και φτάνει στην τιμή 37,76%, η οποία είναι και η μέγιστη για την τελευταία ημέρα της ζύμωσης.

Όσον αφορά στην πορεία της παραμέτρου X_f , η οποία αναπαριστά την ελεύθερη λίπους βιομάζα, παρατηρείται ότι γενικά αυξάνεται σχεδόν ανάλογα με τη βιομάζα

μέχρι την 4^η ημέρα και έπειτα, σταθεροποιείται και παρουσιάζει μια μικρή μείωση. Αυτή η συμπεριφορά είναι αναμενόμενη καθώς από την 4^η ημέρα και μετά ξεκινάει η μεγαλύτερη παραγωγή λίπους, ενώ η πορεία της βιομάζας τείνει να σταθεροποιηθεί.

Τέλος, για την ημέρα που παρατηρήθηκε η μέγιστη παραγωγή λίπους (και από άποψη ποσότητας g/L και από άποψη %λιπιδίων επί ξηράς βιομάζας), η οποία είναι και η τελευταία ημέρα της ζύμωσης, αναφέρονται ενδεικτικά οι παρακάτω συντελεστές:

- ο συντελεστής παραγωγής βιομάζας $Y_{x/s}$: 0,26 g/g
- ο συντελεστής απόδοσης λίπους, $Y_{l/s}$: 0,10 g/g
- ο συντελεστής παραγωγής ελεύθερης λίπους βιομάζας, $Y_{xf/s}$: 0,17 g/g

Αναφέρεται επίσης ότι για τις τιμές του pH της καλλιέργειας που μετρήθηκαν για όλες τις ημέρες της καλλιέργειας καταγράφηκε μια μικρή πτώση και έπειτα σταθεροποίηση της στην τιμή 5,6. Αυτό πιθανότατα οφείλεται στην παραγωγή κάποιων οργανικών οξέων από τον μικροοργανισμό.

Πείραμα Γ2: Καλλιέργεια του μύκητα σε υπόστρωμα με πηγή αζώτου το yeast extract και λόγο C/N=100 (σε αρχική συγκέντρωση yeast extract 1,460 g/L)

Το πείραμα αυτό έχει περιγραφεί στην ενότητα «Επίδραση πηγής Αζώτου».

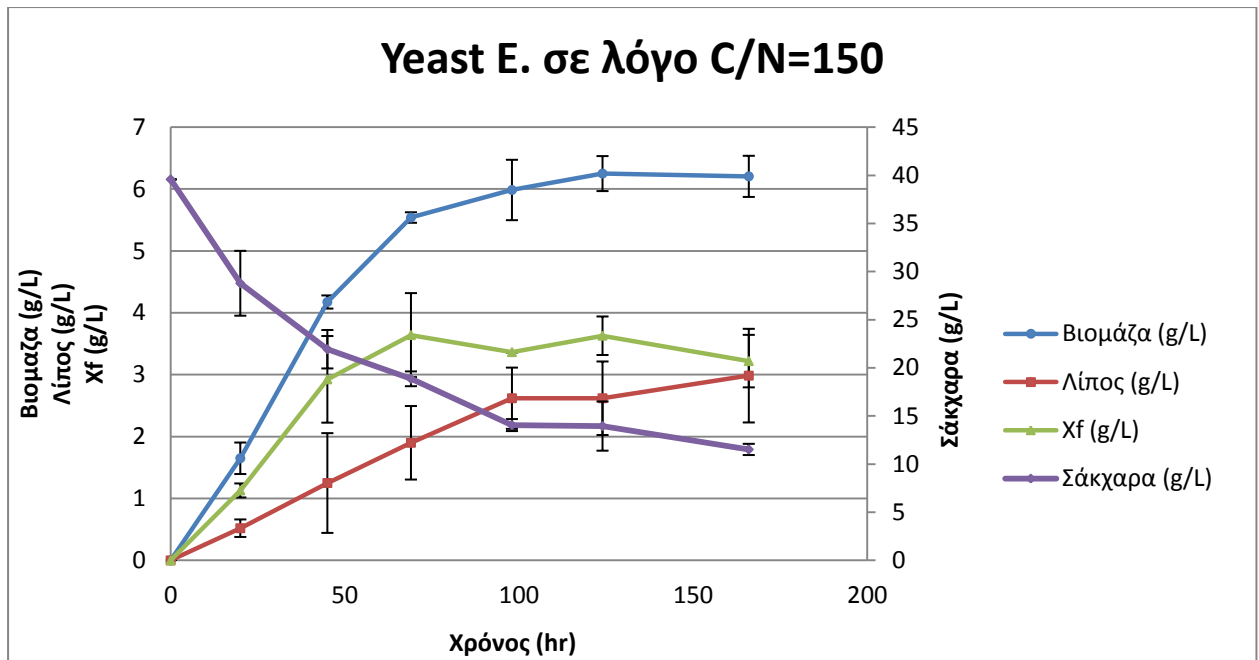
Πείραμα Γ3: Καλλιέργεια του μύκητα σε υπόστρωμα με πηγή αζώτου το yeast extract και λόγο C/N=150 (σε αρχική συγκέντρωση yeast extract 1,010 g/L)

Η αρχική συγκέντρωση των σακχάρων (μείγμα σακχαρόζη, γλυκόζη, φρουκτόζη) ήταν 40 g/L, ενώ ως πηγή αζώτου χρησιμοποιήθηκε το yeast extract σε συγκέντρωση 1,010g/L, για να επιτευχθεί ο ζητούμενος λόγος.

Η ζύμωση που πραγματοποιήθηκε ήταν ασυνεχούς τύπου σε ανακινούμενο επωαστήρα, με ανάδευση (200rpm) και σε θερμοκρασία 30°C κάτω από αερόβιες συνθήκες, και το αρχικό pH των καλλιεργειών είχε ρυθμιστεί στο 6,00.

Η ζύμωση στην περίπτωση του λόγου άνθρακα/αζώτου στην τιμή 150, κράτησε 6 ημέρες, αφού ήδη από την 6^η ημέρα παρατηρείται σταθεροποίηση της κατανάλωσης υποστρώματος.

Στο παρακάτω διάγραμμα απεικονίζονται η αύξηση της βιομάζας (X), η ελεύθερη λίπους βιομάζα (X_f), η παραγωγή ενδοκυτταρικού λίπους και η κατανάλωση του υποστρώματος από το μύκητα *Fusarium oxysporum* σε θρεπτικό μέσο το οποίο περιείχε ως πηγή αζώτου yeast extract (1,010 g/L).



Διάγραμμα 24: Κινητική της εξέλιξης της βιομάζας, της παραγωγής ενδοκυτταρικού λίπους, της ελεύθερης λίπους βιομάζας και της κατανάλωσης υποστρώματος συναρτήσει του χρόνου κατά την καλλιέργεια του μύκητα *F. Oxysporum* σε λόγο άνθρακα/αζώτου ίσο με 150.

Από το διάγραμμα, παρατηρείται ότι για τις 2 πρώτες ημέρες, η κατανάλωση των σακχάρων είναι γραμμική και μάλιστα με έντονο ρυθμό, αφού μέχρι το τέλος της 2^{ης} ημέρας έχει καταναλωθεί το 44,58% του υποστρώματος. Στη συνέχεια ο μύκητας καταναλώνει τα σάκχαρα με πιο αργό ρυθμό, μέχρι σταθεροποίηση της κατανάλωσης, η οποία αντιστοιχεί σε ποσοστό 70,88% της αρχικής ποσότητας υποστρώματος την 7^η και τελευταία ημέρα ζύμωσης.

Η παραγωγή βιομάζας, εξελίσσεται με έντονο ρυθμό ειδικά μέχρι τη 3^η ημέρα ζύμωσης, φτάνοντας την τιμή 5,54 g/L, κατά αντιστοιχία με τον έντονο ρυθμό κατανάλωσης του υποστρώματος. Στη συνέχεια, μειώνεται ο ρυθμός αύξησής, και δείχνει σταθεροποίηση, φτάνοντας τη μέγιστη τιμή της την 6^η ημέρα της καλλιέργειας με τιμή 6,25 g/L.

Η παραγωγή του ενδοκυτταρικού λίπους στην περίπτωση του υψηλού λόγου άνθρακα/αζώτου, ξεκινάει σχετικά γρήγορα, καθώς μόνο για την 1^η παράγεται ποσότητα λίπους <1 g λίπους/L. Από τη 2^η ημέρα και μέχρι την 4^η το παραγόμενο λίπος αυξάνεται με έντονο ρυθμό και φτάνει μέχρι την τιμή 2,62 g/L. Τέλος, τις 2 τελευταίες ημέρες, και ενώ η ανάπτυξη της βιομάζας έχει πλέον σταθεροποιηθεί, το παραγόμενο λίπος σημειώνει μια μικρή αύξηση και φτάνει τη μέγιστη τιμή του την 7^η και τελευταία ημέρα στα 2,99 g/L. Ταυτόχρονα και αναμενόμενα, αυξάνεται και το ποσοστό των λιπιδίων επί ξηράς μάζας κυττάρων, το οποίο ξεκίνησε με την τιμή 31,51% για την 1^η ημέρα ζύμωσης, τιμή ιδιαίτερα υψηλή. Στη συνέχεια, το ποσοστό αυτό αυξάνει και φτάνει στην τιμή 48,12%, η οποία είναι και η μέγιστη για την 7^η και τελευταία ημέρα της ζύμωσης.

Για την πορεία της παραμέτρου X_f , γενικά αυξάνεται σχεδόν ανάλογα με τη βιομάζα

μέχρι την 3^η ημέρα και έπειτα σταθεροποιείται. Αυτή η συμπεριφορά είναι αναμενόμενη καθώς από την 3^η ημέρα και μετά μειώνεται ο ρυθμός αύξησης της βιομάζας και ξεκινάει η μεγαλύτερη παραγωγή λίπους. Η μείωση της για την τελευταία ημέρα συσχετίζεται με την μεγαλύτερη παραγωγή λίπους σε βάρος της βιομάζας

Τέλος, για την ημέρα που παρατηρήθηκε η μέγιστη παραγωγή λίπους (και από άποψη ποσότητας g/L και από άποψη %λιπιδίων επί ξηράς βιομάζας), η οποία είναι και η τελευταία ημέρα της ζύμωσης, αναφέρονται ενδεικτικά οι παρακάτω συντελεστές:

-ο συντελεστής παραγωγής βιομάζας $Y_{x/s}$:0,22 g/g

-ο συντελεστής απόδοσης λίπους, $Y_{l/s}$:0,11 g/g

-ο συντελεστής παραγωγής ελεύθερης λίπους βιομάζας, $Y_{xf/s}$:0,015 g/g

Αναφέρεται επίσης ότι για τις τιμές του pH της καλλιέργειας που μετρήθηκαν για όλες τις ημέρες της καλλιέργειας καταγράφηκε μια μικρή πτώση και έπειτα σταθεροποίηση της στην τιμή 5,7. Αυτό πιθανότατα οφείλεται στην παραγωγή κάποιων οργανικών οξέων από τον μικροοργανισμό.

4.1.6 Συζήτηση αποτελεσμάτων για την επίδραση του λόγου Άνθρακα/Αζώτου

Σκοπός αυτής της σειράς ήταν να βρεθεί ο βέλτιστος λόγος άνθρακα/αζώτου από άποψη ποσότητας ενδοκυτταρικού λίπους που θα συσσωρευτεί από τον μύκητα.

Στον πίνακα που ακολουθεί, οι τιμές που αντιστοιχούν σε δεδομένα για τη βιομάζα και την παραγωγή λίπους αναφέρονται στην ημέρα καλλιέργειας που παρατηρήθηκε η μεγαλύτερη ποσότητα παραγόμενου λίπους σε g/L, ενώ ο χρόνος ζύμωσης και η κατανάλωση υποστρώματος είναι για το συνολικό χρόνο που κράτησε η καλλιέργεια.

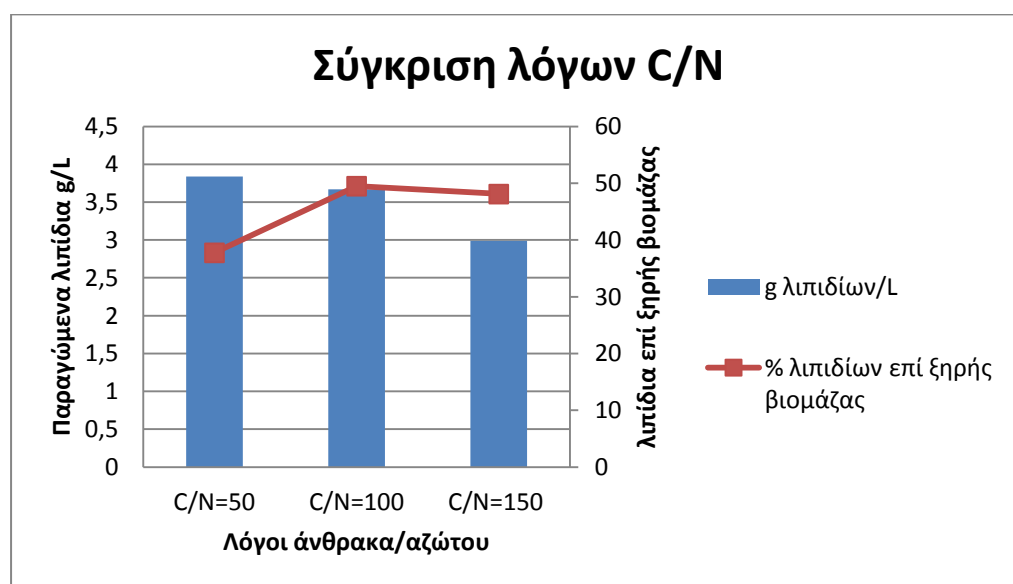
Πίνακας 14: Συνοπτικός πίνακας των εναπομεινάντων σακχάρων (g/L), της βιομάζας (g/L), του λίπους (g/L), της ελεύθερης λίπους βιομάζας (g/L) και του συντελεστή απόδοσης λίπους (%) για τους διαφορετικούς λόγους C/N.

| | Χρόνος Ζύμωσης (days) | Κατανάλωση υποστρώματος (%) | Βιομάζα (g/L) | Λίπος (g/L) | X_f (g/L) | % λίπους επί ξηράς βιομάζας |
|----------------|-----------------------|-----------------------------|---------------|-------------|-------------|-----------------------------|
| C/N=50 | 5 | 95,88 | 10,17 | 3,84 | 6,33 | 37,76 |
| C/N=100 | 9 | 85,46 | 7,43 | 3,67 | 3,75 | 49,50 |
| C/N=150 | 6 | 75,67 | 6,21 | 2,99 | 3,22 | 48,11 |

Τα καλύτερα αποτελέσματα από άποψη παραγόμενων λιπιδίων προέκυψαν στην περίπτωση του χαμηλότερου λόγου άνθρακα/αζώτου δηλαδή της τιμής 50, με ποσότητα

παραγόμενων λιπιδίων ίση με 3,84 g/L. Ακολουθεί με πολύ μικρή διαφορά η περίπτωση του λόγου με τιμή 100, με ποσότητα λιπιδίων 3,67 g/L.

Όσο μεγαλώνει ο λόγος άνθρακα/αζώτου, που πρακτικά σημαίνει όσο μειώνεται η ποσότητα του αζώτου που έχει προστεθεί στο μέσο, τόσο μειώνεται και η κατανάλωση του υποστρώματος, γεγονός που δείχνει ότι η ποσότητα του αζώτου έχει επίδραση στην αφομοίωση των σακχάρων. Αυτή η διαπίστωση συμφωνεί και με την πορεία της βιομάζας, η οποία είναι μεγαλύτερη στον μικρότερο λόγο άνθρακα/αζώτου και μειώνεται όσο αυξάνεται ο λόγος. Το βασικό όμως είναι η εύρεση του λόγου άνθρακα/αζώτου στον οποίο ο μεταβολισμός του κυττάρου κατευθύνεται κυρίως στη συσσώρευση λιπιδίων παρά στην ανάπτυξη της βιομάζας, στοιχεία τα οποία δεν είναι υποχρεωτικό να συμβαδίζουν.



Διάγραμμα 25: Συγκεντρωτικά αποτελέσματα για τη σύγκριση λόγων άνθρακα/αζώτου.

Επομένως, από τα παραπάνω προκύπτει σαν συμπέρασμα, ότι η παραγωγή και συσσώρευση λιπιδίων στο μύκητα *Fusarium oxysporum*, ευνοείται σε χαμηλούς λόγους άνθρακα/αζώτου με βέλτιστη τιμή την τιμή 50. Να σχολιαστεί η διαφορά που παρουσιάζουν τα παραγόμενα λιπίδια για τους λόγους 50 και 100 είναι πάρα πολύ μικρή και μάλιστα αν ληφθούν υπόψη και τα πειραματικά σφάλματα, θα μπορούσε να θεωρηθεί πως τελικά ο λόγος άνθρακα/αζώτου δεν έχει επίδραση για αυτές τις τιμές. Αυτό σημαίνει πως θα μπορούσαν να ληφθούν υπόψη άλλες παράμετροι, όπως για παράδειγμα ο χρόνος της ζύμωσης για να επιτευχθεί αυτή η ποσότητα λιπιδίων (στο λόγο 50 η ίδια ποσότητα επιτυγχάνεται σε 5 ημέρες ενώ στο λόγο 100 σε 9 ημέρες) ή το κόστος της πηγής αζώτου (στο λόγο 50 αυξάνεται το κόστος της διεργασίας λόγω της μεγαλύτερης ποσότητας πηγής αζώτου που πρέπει να προστεθεί).

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, γενικά είναι αποδεκτό ότι η σύνθεση λιπιδίων μπορεί να ξεκινήσει από λόγους C/N>20 και ότι η αύξηση του, αυξάνει και την παραγόμενη ποσότητα λιπιδίων μέχρι ενός σημείου, πέρα από το οποίο τη μειώνει. Επίσης, η εύρεση του βέλτιστου λόγου είναι ένα στοιχείο το οποίο εξαρτάται από το μικροοργανισμό και τις

υπόλοιπες συνθήκες της καλλιέργειας (πηγή άνθρακα κλπ), οπότε μπορεί να προκύψει μετά από πειράματα. Οι λόγοι άνθρακα αζώτου που έχουν μελετηθεί περιλαμβάνουν ένα μεγάλο εύρος ξεκινώντας από χαμηλές τιμές (π.χ. 40) και φτάνοντας έως πολύ υψηλές τιμές (π.χ. 340) για διαφορετικούς μικροοργανισμούς και διαφορετικές συνθήκες καλλιέργειας. (48), (92), (93)

Τέλος, να σχολιαστεί ότι με κριτήριο τους συντελεστές απόδοσης λίπους $Y_{L/S}$, για τους λόγους 50 και 100, ο συντελεστής απόδοσης λίπους έχει την ίδια τιμή δηλαδή 0,10 g λίπους/g καταναλωθέντων σακχάρων, ενώ για το λόγο 150 ο αντίστοιχος συντελεστής είναι 0,11 g λίπους/g καταναλωθέντων σακχάρων.

4.2 Σόργο

Με βάση την ανάλυση που έγινε χρησιμοποιώντας σαν υπόστρωμα καθαρές πηγές, προέκυψε ότι ο μύκητας μπορεί να αναπτυχθεί αποτελεσματικά και να παράγει ενδοκυτταρικό λίπος χρησιμοποιώντας τα σάκχαρα του σόργου, σε καθαρές πηγές. Αυτό είναι πολύ θετικό και στα πειράματα που θα ακολουθήσουν, θα διαπιστωθεί κατά πόσο ο μικροοργανισμός μπορεί να αναπτυχθεί και να παράγει λίπος χρησιμοποιώντας σαν πηγή άνθρακα ρευστοποιημένα στελέχη σόργου. Όσον αφορά στην πηγή αζώτου, το σόργο περιέχει άζωτο είτε σε μορφή πρωτεϊνών είτε σε μορφή αμινοξέων, τα οποία είναι και περισσότερο αφομοιώσιμα σε σχέση με την πρωτεϊνική μορφή του αζώτου.

Στην 1^η σειρά πειραμάτων μελετάται κατά πόσο θα ήταν χρήσιμη η προσθήκη πηγής αζώτου, επειδή δεν είναι γνωστό αν ο μύκητας μπορεί να αξιοποιήσει το άζωτο του σόργου. Στη σειρά αυτή διατηρήθηκε σταθερή η συγκέντρωση των στερεών για να μείνει ίδια η συγκέντρωση των σακχάρων του σόργου και συγκεκριμένα στην τιμή 8,69% επί της συνολικής ποσότητας (g) της καλλιέργειας. Στο 1^ο πείραμα δεν προστέθηκε πηγή αζώτου, ενώ στο 2^ο προστέθηκε ποσότητα αζώτου ίση με το 0,2/100g στερεών. Ως πηγή αζώτου χρησιμοποιήθηκε το yeast extract, το οποίο σύμφωνα με τα αποτελέσματα της σειράς καθαρών πηγών, έδωσε τα καλύτερα αποτελέσματα από άποψη συσσώρευσης ενδοκυτταρικού λίπους.

Στη 2^η σειρά πειραμάτων, πραγματοποιήθηκε ένα πείραμα χωρίς να έχει προηγηθεί ενζυμική υδρόλυση. Στόχος του είναι να διερευνηθεί το κατά πόσο η ενζυμική υδρόλυση, αυξάνει τα διαθέσιμα σάκχαρα προς ζύμωση και κατά πόσο αυτό ευνοεί τη συσσώρευση λίπους. Το συμπέρασμα αυτό είναι ιδιαίτερα κρίσιμο όσον αφορά το κόστος της διεργασίας, μιας και η χρήση ενζύμων, έχει αδιαμφισβήτητη μεγάλη επίδραση στο λειτουργικό όσο και στο πάγιο κόστος της διεργασίας.

Τέλος, χωρίς να προστίθεται επιπλέον πηγή αζώτου, καθώς από την προηγούμενη σειρά πειραμάτων, προέκυψε ότι η προσθήκη πηγής της δεν έχει θετική επίδραση στην παραγωγή ενδοκυτταρικού λίπους, αλλάζει είναι η συγκέντρωση των στερεών, η οποία θα αυξηθεί στην τιμή 12% επί της συνολικής ποσότητας (g) της καλλιέργειας και στην τιμή 16%.

Στο σημείο αυτό θα αναλυθεί πως γίνονται οι υπολογισμοί για τις περιεκτικότητες σε στερεά των καλλιιεργειών:

Στο πείραμα της χαμηλής συγκέντρωσης στερεών (8,69%), έγινε προσθήκη 20 gr στερεών στη φιάλη καλλιέργειας, η οποία περιείχε 200 mL διαλύματος θρεπτικών. Επίσης, προστέθηκαν 10 mL εμβολίου από τη φιάλη της προκαλλιέργειας, όπως έχει περιγραφεί παραπάνω. Επομένως, η συνολική ποσότητα -σε g- καλλιέργειας σε κάθε κωνική φιάλη είναι 230 g. Σε αυτή την τιμή, η ποσότητα των 20 g στερεών αντιστοιχεί σε 8,69% επί της συνολικής ποσότητας της καλλιέργειας. Στο επόμενο πείραμα με την αυξημένη ποσότητα στερεών, διατηρείται σταθερή η συνολική ποσότητα της καλλιέργειας στα 230 g και για να επιτευχθεί συγκέντρωση στερεών 12%, και έτσι προκύπτει ότι πρέπει να προστεθούν 27,6 g σόργου. Η ποσότητα του διαλύματος των θρεπτικών είναι 192,4 mL, έτσι ώστε μαζί με την ποσότητα του εμβολίου να διατηρηθεί σταθερή η ποσότητα της καλλιέργειας στα 230 g. Με τον ίδιο τρόπο προκύπτει ο υπολογισμός της μάζας του σόργου και του όγκου του θρεπτικού διαλύματος και στην περίπτωση της συγκέντρωσης στερεών 16%.

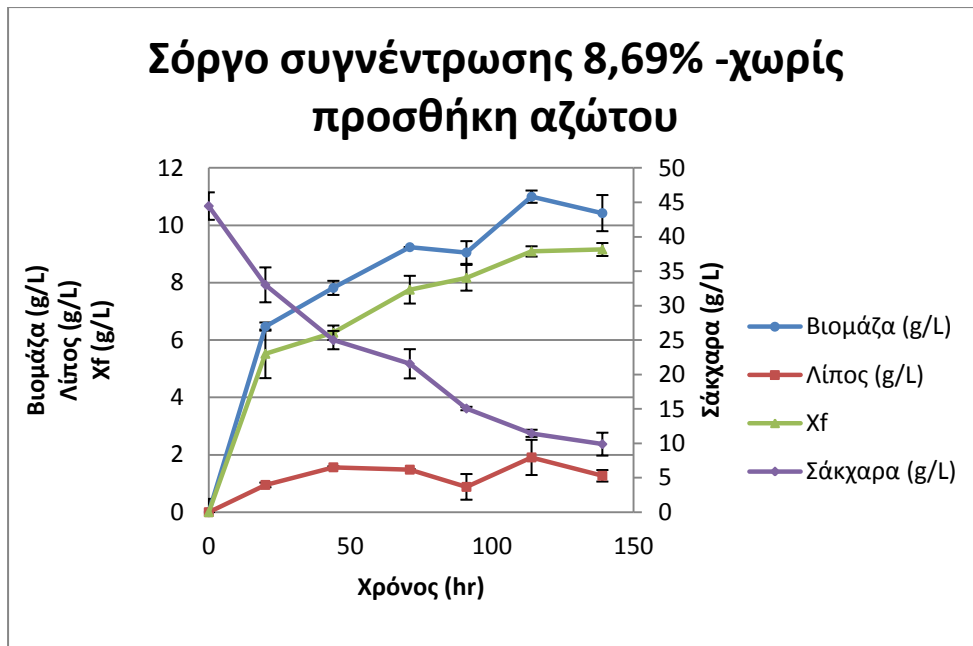
4.2.1 Επίδραση προσθήκης αζώτου

Πείραμα α1: Καλλιέργεια του μύκητα σε υπόστρωμα με γλυκό σόργο (σε αρχική συγκέντρωση 8,69%) και χωρίς προσθήκη πηγής αζώτου

Στο διάγραμμα που ακολουθεί παρουσιάζονται η αύξηση της βιομάζας (X), η ελεύθερη λίπους βιομάζα (X_f), η παραγωγή ενδοκυτταρικού λίπους και η κατανάλωση του υποστρώματος από τον μύκητα κατά την ανάπτυξή του σε μέσο καλλιέργειας που περιέχει σόργο σε συγκέντρωση 8,69% και χωρίς προσθήκη πηγής αζώτου.

Η ζύμωση ήταν ασυνεχούς τύπου σε ανακινούμενο επωαστήρα, με ανάδευση (200rpm) και σε θερμοκρασία 30°C, κάτω από αερόβιες συνθήκες. Το αρχικό pH των καλλιιεργειών είχε ρυθμιστεί στο 6,00.

Η ζύμωση κράτησε 6 ημέρες, αφού ήδη από την 5^η ημέρα και μετά παρατηρείται σταθεροποίηση της κατανάλωσης υποστρώματος από τον μύκητα και στασιμότητα στην ανάπτυξη της βιομάζας.



Διάγραμμα 26: Κινητική της εξέλιξης της βιομάζας, της παραγωγής ενδοκυτταρικού λίπους, της ελεύθερης λίπους βιομάζας και της κατανάλωσης υποστρώματος συναρτήσει του χρόνου κατά την καλλιέργεια του μύκητα *F. Oxyrogrum* σε γλυκό σόργο, χωρίς προσθήκη αζώτου.

Από το διάγραμμα, τις 4 πρώτες ημέρες, η κατανάλωση των σακχάρων εξελίσσεται με έντονο ρυθμό και μέχρι το τέλος της 4^{ης} ημέρας έχει καταναλωθεί το 66,14% του υποστρώματος. Στη συνέχεια ο μύκητας καταναλώνει τα σάκχαρα με μικρότερο ρυθμό, μέχρι σταθεροποίηση της κατανάλωσης, η οποία αντιστοιχεί σε ποσοστό 77,78% της αρχικής ποσότητας υποστρώματος την 6^η και τελευταία ημέρα ζύμωσης.

Η παραγωγή βιομάζας είναι ιδιαίτερα έντονη για τις 5 πρώτες ημέρες, κατά αντιστοιχία με τον έντονο ρυθμό κατανάλωσης του υποστρώματος και από εκεί και έπειτα σταματάει να αυξάνεται. Φτάνει τη μέγιστη τιμή της την 5^η ημέρα με τιμή 10,99 g/L.

Η παραγωγή του ενδοκυτταρικού λίπους ξεκινάει σχετικά γρήγορα καθώς από την 1^η μέρα παράγεται ποσότητα λίπους κοντά στην τιμή 1 g λίπους/L και συνεχίζει να αυξάνεται μέχρι την και την 5^η ημέρα οπότε φτάνει και τη μέγιστη τιμή η οποία ανέρχεται στα 1,91 g λίπους/L. Όπως έχει αναφερθεί, στο διάστημα αυτό, ο μύκητας αφομοιώνει τα σάκχαρα για παραγωγή βιομάζας αλλά και για παραγωγή λίπους. Ταυτόχρονα όμως, αυξάνεται και το ποσοστό των λιπιδίων επί ξηράς μάζας κυττάρων, το οποίο ξεκίνησε με την τιμή 14,68% για την πρώτη ημέρα ζύμωσης, και με αυξητική τάση έφτασε μέχρι την τιμή 17,35%, για την 5^η ημέρα ζύμωσης. Τέλος, για την τελευταία ημέρες της καλλιέργειας, το παραγόμενο λίπος μειώνεται, γεγονός που υποδηλώνει κατανάλωση του από τον ίδιο το μικροοργανισμό.

Να σημειωθεί ότι οι τιμές που αναπαρίστανται στο γράφημα και αφορούν την παραγωγή ενδοκυτταρικού λίπους αναφέρονται στο καθαρό λίπος. Το γλυκό σόργο περιέχει από μόνο του μια ποσότητα λίπους η οποία έχει αφαιρεθεί, ώστε τα αποτελέσματα να δείχνουν καθαρά το λίπος που έχει παραχθεί από την ανάπτυξη του μύκητα στο σόργο. Αυτό έγινε με μέτρηση της συγκέντρωσης του λίπους κατά τον χρόνο όπου πραγματοποιήθηκε ο

εμβολιασμός και αφαίρεση της τιμής αυτής από τις τιμές συγκέντρωσης που αντιστοιχούν στις υπόλοιπες ημέρες καλλιέργειας. Αυτό έχει γίνει σε όλα τα διαγράμματα που αναπαριστούν τη συγκέντρωση του ενδοκυτταρικού λίπους που συσσωρεύεται σε όλες τις καλλιέργειες που έγιναν με υπόστρωμα το γλυκό σόργο.

Όσον αφορά στην πορεία της παραμέτρου X_f , η οποία αναπαριστά την ελεύθερη λίπους βιομάζα, παρατηρείται ότι γενικά αυξάνεται σχεδόν ανάλογα με τη βιομάζα.

Τέλος, για την ημέρα που παρατηρήθηκε η μέγιστη παραγωγή λίπους (και από άποψη ποσότητας g/L και από άποψη % λιπιδίων επί ξηράς βιομάζας), η οποία είναι η 5^η ημέρα της ζύμωσης, αναφέρονται ενδεικτικά οι παρακάτω συντελεστές:

-ο συντελεστής παραγωγής βιομάζας $Y_{x/s}$: 0,33 g/g

-ο συντελεστής απόδοσης λίπους, $Y_{L/s}$: 0,058 g/g -ο συντελεστής παραγωγής ελεύθερης λίπους βιομάζας, $Y_{xf/s}$: 0,28 g/g.

Οι τιμές του pH της καλλιέργειας που μετρήθηκαν για όλες τις ημέρες της καλλιέργειας σημείωσαν μια μικρή πτώση από την 2^η ημέρα στην τιμή περίπου 5,2 και έπειτα σταθεροποίηση της στην τιμή 5,7 περίπου. Αυτό πιθανότατα οφείλεται στην παραγωγή κάποιων οργανικών οξέων από τον μικροοργανισμό.

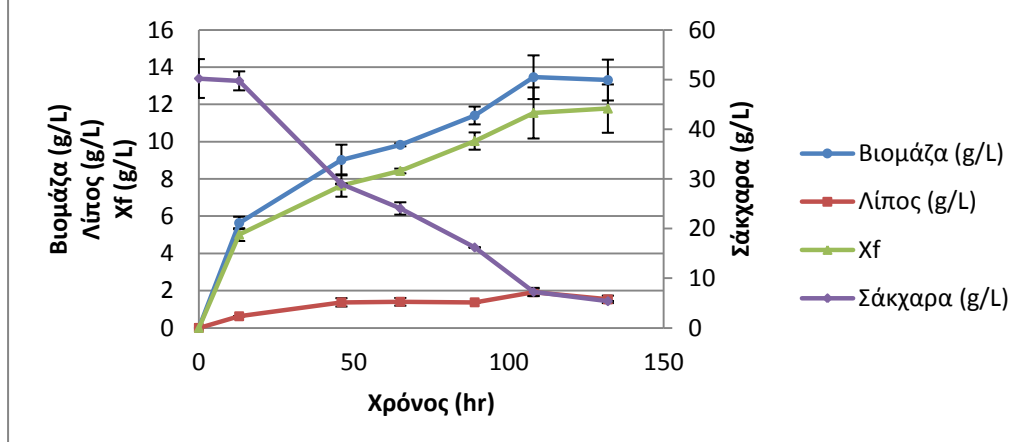
Πείραμα α2: Καλλιέργεια του μύκητα σε υπόστρωμα με γλυκό σόργο (σε αρχική συγκέντρωση 8,69%) και προσθήκη yeast extract ως πηγή αζώτου (0,2g/100g στερεών)

Στο διάγραμμα που ακολουθεί παρουσιάζονται η αύξηση της βιομάζας (X), η ελεύθερη λίπους βιομάζα (X_f), η παραγωγή ενδοκυτταρικού λίπους και η κατανάλωση του υποστρώματος από τον μύκητα κατά την ανάπτυξή του σε μέσο καλλιέργειας που περιέχει σόργο σε συγκέντρωση 8,69% και προσθήκη πηγής αζώτου.

Η ζύμωση ήταν ασυνεχούς τύπου σε ανακινούμενο επωαστήρα, με ανάδευση (200rpm) και σε θερμοκρασία 30°C, κάτω από αερόβιες συνθήκες. Το αρχικό pH των καλλιεργειών είχε ρυθμιστεί στο 6,00.

Η ζύμωση κράτησε 6 ημέρες, αφού ήδη από την 5^η ημέρα παρατηρείται σταθεροποίηση της κατανάλωσης υποστρώματος από τον μύκητα και στασιμότητα στην ανάπτυξη της βιομάζας.

Σόργο συγκέντρωσης 8,69%- με προσθήκη αζώτου



Διάγραμμα 27: Κινητική της εξέλιξης της βιομάζας, της παραγωγής ενδοκυτταρικού λίπους, της ελεύθερης λίπους βιομάζας και της κατανάλωσης υποστρώματος συναρτήσει του χρόνου κατά την καλλιέργεια του μύκητα *F. Oxyrogiu* σε γλυκό σόργο, με προσθήκη αζώτου.

Από το διάγραμμα φαίνεται πως τις 5 πρώτες ημέρες, η κατανάλωση των σακχάρων εξελίσσεται με έντονο ρυθμό και μέχρι το τέλος της 4^{ης} ημέρας έχει καταναλωθεί το 85,6% του υποστρώματος. Στη συνέχεια ο μύκητας καταναλώνει τα σάκχαρα με μικρότερο ρυθμό, μέχρι σταθεροποίηση της κατανάλωσης, η οποία αντιστοιχεί σε ποσοστό 89,29% της αρχικής ποσότητας υποστρώματος την 6^η και τελευταία ημέρα ζύμωσης.

Η παραγωγή βιομάζας είναι ιδιαίτερα έντονη για τις 5 πρώτες ημέρες, κατά αντιστοιχία με τον έντονο ρυθμό κατανάλωσης του υποστρώματος και από εκεί και έπειτα δείχνει τάση σταθεροποίησης κοντά στην τιμή 13,46 g/L που είναι και η μέγιστη.

Η παραγωγή του ενδοκυτταρικού λίπους ξεκινάει σχετικά και από τη 2^η μέρα παράγεται ποσότητα λίπους 1,37 g/L και συνεχίζει να αυξάνεται -όχι με έντονο ρυθμό- μέχρι την και την 5^η ημέρα οπότε φτάνει και τη μέγιστη τιμή η οποία ανέρχεται στα 1,91 g λίπους/L. Το ποσοστό των λιπιδίων επί ξηράς μάζας κυττάρων, ξεκίνησε με την τιμή 11,09% για την 1^η ημέρα ζύμωσης, και την 5^η ημέρα ζύμωσης φτάνει στο ποσοστό 14,25%.

Η παράμετρος X_f αυξάνεται σχεδόν ανάλογα με τη βιομάζα. Το γεγονός ότι δεν παρατηρείται σταθεροποίηση της, τις ημέρες που συσσωρεύεται μεγάλη ποσότητα λιπιδίων, οφείλεται στη μεγάλη ανάπτυξη βιομάζας. Αυτό είναι αναμενόμενο μιας και στην περίπτωση αυτής της καλλιέργειας, προστέθηκε επιπλέον πηγή αζώτου, η οποία ευνοεί τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων.

Τέλος, για την ημέρα που παρατηρήθηκε η μέγιστη παραγωγή λίπους (και από άποψη ποσότητα g/L και από άποψη % λιπιδίων επί ξηράς βιομάζας), η οποία είναι η 5^η ημέρα της ζύμωσης, αναφέρονται ενδεικτικά οι παρακάτω συντελεστές:

-ο συντελεστής παραγωγής βιομάζας $Y_{x/s}$: 0,31 g/g

-ο συντελεστής απόδοσης λίπους, $Y_{L/S}$: 0,045 g/g -ο συντελεστής παραγωγής ελεύθερης λίπους βιομάζας, $Y_{xf/S}$: 0,27 g/g.

Οι τιμές του pH της καλλιέργειας που μετρήθηκαν για όλες τις ημέρες της καλλιέργειας σημείωσαν μια μικρή πτώση από την 2^η ημέρα στην τιμή περίπου 5,5 και έπειτα σταθεροποίηση της στην τιμή 5,9. Αυτό πιθανότατα οφείλεται στην παραγωγή κάποιων οργανικών οξέων από τον μικροοργανισμό.

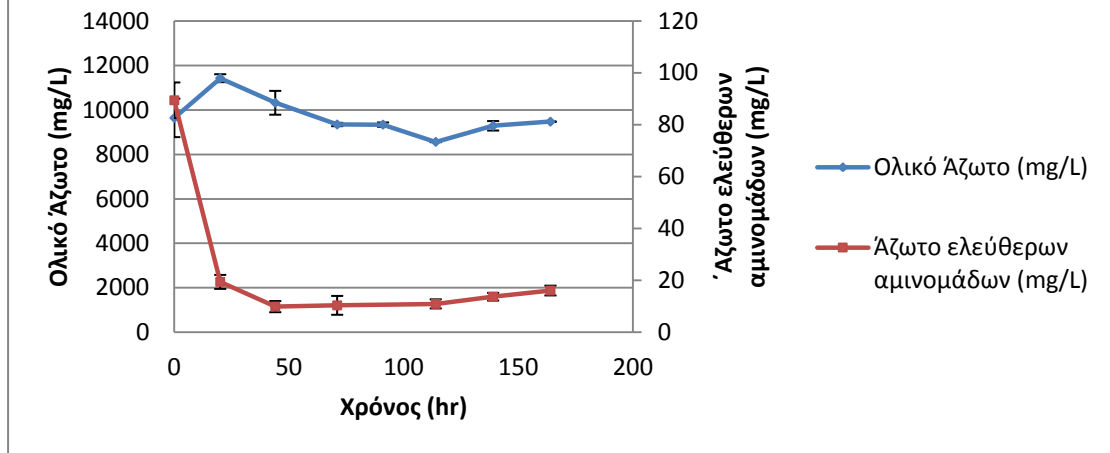
Όπως έχει αναφερθεί στο θεωρητικό μέρος, για την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό του μύκητα απαιτείται, πέρα από την πηγή άνθρακα, κάποια πηγή αζώτου για να μπορέσουν να σχηματιστούν αμινοξέα και νουκλεοτίδια, τα οποία στη συνέχεια θα σχηματίσουν πρωτεΐνες, ένζυμα και νουκλεϊκά οξέα.

Στο πείραμα «α1» του σόργου, ερευνάται το κατά πόσο ο μύκητας μπορεί να αφομοιώσει το άζωτο που περιέχεται αποκλειστικά από το γλυκό σόργο, ενώ στο πείραμα «α2» ερευνάται το εάν είναι χρήσιμη η προσθήκη επιπλέον ποσότητας αζώτου πέρα από αυτής που περιέχεται στο σόργο πόσο ο μύκητας. Επίσης, να σχολιαστεί ότι και στις 2 παραπάνω καλλιέργειες, έχει προηγηθεί ενζυμική υδρόλυση του σόργου, οπότε έχει προστεθεί άζωτο λόγω της προσθήκη ενζύμων.

Από τη συνολική ποσότητα αζώτου που περιέχεται στο θρεπτικό, ο μικροοργανισμός μπορεί να αφομοιώσει μόνο το άζωτο ελεύθερων αμινομάδων (free amino nitrogen -FAN) ως εξής: ο μύκητας αφαιρεί την αμινο-ομάδα από οποιοδήποτε αμινοξύ και τη χρησιμοποιεί για να συνθέσει άλλα αμινοξέα. Έτσι, δεν είναι απαραίτητο να παρέχεται μίγμα συγκεκριμένων αμινοξέων, αλλά μια ορισμένη συνολική ποσότητα αζώτου ελεύθερου αμινομάδων, ώστε ο μύκητας να μπορέσει να συνθέσει τα αμινοξέα τα οποία χρειάζεται και τα οποία θα χρησιμοποιηθούν για το σχηματισμό των πρωτεϊνών κλπ.

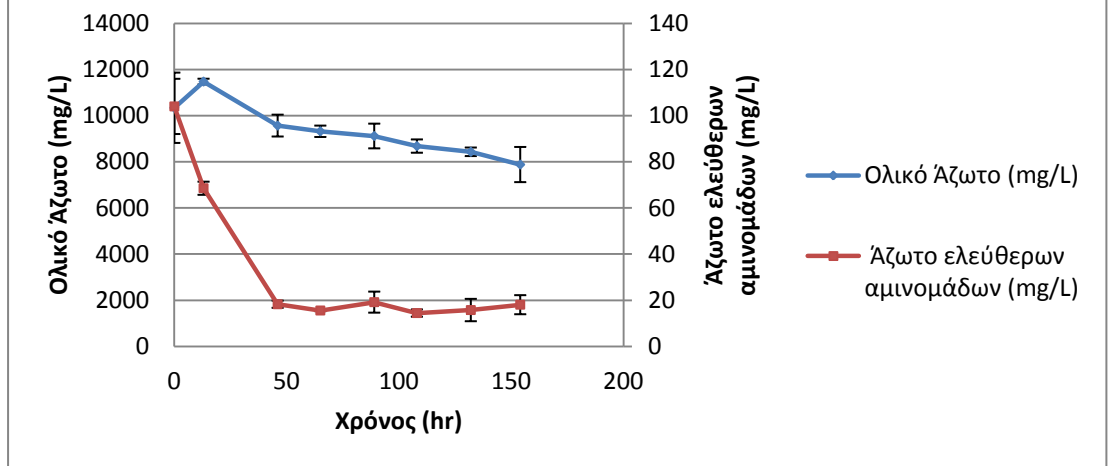
Για το λόγο αυτό στις παραπάνω καλλιέργειες, έχει προσδιοριστεί και το ολικό άζωτο (μέθοδος Lowry) και το άζωτο ελεύθερων αμινομάδων(μέθοδος νινυδρίνης). Τα αποτελέσματα και για τις δυο μορφές αζώτου παρουσιάζονται στα διαγράμματα που ακολουθούν για καθένα από τα παραπάνω πειράματα που παρουσιάστηκαν.

Σόργο συγκέντρωσης 8,69% -χωρίς προσθήκη αζώτου



Διάγραμμα 28: Γραφική απεικόνιση της χρονικής εξέλιξης της συγκέντρωσης του ολικού αζώτου και του αζώτου ελεύθερων αμινομάδων, για την καλλιέργεια χωρίς προσθήκη πηγής αζώτου

Σόργο συγκέντρωσης 8,69% -με προσθήκη αζώτου



Διάγραμμα 29: Γραφική απεικόνιση της χρονικής εξέλιξης της συγκέντρωσης του ολικού αζώτου και του αζώτου ελεύθερων αμινομάδων, για την καλλιέργεια με προσθήκη πηγής αζώτου

Από τα δυο παραπάνω διαγράμματα, παρατηρείται ότι η πορεία των 2 μορφών αζώτου είναι ποιοτικά ίδια και για τα 2 πειράματα. Όσον αφορά στο άζωτο ελεύθερων αμινομάδων φαίνεται ότι ο μύκητας καταναλώνει αυτό κατά βάση και σχετικά σύντομα. Στο πρώτο πείραμα (χωρίς προσθήκη πηγής αζώτου), ήδη την 1^η μέρα καλλιέργειας έχει καταναλώσει

το 78,76% της συνολικής ποσότητας που μετρήθηκε τη στιγμή του εμβολιασμού, ενώ στο δεύτερο πείραμα (με προσθήκη πηγής αζώτου) τη 2^η ημέρα καλλιέργειας, έχει καταναλώσει το 82,19 της συνολικής ποσότητας αζώτου ελεύθερων αμινομάδων. Στη συνέχεια η πορεία του αζώτου ελεύθερων αμινομάδων φαίνεται να σταθεροποιείται. Να σχολιαστεί επίσης, ότι απαραίτητη προϋπόθεση για την έναρξη της συσσώρευσης του ενδοκυτταρικού λίπους αποτελεί η κατανάλωση του αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων (και συγκεκριμένα μέχρι το σημείο που παρατηρείται σταθεροποίηση μιας και από εκεί και έπειτα σταματάει να το καταναλώνει). Ποσοτικά η αύξηση στην ποσότητα του αζώτου ελεύθερων αμινομάδων για το πείραμα με προσθήκη αζώτου είναι: 14,56 mg/L επιπλέον.

Για το ολικό άζωτο που μετρήθηκε, παρατηρείται ότι και στα 2 πειράματα, την επόμενη ημέρα του εμβολιασμού, η ποσότητα του αυξάνεται, ενώ στη συνέχεια μειώνεται με πολύ αργό ρυθμό. Μια πιθανή εξήγηση για την αύξηση της ποσότητας του ολικού αζώτου, μπορεί να είναι η παραγωγή κάποιων πρωτεϊνών από τον μύκητα, γεγονός πιθανό μιας και η αύξηση της ποσότητας του ολικού αζώτου συμπίπτει με τον έντονο ρυθμό μείωσης του αζώτου ελευθέρων αμινομάδων. Με άλλα λόγια δηλαδή, ο μύκητας μπορεί να καταναλώνει το άζωτο ελευθέρων αμινομάδων προς σχηματισμό πρωτεϊνών ενώ επίσης αναφέρεται ότι για την ίδια ημέρα η παραγωγή ενδοκυτταρικού λίπους, και στα 2 πειράματα είναι ιδιαίτερα χαμηλή. Επίσης, ένα άλλο συμπέρασμα που προκύπτει από το χαμηλό ρυθμό μείωσης του ολικού αζώτου είναι το ότι ο μύκητας αυτός δεν διαθέτει αξιόλογη πρωτεολυτική δράση για να το αξιοποιήσει.

Στον παρακάτω πίνακα, οι τιμές που αντιστοιχούν σε δεδομένα για τη βιομάζα και την παραγωγή λίπους αναφέρονται στην ημέρα καλλιέργειας που παρατηρήθηκε η μεγαλύτερη ποσότητα παραγόμενου λίπους σε g/L, ενώ ο χρόνος ζύμωσης και η κατανάλωση των σακχάρων αφορούν το συνολικό χρόνο που κράτησε η καλλιέργεια.

Πίνακας 15: Συνοπτικός πίνακας των εναπομεινάντων σακχάρων (g/L), της βιομάζας (g/L), του λίπους (g/L), της ελεύθερης λίπους βιομάζας (g/L) και του συντελεστή απόδοσης λίπους (%) για τα πειράματα με και χωρίς προσθήκη πηγής αζώτου σε υπόστρωμα γλυκό σόργο συγκέντρωσης 8,69%.

| | Χρόνος Ζύμωσης (days) | Κατανάλωση υποστρώματος (%) | Βιομάζα (g/L) | Λίπος (g/L) | X _f (g/L) | % λίπους επί ξηρής βιομάζας |
|------------------------------|-----------------------|-----------------------------|---------------|-------------|----------------------|-----------------------------|
| Χωρίς προσθήκη αζώτου | 6 | 77,78 | 10,99 | 1,91 | 9,09 | 17,35 |
| Με προσθήκη αζώτου | 6 | 89,29 | 13,46 | 1,91 | 11,54 | 14,25 |

Από τη σύγκριση των δυο πειραμάτων, το βασικό συμπέρασμα που προκύπτει είναι ότι η προσθήκη αζώτου τελικά δεν επηρεάζει την παραγωγή ενδοκυτταρικού λίπους του μύκητα. Η προσθήκη αζώτου προκάλεσε μεγαλύτερη ανάπτυξη βιομάζας αλλά το λίπος που συσσωρεύτηκε ήταν ίσο με την περίπτωση χωρίς προσθήκη αζώτου, οπότε για το λόγο αυτό παρουσιάζει και μικρότερο %λίπους επί ξηρής βιομάζας. Στο ίδιο συμπέρασμα οδηγούμαστε λαμβάνοντας υπόψη τους συντελεστές παραγωγής λίπους ανά g καταναλισκόμενων σακχάρων, ο οποίος είναι υψηλότερος στην περίπτωση του πειράματος χωρίς προσθήκη αζώτου: 0,058 g/ g έναντι 0,045 g/ g. Αυτό σημαίνει ότι μείωση του λόγου C/N που προκύπτει με την προσθήκη της πηγής αζώτου, δεν ευνοεί τη συσσώρευση λίπους. Επομένως, αυτό σημαίνει ότι το άζωτο που περιέχεται στο σόργο (και στα υδρολυτικά ένζυμα που χρησιμοποιούνται) επαρκεί για αποτελεσματική συσσώρευση λίπους. Αυτό το στοιχείο είναι θετικό, καθώς προσθήκη επιπλέον πηγής αζώτου, θα αύξανε το κόστος της διεργασίας.

4.2.2 Επίδραση προσθήκης ενζύμων

Πείραμα β1: Καλλιέργεια του μύκητα σε υπόστρωμα με γλυκό σόργο (σε αρχική συγκέντρωση 8,69%) με ενζυμική υδρόλυση

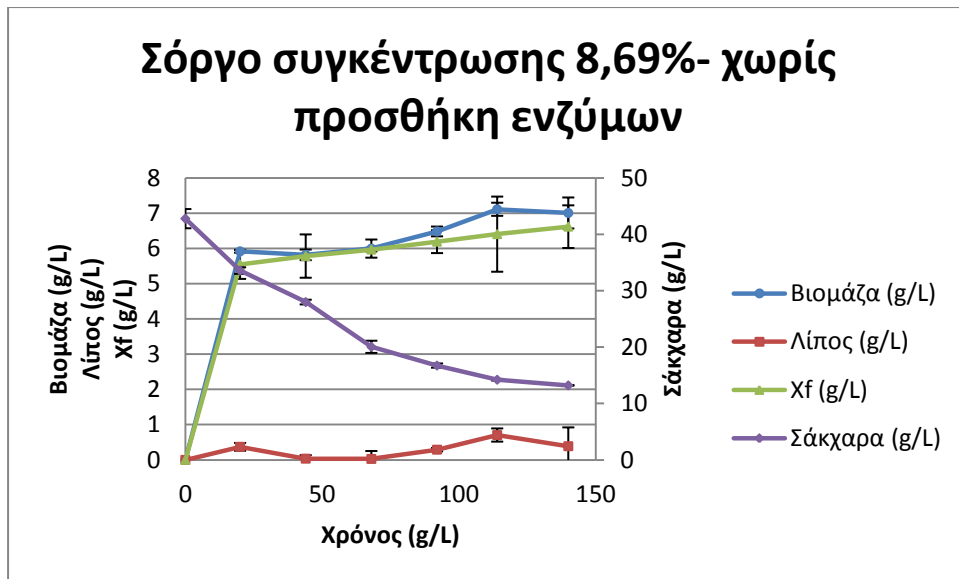
Το πείραμα αυτό έχει περιγραφεί στην ενότητα «Επίδραση προσθήκης αζώτου».

Πείραμα β2: Καλλιέργεια του μύκητα σε υπόστρωμα με γλυκό σόργο (σε αρχική συγκέντρωση 8,69%) και χωρίς ενζυμική υδρόλυση

Στο διάγραμμα που ακολουθεί παρουσιάζονται η αύξηση της βιομάζας (X), η ελεύθερη λίπους βιομάζα (X_f), η παραγωγή ενδοκυτταρικού λίπους και η κατανάλωση του υποστρώματος από τον μύκητα κατά την ανάπτυξή του σε μέσο καλλιέργειας που περιέχει σόργο σε συγκέντρωση 8,69% και χωρίς ενζυμική υδρόλυση του σόργου.

Η ζύμωση ήταν ασυνεχούς τύπου σε ανακινούμενο επωαστήριο, με ανάδευση (200rpm) και σε θερμοκρασία 30°C, κάτω από αερόβιες συνθήκες. Το αρχικό pH των καλλιεργειών είχε ρυθμιστεί στο 6,00.

Η ζύμωση κράτησε 6 ημέρες, αφού ήδη από την 6^η ημέρα παρατηρείται σταθεροποίηση της κατανάλωσης υποστρώματος από τον μύκητα.



Διάγραμμα 30: Κινητική της εξέλιξης της βιομάζας, της παραγωγής ενδοκυτταρικού λίπους, της ελεύθερης λιπιδίων βιομάζας και της κατανάλωσης υποστρώματος συναρτήσει του χρόνου κατά την καλλιέργεια του μύκητα *F. Oxy-sporum* σε γλυκό σόργο, χωρίς ενζυμική υδρόλυση.

Από το διάγραμμα φαίνεται πως τις 5 πρώτες ημέρες, η κατανάλωση των σακχάρων εξελίσσεται με έντονο ρυθμό, χωρίς ωστόσο να αφομοιώνονται σημαντικές ποσότητες σακχάρων. Σταθεροποίηση της κατανάλωσης επέρχεται μετά την 5^η ημέρα και την 6^η και τελευταία ημέρα καλλιέργειας, έχει καταναλωθεί το 69,11% του υποστρώματος.

Η παραγωγή βιομάζας δεν είναι ιδιαίτερα έντονη, καθώς από την 1^η μέρα και μετά αρχίζει αυξάνεται με πολύ μικρό ρυθμό. Στην πραγματικότητα η μεγάλη μεταβολή της βιομάζας τη μηδενική και την 1^η ημέρα ευθύνεται σε μεγάλο βαθμό στην ποσότητα του μικροοργανισμού λόγω του εμβολίου. Από εκεί και έπειτα δείχνει τάση σταθεροποίησης με μικρό ρυθμό αύξησης και φτάνει τη μέγιστη τιμή της την 5^η ημέρα με τιμή 7,11 g/L.

Η παραγωγή του ενδοκυτταρικού λίπους ξεκινάει σχετικά αργά και μάλιστα, όπως παρατηρείται από το διάγραμμα, σε μικρές συγκεντρώσεις. Ειδικότερα, για τις 3 πρώτες ημέρες, παράγεται και συσσωρεύεται πολύ μικρή ποσότητα λίπους. Από την 4^η ημέρα και μετά ξεκινά να παράγεται αξιοσημείωτη ποσότητα, η οποία είναι ιδιαίτερα χαμηλή, σε σχέση με το αντίστοιχο πείραμα όπου έχει προηγηθεί ενζυμική υδρόλυση σόργου. Την 5^η ημέρα παράγεται η μεγαλύτερη ποσότητα λιπιδίων, η οποία ανέρχεται σε 0,71 g λίπους/L. Το ποσοστό των λιπιδίων επί ξηράς μάζας κυττάρων, μετά την 1^η ημέρα ζύμωσης ξεκινάει να αυξάνεται και την 5^η ημέρα ζύμωσης φτάνει τη μέγιστη τιμή, η οποία είναι 9,93%. Μετά την 5^η ημέρα, η ποσότητα των παραγόμενων λιπαρών, και κατ'αντιστοιχία το ποσοστό τους, αρχίζει να μειώνεται.

Η παράμετρος X_f παρουσιάζει ποιοτικά ίδια συμπεριφορά με τη βιομάζα. Τις 2 πρώτες ημέρες αυξάνεται και στη συνέχεια παραμένει σχεδόν σταθερή. Την 5^η ημέρα οπότε και παρατηρείται η μέγιστη ποσότητα λιπαρών, παρουσιάζει μια μικρή μείωση, γεγονός αναμενόμενο.

Τέλος, για την ημέρα που παρατηρήθηκε η μέγιστη παραγωγή λίπους (και από άποψη ποσότητα g/L και από άποψη % λιπιδίων επί ξηράς βιομάζας), η οποία είναι η 5^η ημέρα της ζύμωσης, αναφέρονται ενδεικτικά οι παρακάτω συντελεστές:

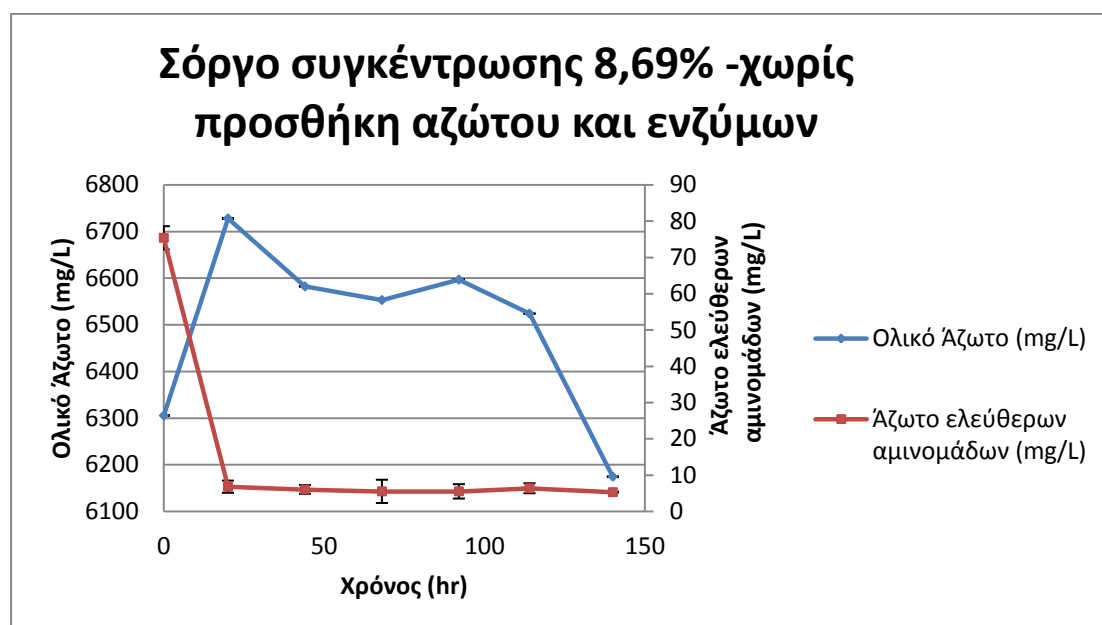
-ο συντελεστής παραγωγής βιομάζας $Y_{x/s}$: 0,25 g/g

-ο συντελεστής απόδοσης λίπους, $Y_{L/s}$: 0,025 g/g

-ο συντελεστής παραγωγής ελεύθερης λίπους βιομάζας, $Y_{xf/s}$: 0,22 g/g.

Οι τιμές του pH της καλλιέργειας που μετρήθηκαν για όλες τις ημέρες της καλλιέργειας σημείωσαν μια μικρή πτώση στην τιμή περίπου 5,7 και έπειτα σταθεροποίηση της στην τιμή αυτή. Αυτό πιθανότατα οφείλεται στην παραγωγή κάποιων οργανικών οξέων από τον μικροοργανισμό.

Ακολουθούν τα αποτελέσματα για την πορεία των 2 μορφών αζώτου στο διάγραμμα που ακολουθεί.



Διάγραμμα 31: Γραφική απεικόνιση της χρονικής εξέλιξης της συγκέντρωσης του ολικού αζώτου και του αζώτου ελεύθερων αμινομάδων, για την καλλιέργεια χωρίς προσθήκη πηγής αζώτου και ενζύμων

Παρατηρείται ότι η πορεία των 2 μορφών αζώτου είναι ποιοτικά ίδια με την αντίστοιχη πορεία τους στα πειράματα «α1» και «α2» του σόργου που έχουν ήδη σχολιαστεί. Όσον αφορά στο άζωτο ελεύθερων αμινομάδων φαίνεται ότι ο μύκητας το καταναλώνει σύντομα. Την 1^η μέρα καλλιέργειας έχει καταναλώσει το 90,99% της συνολικής ποσότητας που μετρήθηκε τη στιγμή του εμβολιασμού ενώ στη συνέχεια η πορεία του δείχνει σταθεροποίηση. Λογικά και αναμενόμενα, η αρχική ποσότητα του αζώτου ελεύθερων αμινομάδων στην περίπτωση αυτού του πειράματος είναι μικρότερη σε σχέση με τα πειράματα «α1» και «α2» και συγκεκριμένα είναι: 75,36 mg/L έναντι 89,42 mg/L και 103,98 mg/L για τα υπόλοιπα πειράματα αντίστοιχα.

Για το ολικό άζωτο στην περίπτωση του πειράματος αυτού, παρατηρείται μια γενικευμένη αύξηση της ποσότητας του που ξεκινάει την επομένη του εμβολιασμού, όπως είχε συμβεί και στα προηγούμενα πειράματα, μόνο που στο συγκεκριμένο, η αυξημένη ποσότητα παραμένει για το σύνολο σχεδόν των ημερών της καλλιέργειας. Η εξήγηση που προτείνεται είναι η παραγωγή κάποιων πρωτεϊνών.

Στον παρακάτω πίνακα, οι τιμές που αντιστοιχούν σε δεδομένα για τη βιομάζα και την παραγωγή λίπους αναφέρονται στην ημέρα καλλιέργειας που παρατηρήθηκε η μεγαλύτερη ποσότητα παραγόμενου λίπους σε g/L, ενώ ο χρόνος ζύμωσης και η κατανάλωση των σακχάρων αφορούν το συνολικό χρόνο που κράτησε η καλλιέργεια.

Πίνακας 16: Συνοπτικός πίνακας των εναπομεινάντων σακχάρων (g/L), της βιομάζας (g/L), του λίπους (g/L), της ελεύθερης λίπους βιομάζας (g/L) και του συντελεστή απόδοσης λίπους (%) για τα πειράματα με και χωρίς ενζυμική υδρόλυση του γλυκού σόργου σε συγκέντρωση στερεών 8,69%.

| | Χρόνος Ζύμωσης (days) | Κατανάλωση υποστρώματος (%) | Βιομάζα (g/L) | Λίπος (g/L) | Xf (g/L) | % λίπους επί ξηρής βιομάζας |
|-------------------------------|-----------------------|-----------------------------|---------------|-------------|----------|-----------------------------|
| Χωρίς προσθήκη ενζύμων | 6 | 69,11 | 7,11 | 0,71 | 6,40 | 9,93 |
| Με προσθήκη ενζύμων | 6 | 77,78 | 10,99 | 1,91 | 9,09 | 17,35 |

Από τη σύγκριση των 2 πειραμάτων προκύπτει ότι η μεσολάβηση της ενζυμικής υδρόλυσης του σόργου, σαφέστατα έχει πολύ θετική επίδραση στην ποσότητα (g/L) των παραγόμενων λιπιδίων από το μύκητα και στο %λιπιδίων επί ξηρής βιομάζας. Αυτό είναι αναμενόμενο καθώς η ενζυμική υδρόλυση αυξάνει τα διαθέσιμα σάκχαρα προς κατανάλωση και ταυτόχρονα αυξάνει και το λόγο C/N. Επίσης να σχολιαστεί ότι, η αύξηση της ποσότητας του ολικού αζώτου που μετρήθηκε, είναι πιθανό να σχετίζεται με την παραγωγή κάποιων υδρολυτικών ενζύμων από τον ίδιο το μύκητα (κυτταρινάσες, ιμπερτάση, γλυκοζιδάσες).

Σε σύγκριση με δεδομένα της βιβλιογραφίας, αναφέρεται ότι σε παρόμοια μελέτη που βρέθηκε, η παραγωγή μικροβιακού λίπους με χρήση του νηματοειδούς μύκητα *M. Isabellina* σε ανάπτυξη σε γλυκό σόργο, χωρίς ενζυμική υδρόλυση, κυμαίνεται από 9-11 g λίπους /100 gr στερεών. Να σχολιαστεί ότι μετατρέποντας τη απόδοση που επετεύχθη με τον μύκητα *F.Oxysporum* στην ίδια μορφή με την παραπάνω, προκύπτει ότι είναι 3,55 g λίπους /100 gr στερεών, γεγονός που δείχνει ότι για το συγκεκριμένο μύκητα, η διαδικασία της ενζυμικής υδρόλυσης του σόργου είναι ιδιαίτερα σημαντική καθώς δεν μπορεί να αξιοποιήσει αποτελεσματικά τα σάκχαρα του σόργου. (94)

4.1.1 Επίδραση διαφορετικής συγκέντρωσης στερεών

Σε αυτή τη σειρά πειραμάτων, μελετάται η επίδραση της αύξησης της συγκέντρωσης του γλυκού σόργου. Συγκεκριμένα διεξήχθησαν πειράματα με συγκεντρώσεις 12% και 16% στερεών επί της συνολικής ποσότητας της καλλιέργειας. (Οι υπολογισμοί έχουν περιγραφεί στην ενότητα «Σόργο»). Επίσης, δεν γίνεται προσθήκη πηγής αζώτου, καθώς από την προηγούμενη σειρά προέκυψε πως η επιπλέον ποσότητα σόργου δεν έχει θετική επίδραση στη συγκέντρωση του παραγόμενου λίπους που θα συσσωρευτεί από τον μύκητα.

Να διευκρινιστεί ότι σε αυτή τη σειρά πειραμάτων υπήρξε μια τροποποίηση της μεθόδου της καλλιέργειας και της δειγματοληψίας. Συγκεκριμένα, παρασκευάστηκαν τόσες κωνικές φιάλες όσες και οι αναμενόμενες ημέρες καλλιέργειας. Οι κωνικές ήταν μεγέθους 100 mL και σε αυτές προστέθηκαν 23 g συνολικής ποσότητας καλλιέργειας και όλη η περιεχόμενη ποσότητα της φιάλης λαμβανόταν σαν δείγμα μιας ημέρας. Με αυτό τον τρόπο μειώθηκαν τα σφάλματα που σχετίζονται με την λήψη μη σωστού και ομοιόμορφου δείγματος καλλιέργειας, γεγονός το οποίο είναι σημαντικό μιας και η ύπαρξη των στερεών στην καλλιέργεια μπορεί να δημιουργήσει πολλά σφάλματα στα υπόλοιπα στάδια επεξεργασίας. Λήφθηκαν δείγματα τις ώρες: 0, 72, 120 και 168.

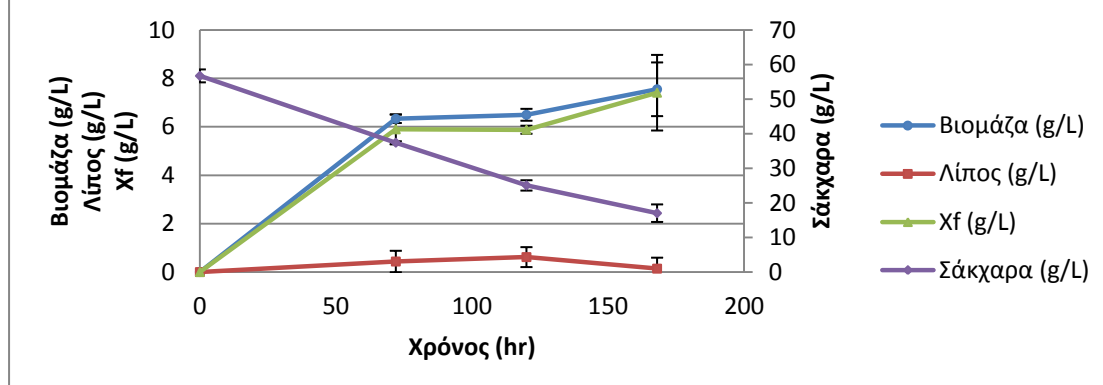
Πείραμα γ1: Καλλιέργεια του μύκητα σε υπόστρωμα με γλυκό σόργο (σε αρχική συγκέντρωση 12%) και χωρίς προσθήκη πηγής αζώτου

Στο διάγραμμα που ακολουθεί παρουσιάζονται η αύξηση της βιομάζας (X), η ελεύθερη λίπους βιομάζα (X_f), η παραγωγή ενδοκυτταρικού λίπους και η κατανάλωση του υποστρώματος από τον μύκητα κατά την ανάπτυξή του σε μέσο καλλιέργειας που περιέχει γλυκό σόργο σε συγκέντρωση 12%.

Η ζύμωση ήταν ασυνεχούς τύπου σε ανακινούμενο επωαστήρα, με ανάδευση (200rpm) και σε θερμοκρασία 30°C, κάτω από αερόβιες συνθήκες. Το αρχικό pH των καλλιιεργειών είχε ρυθμιστεί στο 6,00.

Η διάρκεια της ζύμωσης στην περίπτωση της συγκέντρωσης 12%, δεν μπορεί να αποδοθεί με ακρίβεια καθώς οι ημέρες της δειγματοληψίας ήταν προκαθορισμένες. Η μέγιστη ποσότητα λίπους επετεύχθη την 5^η ημέρα.

Σόργο συγκέντρωσης 12% -χωρίς προσθήκη αζώτου



Διάγραμμα 32: Κινητική της εξέλιξης της βιομάζας, της παραγωγής ενδοκυτταρικού λίπους, της ελεύθερης λίπους βιομάζας και της κατανάλωσης υποστρώματος συναρτήσει του χρόνου κατά την καλλιέργεια του μύκητα *F. Oxyrostrum* σε γλυκό σόργο, συγκέντρωσης 12%.

Από το διάγραμμα, η κατανάλωση των σακχάρων εξελίσσεται γραμμικά και μέχρι την τελευταία ημέρα έχει καταναλωθεί το 69,69% του υποστρώματος.

Η παραγωγή βιομάζας είναι ιδιαίτερα έντονη για τις 3 πρώτες ημέρες, και από εκεί και έπειτα δείχνει τάση σταθεροποίησης κοντά στην τιμή 7,54 g/L την 7^η και τελευταία ημέρα.

Η παραγωγή του ενδοκυτταρικού λίπους –αφού έχει αφαιρεθεί το λίπος που περιέχεται στο σόργο-, έχει ήδη ξεκινήσει από την 3^η ημέρα με τιμή 0,44 g/L και φτάνει τη μέγιστη τιμή την 5^η ημέρα με τιμή 0,62 g/L. Το ποσοστό των λιπιδίων επί ξηράς μάζας κυττάρων, την ίδια ημέρα ανέρχεται στο 9,50%, τιμή η οποία είναι η μέγιστη για την καλλιέργεια.

Τέλος, για την ημέρα που παρατηρήθηκε η μέγιστη παραγωγή λίπους (και από άποψη ποσότητα g/L και από άποψη % λιπιδίων επί ξηράς βιομάζας), η οποία είναι η 5^η ημέρα της ζύμωσης, αναφέρονται ενδεικτικά οι παρακάτω συντελεστές:

-ο συντελεστής παραγωγής βιομάζας $Y_{X/S}$: 0,20 g/g

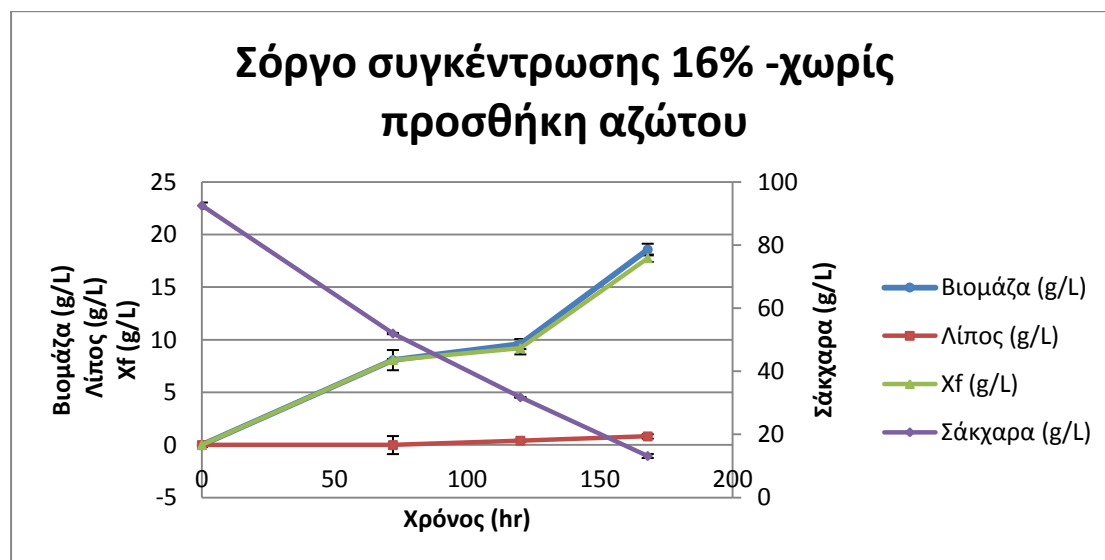
-ο συντελεστής απόδοσης λίπους, $Y_{L/S}$: 0,019 g/g -ο συντελεστής παραγωγής ελεύθερης λίπους βιομάζας, $Y_{Xf/S}$: 0,19 g/g.

Πείραμα γ2: Καλλιέργεια του μύκητα σε υπόστρωμα με γλυκό σόργο (σε αρχική συγκέντρωση 16%) και χωρίς προσθήκη πηγής αζώτου

Στο διάγραμμα που ακολουθεί παρουσιάζονται η αύξηση της βιομάζας (X), η ελεύθερη λίπους βιομάζα (X_f), η παραγωγή ενδοκυτταρικού λίπους και η κατανάλωση του υποστρώματος από τον μύκητα κατά την ανάπτυξή του σε μέσο καλλιέργειας που περιέχει γλυκό σόργο σε συγκέντρωση 16%.

Η ζύμωση ήταν ασυνεχούς τύπου σε ανακινούμενο επωαστήριο, με ανάδευση (200rpm) και σε θερμοκρασία 30°C, κάτω από αερόβιες συνθήκες. Το αρχικό pH των καλλιεργειών είχε ρυθμιστεί στο 6,00.

Η διάρκεια της ζύμωσης στην περίπτωση της συγκέντρωσης 16%, δεν μπορεί να αποδοθεί με ακρίβεια καθώς οι ημέρες της δειγματοληψίας ήταν προκαθορισμένες. Η μέγιστη ποσότητα λίπους επετεύχθη την 7^η και τελευταία ημέρα.



Διάγραμμα 33: Κινητική της εξέλιξης της βιομάζας, της παραγωγής ενδοκυτταρικού λίπους, της ελεύθερης λίπους βιομάζας και της κατανάλωσης υποστρώματος συναρτήσει του χρόνου κατά την καλλιέργεια του μύκητα *F. Oxyrostrum* σε γλυκό σόργο, συγκέντρωσης 16%.

Από το διάγραμμα, η κατανάλωση των σακχάρων εξελίσσεται γραμμικά και μέχρι την τελευταία ημέρα έχει καταναλωθεί το 85,73% του υποστρώματος.

Η παραγωγή βιομάζας είναι ιδιαίτερα έντονη για τις 3 πρώτες ημέρες, και από εκεί και έπειτα δείχνει τάση σταθεροποίησης κοντά στην τιμή 18,59 g/L την 7^η και τελευταία ημέρα.

Η παραγωγή του ενδοκυτταρικού λίπους –αφού έχει αφαιρεθεί το λίπος που περιέχεται στο σόργο-, ξεκινάει αργά και συγκεκριμένα από την 5^η ημέρα με τιμή 0,41 g/L και φτάνει τη μέγιστη τιμή την 7^η ημέρα με τιμή 0,82 g/L. Το ποσοστό των λιπιδίων επί ξηράς μάζας κυττάρων, την ίδια ημέρα (7^η) ανέρχεται στο 4,42%, τιμή η οποία είναι η μέγιστη για την καλλιέργεια.

Τέλος, για την ημέρα που παρατηρήθηκε η μέγιστη παραγωγή λίπους (και από άποψη ποσότητα g/L και από άποψη % λιπιδίων επί ξηράς βιομάζας), η οποία είναι η 7^η ημέρα της ζύμωσης, αναφέρονται ενδεικτικά οι παρακάτω συντελεστές:

- ο συντελεστής παραγωγής βιομάζας $Y_{x/s}$: 0,23 g/g
- ο συντελεστής απόδοσης λίπους, $Y_{l/s}$: 0,010 g/g
- ο συντελεστής παραγωγής ελεύθερης λίπους βιομάζας, $Y_{xf/s}$: 0,22 g/g.

Στον παρακάτω πίνακα, οι τιμές που αντιστοιχούν σε δεδομένα για τη βιομάζα και την παραγωγή λίπους αναφέρονται στην ημέρα καλλιέργειας που παρατηρήθηκε η μεγαλύτερη

ποσότητα παραγόμενου λίπους σε g/L, ενώ ο χρόνος ζύμωσης και η κατανάλωση των σακχάρων αφορούν το συνολικό χρόνο που κράτησε η καλλιέργεια.

Πίνακας 17: Συνοπτικός πίνακας των εναπομεινάντων σακχάρων (g/L), της βιομάζας (g/L), του λίπους (g/L), της ελεύθερης λίπους βιομάζας (g/L) και του συντελεστή απόδοσης λίπους (%) για τα πειράματα με διαφορετική συγκέντρωση γλυκού σόργου και χωρίς προσθήκη πηγής αζώτου.

| | Χρόνος Ζύμωσης (days) | Κατανάλωση υποστρώματος (%) | Βιομάζα (g/L) | Λίπος (g/L) | Xf (g/L) | % λίπους επί ξηρής βιομάζας |
|----------------------------------|-----------------------|-----------------------------|---------------|-------------|----------|-----------------------------|
| 8,69% συγκέντρωση στερεών | 6 | 77,78 | 10,99 | 1,91 | 9,09 | 17,35 |
| 12% συγκέντρωση στερεών | 7 | 69,69 | 6,50 | 0,62 | 5,88 | 9,50 |
| 16% συγκέντρωση στερεών | 7 | 85,73 | 18,59 | 0,82 | 17,76 | 4,42 |

Η αύξηση της συγκέντρωσης των στερεών, αν και αυξάνει τη συγκέντρωση των σακχάρων της καλλιέργειας, δεν αυξάνει την ποσότητα των παραγόμενων λιπιδίων. Επίσης, με αύξηση της συγκέντρωσης, μειώνονται και τα %λιπιδίων επί ξηρής βιομάζας. Στις υψηλότερες συγκεντρώσεις στερεών ο μύκητας, αν και μπορεί να καταναλώσει τα σάκχαρα σε ικανοποιητικό βαθμό, δεν στρέφει το μεταβολισμό του προς την παραγωγή λίπους. Βέβαια να σχολιαστεί ότι στις υψηλές συγκεντρώσεις, δημιουργούνται πιθανότατα προβλήματα αερισμού, γεγονός που δικαιολογεί και τη χρονική υστέρηση στην παραγωγή και συσσώρευση λίπους από τον μύκητα.

4.2 Liquid Fraction

Στην περίπτωση του Liquid Fraction, διεξήχθησαν 2 σειρές πειραμάτων για να διαπιστωθεί αν μπορεί να αποτελέσει υπόστρωμα κατάλληλο για την ανάπτυξη και την παραγωγή λίπους από τον μύκητα *Fusarium oxysporum*.

Για την παρασκευή του υγρού της καλλιέργειας, προστέθηκαν τα κατάλληλα άλατα στο Liquid Fraction, και στην 1^η σειρά πειραμάτων δεν προστέθηκε πηγή αζώτου, ενώ στη 2^η σειρά, προστέθηκε τόση ποσότητα yeast extract (η πηγή αζώτου που έδωσε τα καλύτερα αποτελέσματα στην περίπτωση των καθαρών πηγών), σε ποσότητα ώστε να δημιουργείται λόγος άνθρακα/αζώτου ίσος με 100.

Η ζύμωση ήταν ασυνεχούς τύπου σε ανακινούμενο επωαστήρα, με ανάδευση (200rpm) και σε θερμοκρασία 30°C, κάτω από αερόβιες συνθήκες. Το αρχικό pH των καλλιιεργειών είχε ρυθμιστεί στο 6,00.

Στην πρώτη περίπτωση (χωρίς την προσθήκη της πηγής αζώτου), ζύμωση κράτησε 4 ημέρες. Τα αποτελέσματα για την ημέρα με την μεγαλύτερη αποδοτικότητα, η οποία ήταν η 3^η ημέρα καλλιέργειας, συνοψίζονται στον πίνακα που ακολουθεί:

Να διευκρινιστεί ότι η κατανάλωση υποστρώματος, υπολογίστηκε για το σάκχαρο που βρίσκεται στην μεγαλύτερη αναλογία, δηλαδή στη ξυλόζη.

Πίνακας 18: Συγκεντρωτικά αποτελέσματα για την ανάπτυξη και την παραγωγή λίπους του μύκητα στο υπόστρωμα Liquid Fraction χωρίς και με προσθήκη αζώτου

| | Χρόνος Ζύμωσης (days) | Κατανάλωση υποστρώματος (%) | Βιομάζα (g/L) | Λίπος (g/L) | X _f (g/L) | % λίπους επί ξηρής βιομάζας |
|--------------------------|-----------------------|-----------------------------|---------------|-------------|----------------------|-----------------------------|
| Χωρίς πηγή Αζώτου | 4 | 16,32 | 1,13 | 0,55 | 0,58 | 48,67 |
| Με πηγή αζώτου | 4 | 20,00 | 1,17 | 0,57 | 0,60 | 51,28 |

Αρχικά, από τον παραπάνω πίνακα, παρατηρείται η μικρή απόδοση σε ποσότητα λιπαρών/L, η οποία δικαιολογείται από την μικρή κατανάλωση των αναγωγικών σακχάρων, η οποία προσδιορίστηκε με τη μέθοδο του DNS. Επίσης η απόδοση σε βιομάζα είναι ιδιαίτερα χαμηλή, κάτι που φαίνεται τόσο από την ποσότητα g/L αλλά και από το δείκτη $Y_{x/s}$, ο οποίος υπολογίστηκε 0,59 και 0,51 g/g για κάθε πείραμα αντίστοιχα. Όσον αφορά στο δείκτη απόδοσης, λίπους $Y_{l/s}$, αυτός υπολογίστηκε ιδιαίτερα υψηλός και κοντά στη μέγιστη θεωρητική τιμή 0,3. Αν αυτό δεν οφείλεται σε σφάλμα της μέτρησης της βιομάζας, αυτό σημαίνει ότι ο μικροοργανισμός έστρεψε το μεταβολισμό του στην παραγωγή λίπους.

Σαν συμπέρασμα και από τα 2 πειράματα είναι το ότι η προσθήκη της πηγής αζώτου δεν προκάλεσε αξιοσημείωτη βελτίωση ούτε στην παραγωγή βιομάζας ούτε στην ποσότητα των

παραγόμενων λιπιδίων. Είναι φανερό ότι στην περίπτωση του LF απαιτείται λόγος άνθρακας/αζώτου υψηλότερος από την τιμή 100 (στην περίπτωση που δεν προστέθηκε πηγή αζώτου, ο λόγος άνθρακας/αζώτου είναι σίγουρα υψηλότερος του 100 καθώς περιέχει λιγότερο άζωτο). Επίσης, αυτό μπορεί να σημαίνει ότι ο μικροοργανισμός μπορεί να αφομοίωσε κάποια ποσότητα αζώτου από το LF. Επομένως, δεν έχει νόημα η προσθήκη πηγής αζώτου μιας και αυξάνει το κόστος της διεργασίας, χωρίς αποτέλεσμα.

Γενικά, και οι 2 καλλιέργειες είχαν μικρή διάρκεια, μιας και μετά την 3^η ημέρα η κατανάλωση υποστρώματος σημείωσε σταθεροποίηση, ενώ η βιομάζα και το παραγόμενο λίπος σημείωσαν μείωση, γεγονός που αποδίδεται σε αυτόλυση των κυττάρων και κατανάλωση του λίπους από τα ίδια τα κύτταρα.

Το LF περιέχει και ουσίες (φουρφουράλη, υδρόξυ-μέθυλ-φουρφουράλη, οξικό οξύ, φορμικό οξύ, φουροϊκό οξύ, φαινόλες) οι οποίες μπορούν να δράσουν σαν παρεμποδιστές τόσο της κυτταρικής ανάπτυξης όσο και της παραγωγής λίπους. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, οι ελαιογόνοι μικροοργανισμοί επηρεάζονται δυσμενώς από αυτές τις ουσίες, οι οποίες είναι παρούσες σε λιγνοκυτταρινούχα υδρολύματα.

Σε παρόμοια μελέτη από βιβλιογραφία, όπου έχει χρησιμοποιηθεί σαν υπόστρωμα υδρόλυμα από άχυρο σίτου πλούσιο σε ξυλόζη, και χωρίς απομάκρυνση των παρεμποδιστών, αναφέρεται ότι η παραγωγή βιομάζας (ξηρή) σε μύκητες (*A. terreus*, *C. Elegans*, *M. Isabellina*, *Mortierella Vinacea*, *Rhizopus Oryzae*, *Thermomyces Lanuginosus*), κυμαίνεται σε συγκεντρώσεις από 3,8 g/L έως 7,6 g/L και ποσοστό λιπιδίων επί ξηρής βιομάζας από 17% ως 19,4%. Ο μύκητας που σημείωσε τα πιο αξιόλογα αποτελέσματα ήταν ο *M. Isabellina* με παραγωγή λιπαρών 2,63 g/L και ο *M. Vinacea* με παραγωγή λιπαρών 2,46 g/L. (47)

Στις προτάσεις για βελτίωση, γενικά έχουν αναφερθεί διάφορες μέθοδοι αποτοξίνωσης για αφαίρεση των παρεμποδιστών από τα λιγνοκυτταρινούχα υποστρώματα ή προσαρμογή των μικροοργανισμών μέσω τροποποίησης για αύξηση της ανοχής τους. Στα πλαίσια του συγκεκριμένου πειράματος, θα μπορούσε να δοκιμαστεί ανάπτυξη του μύκητα με περιοριστικό παράγοντα κάποιο άλλο συστατικό, εκτός από το άζωτο, φώσφορο ή θείο. (66)

IV. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής ήταν η διερεύνηση της ικανότητας του μύκητα *Fusarium oxysporum* να συσσωρεύει ικανοποιητική ποσότητα λίπους και ταυτόχρονα έγινε προσπάθεια εύρεσης των βέλτιστων συνθηκών για τη μέγιστη παραγωγή λίπους.

Αρχικά, μελετήθηκε η ικανότητα ανάπτυξης και παραγωγής ενδοκυτταρικού λίπους σε υποστρώματα με γλυκόζη, φρουκτόζη, σακχαρόζη και μείγμα τους (στην αναλογία που εντοπίζονται στο σόργο). Προέκυψε ότι το καλύτερο υπόστρωμα από άποψη παραγωγής λίπους ήταν εκείνο του μείγματος των 3 σακχάρων, γεγονός το οποίο είναι πολύ ενθαρρυντικό καθώς τα 3 αυτά σάκχαρα περιέχονται στο σόργο. Ακολούθησε έλεγχος της πηγής αζώτου, όπου ανάμεσα στις διάφορες πηγές αζώτου που ερευνήθηκαν, τα καλύτερα αποτελέσματα σε ποσότητα λίπους παρουσίασε το yeast extract. Το γεγονός ότι με χρήση οργανικής πηγής αζώτου συσσωρεύτηκε η μεγαλύτερη ποσότητα ενδοκυτταρικού λίπους είναι επίσης ιδιαίτερα θετικό καθώς σημαίνει αξιοποίηση της περιέχουσας στο σόργο πρωτεΐνης για την ανάπτυξη του μύκητα, μειώνοντας περαιτέρω το κόστος της διεργασίας. Μετά την εύρεση της καλύτερης πηγής αζώτου, μελετήθηκε η επίδραση του λόγου C/N. Προέκυψε ότι ο μύκητας μπορεί να συσσωρεύσει σημαντικές ποσότητες λίπους σε ένα εύρος τιμών του λόγου C/N από 50-100. Αυτό είναι πολύ σημαντικό, καθώς όταν πραγματοποιηθούν πειράματα στο γλυκό σόργο, λόγω της παρουσίας πρωτεϊνών πιθανώς η διαμόρφωση του λόγου C/N στα επιθυμητά επίπεδα να είναι δύσκολη.

Στο δεύτερο σκέλος πραγματοποιήθηκε η ανάπτυξη του μύκητα σε ρευστοποιημένο γλυκό σόργο. Αρχικά διερευνήθηκε το κατά πόσο ο μύκητας μπορεί να αφομοιώσει το περιεχόμενο στο σόργο άζωτο (σε πρωτεϊνική μορφή). Για το λόγο αυτό έγιναν πειράματα με και χωρίς προσθήκη πηγής αζώτου, η οποία ήταν το yeast extract καθώς αυτό είχε βγάλει τα καλύτερα ποσοτικά αποτελέσματα λίπους στις καθαρές πηγές. Προέκυψε ότι η προσθήκη αζώτου, δεν έχει επίδραση στην ποσότητα των παραγόμενων λιπιδίων, γεγονός ενθαρρυντικό καθώς δεν θα αυξηθεί περαιτέρω το κόστος της διεργασίας. Στη συνέχεια, για την ίδια συγκέντρωση στερεών διερευνήθηκε αν υπάρχει η επίδραση της ενζυμικής υδρόλυσης της κυτταρίνης του σόργου στη ζύμωση προς παραγωγή λίπους. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η ενζυμική υδρόλυση πριν τη ζύμωση είναι κρίσιμης σημασίας, καθώς, χωρίς ενζυμική υδρόλυση ο μύκητας αναπτύχθηκε ανεπαρκώς και οι ποσότητες των λιπιδίων που συσσωρεύτηκαν ήταν πολύ μικρές. Τέλος, μελετήθηκε η επίδραση της αύξησης της ποσότητας των στερεών στο μέσο της καλλιέργειας και προέκυψε ότι με αύξηση της μειώνεται σημαντικά η ποσότητα των παραγόμενων λιπιδίων. Σαν μια προσπάθεια λύσης του προβλήματος αερισμού που δημιουργείται στις υψηλές συγκεντρώσεις στερεών και πιθανότατα αποτελεί την αιτία της χαμηλής απόδοσης σε ποσότητα λιπιδίων, προτείνεται η διεξαγωγή πειραμάτων με καλλιέργειες από τις οποίες θα έχει αφαιρεθεί η ποσότητα των στερεών, αμέσως μετά την ενζυμική υδρόλυση.

Από τα συνολικά πειράματα, κρίσιμης σημασίας ήταν εκείνα στα οποία χρησιμοποιήθηκε το γλυκό σόργο σαν υπόστρωμα, μιας και ο στόχος σε γενικότερο πλαίσιο της μικροβιακής παραγωγής λιπιδίων, όπως βρέθηκε στη βιβλιογραφία είναι η χρησιμοποίηση λιγνινοκυτταρινούχας βιομάζας και όχι συστατικών είναι ανταγωνιστικά με τα τρόφιμα.

Τέλος από τα πειράματα που έγιναν με χρήση LF σαν υπόστρωμα, προέκυψε ότι η προσθήκη πηγής αζώτου δεν έχει σημαντική επίδραση στην ποσότητα του λίπους που συσσωρεύεται, καθώς αυτή έτσι και αλλιώς είναι πολύ χαμηλή. Στις προτάσεις για μελλοντικά πειράματα, θα μπορούσαν να αναφερθούν η αφαίρεση των παρεμποδιστών από τα λιγνοκυτταρινούχα υποστρώματα καθώς και να δοκιμαστεί ανάπτυξη του μύκητα με περιοριστικό παράγοντα κάποιο άλλο συστατικό, εκτός από το άζωτο και συγκεκριμένα φώσφορο ή θείο.

V. ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΠΙΝΑΚΩΝ, ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ & ΕΙΚΟΝΩΝ

| | |
|--|-----|
| Πίνακας 1: Δομές λιπαρών οξέων που μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως πρώτες ύλες για το βιοντίζελ (31)..... | 22 |
| Πίνακας 2: Βάρος επί τις εκατό λιπαρών οξέων σε διάφορες πρώτες ύλες του βιοντίζελ (31) | 22 |
| Πίνακας 3: Επιλεγμένες ιδιότητες για το ντίζελ και το βιοντίζελ (31) | 27 |
| Πίνακας 4: Η περιεκτικότητα σε έλαια επί ξηρής βιομάζας για κάποια αντιπροσωπευτικά είδη μικροοργανισμών (52) | 33 |
| Πίνακας 5: Η ποιοτική σύσταση των παραγόμενων λιπιδίων ανά κατηγορία μικροοργανισμού (52)..... | 34 |
| Πίνακας 6: Μελέτες για την εύρεση μικροοργανισμών που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για παραγωγή μικροβιακού λίπους (58)..... | 35 |
| Πίνακας 7: Συνοπτική παρουσίαση κάποιων υποστρωμάτων μαζί με τα αντίστοιχα στελέχη μικροοργανισμών που έχουν χρησιμοποιηθεί από ερευνητές για μικροβιακή παραγωγή λίπους (51)..... | 49 |
| Πίνακας 8: Η σύσταση του Liquid Fraction | 55 |
| Πίνακας 9: Τα συστατικά του στερεού υπόστρωματος για το sland | 56 |
| Πίνακας 10: Τα συστατικά για το υπόστρωμα της προκαλλιέργειας | 56 |
| Πίνακας 11: Τα συστατικά για το υπόστρωμα της κυρίως καλλιέργειας | 57 |
| Πίνακας 12: Συνοπτικός πίνακας των εναπομεινάντων σακχάρων (g/L), της βιομάζας (g/L), του λίπους (g/L), της ελεύθερης λίπους βιομάζας (g/L) και του συντελεστή απόδοσης λίπους (%) για τις πηγές άνθρακα που χρησιμοποιήθηκαν | 77 |
| Πίνακας 13: Συνοπτικός πίνακας των εναπομεινάντων σακχάρων (g/L), της βιομάζας (g/L), του λίπους (g/L), της ελεύθερης λίπους βιομάζας (g/L) και του συντελεστή απόδοσης λίπους (%) για τις πηγές αζώτου που χρησιμοποιήθηκαν..... | 91 |
| Πίνακας 14: Συνοπτικός πίνακας των εναπομεινάντων σακχάρων (g/L), της βιομάζας (g/L), του λίπους (g/L), της ελεύθερης λίπους βιομάζας (g/L) και του συντελεστή απόδοσης λίπους (%) για τους διαφορετικούς λόγους C/N. | 97 |
| Πίνακας 15: Συνοπτικός πίνακας των εναπομεινάντων σακχάρων (g/L), της βιομάζας (g/L), του λίπους (g/L), της ελεύθερης λίπους βιομάζας (g/L) και του συντελεστή απόδοσης λίπους (%) για τα πειράματα με και χωρίς προσθήκη πηγής αζώτου σε υπόστρωμα γλυκό σόργο συγκέντρωσης 8,69%. | 106 |
| Πίνακας 16: Συνοπτικός πίνακας των εναπομεινάντων σακχάρων (g/L), της βιομάζας (g/L), του λίπους (g/L), της ελεύθερης λίπους βιομάζας (g/L) και του συντελεστή απόδοσης λίπους (%) για τα πειράματα με και χωρίς ενζυμική υδρόλυση του γλυκού σόργου σε συγκέντρωση στερεών 8,69%. | 110 |
| Πίνακας 17: Συνοπτικός πίνακας των εναπομεινάντων σακχάρων (g/L), της βιομάζας (g/L), του λίπους (g/L), της ελεύθερης λίπους βιομάζας (g/L) και του συντελεστή απόδοσης λίπους (%) για τα πειράματα με διαφορετική συγκέντρωση γλυκού σόργου και χωρίς προσθήκη πηγής αζώτου..... | 114 |
| Πίνακας 18: Συγκεντρωτικά αποτελέσματα για την ανάπτυξη και την παραγωγή λίπους του μύκητα στο υπόστρωμα Liquid Fraction χωρίς και με προσθήκη αζώτου | 115 |

| | |
|---|----|
| Εικόνα 1: Παραστατική αναπαράσταση της παραγωγής βιοκαυσίμων (11)..... | 14 |
| Εικόνα 2: Γενική αντίδραση μεθεστεροποίησης..... | 24 |
| Εικόνα 3: Αντίδραση μεθανόλυσης τριγλυκεριδίων..... | 24 |
| Εικόνα 4: Ο μύκητας <i>Fusarium oxysporum</i> στο μικροσκόπιο με μικρότερη και μεγαλύτερη εστίαση..... | 34 |
| Εικόνα 5: Διάγραμμα ροής που αναπαριστά την πορεία αντιδράσεων που οδηγούν στην βιοσυσσώρευση λιπιδίων σε ελαιογόνα είδη. Οπου: TCA: κύκλος τρικαρβοξυλικού οξέος, ACL: ATP-κιτρική λυάση, MDH (malate dehydrogenase): αφυδρογονάση του μηλικού οξέος, ME (malate enzyme): μηλικό ένζυμο, PC (pyruvate carboxylase): καρβοξυλάση του πυροσταφυλικού οξέος (69)..... | 43 |
| Εικόνα 6: Δομή της φυτικής βιομάζας (95)..... | 46 |
| Εικόνα 7: Διάγραμμα ροής που αναπαριστά τις πηγές και τους βασικούς τρόπους χρήσης της βιομάζας (70)..... | 47 |
| Εικόνα 8: Το ενεργειακό φυτό σόργο (74)..... | 51 |

| | |
|---|----|
| Διάγραμμα 1: Η πορεία της παγκόσμιας ενεργειακής κατανάλωσης από το 1980 φτάνοντας ως το 2030 σύμφωνα με εκτιμήσεις (2)..... | 10 |
| Διάγραμμα 2: Η συνεισφορά των διάφορων μορφών ενέργειας στη διαμόρφωση της παγκόσμιας ενεργειακής κατανάλωσης (7)..... | 12 |
| Διάγραμμα 3: Παρουσίαση της μέσης ετήσιας αύξησης παραγωγής βιοκαυσίμων για το 2012 και η μεταβολή που σημειώθηκε από το 2007-2012 (9)..... | 13 |
| Διάγραμμα 4: Προέλευση των βιοκαυσίμων (12)..... | 14 |
| Διάγραμμα 5: Ετήσια παραγωγή βιοκαυσίμων για τα έτη 2000-2012 (9)..... | 18 |
| Διάγραμμα 6: Η μείωση στις εκπομπές του βιοντίζελ σε σχέση με καύσιμο που αποτελείται από μείγμα βιοντίζελ-πετροντίζελ (40)..... | 26 |
| Διάγραμμα 7: Τυπικό διάγραμμα για την ανάπτυξη της βιομάζας και την πορεία συσσώρευσης των λιπιδίων σε συνθήκες ασυνεχούς καλλιέργειας (batch) (67)..... | 39 |
| Διάγραμμα 8: Το μερίδιο καθεμίας από τις ανανεώσιμες πηγές ενέργειας στην παγκόσμια κατανομή της ενέργειας και η αναμενόμενη πορεία της στα επόμενα χρόνια (72)..... | 49 |
| Διάγραμμα 9: Πρότυπη καμπύλη γλυκόζης για τη μέθοδο DNS..... | 61 |
| Διάγραμμα 10: Πρότυπη καμπύλη ξυλόζης για τη μέθοδο DNS..... | 62 |
| Διάγραμμα 11: Κινητική της εξέλιξης της βιομάζας, της παραγωγής ενδοκυτταρικού λίπους, της ελεύθερης λίπους βιομάζας και της κατανάλωσης υποστρώματος συναρτήσει του χρόνου κατά την καλλιέργεια του μύκητα <i>F. Oxysporum</i> σε γλυκόζη, ως μόνη πηγή άνθρακα..... | 69 |
| Διάγραμμα 12: Κινητική της εξέλιξης της βιομάζας, της παραγωγής ενδοκυτταρικού λίπους, της ελεύθερης λίπους βιομάζας και της κατανάλωσης υποστρώματος συναρτήσει του χρόνου κατά την καλλιέργεια του μύκητα <i>F. Oxysporum</i> σε φρουκτόζη, ως μόνη πηγή άνθρακα..... | 71 |
| Διάγραμμα 13: Κινητική της εξέλιξης της βιομάζας, της παραγωγής ενδοκυτταρικού λίπους, της ελεύθερης λίπους βιομάζας και της κατανάλωσης υποστρώματος συναρτήσει του χρόνου κατά την καλλιέργεια του μύκητα <i>F. Oxysporum</i> σε σακχαρόζη, ως μόνη πηγή άνθρακα..... | 73 |

| | |
|--|-----|
| Διάγραμμα 14: Κινητική της εξέλιξης της βιομάζας, της παραγωγής ενδοκυτταρικού λίπους, της ελεύθερης λίπους βιομάζας και της κατανάλωσης υποστρώματος συναρτήσει του χρόνου κατά την καλλιέργεια του μύκητα <i>F. Oxysporum</i> σε μείγμα σακχαρόζης-γλυκόζης-φρουκτόζης. | 75 |
| Διάγραμμα 15: Συγκεντρωτικά αποτελέσματα για τη σύγκριση των πηγών άνθρακα. | 77 |
| Διάγραμμα 16: Κινητική της εξέλιξης της βιομάζας, της παραγωγής ενδοκυτταρικού λίπους, της ελεύθερης λίπους βιομάζας και της κατανάλωσης υποστρώματος συναρτήσει του χρόνου κατά την καλλιέργεια του μύκητα <i>F. Oxysporum</i> σε θειικό αμμώνιο σαν πηγή αζώτου. | 79 |
| Διάγραμμα 17: Κινητική της εξέλιξης της βιομάζας, της παραγωγής ενδοκυτταρικού λίπους, της ελεύθερης λίπους βιομάζας και της κατανάλωσης υποστρώματος συναρτήσει του χρόνου κατά την καλλιέργεια του μύκητα <i>F. Oxysporum</i> σε χλωριούχο αμμώνιο σαν πηγή αζώτου. | 81 |
| Διάγραμμα 18: Κινητική της εξέλιξης της βιομάζας, της παραγωγής ενδοκυτταρικού λίπους, της ελεύθερης λίπους βιομάζας και της κατανάλωσης υποστρώματος συναρτήσει του χρόνου κατά την καλλιέργεια του μύκητα <i>F. Oxysporum</i> σε όξινο φωσφορικό αμμώνιο σαν πηγή αζώτου. | 83 |
| Διάγραμμα 19: Κινητική της εξέλιξης της βιομάζας, της παραγωγής ενδοκυτταρικού λίπους, της ελεύθερης λίπους βιομάζας και της κατανάλωσης υποστρώματος συναρτήσει του χρόνου κατά την καλλιέργεια του μύκητα <i>F. Oxysporum</i> σε εκχύλισμα ζύμης σαν πηγή αζώτου. | 85 |
| Διάγραμμα 20: Κινητική της εξέλιξης της βιομάζας, της παραγωγής ενδοκυτταρικού λίπους, της ελεύθερης λίπους βιομάζας και της κατανάλωσης υποστρώματος συναρτήσει του χρόνου κατά την καλλιέργεια του μύκητα <i>F. Oxysporum</i> σε ουρία σαν πηγή αζώτου. | 87 |
| Διάγραμμα 21: Κινητική της εξέλιξης της βιομάζας, της παραγωγής ενδοκυτταρικού λίπους, της ελεύθερης λίπους βιομάζας και της κατανάλωσης υποστρώματος συναρτήσει του χρόνου κατά την καλλιέργεια του μύκητα <i>F. Oxysporum</i> σε πεπτόνη σαν πηγή αζώτου. | 89 |
| Διάγραμμα 22: Συγκεντρωτικά αποτελέσματα για τη σύγκριση πηγών αζώτου. | 92 |
| Διάγραμμα 23: Κινητική της εξέλιξης της βιομάζας, της παραγωγής ενδοκυτταρικού λίπους, της ελεύθερης λίπους βιομάζας και της κατανάλωσης υποστρώματος συναρτήσει του χρόνου κατά την καλλιέργεια του μύκητα <i>F. Oxysporum</i> σε λόγο άνθρακα/αζώτου ίσο με 50. | 94 |
| Διάγραμμα 24: Κινητική της εξέλιξης της βιομάζας, της παραγωγής ενδοκυτταρικού λίπους, της ελεύθερης λίπους βιομάζας και της κατανάλωσης υποστρώματος συναρτήσει του χρόνου κατά την καλλιέργεια του μύκητα <i>F. Oxysporum</i> σε λόγο άνθρακα/αζώτου ίσο με 150. | 96 |
| Διάγραμμα 25: Συγκεντρωτικά αποτελέσματα για τη σύγκριση λόγων άνθρακα/αζώτου. .. | 98 |
| Διάγραμμα 26: Κινητική της εξέλιξης της βιομάζας, της παραγωγής ενδοκυτταρικού λίπους, της ελεύθερης λίπους βιομάζας και της κατανάλωσης υποστρώματος συναρτήσει του χρόνου κατά την καλλιέργεια του μύκητα <i>F. Oxysporum</i> σε γλυκό σόργο, χωρίς προσθήκη αζώτου. | 101 |
| Διάγραμμα 27: Κινητική της εξέλιξης της βιομάζας, της παραγωγής ενδοκυτταρικού λίπους, της ελεύθερης λίπους βιομάζας και της κατανάλωσης υποστρώματος συναρτήσει του χρόνου κατά την καλλιέργεια του μύκητα <i>F. Oxysporum</i> σε γλυκό σόργο, με προσθήκη αζώτου. | 103 |

| | |
|--|-----|
| Διάγραμμα 28: Γραφική απεικόνιση της χρονικής εξέλιξης της συγκέντρωσης του ολικού αζώτου και του αζώτου ελεύθερων αμινομάδων, για την καλλιέργεια χωρίς προσθήκη πηγής αζώτου | 105 |
| Διάγραμμα 29: Γραφική απεικόνιση της χρονικής εξέλιξης της συγκέντρωσης του ολικού αζώτου και του αζώτου ελεύθερων αμινομάδων, για την καλλιέργεια με προσθήκη πηγής αζώτου | 105 |
| Διάγραμμα 30: Κινητική της εξέλιξης της βιομάζας, της παραγωγής ενδοκυτταρικού λίπους, της ελεύθερης λίπους βιομάζας και της κατανάλωσης υποστρώματος συναρτήσει του χρόνου κατά την καλλιέργεια του μύκητα <i>F. Oxyroium</i> σε γλυκό σόργο, χωρίς ενζυμική υδρόλυση. | 108 |
| Διάγραμμα 31: Γραφική απεικόνιση της χρονικής εξέλιξης της συγκέντρωσης του ολικού αζώτου και του αζώτου ελεύθερων αμινομάδων, για την καλλιέργεια χωρίς προσθήκη πηγής αζώτου και ενζύμων | 109 |
| Διάγραμμα 32: Κινητική της εξέλιξης της βιομάζας, της παραγωγής ενδοκυτταρικού λίπους, της ελεύθερης λίπους βιομάζας και της κατανάλωσης υποστρώματος συναρτήσει του χρόνου κατά την καλλιέργεια του μύκητα <i>F. Oxyroium</i> σε γλυκό σόργο, συγκέντρωσης 12%. | 112 |
| Διάγραμμα 33: Κινητική της εξέλιξης της βιομάζας, της παραγωγής ενδοκυτταρικού λίπους, της ελεύθερης λίπους βιομάζας και της κατανάλωσης υποστρώματος συναρτήσει του χρόνου κατά την καλλιέργεια του μύκητα <i>F. Oxyroium</i> σε γλυκό σόργο, συγκέντρωσης 16%. | 113 |

VI. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. U.S. Sencus Bureau. [Ηλεκτρονικό]
<http://www.census.gov/population/international/data/idb/worldpopgraph.php>.
2. Energy Information Administration . [Ηλεκτρονικό] Office of Integrated Analysis and Forecasting U.S. Department of Energy, 2008.
<http://www.tulane.edu/~bifleury/envirobio/readings/International%20Energy%20Outlook%2008.pdf>.
3. **M.Mediavilla, L.J.Miguel, C.de Castro**. From fossil Fuels to Renewable Energies. [Ηλεκτρονικό] 2011. <http://www.eis.uva.es/energiasostenible/wp-content/uploads/2011/12/artic-enerficcion-atenas08.pdf>.
4. **Bharat Raj Singh, Onkar Singh, Shahriar Khan**. *Fossil Fuel and the Environment*. s.l. : In Tech, 2012. σσ. 167-189.
5. **Π.Χριστακόπουλος, Ε.Τόπακας**. *Βιοτεχνολογία Παραγωγής Βιοκαυσίμων*. Αθήνα : Ε.Μ.Π. Σχολή Χημικών Μηχανικών Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας, 2012.
6. **Ν.Ανδρίτσος**. *Ενέργεια και Περιβάλλον*. Βόλος : Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας Τμήμα Μηχανολόγων Μηχανικών, 2008.
7. Energy Information Administration . [Ηλεκτρονικό] Center for Strategic and International Studies, 2013. http://www.eia.gov/pressroom/presentations/sieminski_07252013.pdf.
8. Υπουργείο Περιβάλλοντος Ενέργειας και Κλιματικής Αλλαγής. [Ηλεκτρονικό]
<http://www.ypeka.gr/Default.aspx?tabid=292..>
9. Renewables 2013 Global Status Report. [Ηλεκτρονικό] REN Renewable Energy Policy Network for the 21st Century, 2013.
http://www.ren21.net/Portals/0/documents/Resources/GSR/2013/GSR2013_lowres.pdf.
10. *Βιοντίζελ και Πράσινο Ντίζελ ως Υποκατάστατα του Πετρελαικού Ντίζελ*.
Ν.Παπαγιαννάκος. s.l. : 2η Επιστημονική Ημερίδα Bioenergy 2012- Ενέργεια από βιομάζα: Πρώτες Υλεις-Προοπτική-Τεχνολογικές Εφαρμογές.
11. [Ηλεκτρονικό] <http://www.reepedia.com/education/renewable-energy-resources>.
12. Energy Information Administration. [Ηλεκτρονικό] Indipendent Statistics and Analysis, 2013. <http://www.eia.gov/todayinenergy/detail.cfm?id=12531>.
13. **S.N. Naik, Vaibhav V. Goud, Prasant K. Rout, Ajay K. Dalai**. Production of first and second generation biofuels: A comprehensive review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews 14*. Elsevier, 2010, Τόμ. 14, σσ. 578-597.
14. Towards Sustainable Production and Use of Resources - Assessing Biofuels.
[Ηλεκτρονικό] 2009. http://www.unep.org/pdf/Assessing_Biofuels-full_report-Web.pdf.
15. *Παραγωγή Καυσίμου Ντίζελ από Ανανεώσιμες Πρώτες Υλεις*. **Ν.Παπαγιαννάκος**. Αλεξανδρούπολη : Παρουσίαση με θέμα: Ο Πετρελαιοκός Τομέας στην Ελλάδα, 2009.

16. **R.Sims, M.Taylor, J.Saddler, W.Mabee.** From 1st- to 2nd-Generation Biofuel Technologies An overview of current industry and RD&D activities. 2008.
17. **G.Dragone, B. Fernandes, A.A.Vicente, J. A.Teixeira.** Third generation biofuels from microalgae. *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology.* 2010, σσ. 1355-1366.
18. Energy from Waste and Wood. [Ηλεκτρονικό] The University of Edinburgh. <http://energyfromwasteandwood.weebly.com/generations-of-biofuels.html>.
19. International Energy Outlook. [Ηλεκτρονικό] Office of Integrated Analysis and Forecasting, 2010. <http://large.stanford.edu/courses/2010/ph240/riley2/docs/EIA-0484-2010.pdf>.
20. Energy Efficiency & Renewable Energy. [Ηλεκτρονικό] U.S. Department of Energy. <http://www.afdc.energy.gov/laws/law/WI/6158>.
21. Biodiesel America's Advanced Biofuel. [Ηλεκτρονικό] <http://www.biodiesel.org/what-is-biodiesel>.
22. **M. Mofijur, H.H. Masjuki, M.A. Kalam, A.E. Atabani, M. Shahabuddin, S.M. Palash, M.A. Hazrat.** Effect of biodiesel from various feedstocks on combustion characteristics, engine durability and materials compatibility: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews.* Elsevier, 2013, Τόμ. 28, σσ. 441-455.
23. **Lin Lin, Zhou Cunshan, Saritporn Vittayapadung, Shen Xiangqian, Dong Mingdong.** Opportunities and challenges for biodiesel fuel. *Applied Energy.* 2011, Τόμ. 88, σσ. 1020-1031.
24. **Avinash Kumar Agarwal.** Biofuels (alcohols and biodiesel) applications as fuels for internal. *Progress in Energy and Combustion Science.* 2007, Τόμ. 33, σσ. 233-271.
25. **A.Murugesen, C.Umarani, T.R.Chinnusamy, M.Krishnan, R.Subramanian, N.Neduzchezchain.** Production and analysis of bio-diesel from non-edible oils--A review. *Renewable & Sustainable Energy Reviews.* 2008, Τόμ. 13, σσ. 825-834.
26. **X.Lang, A.K.Dalai, N.N.Bakhshi, M.J.Reaney, P.B.Hertz.** Preparation and characterization of bio-diesels from various bio-oils. *Bioresource Technology.* Elsevier, 2001, Τόμ. 80, σσ. 53-62.
27. **Amin Talebian-Kiakalaieha, E-mail the corresponding author, Nor Aishah Saidina Amina, Corresponding Amin Talebian-Kiakalaieh, Nor Aishah Saidina Amin, Hossein Mazaheria.** A review on novel processes of biodiesel production from waste cooking oil. *Applied Energy.* 2013, Τόμ. 104, σσ. 683-710.
28. **Y.Zhang, M.A.Dube, D.D.McLean, M.Kates.** Biodiesel production from waste cooking oil: 1.Process design and technological assessment. *Bioresource Technology.* Elsevier, 2003, Τόμ. 89, σσ. 1-16.

29. **M.Canakci, J.V. Gerpen.** Biodiesel production from oils and fats with high free fatty acids. *Soil & Water Division of ASAE*. American Society of Agricultural Engineers, 2001, Τόμ. 44, 6, σσ. 1429-1436.
30. **P.Sivakumar, K.Anbarasu, S.Renganathan.** Bio-diesel production by alkali catalyzed transesterification of dairy waste scum. *Fuel*. Elsevier, 2010, Τόμ. 90, σσ. 147-151.
31. **Tyson K. Shaine.** Biodiesel Handling and Use Guidelines. National Renewable Energy Laboratory, 2001.
32. **Ahmad Abbaszaadeh, Barat Ghobadian, Mohammad Reza Omidkhah, Gholamhassan Najafi.** Current biodiesel production technologies: A comparative review. *Energy Conversion and Management*. 2012, Τόμ. 63, σσ. 138-148.
33. **A.E. Atabania, A.S. Silitongaa, H.C. Onga, T.M.I. Mahliac, H.H. Masjukia, Irfan Anjum Badruddina, H. Fayaz.** Non-edible vegetable oils: A critical evaluation of oil extraction, fatty acid compositions, biodiesel production, characteristics, engine performance and emissions production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 2013, Τόμ. 18, σσ. 211-245.
34. **Gemma Vicentea, L. Fernando Bautistaa, Rosalía Rodrígueza, F. Javier Gutiérreza, Irantzu Sádabaa, Rosa M. Ruiz-Vázquezb, Santiago Torres-Martínezb, Victoriano Garreb.** Biodiesel production from biomass of an oleaginous fungus. *Biochemical Engineering Journal*. 2009, Τόμ. 48, 1, σσ. 22-27.
35. **G. Venkata Subhash, S. Venkata Mohan.** Biodiesel production from isolated oleaginous fungi *Aspergillus* sp. using corncob waste liquor as a substrate. *Bioresource Technology*. 2011, Τόμ. 102, σσ. 9286-9290.
36. **G.Knothe, J.V.Gerpen, J.Krahl.** *The biodiesel handbook*. USA : AOCS Press, 2005. σσ. 34,.
37. IEA Energy Technology Essentials. [Ηλεκτρονικό] 2007.
<http://www.iea.org/techno/essentials2.pdf>.
38. **Casey Allena, Elisa Toulsona, Daniel Tepea, Harold Schocka, Dennis Millerb, Tonghun Leea.** Characterization of the effect of fatty ester composition on the ignition behavior of biodiesel fuel sprays. *Fuel*. 2013, Τόμ. 111, σσ. 659-669.
39. **S.M. Palash, H.H. Masjuki, M.A. Kalam, B.M. Masum, A. Sanjid, M.J. Abedin.** State of the art of NOx mitigation technologies and their effect on the performance and emission characteristics of biodiesel-fueled Compression Ignition engines. *Energy Conversion and Management*. 2013, Τόμ. 76, σσ. 400-420.
40. biofuels.coop. [Ηλεκτρονικό] http://www.biofuels.coop/pdfs/9_emissions.pdf.
41. **Mustafa Balat, Hawva Balat.** Progress in biodiesel processing. *Applied Energy*. 2010, Τόμ. 87, 6, σσ. 1815-1835.

42. European Committee for Standardization. [Ηλεκτρονικό] 2010.
<http://www.cen.eu/boss/supporting/Guidance%20documents/GD059%20-%20CEN%20deliverables/Pages/GD%20-%20CEN%20deliverables.aspx>.
43. ASTM International. [Ηλεκτρονικό] <http://www.astm.org/>.
44. **Dev Shrestha**. America's Research-Based Learning Network. [Ηλεκτρονικό]
http://www.extension.org/pages/27998/biodiesel-fuel-quality#.UnkbG_nwle8.
45. 5η εθνική έκθεση σχετικά με τηνπρώθηση της ωρήσης των βιοκαυσίμων ή άλλων ανανεώσιμων καυσίμων για μεταφορές στην Ελλάδα την περίοδο 2005 – 2010. [Ηλεκτρονικό] 2008.
<http://www.ypeka.gr/LinkClick.aspx?fileticket=rUa18pYyKkc%3D&tabid=292>.
46. **Demirbas, Ayhan**. Political, economic and environmental impacts of biofuels: A review. *Applied Energy*. 2009, Τόμ. 86, σσ. 108-117.
47. **Yubin Zheng, Xiaochen Yu, Jijiao Zeng and Shulin Chen**. Feasibility of filamentous fungi for biofuel production using hydrolysate from dilute sulfuric acid pretreatment of wheat straw. *Biotechnology for Biofuels*. 2012, Τόμ. 5, 50.
48. **Seraphim Papanikolaou, George Aggelis**. Lipids of oleaginous yeasts. Part II: Technology and potential applications. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 2011, Τόμ. 113, σσ. 1052-1073.
49. **Ramalingam Subramaniam, Stephen Dufreche, Mark Zappi, Rakesh Bajpai**. Microbial lipids from renewable resources: production and characterization. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 2010, Τόμ. 37, σσ. 1271-1287.
50. **Mainak Mukhopadhyah, Ansu Singh, Rintu Banerjee**. Oleagenous Fungi: A solution to Oil Crisis. [συγγρ. βιβλίου] Bhavdish Narain Johri, Anil Prakash T. Satyanarayana. *Microorganisms for Environmental Management Microbes and Environment*. s.l. : Springer, 2012, σσ. 403-415.
51. **Chao Huanga, Xue-fang Chenb, Lian Xionga, Xin-de Chena, Long-long Maa, Yong Chen**. Single cell oil production from low-cost substrates: The possibility and potential of its industrialization. *Biotechnology Advances*. 2013, Τόμ. 31, 2, σσ. 129-139.
52. **Xin Meng, Jianming Yang, Xin Xu, Lei Zhang, Qingjuan Nie, Mo Xian**. Biodiesel production from oleaginous microorganisms. *Renewable Energy*. 2009, Τόμ. 34, σσ. 1-5.
53. **Stylios Fakas, Seraphim Papanikolaou, Maria Galiotou-Panayotou, Michael Komaitis, George Aggelis**. Biochemistry and Biotechnology of Single Cell Oil. [Ηλεκτρονικό]
http://www.academia.edu/614453/Biochemistry_and_biotechnology_of_single_cell_oil#.
54. **Leman, Jacek**. Oleaginous Microorganisms: An Assessment of the Potential. *Advances in Applied Microbiology*. s.l. : Academic Press, 1997, Τόμ. 43, σσ. 195-243.

55. **Mahesh Khot, Srijay Kamat, Smita Zinjarde, Aditi Pant, Balu Chopade and Ameeta RaviKumar.** Single cell oil of oleaginous fungi from the tropical mangrove wetlands as a potential feedstock for biodiesel. *Microbial Cell Factories*. 2012, Τόμ. 11, 71.
56. **Gwendoline Christophe, Vinod Kumar, Régis Nouaille, Geneviève Gaudet, Pierre Fontanille, Ashok Pandey, Carlos Ricardo Soccol, Christian Larroche.** Recent developments in microbial oils production: a possible alternative to vegetable oils for biodiesel without competition with human food? *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 2012, Τόμ. 5, 1.
57. NCBI. [Ηλεκτρονικό] US National Library of Medicine National Institutes of Health. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19400835>.
58. **BAQIR S. NAQVI, KHURSHID HASHMI, FAROOQ ALI KHAN, DILNAWAZ SHEIKH, ZAFAR ALAM MEHMOOD.** PRODUCTION OF LIPIDS BY FERMENTATION PRELIMINARY REPORT. *Industrial Microbiology*. 1997, Τόμ. 10, 1, σσ. 13-18.
59. **A. AZEEM, Y.F. NEELAGUND, V. RATHOD.** Biotechnological production of oil: Fatty acid composition of microbial oil. *Plant Foods for Human Nutrition*. 1999, Τόμ. 53, σσ. 381-386.
60. **D.S. Chahal, MADhu Singla, R.P. Gupta.** Comparison of lipid Production by unicellular and filamentous fungi. *Microbiology*. 1979, Τόμ. 45, 1, σσ. 18-26.
61. **Ioannis Dogaris, Sofia Karapati, Diomi Mamma, Emmanuel Kalogieris, Dimitris Kekos.** Hydrothermal processing and enzymatic hydrolysis of sorghum bagasse for fermentable carbohydrates production. *Bioresource Technology*. 2009, Τόμ. 100, σσ. 6543-6549.
62. **Shuwahida Shuib, Othman Omar, MohdSahaid Khalil, Abdul Jalil, Abdul Kader, Aidil.** Enhancement of Lipid Accumulation in *Cunninghamella bairdii* sp. *OnLine Journal of Biological Sciences*. 2008, Τόμ. 8, 3, σσ. 62-67.
63. **Subramaniyam R., Vimala R.** SOLID STATE AND SUBMERGED FERMENTATION FOR THE PRODUCTION OF BIOACTIVE SUBSTANCES: A COMPARATIVE STUDY. *Internation journal of science and nature*. 2012, Τόμ. 3, 3, σσ. 480-486.
64. **Lenz, U. Hölker. M. Höfer. J.** Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. *Appl Microbiol Biotechnol*. 64, σσ. 175-186.
65. **Xiaowei Penga, Hongzhang Chen.** Single cell oil production in solid-state fermentation by *Microsphaeropsis* sp. from steam-exploded wheat straw mixed with wheat bran. *Bioresource Technology*. 2008, Τόμ. 99, 9, σσ. 3885-3889.
66. **Seraphim Papanikolaou, George Aggelis.** Lipids of oleaginous yeasts. Part I: Biochemistry of single. *Eur. J. Lipid Sci. Technol*. 2011, Τόμ. 113, σσ. 1031-1051.
67. **C. Ratledge, J.P. Wynn.** The Biochemistry and Molecular Biology of Lipid Accumulation in Oleaginous Microorganisms. *ADVANCES IN APPLIED MICROBIOLOGY*. 2002, Τόμ. 51.
68. **Colin, Ratledge.** Fatty acid biosynthesis in microorganisms being used for Single Cell Oil production. *Biochimie*. 2004, 86, σσ. 807-815.

69. **Maddalena Rossi, Alberto Amaretti, Stefano Raimondi and Alan Leonardi.** Getting Lipids for Biodiesel Production from Oleaginous Fungi . *intechopen*. [Ηλεκτρονικό] <http://cdn.intechopen.com/pdfs-wm/22994.pdf>.
70. Biofuels 2020 A policy driven logistics and business challenge. [Ηλεκτρονικό] http://www.dnv.com/binaries/biofuels%202020%20position%20paper_tcm4-434417.pdf.
71. Βιομάζα. *Κέντρο Ανανεώσιμων Πηγών Ενέργειας*. [Ηλεκτρονικό] http://www.cres.gr/energy-saving/images/pdf/biomass_guide.pdf.
72. Institute for Energy Resource. [Ηλεκτρονικό] 2012. <http://www.instituteforenergyresearch.org/2012/12/07/fossil-fuels-still-king-in-eias-annual-energy-outlook-2013/>.
73. *Εγκυκλοπαίδεια Πάπυρος Λαρούς Μπριτάνικα*. Τόμ. 54.
74. **Δήμας, Κ.** Ημερίδα: "Παραγωγή Βιοαιθανόλης από Γλυκό Σόργο". [Ηλεκτρονικό] <http://www.sweethanol.eu/upload/Dr%20Kitsios.pdf>.
75. **Matthew B. Whitfield, Mari S. Chinn, Matthew W. Veal.** Processing of materials derived from sweet sorghum for biobased products. *Industrial Crops and Products*. 2012, Τόμ. 37, 1, σσ. 362-375.
76. [Ηλεκτρονικό] America's Research based Learning Network, 2014. http://www.extension.org/pages/26634/sweet-sorghum-for-biofuel-production#.Uy1Uj_l_t4D.
77. **Carla E. Shoemaker and David I. Bransby, Department of Agronomy and Soils, U.S.A.** The Role of Sorghum as a Bioenergy Feedstock. [Ηλεκτρονικό] http://www.swcs.org/documents/resources/Chapter_9__Shoemaker__Sorghum_C07AF2168027B.pdf.
78. [Ηλεκτρονικό] Biofuels.gr. <http://www.biofuels.gr/energy-crops/sweet-sorghum/>.
79. **Mette Hedegaard Thomsen, Anders Thygesen, Anne Belinda Thomsen.** Hydrothermal treatment of wheat straw at pilot plant scale using a three-step reactor system aiming at high hemicellulose recovery, high cellulose digestibility and low lignin hydrolysis. *Bioresource Technology*. 2008, Τόμ. 99, 10, σσ. 4221-4228.
80. **Xin-she Li, Bu-shi Lu, Hai-Long Li, Tao Yin.** Production of Microbial Oils fermented by Two-step Fermentation with Corn stalk. *Procedia Environmental Sciences*. 2012, Τόμ. 12, σσ. 432-438.
81. **Leonidas Matsakas, Paul Christakopoulos.** Optimization of ethanol production from high dry matter liquefied dry sweet sorghum stalks. *Biomass and Bioenergy*. 2013, Τόμ. 51, σσ. 91-98.
82. **P. Christakopoulos, B. J. Macris, D. Kekos.** Direct fermentation of cellulose to ethanol by *Fusarium oxysporum*. *Enzyme Microb. Technol.* 1989, Τόμ. 11, σσ. 236-239.

83. **G.L.Miller.** Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*. 1959, Τόμ. 31, 3, σσ. 426-428.
84. BioMed Central. *Overview and appraisal of lipid extraction methods*. [Ηλεκτρονικό]
<http://www.biomedcentral.com/content/supplementary/2190-4715-24-13-S1.PDF>.
85. **J.Folch, M. Lees, G.H.S.Stanley.** A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 1957, Τόμ. 226, σσ. 497-509.
86. Chloroform MSDS. [Ηλεκτρονικό]
<http://www.sciencelab.com/msds.php?msdsId=9927133>.
87. Methyl Alcohol MSDS. [Ηλεκτρονικό]
<http://www.sciencelab.com/msds.php?msdsId=9927227>.
88. **Lie, S.** The EBC-Ninhydrin Method for Determination of Free Alpha Amino Nitrogen. *EBC Analysis Committee*. 1973, Τόμ. 79, 1, σσ. 37-41.
89. **Oliver H. Lowry, Nira J. Rosebrough, A. Lewis Farr, Rose J. Randall.** Protein Measurement with Folin Phenol Reagent. *J. Biol. Chem.* 1951, Τόμ. 193, σσ. 265-275.
90. **Hami Kaboosi, Bita Behbahani.** An overview on effective parameters in production of single cell oil by microorganisms especially the fungus of *Mortierella isabellina*. *Annals of Biological Research*. 2012, Τόμ. 3, 3, σσ. 1650-1654.
91. **S. Fakas, S. Papanikolaou, M. Galiotou-Panayotou, M. Komaitis, G. Aggelis.** Organic nitrogen of tomato waste hydrolysate enhances glucose uptake and lipid accumulation in *Cunninghamella echinulata*. *Journal of Applied Microbiology*. 2008, Τόμ. 105, σσ. 1062-1070.
92. **Yi-Huang Changa, Ku-Shang Chang, Hung-Der Jang, Chuan-Liang Hsu.** Effect of carbon source and high C/N ratio in the cellulosic hydrolysate- based media on the crude lipid contents and unsaturated fatty acid compositions of yeasts .
93. **C.N. Economou, G. Aggelis, S. Pavlou, D.V. Vayenas.** Modeling of Single-Cell Oil production under nitrogen-limited and substrate inhibition conditions. *Biotechnology and Bioengineering*. 2010.
94. **Ch.N. Economou, A. Makri, G. Aggelis, S. Pavlou, D.V. Vayenas.** Semi-solid state fermentation of sweet sorghum for the biotechnical production of single cell oil. *Bioresource Technology*. Elsevier, 2010, Τόμ. 101, σσ. 1385-1388.
95. Lawrence Berkeley National Laboratory . [Ηλεκτρονικό] US Department of Energy.
<http://www.lbl.gov/Publications/YOS/Feb/>.