



Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων & Διατροφής

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Αξιοποίηση Αγρο-Διατροφικών Αποβλήτων

Μέρος ΙΙΙ: Βιοτεχνολογικές μέθοδοι αξιοποίησης

Ενότητα ΙΙΙ.2: Μικροβιακή παραγωγή λιποειδών

Δημήτρης Π. Μακρής *PhD DIC*

Αναπληρωτής Καθηγητής

dimitrismakris@uth.gr

Εισαγωγή

Οι ελαιογόνοι μικροοργανισμοί είναι ελαιογόνα είδη των οποίων η περιεκτικότητα σε έλαιο υπερβαίνει το 20% του βάρους της βιομάζας. Τα μικροβιακά έλαια, τα οποία αποκαλούνται σε μονοκυτταρικά έλαια (single-cell oils – SCO), παράγονται από μερικούς ελαιογόνους μικροοργανισμούς, όπως ζύμες, μύκητες, βακτήρια και μικροάλγη.

Ενώ οι ευκαριωτικές ζύμες, μύκητες και μικροάλγη μπορούν να συνθέσουν τριακυλγλυκερόλες (TAG), που είναι παρόμοιας σύνθεσης με τα φυτικά έλαια, τα προκαρυωτικά βακτήρια συνθέτουν ειδικά λίπη.

Εν συγκρίσει με τις ζύμες, οι ελαιογόνοι μύκητες και μικροάλγη έχουν μικρότερη ικανότητα συσσώρευσης λιπών. Εντούτοις, τα προφίλ των λιπαρών οξέων είναι διαφορετικά στα έλαια ζυμών, ειδικά στην αναλογία των λιπαρών οξέων C20 και των ω -6.

Table 1. Lipid accumulation and fatty acid profiles of selected oils plants and oleaginous microorganisms.

	Lipid content (% w/w)	Fatty acid composition (% w/w)							Other
		C14:0	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3	
Oilseed									
Peanut	50		11	0	2	48	32		C20:0 (1%)
Rapeseed	45		4		2	62	22	10	
Sunflower	45		7		5	19	68	1	
Soybean	20		11		4	24	54	7	
Tree fruits and kernels									
Coconut	50	18	9		3	6	2		C4-C10 (15%); C12:0 (47%)
Olive	6 kg/l		13	1	3	71	10	1	C20 (1%)
Palm	50	1	44		4	38	10	1	C4-C10 (1%); C12:0 (1%)
Palm kernel		16	8		3	15	2		C4-C10 (4%); C12:0 (48%)
Microorganismes									
Yeast									
<i>Cryptococcus albidus</i>	60		12	1	3	73	12		
<i>Lipomyces starkeyi</i>	63		34	6	5	51	3		
<i>Rhodospiridium toruloides</i>	66		18	3	3	66			C23:0 (3%); C24:0 (6%)
<i>Rhodotorula glutinis</i>	72		37	1	3	47	8		
<i>Yarrowia lipolytica</i>	36		11	6	1	28	51		
<i>Rhizopus arrhizus</i>	57		18		6	22	10	12	
Fungi									
<i>Mortierella isabellina</i>	50		29		3	55	3	3 (n-6)	
<i>Mucor circinelloides</i>	25		22		5	38	10	15 (n-6)	
<i>Pythium ultimum</i>	48		15		2	20	16	1	C4-C10 (7%); C20:1 (4%); C20:4 (15%); C20:5 (12%)
<i>Aspergillus terreus</i>		2	23		trace	14	40		C21 n-3 (21%)
<i>Pellicularia praticola</i>			8		2	11	72		C21 n-3 (2%)
<i>Claviceps purpurea</i>			23		2	19	8		12-OH-C18:1 (42%)
Bacteria									
<i>Rhodococcus opacus</i>	19–26				3–19	6–74			
Microalgae									
<i>Chlorella</i> sp.	28–32		7–19	10,9	1–4	8–9	1–14	16–19	C15 (5%); C16:2 (11%)
<i>Chlorella zofingiensis</i>	28–32		23	2	2	36	18	8	C16:2 (7%); C16:3 (2%)
<i>Cryptocodinium cohnii</i>	23	13	23		3	8			C12 (3%); C22:6 (50%)
<i>Chatoceros muelleri</i>	31–68	18–40	5–40		0–25	0–4	0–5	0–5	C12 (6–20%); C16:2 (0–8%)
<i>Schizochytrium linacinum</i>	50–77	3–4	54–60		1–4				C22:5:2 (4–6%); C22:6 (29–35%)

Εισαγωγή

Η περιεκτικότητα και η σύσταση των λιπαρών οξέων των SCO μπορεί να κυμαίνεται, ανάλογα με τον τύπο της διεργασίας και το χρησιμοποιούμενο υπόστρωμα. Οι κύριοι παράγοντες για την αξιολόγηση του δυναμικού παραγωγής ελαίου ενός μικροοργανισμού είναι:

1. Η ποσότητα του παραγόμενου ελαίου. Όσο περισσότερο έλαιο μπορεί να συσσωρεύσει ένα μικροβιακό κύτταρο, τόσο πιο ελκυστικό είναι από την οπτική γωνία της εμπορικότητας.
2. Η ποιότητα του παραγόμενου ελαίου. Το προφίλ των λιπαρών οξέων ποικίλει από μικροοργανισμό σε μικροοργανισμό. Μερικοί μύκητες και μικροάλγη παράγουν πολυακόρεστα λιπαρά οξέα με μήκος ανθρακικής αλυσίδας και βαθμό ακορεστότητας υψηλότερα από αυτά που υπάρχουν σε φυτικά έλαια.
3. Την ικανότητα χρήσης φθηνών πρώτων υλών.

Αυτές οι παράμετροι είναι βασικές στην σύγχρονη έρευνα που αφορά στην παραγωγή μικροβιακών ελαίων.

Μικροοργανισμοί

Ζύμες

Οι ελαιογόνες ζύμες, έχοντας το 20% του ξηρού τους βάρους αποτελούμενο από λιπίδια, παρουσιάζουν υψηλή ανάπτυξη και ελαιοπεριεκτικότητα. Οι περισσότερες ελαιογόνες ζύμες μπορούν να συσσωρεύσουν λίπος σε επίπεδα πέραν του 40% του ξηρού τους βάρους και το πολύ 70% υπό συνθήκες έλλειψης διατροφικών στοιχείων.

Εντούτοις, η περιεκτικότητα σε λίπος και η λιπιδική σύσταση διαφέρει ανάμεσα στα διάφορα είδη. Οι πλέον γνωστές ελαιογόνες ζύμες ανήκουν στα γένη *Candida*, *Cryptococcus*, *Lipomyces*, *Rhodosporidium*, *Rhodotorula*, *Rhizpus*, *Trichosporon* και *Yarrowia*.

Οι ζύμες είναι ικανές να χρησιμοποιούν αρκετές διαφορετικές πηγές άνθρακα για την παραγωγή κυτταρικής μάζας και λιπιδίων. Αυτές οι πηγές μπορεί να είναι η γλυκόζη, η ξυλόζη, η γλυκερόλη, το άμυλο, τα υδρολύματα κυτταρίνης και βιομηχανικά οργανικά απόβλητα.

Μικροοργανισμοί

Ζύμες

Σε όλες τις περιπτώσεις, η συσσώρευση λιπιδίων γίνεται υπό συνθήκες έλλειψης θρεπτικών συστατικών που δεν είναι ο άνθρακας. Όταν τα κύτταρα δεν έχουν επαρκή σημαντικά θρεπτικά συστατικά, συνήθως άζωτο, τότε συνεχίζουν ν' αφομοιώνουν άνθρακα, τον οποίο μετατρέπουν σε αποθηκευτικό λίπος.

Εντούτοις, τα κύτταρα παύουν να πολλαπλασιάζονται γιατί το άζωτο είναι απαραίτητο για την βιοσύνθεση των πρωτεϊνών και των νουκλεϊκών οξέων. Αυτό το μοτίβο παρατηρείται σε ελαιογόνες ζύμες και μύκητες αλλά όχι σε φωτοσυνθετικά ή ετερότροφα άλγη.

Μικροοργανισμοί

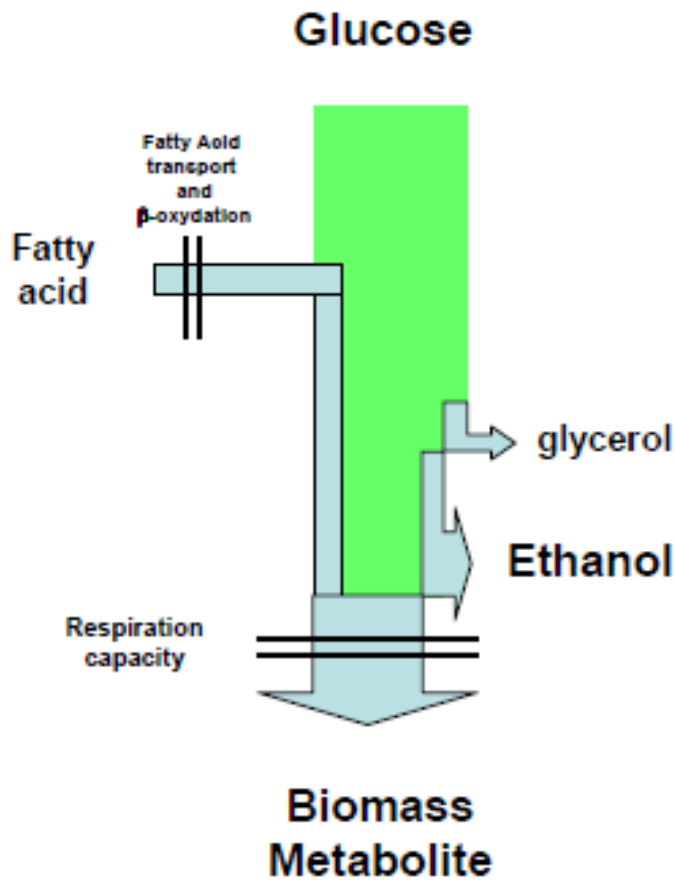
Μύκητες

Οι ελαιογόνοι μύκητες μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την παραγωγή υποκατάστατων βούτυρου κακάο. Το βούτυρο κακάο έχει υψηλή περιεκτικότητα σε κορεσμένα λιπαρά οξέα που ανέρχεται το πολύ σε 60%. Από αυτά, 35% είναι στεαρικό και 25% παλμιτικό οξύ.

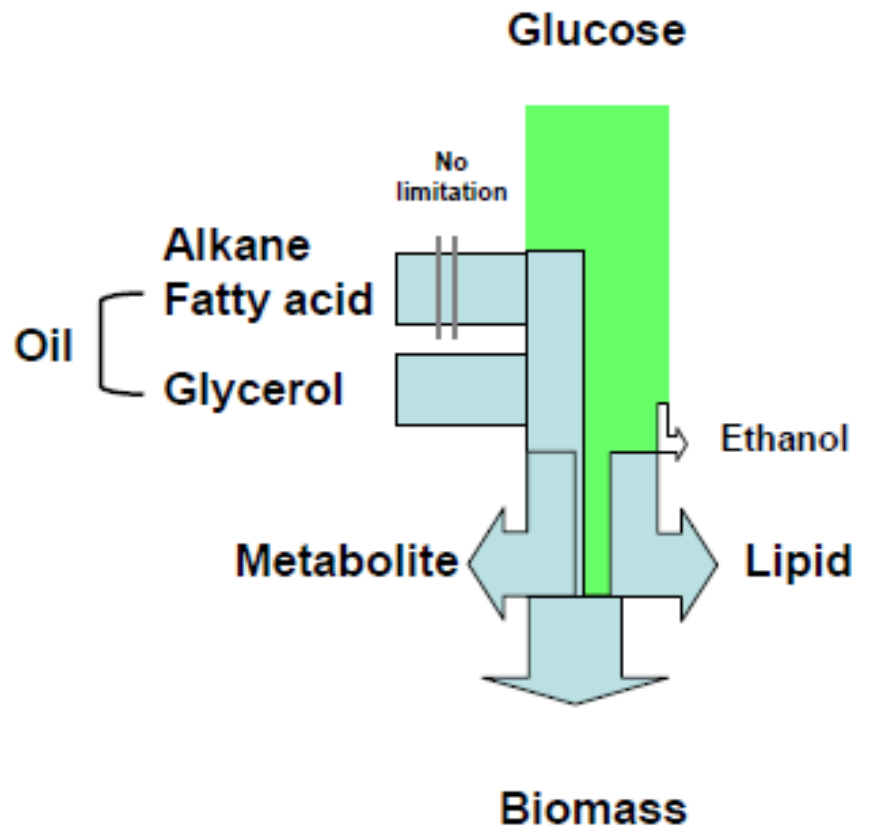
Οι πηγές άνθρακα μπορούν να επηρεάσουν ισχυρά την παραγωγή και σύνθεση των λιπαρών οξέων στα λιπίδια των μυκήτων, εξαιτίας των διαφορών στον μεταβολισμό. Γλυκόζη, λακτόζη, άμυλο, έλαια κτλ. έχουν χρησιμοποιηθεί ως πηγές άνθρακα για την παραγωγή λιπιδίων από μύκητες.

Η συσσώρευση των λιπιδίων εξαρτάται κυρίως από την φυσιολογία του μικροοργανισμού, την έλλειψη θρεπτικών συστατικών και τις περιβαλλοντικές συνθήκες (θερμοκρασία, pH). Επηρεάζεται επίσης από την παραγωγή δευτερογενών μεταβολιτών, όπως η αιθανόλη και το κιτρικό οξύ.

A *S. cerevisiae*



B *Y. lipolytica*



Υποστρώματα

Η διεργασία παραγωγής μικροβιακού λίπους κοστίζει περισσότερο από την παραγωγή φυτικών ή ζωικών ελαίων, πρωτίστως επειδή οι πηγές άνθρακα που χρησιμοποιούνται στις ζυμώσεις καλύπτουν μια σημαντική αναλογία.

Πολλά υλικά χαμηλού κόστους έχουν μελετηθεί για την παραγωγή μικροβιακού λίπους. Για να καταστεί η παραγωγή οικονομικώς βιώσιμη, ο πιο ελκυστικός τρόπος είναι παραγωγή μικροβιακού ελαίου με συμπαραγωγή υψηλής αξίας παραπροϊόντων, με χρήση χαμηλού κόστους βιο-αποβλήτων.

Μια μεγάλη ποικιλία υποστρωμάτων έχουν χρησιμοποιηθεί ως πηγές άνθρακα για ελαιογόνους μικροοργανισμούς. Αυτά τα υποστρώματα συμπεριλαμβάνουν σάκχαρα, μελάσες, τυρόγαλα, γλυκερόλη, υδρολύματα αμύλου, υδρολύματα υπολειμμάτων ρυζιού, οργανικά οξέα και αιθανόλη.

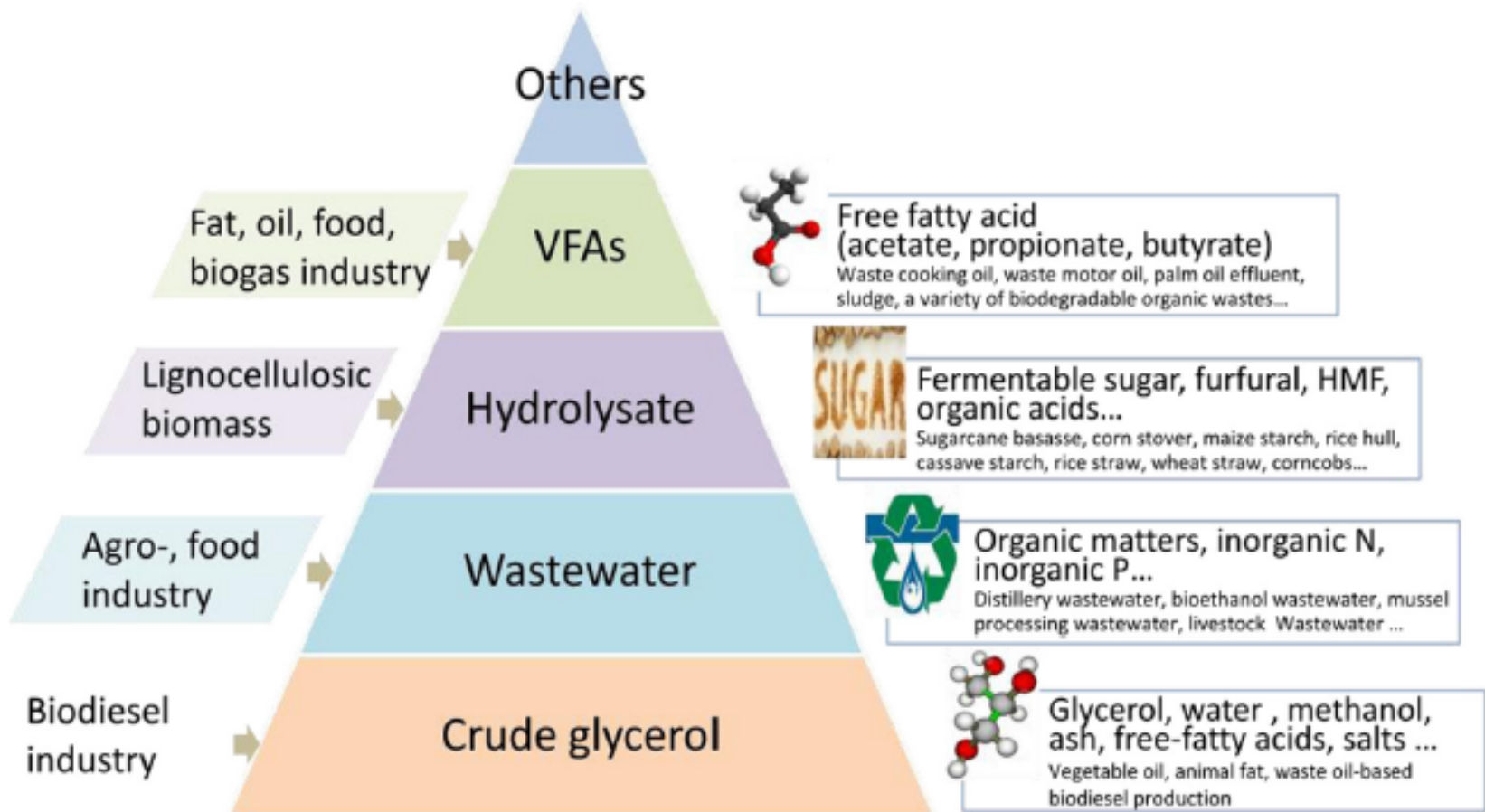
Υποστρώματα

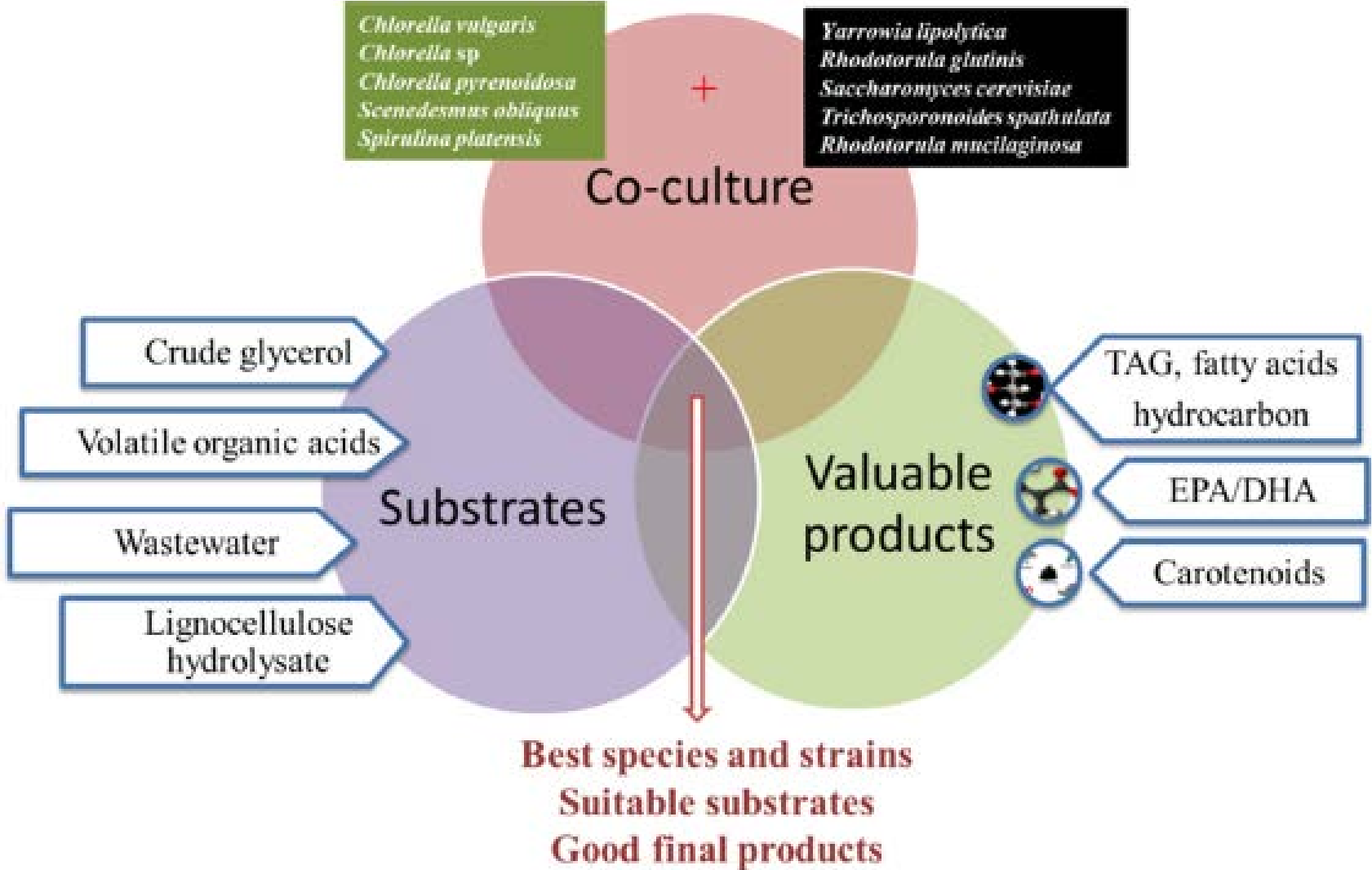
Επίσης, στην διεργασία βιομετατροπής των χαμηλού κόστους υποστρωμάτων σε λιπίδια, θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη τα φυσιολογικά χαρακτηριστικά των ζυμών και των υποστρωμάτων ζύμωσης.

Η χρησιμοποίηση υποστρωμάτων χαμηλού κόστους είναι κρίσιμη για αμφότερα την μείωση του κόστους της συνολικής διεργασίας και την αποφυγή απόρριψης στο περιβάλλον υλικών υψηλού ρυπαντικού φορτίου.

Γενικά, οι πολλαπλές πρώτες ύλες που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή μικροβιακού λίπους διακρίνονται σε δύο κατηγορίες, τα υδρόφιλα και τα υδρόφοβα. Με βάση αυτό, υπάρχουν δύο τύποι σύνθεσης λιπαρών στους ελαιογόνους μικροοργανισμούς.

Η “*de novo*” συσσώρευση λιπών είναι μια διεργασία που πραγματοποιείται με υδρόφιλα υλικά και συνήθως απαιτεί καλλιέργεια με περιορισμό πηγών αζώτου. Αντιθέτως, η “*ex novo*” παραγωγή λιπών γίνεται μέσω ζύμωσης υδρόφοβων υλικών.





Υποστρώματα

Γλυκερόλη

Η ακατέργαστη γλυκερόλη (crude glycerol) περιέχει περίπου 80% γλυκερόλη, 10% νερό, 7% τέφρα, και λιγότερο από 1% μεθανόλη. Είναι το κύριο υποπροϊόν της παραγωγής βιοντίζελ. Κατά την παραγωγή 10 kg βιοντίζελ, δημιουργείται ως υποπροϊόν 1 kg γλυκερόλης.

Εντούτοις, ο καθαρισμός της ακατέργαστης γλυκερόλης παρουσιάζει σημαντικό κόστος. Ως πηγή άνθρακα, η ακατέργαστη γλυκερόλη έχει πολλά πλεονεκτήματα σε σχέση με τα σάκχαρα, όπως χαμηλότερο κόστος, καλύτερη διαθεσιμότητα, λιγότερη έκλυση CO₂ κατά την ζύμωση και μικρότερο ανταγωνισμό με την παραγωγή τροφίμων και ζωοτροφών.

Η ακατέργαστη γλυκερόλη έχει το πλεονέκτημα να χρησιμοποιείται σε μικροβιακές ζυμώσεις χωρίς την ανάγκη καθαρισμού. Οι ζύμες που μπορούν να χρησιμοποιήσουν γλυκερόλη ανήκουν στα γένη *Candida*, *Yarrowia*, *Rhodospiridium*, *Rhodotorula*, *Cryptococcus*, *Trichosporonoides*, *Lipomyces* and *Schizosaccharomyces*.

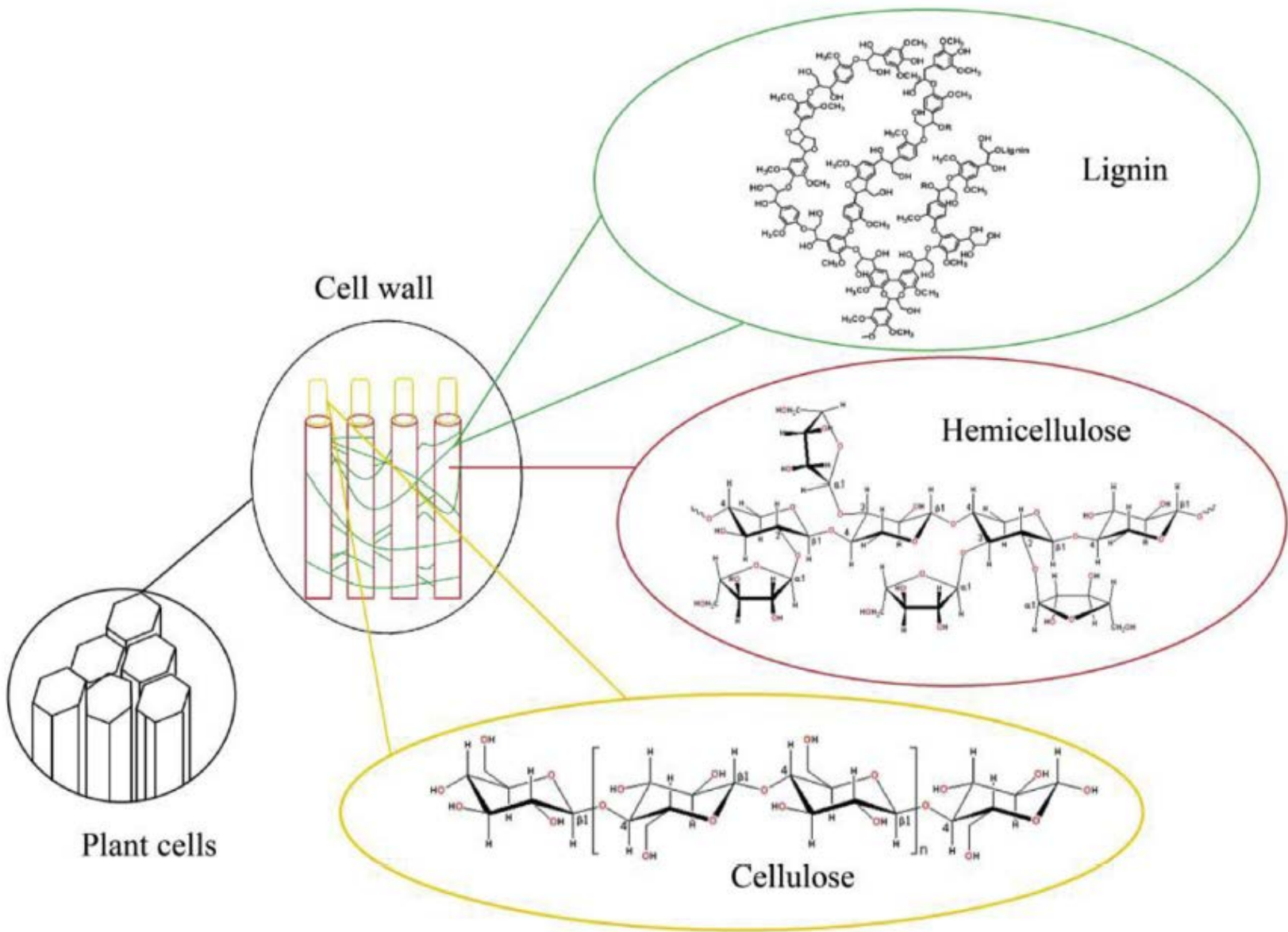
Υποστρώματα

Λιγνινοκυτταρινούχες ύλες

Τα λιγνινοκυτταρινούχα υλικά αποτελούν ένα σημαντικό κλάσμα των αγροδιατροφικών υποπροϊόντων, των αστικών στερεών αποβλήτων και των δασικών υπολειμμάτων, και είναι ο πιο άφθονος ανανεώσιμος οργανικός πόρος.

Χάρη στην υψηλή διαθεσιμότητα και το χαμηλό ρίσκο επίδρασης στις τιμές των τροφίμων, τα λιγνινοκυτταρινούχα υλικά έχουν γίνει πολύ ελκυστικά όσον αφορά στην μικροβιακή παραγωγή λιποειδών.

Τα λιγνινοκυτταρινούχα υλικά συνήθως αποτελούνται από τρία διαφορετικά πολυμερή, την κυτταρίνη, την ημι-κυτταρίνη και την λιγνίνη, σε ποικίλες αναλογίες που κυμαίνονται με το φυτικό είδος.



Υποστρώματα

Λιγνινοκυτταρινούχες ύλες

Η κυτταρίνη και η ημι-κυτταρίνη, ως οι δύο μορφές βιοπολυμερών που αποτελούνται από σάκχαρα, μπορούν να υδρολυθούν δίνοντας απλές εξόζες (γλυκόζη) ή πεντόζες (ξυλόζη).

Επειδή οι λιγνινοκυτταρινούχες ύλες περιέχουν διάφορες ουσίες, η κύρια πρόκληση στην χρήση αυτών των υλικών είναι η επαρκής μετατροπή των διαφόρων σακχάρων από τις ελαιογόνες ζύμες, σε υψηλής ποιότητας λιπίδια.

Οι περισσότερες ελαιογόνες ζύμες καταναλώνουν σάκχαρα με μια αλληλουχία, επιδεικνύοντας ισχυρή προτίμηση στην γλυκόζη. Μια πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι από 418 στελέχη ζυμών που μελετήθηκαν, το στέλεχος *Rhodospiridium fluviale* DMKU-SP314 βρέθηκε να δίνει μέγιστη παραγωγή λίπους (7.9 g/L) από μίγμα γλυκόζης και ξυλόζης 2:1, το οποίο συνήθως υπάρχει σε λιγνινοκυτταρινούχες ύλες.

Βιβλιογραφία

Papanikolaou S., Aggelis G., **2011**. Lipids of oleaginous yeasts. Part II: Technology and potential applications. **European Journal of Lipid Science & Technology**, 113, 1052–1073.

Thevenieau F., Nicaud J.-M., **2013**. Microorganisms as sources of oils. **Oilseeds and Fat Crops & Lipids**, 20, D603.

Qin L., Liu L., Zeng A.-P., Wei D., **2017**. From low-cost substrates to Single Cell Oils synthesized by oleaginous yeasts. **Bioresource Technology**, 245, 1507–1519.