

ΑΞΙΟΠΟΙΗΣΗ ΒΙΟΑΠΟΒΛΗΤΩΝ ΓΙΑ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΕΙΚΟΣΙΔΙΕΞΑΝΟΪΚΟΥ ΟΞΕΟΣ ΑΠΟ ΜΙΚΡΟΦΥΚΗ ΜΕΣΩ ΜΙΑΣ ΔΙΕΡΓΑΣΙΑΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ ΗΜΙΔΙΑΛΕΙΠΟΝΤΟΣ ΕΡΓΟΥ**Α. Χαλιμά^{1,*}, Α. Χατζηδάκη¹, Γ. Ταξειδης¹, Α. Καρναούρη¹, Ε. Τόπακας¹**¹ Ομάδα IndubioCat, Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας, Σχολή Χημικών Μηχανικών, ΕΜΠ, Αθήνα, Ελλάδα(*anq.chalima@gmail.com)**ΠΕΡΙΛΗΨΗ**

Η σκοτεινή ζύμωση βιοαποβλήτων οδηγεί στην παραγωγή οργανικών πτητικών οξέων, τα οποία είναι βλαβερά για το περιβάλλον. Για το λόγο αυτό επιδιώκεται η βιομετατροπή τους σε χρήσιμες ουσίες υψηλής προστιθέμενης αξίας. Σκοπός της παρούσας εργασίας αποτέλεσε ο σχεδιασμός ενός πρωτόκολλου καλλιέργειας του ετερότροφου μικροφύκου *Cryptocodium cohni* στο υγρό κλάσμα της επεξεργασίας βιοαποβλήτων για την παραγωγή του εικοσιδιεξανοϊκού οξέος. Για το σκοπό αυτό αρχικά πραγματοποιήθηκαν καλλιέργειες του στελέχους *C. cohni* ATCC 30772 σε διαφορετικά πτητικά οργανικά οξέα για να εξακριβωθεί η ικανότητα ανάπτυξης σε αυτά. Στη συνέχεια σχεδιάστηκε και πραγματοποιήθηκε καλλιέργεια ημιδιαλείποντος έργου με παροχή υγρού κλάσματος σκοτεινής ζύμωσης από απόβλητα τροφίμων και κηπευτικών. Ύστερα από 60 h ανάπτυξης προέκυψε βιομάζα με περιεκτικότητα DHA 29.8 % των ολικών λιπαρών οξέων. Για την επιπλέον ενίσχυση της παραγωγής του ω-3, εξετάζονται οι διάφορες συνθήκες καλλιέργειας με στόχο τη βελτιστοποίηση της διαδικασίας καλλιέργειας.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τα τελευταία χρόνια η ετερότροφη καλλιέργεια μικροφυκών για τη συλλογή μεταβολιτών έχει προσελκύσει ιδιαίτερο ερευνητικό ενδιαφέρον. Αυτό οφείλεται όχι μόνο στην ποικιλία χρήσιμων προϊόντων που προσφέρουν αυτοί οι μικροοργανισμοί, αλλά και στη δυνατότητα συγκέντρωσης υψηλής πυκνότητας βιομάζας απουσία φωτός. Ωστόσο το κόστος των θρεπτικών υλών για την καλλιέργεια αποτελεί ακόμη ένα πρόβλημα που πρέπει να αντιμετωπιστεί. Στα πλαίσια μίας κυκλικής οικονομίας, η αξιοποίηση βιοαποβλήτων για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών εξαλείφει το κόστος των πρώτων υλών και εξασφαλίζει τη μείωση της απελευθέρωσής τους στο περιβάλλον.

Το ετερότροφο μικροφύκος *C. cohni* είναι γνωστό για την ικανότητα παραγωγής υψηλού ποσοστού εικοσιδιεξανοϊκού οξέος (DHA, c22:6)¹. Το DHA πρόκειται για ένα εκ των δύο απαραίτητων ω-3 λιπαρών οξέων με σημαντικά οφέλη για την καρδιακή και νευρική λειτουργία του ανθρώπινου οργανισμού². Ως εκ τούτου η σημασία της πρόσληψης του από τη διατροφή έχει επισημανθεί από πολλούς οργανισμούς υγείας³. Έχει ήδη βρεθεί πως ο μικροοργανισμός αυτός έχει την ικανότητα να αναπτύσσεται παρουσία οξικού οξέος, αξιοποιώντας το ως βασική πηγή άνθρακα για το μεταβολισμό του⁴. Η διεργασία της σκοτεινής ζύμωσης (dark fermentation) πρόκειται για μία διεργασία αναερόβιας χώνευσης βιοαποβλήτων, κατά την οποία το τελευταίο στάδιο της μεθανογένεσης έχει παρεμποδιστεί. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή υδρογόνου και αξιόλογου ποσοστού οργανικών πτητικών οξέων και κυρίως οξικού οξέος⁵. Τόσο για την προώθηση της σκοτεινής ζύμωσης ως τεχνικής παραγωγής βιο-υδρογόνου, όσο και για την αντιμετώπιση της περιβαλλοντικής μόλυνσης που προκαλείται από την απελευθέρωση των οργανικών πτητικών οξέων, κρίνεται απαραίτητη η αξιοποίησή τους. Η σκοτεινή ζύμωση ή οξεογένεση, για την παραγωγή αυτών των οξέων, μπορεί να συνδυαστεί με την χρήση τους ως πηγή άνθρακα για την καλλιέργεια του *C. cohni* και την παραγωγή ω-3 λιπαρού οξέος. Έτσι δημιουργείται η προοπτική μίας αποτελεσματικής διεργασίας βιομετατροπής στα πλαίσια της έννοιας του «βιοδιυλιστηρίου»⁶.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Το μικροφύκος *C. cohnii* ATCC 30772 διατηρήθηκε σε υγρές καλλιέργειες παρουσία του θρεπτικού μέσου ATCC 460, σύμφωνα με τις προδιαγραφές της εταιρίας. Για τη διατήρησή του πραγματοποιούνταν ανακαλλιέργεια κάθε 14 ημέρες, ενώ προετοιμάστηκαν και κυτταρικά αποθέματα σε γλυκερόλη που αποθηκεύτηκαν σε θερμοκρασία -80°C.

Για το σκοπό της εργασίας πραγματοποιήθηκαν αρχικά καλλιέργειες διαλείποντος έργου σε φιάλες Erlenmeyer με διαφορετικά οργανικά οξέα ως πηγή άνθρακα. Το θρεπτικό μέσο που χρησιμοποιήθηκε περιελάμβανε, εκτός της πηγής άνθρακα, εκχύλισμα ζύμης ως βασική πηγή αζώτου και μίγμα αλάτων και ιχνοστοιχείων θαλασσινού νερού. Η διατήρηση ενός σταθερού pH κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας πραγματοποιήθηκε με την αρχική προσθήκη ρυθμιστικού διαλύματος Tris/HCl 100 mM pH 6.5. Στα πλαίσια των πειραμάτων βελτιστοποίησης εξετάστηκε η ανάπτυξη σε εύρος θερμοκρασιών 20-30°C.

Οι καλλιέργειες ημιδιαλείποντος έργου πραγματοποιήθηκαν σε βιοαντιδραστήρες συνολικού όγκου 2 L (New Brunswick Scientific-BioFlo 310) σε όγκο εργασίας 1 L. Το θρεπτικό εντός του βιοαντιδραστήρα περιείχε μία μικρή αρχική ποσότητα οξικού ίση με 15 g/L, ενώ πραγματοποιούνταν προσθήκη καθαρού οξέος, μίγματος αυτών ή διηθήματος του υγρού κλάσματος σκοτεινής ζύμωσης βιοαποβλήτων (Πίνακας 1), με σκοπό την ταυτόχρονη ρύθμιση του pH και την παροχή πηγής άνθρακα.

Οι βιομάζες που συλλέχθηκαν από τις καλλιέργειες λυοφυλίωθηκαν και ακολούθησε εκχύλιση των λιπαρών βάσει μίας τροποποιημένης μεθόδου Folch⁷. Τα λιπαρά ξηράθηκαν για τη ζυγοσταθμική μέτρηση αυτών. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε εστεροποίηση και προσδιορισμός του προφίλ λιπαρών των κυττάρων με ανάλυση αέριας χρωματογραφίας.

Πίνακας 1. Σύσταση διαφορετικών παροχών βιοαντιδραστήρων ως προς τα πτητικά οργανικά οξέα

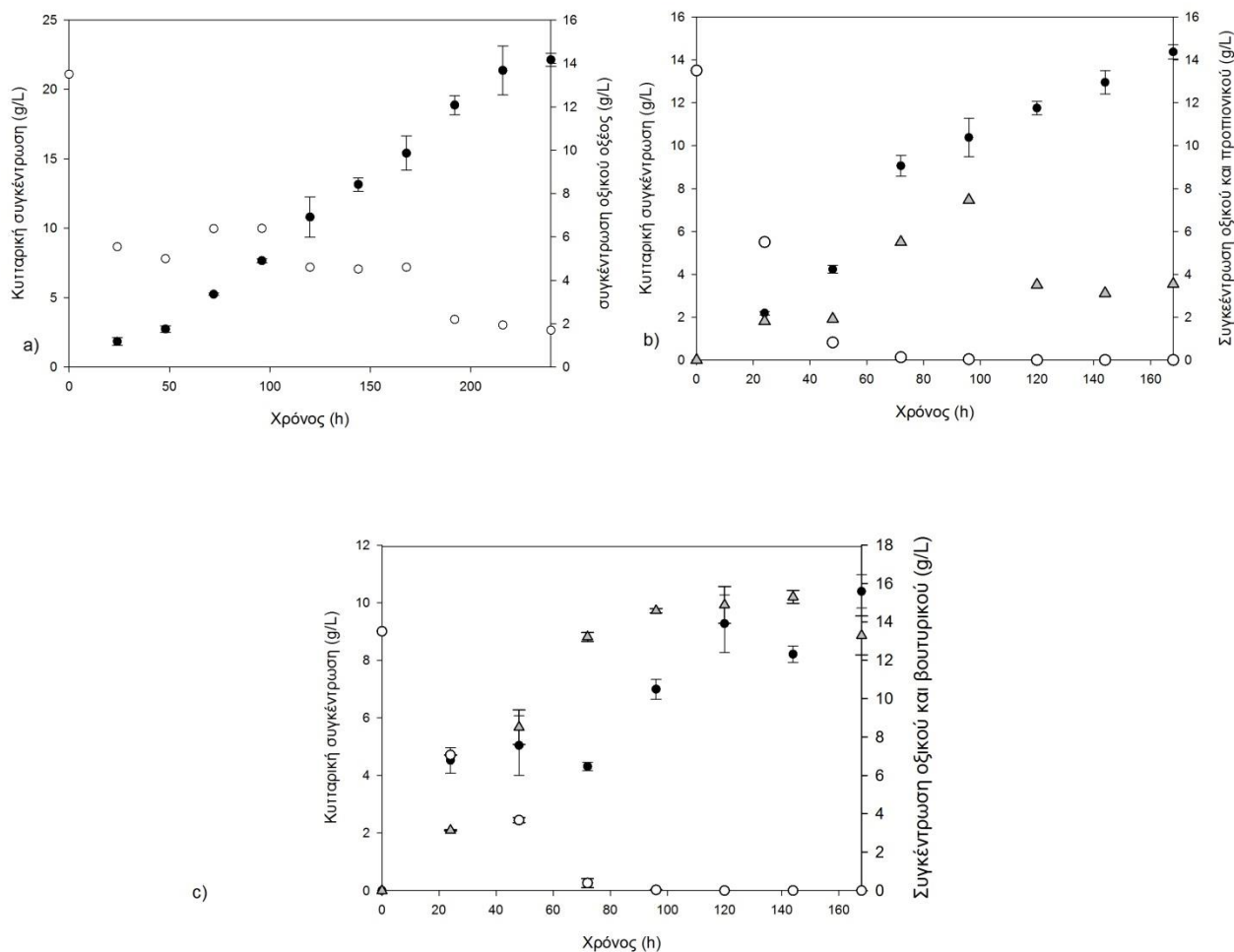
Τροφοδοσία οργανικών οξέων	Οξικό οξύ	Προπιονικό οξύ	Βουτυρικό οξύ	Βαλερικό οξύ	Καπροϊκό οξύ
Οξικό οξύ 33% (v/v)	350	-	-	-	-
Προπιονικό οξύ 25% (v/v)	-	247.5	-	-	-
Βουτυρικό οξύ 25% (v/v)	-	-	237.5	-	-
Διήθημα	5.1	2.7	3.5	0.92	1

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα αποτελέσματα των καλλιεργειών διαλείποντος έργου αποκάλυψαν την ικανότητα του στελέχους να αναπτύσσεται σε θρεπτικό με βασική πηγή άνθρακα το οξικό, αλλά και το προπιονικό και το βουτυρικό. Η αρχική συγκέντρωση οξέος, μεταξύ του εύρους 5-50 g/L, που οδήγησε σε μέγιστη παραγωγή βιομάζας ήταν 30 g/L για το οξικό οξύ, 10 g/L για το προπιονικό οξύ και 15 g/L για το βουτυρικό οξύ. Μέγιστη παραγωγή λιπαρών παρατηρήθηκε για όλα τα οξέα σε αρχική συγκέντρωση 15 g/L.

Η ανάγκη συλλογής περισσότερης βιομάζας, αλλά και διατήρησης της καλλιέργειας για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα, οδήγησε στην χρήση των καλλιεργειών ημιδιαλείποντος έργου. Η αρχική ποσότητα οξικού καταναλώθηκε πλήρως, με αποτέλεσμα τα κύτταρα να αρχίσουν, μετά την πλήρη εξάντληση αυτού, να καταναλώνουν την εξωτερική παροχή οξέος (Σχήμα 1). Το μέγιστο ποσοστό DHA παράχθηκε κατά την ανάπτυξη των κυττάρων σε προπιονικό οξύ (Σχήμα 2), ενώ η ανάπτυξη σε, οξινομένο με HCl σε τελικό pH 2.5, διήθημα υγρού κλάσματος

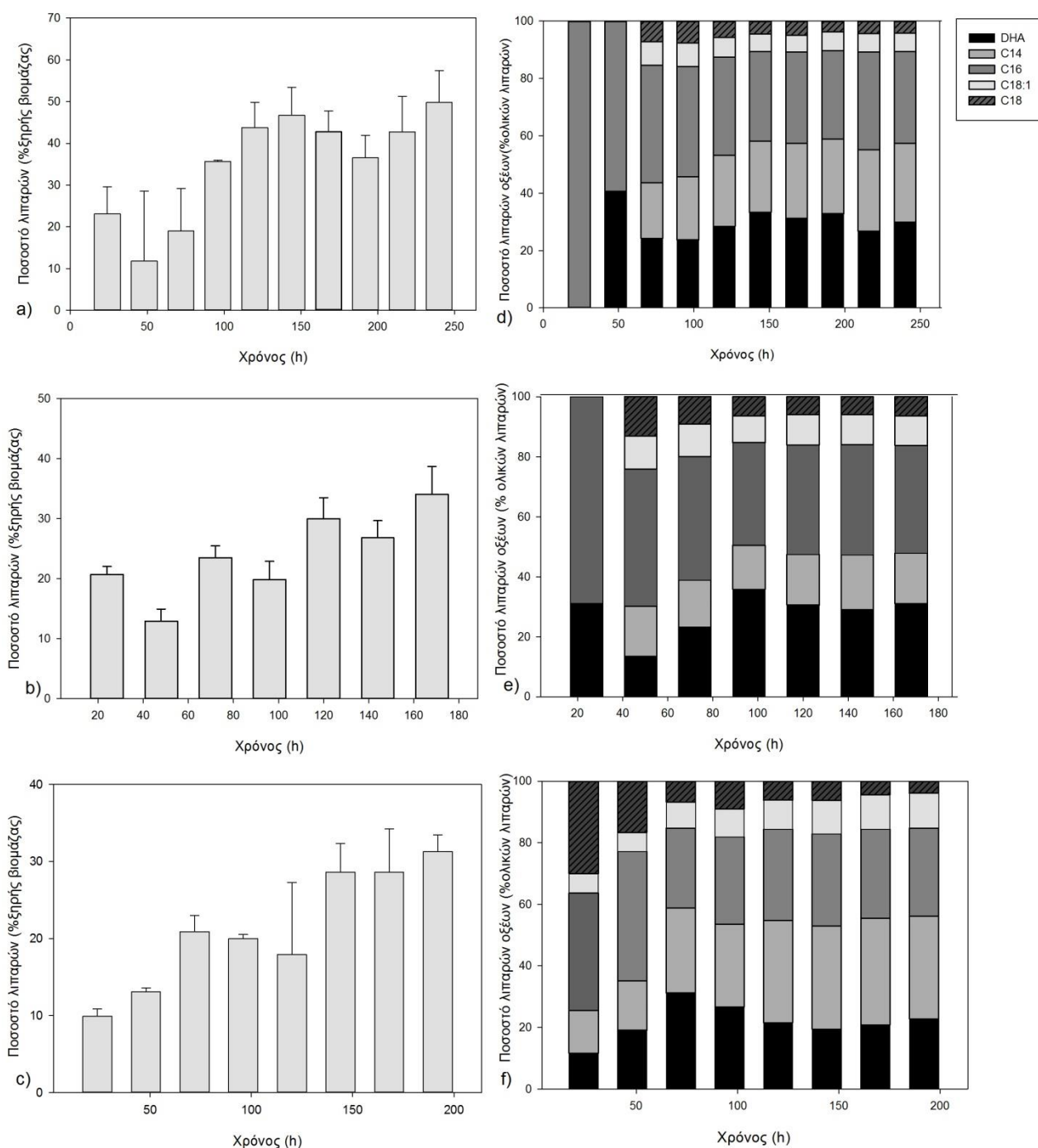
επεξεργασμένου βιοαποβλήτου οδήγησε σε ποσοστό 29.8% DHA επί των ολικών λιπαρών, ύστερα από 60 h ανάπτυξης.



Σχήμα 1. Αξιοποίηση οξικού (a), προπιονικού (b) και βουτυρικού (c) οξέος από κύτταρα *C. cohnii* σε βιοαντιδραστήρες ημιδιαλείποντος έργου. Με λευκούς κύκλους συμβολίζεται η συγκέντρωση οξικού, ενώ με γκρι τρίγωνα οι συγκεντρώσεις του προπιονικού και βουτυρικού αντίστοιχα.

Για την εξέταση της δυνατότητας βελτιστοποίησης της παραγωγής DHA από τα κύτταρα πραγματοποιήθηκαν επιπλέον καλλιέργειες διαλείποντος έργου με διαφορετικές θερμοκρασίες. Επιβεβαιώθηκε πως η βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης των κυττάρων είναι οι 27 °C, ενώ μέγιστο ποσοστό DHA ως προς τα συνολικά λιπαρά εμφάνισαν τα κύτταρα που αναπτύχθηκαν στους 23 °C (33.9 % έναντι 29.3 % για τους 27 °C).

Στα πλαίσια αναζήτησης μίας οικονομικότερης πηγής αζώτου για την καλλιέργεια του μικροφύκου, εξετάστηκαν διαφορετικές πηγές αζώτου σε θρεπτικό μέσο ενισχυμένο με βιταμίνες και ιχνοστοιχεία. Βέλτιστη παραγωγή βιομάζας, αλλά και λιπαρού επιτεύχθηκε με τη χρήση αμμωνιακών αλάτων.



Σχήμα 2. Ποσοστό λιπαρών ανά ξηρή βιομάζα συναρτήσει του χρόνου για το βιοαντιδραστήρα ημιδιαλείποντος έργου με τροφοδοσία οξικού (α), προπιονικού (β) και βουτυρικού (γ) οξέος και τα αντίστοιχα προφίλ λιπαρών (δ), (ε), (φ).

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Το στέλεχος *C. cohnii* ATCC 30772 μπορεί να αφομοιώσει για την ανάπτυξη του το οξικό, το προπιονικό και το βουτυρικό οξύ, καθώς και το διήθημα του υγρού κλάσματος που προκύπτει από τη σκοτεινή ζύμωση βιοαποβλήτων. Αποτελεί επομένως μία εφικτή μέθοδο βιοεξυγίανσης

με παράλληλη αξιοποίηση του οργανικού φορτίου των αποβλήτων στα πλαίσια ενός βιοδιυλιστηρίου. Για την αποδοτικότερη αξιοποίηση του κλάσματος της σκοτεινής ζύμωσης κρίνεται απαραίτητη η αύξηση της συγκέντρωσης των οργανικών οξέων σε αυτό, προκειμένου να μπορεί να διατηρεί την καλλιέργεια για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα, με μικρότερη παροχή όγκου για ρύθμιση του pH και παροχή άνθρακα. Επιπλέον, στους μελλοντικούς στόχους εντάσσεται και η εξέταση διαφορετικών λόγων C/N, με πηγή αζώτου τα αμμωνιακά, για προσδιορισμό της επίδρασης αυτού στη συσσώρευση λιπαρών.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα εργασία υλοποιήθηκε στα πλαίσια του ερευνητικού έργου «Volatile- [Biowaste derived volatile fatty acid platform for biopolymers, bioactive compounds and chemical building blocks]» και χρηματοδοτήθηκε από το Horizon 2020 της Ευρωπαϊκής Ένωσης (Grant agreement No. 720777). Η εργασία της υποψήφιας διδάκτωρ Αγγελίνα Χαλιμά χρηματοδοτήθηκε από το ίδρυμα ΕΛΙΔΕΚ στα πλαίσια της δράσης «1^η προκήρυξη υποτροφιών ΕΛΙΔΕΚ για υποψήφιους διδάκτορες», ενώ η Ανθή Καρναούρη θα ήθελε να ευχαριστήσει το Ίδρυμα Κρατικών Υποτροφιών για την υποτροφία στα πλαίσια μεταδιδακτορικής έρευνας.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Wynn J., Behrens P., Sundararajan A., Hansen J., Apt K. Single Cell Oils Microb. Algal Oils Second Ed. (2010) 115–129.
2. De Swaaf M. E., de Rijk T. C., Eggink G., Sijtsma L. J. Biotechnol. 70 (1999) 185–192.
3. Gupta, A., Barrow C. J., Puri M. Biotechnol. Adv. 30 (2012) 1733–1745.
4. Ratledge C., Kanagachandran K., Anderson A. J., Grantham D. J., Stephenson J. C. Lipids 36 (2001) 1241–1246.
5. Zhou A., Guo Z., Yang C., Kong F., Liu W., Wang A. J. Biotechnol. 168 (2013) 234–239.
6. Bastidas-Oyanedel, J. R., Bonk, F., Thomsen, M. H. & Schmidt, J. E. Rev. Environ. Sci. Biotechnol. 14 (2015) 473–498.
7. Folch, J., Lees, M. & Sloane-Stanley, G. H. J. Biol. Chem. 226 (1957) 497–509.