



ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
Π.Μ.Σ. «ΕΠΙΣΤΗΜΗ & ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΔΙΑΤΡΟΦΗ ΤΟΥ
ΑΝΘΡΩΠΟΥ»

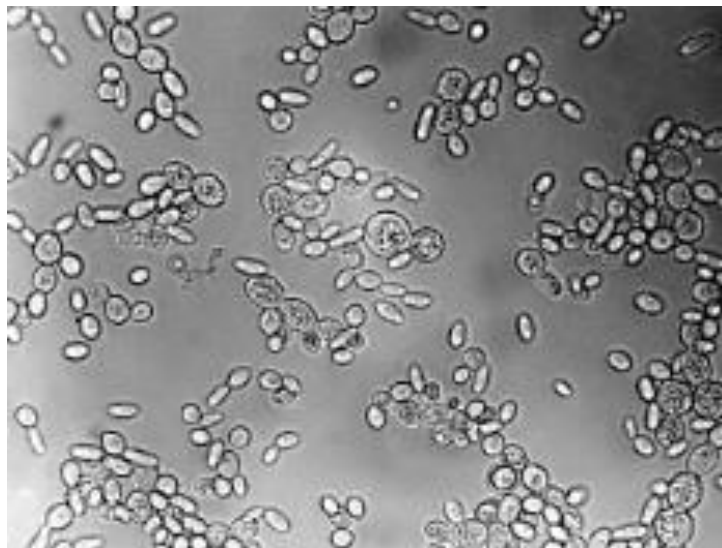
Κατεύθυνση «Βιοδιεργασίες Τροφίμων & Βιοδιυλιστήρια»
Εργαστήριο Μικροβιολογίας & Βιοτεχνολογίας Τροφίμων

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

Μεταπτυχιακός φοιτητής : Μάριος Α. Γεωργούσης

Επιβλέπων καθηγητής : Σεραφείμ Παπανικολάου, Επίκουρος καθηγητής

«Παραγωγή βιοτεχνολογικών προϊόντων κατά την αύξηση ευκαρυωτικών μικροοργανισμών σε υποστρώματα με βάση λιγνοκυτταρινούχα σάκχαρα και την ακάθαρτη γλυκερόλη»



Yeast , microscopy

Αθήνα ,2014

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

«Παραγωγή βιοτεχνολογικών προϊόντων κατά την αύξηση ευκαρυωτικών μικροοργανισμών σε υποστρώματα με βάση λιγνοκυτταρινούχα σάκχαρα και την ακάθαρτη γλυκερόλη»

Μεταπτυχιακός φοιτητής : Μάριος Α. Γεωργούσης

Τριμελής επιτροπή:

Σεραφείμ Παπανικολάου, Επίκουρος καθηγητής (Επιβλέπων)

Απόστολος Κουτίνας , Επίκουρος καθηγητής

Νικόλαος Στοφόρος, Αναπληρωτής καθηγητής

*Στους γονείς μου Ανδρέα και Αικατερίνη,
στα αδέρφια μου Κώστα και Στέλλα.*

*Η απόσταση δεν είναι τίποτα,
Το πρώτο βήμα πάντοτε κοστίζει.*

Richelieu

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα ερευνητική μελέτη εκπονήθηκε στο εργαστήριο Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, στα πλαίσια του Π.Μ.Σ. «Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου». Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επίκουρο καθηγητή και επιβλέπων κ. Παπανικολάου για την εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπο μου καθώς και για την καθοδήγηση και τη συνεργασία μας κατά τη διάρκεια της μελέτης αυτής. Επιπλέον, θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες στον υποψήφιο διδάκτορα κ. Ξενόπουλο Ευάγγελο για την πολύτιμη βοήθεια του κατά τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας και τον Σαρρή Δημήτριο για τη συνεχή καθοδήγηση, τις χρήσιμες συμβουλές του κατά τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας και τη συγγραφή της μελέτης. Επίσης, θα ήθελα να εκφράσω ένα μεγάλο ευχαριστώ στους φίλους μου για τις συμβουλές τους και τη συνεχή στήριξη και ενθάρρυνση καθ' όλη τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας. Επιπλέον, ευχαριστώ τις συμφοιτήτριες και τους συμφοιτητές μου για την άριστη συνεργασία μας και το ευχάριστο κλίμα που επικράτησε στο χώρο του εργαστηρίου. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την οικογένεια μου για την αμέριστη συμπαράσταση και τη στήριξη τους καθ' όλη τη διάρκεια διεξαγωγής της μελέτης αυτής.

Πίνακας περιεχομένων

Περίληψη.....	5
Abstract.....	6
1.Εισαγωγή.....	7
1.1. Λιγνοκυτταρινούχα υποστρώματα και ακάθαρτη γλυκερόλη.....	7
1.1.1. Σύσταση λιγνοκυτταρινούχων υποστρωμάτων.....	7
1.1.2 Παραγωγή λιγνοκυτταρινούχων υποστρωμάτων.....	9
1.1.3. Αξιοποίηση λιγνοκυτταρινούχων υπολειμμάτων.....	11
1.1.4 Παραγωγή βιολογικών καυσίμων πρώτης γενιάς.....	12
1.1.5 Το ζήτημα της βιομηχανικής γλυκερόλης.....	13
1.1.6 Η γλυκερόλη ως υπόστρωμα για την παραγωγή μικροβιακών λιπιδίων.....	15
1 .2. Βιοχημεία παραγωγής λιπιδίων.....	15
1.2.1. Ελαιογόνοι μικροοργανισμοί και μικροβιακό λίπος.....	15
1.2.2. Συσσώρευση λιπιδίων “De novo”	16
1.2.3. Συσσώρευση λιπιδίων “Ex novo”.....	19
1.2.4. Δομή και σύσταση των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (PUFAs).....	20
1.2.5. Ιδιότητες των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (PUFAs).....	21
1.3. Βιοχημεία παραγωγής κιτρικού οξέως.....	22
1.4. Ξυλιτόλη και βιοχημεία παραγωγής της από ξυλόζη.....	24
1.5. Ελαιογόνοι μικροοργανισμοί.....	27
1.6 Συμβολή των μικροοργανισμών στην Τεχνολογία αειφόρου ανάπτυξης.....	30
1.7 Σκοπός της πτυχιακής.....	31
2. Υλικά και μέθοδοι.....	32
2.1 Βιολογικό υλικό.....	32
2.2 Θρεπτικό μέσο καλλιέργειας ζυμών.....	34
2.3 Συνθήκες καλλιέργειας και ανάπτυξης.....	34

2.4 Χημικές αναλύσεις.....	35
2.4.1 Προσδιορισμός pH.....	35
2.4.2 Συλλογή βιομάζας.....	35
2.4.3 Προσδιορισμός ανάγοντων σακχάρων.....	36
2.4.4 Προσδιορισμός κιτρικού οξέος, γλυκερόλης, ξυλόζης και ξυλιτόλης.....	37
2.4.5 Ποσοτικός και ποιοτικός προσδιορισμός παραγόμενου ενδοκυτταρικού λίπους.....	379
2.4.6 Μεθυλεστεροποίηση.....	40
2.4.7 Ανάλυση στον αέριο χρωματογράφο.....	43
2.4.8 Προσδιορισμός ενδοπολυσακχαριτών (IPS).....	44
3.Αποτελέσματα.....	45
3.1. Παραγωγή βιομάζας, κιτρικού οξέος, μικροβιακού λίπους, ενδοπολυσακχαριτών (IPS) και κατανάλωση υποστρώματος ξυλόζης.....	45
3.1.1 Γενική παρουσίαση αποτελεσμάτων.....	45
3.1.2 Παραγωγή βιομάζας, μικροβιακού λίπους και ενδοπολυσακχαριτών (IPS).....	49
3.1.3 Κιτρικό οξύ και λοιποί μεταβολίτες.....	57
3.1.4 Μελέτη της σύστασης του μικροβιακού λίπους (FAMEs).....	58
3.2. Παραγωγή βιομάζας, κιτρικού οξέος, μικροβιακού λίπους, ενδοπολυσακχαριτών (IPS) και κατανάλωση υποστρώματος γλυκερόλης.....	61
3.2.1 Γενική παρουσίαση αποτελεσμάτων.....	61
3.2.2 Παραγωγή βιομάζας, μικροβιακού λίπους και ενδοπολυσακχαριτών (IPS).....	63
3.2.3 Κιτρικό οξύ.....	70
3.2.4 Μελέτη της σύστασης του μικροβιακού λίπους (FAMEs).....	71
3.3. Παραγωγή βιομάζας, κιτρικού οξέος, μικροβιακού λίπους, ενδοπολυσακχαριτών (IPS) και κατανάλωση σε συνυποστρώματα ξυλόζης & γλυκερόλης 50 g/l και περιοριστικές σε άνθρακα συνθήκες.....	74

3.3. Παραγωγή βιομάζας, κιτρικού οξέος, μικροβιακού λίπους, ενδοπολυσακχαριτών (IPS) και κατανάλωση σε συνυποστρώματα ξυλόζης & γλυκερόλης 50 g/l και περιοριστικές σε άνθρακα συνθήκες.....	74
3.3.1 Γενική παρουσίαση αποτελεσμάτων.....	74
3.3.2 Παραγωγή βιομάζας, μικροβιακού λίπους και ενδοπολυσακχαριτών (IPS) και εξειδίκευση στην κατανάλωση γλυκερόλης και και ξυλόζης.....	76
3.3.3 Κιτρικό οξύ και λοιποί μεταβολίτες.....	82
3.3.4 Μελέτη της σύστασης του μικροβιακού λίπους (FAMES).....	83
4. Συμπεράσματα.....	85
Βιβλιογραφία.....	97

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Αντικείμενο της παρούσας μελέτης ήταν η αξιολόγηση της δυνατότητας παραγωγής μικροβιακού λίπους από λιγνοκυτταρινούχα υποστρώματα (συγκεκριμένα ξυλόζη), την ακάθαρτη γλυκερόλη (και συνυποστρώματα αυτών), το οποίο δυνητικά μπορεί να χρησιμοποιηθεί είτε για την παραγωγή πρόσθετων στα τρόφιμα υψηλής διατροφικής και φαρμακευτικής αξίας, είτε για την παραγωγή βιοντήζελ. Η παραγωγή μικροβιακού λίπους στηρίχτηκε στην αξιοποίηση στελεχών ζυμομύκητων *Rhodosporidium toruloides*, *Candida oleophila*, *Cryptococcus curvatus*, *Metschnikowia pulcherima*, *Yarrowia lipolytica* σε διάφορες αρχικές συγκεντρώσεις των παραπάνω θρεπτικών υποστρωμάτων σε πειράματα ανακινούμενων κωνικών φιαλών υγρής ζύμωσης. Κατά τη διάρκεια της ζύμωσης αναλύθηκαν ποσοτικά οι κινητικές των συγκεντρώσεων: α) αναγόντων σακχάρων-ξυλόζη (με την μέθοδο DNS), β) μικροβιακής μάζας, γ) μικροβιακού λίπους, δ) κιτρικού οξέος και ε) ενδοπολυσακχαριτών (IPS). Επιλεγμένα δείγματα λίπους υπόκειντο σε μεθυλεστεροποίηση, ώστε να μετατραπούν σε πτητικά (FAME) λιπαρά οξέα κι έτσι να καταστεί δυνατός ο ποιοτικός προσδιορισμός τους με GC-FID. Από τα πειράματα τα οποία εκτελέστηκαν, διαπιστώθηκαν ποσότητες ξυλιτόλης 6-7 g/L από το θρεπτικό υπόστρωμα που είχε ως μόνη πηγή άνθρακα την ξυλόζη (με αρχική συγκέντρωση 60 g/L) σε διάφορα στελέχη του *Yarrowia lipolytica*. Επίσης, διαπιστώθηκε ότι στην περίπτωση συνυποστρώματος, σε θρεπτικό μέσο με ξυλόζη και ακάθαρτη γλυκερόλη, αρχικής συγκέντρωσης 60 g/L, οι μικροοργανισμοί *Candida oleophila* ATCC 20177, *Rhodosporidium toruloides* DSM 4444 και *Cryptococcus curvatus* ATCC 20509 έδειξαν να καταναλώνουν πολύ πιο γρήγορα την ξυλόζη δείχνοντας την προτίμηση την οποία έχουν όταν βρεθούν και τα δύο στο ίδιο θρεπτικό υπόστρωμα. Συγκεκριμένα για το μικροοργανισμό *Candida oleophila* ATCC 20177 παρατηρήθηκαν μεγαλύτερες αποδόσεις για την παραγωγή μικροβιακής μάζας και μικροβιακού λίπους στην γλυκερόλη με $Y_{x/s} = 0,420$ g/g και $Y_{LX} = 0,203$ g/g. Αντίστοιχα, η ζύμη *Cryptococcus curvatus* ATCC 20509 παρουσιάστηκε καλύτερη ως προς την παραγωγή μικροβιακού λίπους στην ξυλόζη με συντελεστή παραγωγής μικροβιακού λίπους $Y_{LX} = 0,203$ g/g, αντίθετα αποδοτικότερο ως προς την παραγωγή βιομάζας παρουσιάστηκε στην γλυκερόλη με συντελεστή απόδοσης $Y_{X/Glcl} = 0,532$ g/g. Ο μικροοργανισμός *Rhodosporidium toruloides* DSM 4444 παρουσιάστηκε αποδοτικό σε όλα τα υποστρώματα μας αλλά φάνηκε αποδοτικότερο ως προς την παραγωγή μικροβιακού λίπους στην γλυκερόλη με συντελεστή παραγωγής μικροβιακού λίπους επί ξηράς ουσίας $Y_{LX} = 0,253$ g/g καθώς και στην παραγωγή μικροβιακής μάζας με συντελεστή απόδοσης μικροβιακής μάζας επι του καταναλωθέν υποστρώματος $Y_{X/Glcl} = 0,337$ g/g.

ABSTRACT

Aim of the present study was to evaluate the possibility of microbial oil production from lignocellulosic substrates and crude glycerol, which potentially can be used either for the production of additives in food of high nutritional and medicinal value, either for the production of biodiesel. The microbial production of single cell oil was based on exploiting yeast strains *Rhodospodium toruloides*, *Candida oleophila*, *Cryptococcus curvatus*, *Metschnikowia pulcherima*, *Yarrowia lipolytica* at different initial concentrations of these nutrients in substrates experiment on shake-flasks liquid fermentation. During the liquid fermentation we analyzed the kinetics of concentrations : a) sugars D-xylose (with the method DNS), b) the microbial mass, c) microbial cell oil, d) citric acid and e) polysaccharides (IPS). Selected samples of single cell oil were analysed to methyl-esterification to turn volatile (FAME) and thus enable the identification with GC-FID. From the experiments performed, detected amounts of xylitol 6-7 g / L of those that had as sole carbon source xylose (with initial concentration of 60 g/L) in various strains of *Yarrowia lipolytica*. Also, it was found that in the case cosubstrate, in medium with xylose and crude glycerol, at initial total concentration 60 g/L, microorganisms *Candida oleophila* ATCC 20177, *Rhodospodium toruloides* DSM 4444 and *Cryptococcus curvatus* ATCC 20509 showed to consume much faster xylose showing preference which they have when they are both in the same substrate. More specifically for the microorganism *Candida oleophila* ATCC 20177 were observed higher yields for the production of microbial mass and microbial cell oil in raw glycerol with $Y_{X/S} = 0,420$ g / g and $Y_{L/X} = 0,203$ g/g. Also, on yeast *Cryptococcus curvatus* ATCC 20509 presented better production of microbial cell oil in xylose with yield $Y_{L/X} = 0,203$ g/g, on the other hand for the microbial biomass production occurred in glycerol yield rate $Y_{X/Glcl} = 0,532$ g/g. The microorganism *Rhodospodium toruloides* DSM 4444 presented very impressive yields in all substrates but seemed more efficient for the production of microbial cell oil in glycerol with production rate of microbial cell oil $Y_{L/X} = 0,253$ g/g and the production of microbial mass yield rate of microbial mass on the spent substrate $Y_{X/Glcl} = 0,337$ g/g.

Κεφάλαιο 1

1. Εισαγωγή

1.1. Λιγνοκυτταρινούχα υποστρώματα και ακάθαρτη γλυκερόλη

Τα θρεπτικά υποστρώματα στην πλειοψηφία τους περιλαμβάνουν πηγές άνθρακα, νιτρικών, ανόργανων συστατικών και άλλων θρεπτικών στοιχείων. Ωστόσο, η πηγή άνθρακα αποτελεί το κύριο συστατικό των θρεπτικών μέσων και απαντάται σε μεγαλύτερη συγκέντρωση σε αυτά. Ένας σημαντικός αριθμός πρώτων υλών που λειτουργούν ως θρεπτικά μέσα, καθώς και πρωτογενή υλικά που χρησιμοποιούνται ως πηγές άνθρακα, βρίσκουν εφαρμογή στις βιομηχανικές ζυμώσεις με σκοπό την παραγωγή βιοκαυσίμων και άλλων προϊόντων βιολογικής προέλευσης. Για παράδειγμα, οι υδατάνθρακες που προέρχονται από καλλιέργειες πλούσιες σε σάκχαρα ή άμυλο αποτελούν τις κύριες πηγές άνθρακα στις βιομηχανικές ζυμώσεις. Επιπλέον, τα λίπη και τα έλαια χρησιμοποιούνται ως μόνη πηγή άνθρακα ή σε συνδυασμό με τους υδατάνθρακες, καθώς επίσης οι αλκοόλες και άλλα οργανικά συστατικά (Botes, 1999).

Τα τελευταία χρόνια, οι λιγνοκυτταρινούχες πρώτες ύλες έχουν γίνει αντικείμενο μελέτης και έχουν χρησιμοποιηθεί ως θρεπτικά μέσα σε βιομηχανικές ζυμώσεις. Το ξύλο, το γρασίδι, τα διάφορα γεωργικά και δασικά υπολείμματα, καθώς και τα θειούχα υδατικά διαλύματα χαρτοποιίας, που είναι άφθονα στη φύση και δύνανται να βιο-αποικοδομηθούν αποτελούν τις κύριες πηγές των λιγνοκυτταρινούχων υποστρωμάτων (Koutinas *et al*, 2014). Ιδιαίτερη σημασία πρέπει να δοθεί στην αξιοποίηση των λιγνοκυτταρινούχων υλικών από τα υπολείμματα των γεωργικών καλλιεργειών, ο όγκος των οποίων αυξάνει συνεχώς και οδηγεί στην υποβάθμιση του περιβάλλοντος και στην απώλεια ωφέλιμων υλικών, τα οποία μπορούν να χρησιμοποιηθούν για παραγωγή βιοκαυσίμων, για δημιουργία προϊόντων κομποστοποίησης (compost) καθώς και για τη διατροφή του ανθρώπου και των ζώων (Leung, 2001).

1.1.1. Σύσταση λιγνοκυτταρινούχων υποστρωμάτων

Τα λιγνοκυτταρινούχα υλικά, αποτελούνται από κυτταρίνη σε μεγαλύτερο ποσοστό (30-60%), ημικυτταρίνες (20-40%) και λιγνίνη (10-30%). Η κυτταρίνη και οι ημικυτταρίνες είναι μακρομόρια που αποτελούνται από διάφορα σάκχαρα, ενώ η λιγνίνη είναι ένα φαινολικό πολυμερές. Η συγκέντρωση των συστατικών αυτών ποικίλει στις διάφορες πηγές των λιγνοκυτταρινούχων υλικών (Πίνακας 1.1).

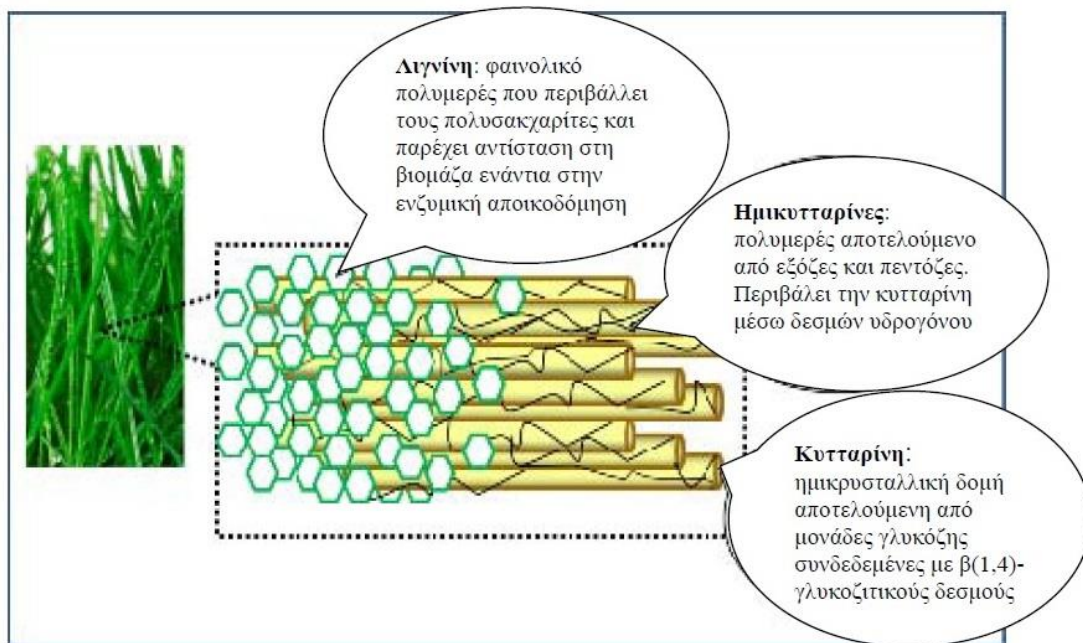
Πίνακας Ι.1. Μέση περιεκτικότητα (%) διαφόρων φυτικών ιστών σε λιγνοκυτταρινούχα συστατικά (Peters, 2006)

Πηγή	Κυτταρίνη	Ημικυτταρίνες	Λιγνίνη
Ξυλεία φυλλοβόλων δέντρων	43-47	25-35	16-24
Ξυλεία κωνοφόρων δέντρων	40-44	25-29	25-31
Σιτάρι	30	50	15
Στελέχη από αραβόσιτο	45	35	15
Βαγιάση (Ζαχαροκαλαμίσκοι)	40	30	20

Η κυτταρίνη είναι ένας πολυσακχαρίτης που αποτελείται από μονάδες D-γλυκόζης ενωμένες με β-1,4-γλυκοζιτικούς δεσμούς. Έτσι δημιουργούνται μακριές αλυσίδες που συνδέονται μεταξύ τους με δεσμούς υδρογόνου και δυνάμεις van der Waals. Η κυτταρίνη απαντάται σε κρυσταλλική μορφή και λόγω των δεσμών υδρογόνου σημειώνονται άμορφες περιοχές στις ίνες της. Εξαιτίας της διαμόρφωσης αυτής, η κυτταρίνη είναι περισσότερο επιρρεπής στην ενζυμική αποικοδόμηση (Dhillon *et al*, 2003).

Οι ημικυτταρίνες είναι πολυσακχαρίτες με μικρότερο μοριακό βάρος από αυτό της κυτταρίνης. Η δομή τους αποτελείται από κοντές και διακλαδισμένες αλυσίδες σακχάρων (εξόζες και πεντόζες). Αυτό σημαίνει ότι οι ημικυτταρίνες αποτελούνται από σάκχαρα με 6 άτομα άνθρακα (γαλακτόζη, γλυκόζη και μανόζη) και από σάκχαρα με 5 άτομα άνθρακα (ξυλόζη και αραβινόζη). Οι ημικυτταρίνες που προέρχονται από ξυλεία των φυλλοβόλων διαθέτουν σάκχαρα με 5 άτομα άνθρακα (κυρίως ξυλόζη), ενώ οι ημικυτταρίνες που προέρχονται από ξυλεία των κωνοφόρων μετρούν περισσότερα σάκχαρα με 6 άτομα άνθρακα. Επιπλέον, οι ημικυτταρίνες υδρολύονται πιο εύκολα σε σχέση με την κυτταρίνη (Gardini *et al*, 2001).

Η λιγνίνη είναι ένα άμορφο ετερομερές, μη διαλυτό στο νερό και οπτικά ανενεργό, το οποίο δομείται από μονάδες φαινυλοπροπανίου που συνδέονται μεταξύ τους με δεσμούς που δεν υδρολύονται. Η λιγνίνη συνδέεται τόσο με την κυτταρίνη, όσο και με τις ημικυτταρίνες, σχηματίζοντας ένα αδιαπέραστο φυσικό κάλυμα στο κυτταρικό τοίχωμα των φυτικών οργανισμών. Με αυτό τον τρόπο παρέχει στο κυτταρικό τοίχωμα μηχανική υποστήριξη, αδιαπερατότητα και αντίσταση στις προσβολές από μικροοργανισμούς και στο οξειδωτικό stress (Goodwin T.W., 1980).



Εικόνα 1 Δομή Λιγνοκυτταρινούχων υλικών (www.napier.ac.uk).

1.1.2 Παραγωγή λιγνοκυτταρινούχων υποστρώματων

Η δομή και η σύσταση των λιγνοκυτταρινούχων υλικών (κυτταρίνη, ημικυτταρίνες και λιγνίνη) είναι υπεύθυνη για την αντίσταση τους στην υδρόλυση και την ανοικοδόμηση από τα ένζυμα. Για αυτό το λόγο, προκειμένου τα λιγνοκυτταρινούχα υλικά να μετατραπούν σε αποικοδομήσιμα υποστρώματα, θα πρέπει να προηγηθούν κατάλληλοι χειρισμοί και διεργασίες έτσι ώστε να απομακρυνθεί η λιγνίνη (Li *et al*, 2006). Ωστόσο, θα πρέπει να παρεμποδιστεί η ανοικοδόμηση των προϊόντων υδρόλυσης (π.χ. οι αντιδράσεις ανοικοδόμησης των μονοσακχαριτών οδηγούν στο σχηματισμό φουρφουράλης ή 5-υδροξυμεθυλοφουρφουράλης) (Peters, 2007). Η ανοικοδόμηση των λιγνοκυτταρινούχων υπολειμμάτων περιλαμβάνει μια σειρά διεργασιών αποτελούμενες από:

- 1) προεπεξεργασία (μηχανική, χημική ή βιολογική)
- 2) υδρόλυση των πολυμερών για την παραγωγή αποικοδομήσιμων σακχάρων (π.χ. εξόζες, πεντόζες)
- 3) αξιοποίηση των ενώσεων αυτών ως υποστρώματα για την ανάπτυξη μικροοργανισμών ή την παραγωγή χημικών προϊόντων
- 4) διαχωρισμός και καθαρισμός

Μετά τον μηχανικό διαχωρισμό και τον τεμαχισμό, η βιομάζα των λιγνοκυτταρινούχων υπολειμμάτων πρέπει να υδρολυθεί έτσι ώστε να γίνει μετατροπή της κυτταρίνης και των

ημικυτταρινών σε απλούς υδατάνθρακες με 6 και 5 άτομα άνθρακα. Το μίγμα των σακχάρων που προκύπτει μετά την υδρόλυση περιέχει κυρίως γλυκόζη και ξυλόζη και σε μικρότερες ποσότητες αραβινόζη, γαλακτόζη και μανόζη (Matsuo *et al* , 2001).

Σύμφωνα με τον Peters (2007), η τεχνολογία της υδρόλυσης μπορεί να περιλαμβάνει φυσικές διεργασίες (explosion-καύση με ατμό, καύση με αμμωνία, ζεστό νερό, θερμοϋδρόλυση υπό πίεση), χημικές μεθόδους, όπως υδρόλυση με συμπυκνωμένο και αραιωμένο οξύ και ακόμα ενζυμικές μεθόδους οι οποίες συχνά συνδυάζονται με τη χημική υδρόλυση. Τα υγρά υδρολύματα που παραλαμβάνονται από κάθε στάδιο και περιέχουν τα σάκχαρα, καθαρίζονται για να αξιοποιηθούν στη συνέχεια ως πηγή άνθρακα στις διάφορες ζυμώσεις.

Οι μικροοργανισμοί που είναι κυρίως υπεύθυνοι για την αποικοδόμηση των λιγνοκυτταρινούχων υπολειμμάτων είναι οι μύκητες. Η ικανότητα τους να αποικοδομούν αποτελεσματικά τα λιγνοκυτταρινούχα υλικά σχετίζεται με την ανάπτυξη του μυκηλίου τους κατά τη διάρκεια της οποίας μεταφέρουν ανεπιθύμητα συστατικά, όπως νιτρικά και σίδηρο, στο φτωχό σε θρεπτικά στοιχεία υπόστρωμα των λιγνοκυτταρινούχων υλικών, που αποτελεί τη δική τους πηγή άνθρακα. Οι μύκητες διαθέτουν δυο τύπους εξωκυτταρικού ενζυμικού συστήματος: το υδρολυτικό σύστημα, κατά το οποίο παράγουν υδρολάσες που αποικοδομούν τους πολυσακχαρίτες και το εξωκυτταρικό και οξειδωτικό λιγνολυτικό σύστημα, όπου αποικοδομούν τη λιγνίνη και λύουν τους φαινολικούς δακτυλίους. Μύκητες όπως οι *Phanerochaete chrysosporium*, *Trichoderma reesei*, *Ceriporiopsis stibxermispora*, θεωρούνται ιδιαίτερα αποτελεσματικοί στην αποικοδόμηση των λιγνοκυτταρινούχων υλικών (Sanchez, 2009).

Η διεργασία κατά την οποία η ενζυμική υδρόλυση πραγματοποιείται χωριστά από τη διαδικασία της ζύμωσης είναι γνωστή ως ξεχωριστή υδρόλυση και ζύμωση (Separate Hydrolysis and Fermentation, SHF). Ωστόσο, υπάρχουν και ταυτόχρονες διεργασίες σακχαροποίησης της κυτταρίνης σε γλυκόζη και της ζύμωσης (Simultaneous Saccharification and Fermentation, SSF), καθώς επίσης ταυτόχρονη σακχαροποίηση της κυτταρίνης και των ημικυτταρινών σε εξόζες και πεντόζες, αντίστοιχα, και της ζύμωσης όλων των αποικοδομήσιμων σακχάρων (Simultaneous Saccharification Co-Fermentation, SSCF). Τα στερεά υπολείμματα της κυτταρίνης και της λιγνίνης μετά την υδρόλυση μπορούν να αξιοποιηθούν ως καύσιμα για παραγωγή ενέργειας (Peters, 2007)

Την τελευταία δεκαετία έχουν αναπτυχθεί διάφορες διεργασίες υδρόλυσης των λιγνοκυτταρινούχων υλικών με τη χρήση οξέων, με σκοπό τη σακχαροποίηση του ξύλου για παραγωγή αποικοδομήσιμων σακχάρων που μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως πηγές άνθρακα στις διάφορες ζυμώσεις. Μόνο οι δύο από αυτές έχουν εξελιχθεί σε σημαντικές: η διεργασία Bergius-Rheinau και η διεργασία Scholler-Tornesch (Peters, 2007). Η διεργασία Bergius-Rheinau αποτελεί τη μόνη διεργασία κατά την οποία παραλαμβάνεται κρυσταλλική γλυκόζη προερχόμενη από την

κυτταρίνη του ξύλου. Επίσης, η ζύμωση ακετόνης-βουτανόλης-αιθανόλης (Acetone-Butanol-Ethanol, ABE), ήταν πριν, κατά τη διάρκεια και λίγο μετά το δεύτερο παγκόσμιο πόλεμο, η σημαντικότερη διεργασία βιομηχανικής ζύμωσης. Οι πρώτες ύλες που χρησιμοποιούνταν για τη ζύμωση αυτή ήταν τα υπολείμματα γεωργικών εκμεταλλεύσεων και τα παραγόμενα προϊόντα αποτελούσαν η ακετόνη και η βουτανόλη (Jones, 2001).

1.1.3. Αξιοποίηση λιγνοκυτταρινούχων υπολειμμάτων

Η βιο-αποικοδόμηση των λιγνοκυτταρινούχων υπολειμμάτων και η βιομετατροπή αυτών σε προϊόντα υψηλής προστιθέμενης αξίας απαιτεί μια σειρά διεργασιών, όπως αναφέρθηκε παραπάνω. Η αξιοποίηση των αποικοδομήσιμων λιγνοκυτταρινούχων υπολειμμάτων αναπτύσσεται συνεχώς και αφορά πολλούς τομείς. Μεταξύ αυτών είναι η χρήση τους ως πρώτες ύλες για την παραγωγή αιθανόλης, για τις χαρτοβιομηχανίες, την παραγωγή compost, την καλλιέργεια εδώδιμων μανιταριών και άμεσα για την διατροφή των ζώων (Sanchez, 2009).

Η έρευνα για την εύρεση εναλλακτικών πηγών με σκοπό την παραγωγή καυσίμων χρησιμοποιώντας βιολογικές μεθόδους έχει αναπτυχθεί αρκετά, κυρίως λόγω της ανάγκης για την προστασία του περιβάλλοντος. Η αιθανόλη μπορεί να αξιοποιηθεί είτε ως χημική πρώτη ύλη είτε ως πρόσθετο στη βενζίνη, με αποτέλεσμα τη μείωση εκπομπής αερίων που είναι υπεύθυνα για το φαινόμενο του θερμοκηπίου, τη μείωση της ατμοσφαιρικής ρύπανσης και την αύξηση του κέρδους (Mosier *et al*, 2005).

Τις δυο τελευταίες δεκαετίες, το κόστος της βιο-αποικοδόμησης των λιγνοκυτταρινούχων υπολειμμάτων για την παραγωγή αιθανόλης έχει μειωθεί αρκετά ώστε να καθιστά τη μέθοδο αυτή οικονομικά βιώσιμη.

Επιπλέον, η καλλιέργεια εδώδιμων μανιταριών μέσω της αξιοποίησης των λιγνοκυτταρινούχων υπολειμμάτων ως υποστρωμάτων, αποτελεί μια ενδιαφέρουσα βιοεφαρμογή, αφού μέσω αυτής, μετατρέπονται τα εν λόγω υλικά σε προϊόντα διατροφής για τον άνθρωπο. Η βιολογική αυτή διαδικασία είναι αρκετά αποτελεσματική όσον αφορά την ανακύκλωση των λιγνοκυτταρινούχων υλικών (Philippousis, 2009). Τα μανιτάρια μπορούν να αναπτυχθούν ικανοποιητικά σε μια μεγάλη ποικιλία λιγνοκυτταρινούχων υπολειμμάτων, όπως τα στάχυα των δημητριακών, τα φύλλα μπανάνας, πολτός από καφέ κτλ. Επίσης, κάποιοι μικροοργανισμοί έχουν τη δυνατότητα να μετατρέπουν την κυτταρίνη και άλλα σάκχαρα των φυτικών ιστών σε μεγάλες ποσότητες οξικού, βουτυρικού και προπιονικού οξέος, τα οποία αποτελούν πηγές άνθρακα και ενέργειας για τα μηρυκαστικά ζώα (Montet D. *et al*, 1985; Koutinas *et al*, 2014).

Στη λίστα των προϊόντων προστιθέμενης αξίας που μπορούν να παραχθούν από την αξιοποίηση των λιγνοκυτταρινούχων υπολειμμάτων συμπεριλαμβάνονται και άλλα προϊόντα, όπως οργανικά οξέα, αμινοξέα, βιταμίνες και πλήθος σακχάρων από βακτήρια και μύκητες (ξανθίνες), σε ζυμώσεις που ως πηγή άνθρακα χρησιμοποιείται η γλυκόζη (Sanchez. 2009). Αξίζει να σημειωθεί ότι η παραγωγή μικροβιακού λίπους και ιδιαιτέρως λιπιδίων που περιέχουν πολυακόρεστα λιπαρά οξέα σπανίως απαντώνται στη φύση, αποτελεί ακόμη μια κατηγορία προϊόντων που μπορούν να παραχθούν από την αξιοποίηση των λιγνοκυτταρινούχων υπολειμμάτων. Κάποιοι μικροοργανισμοί, κυρίως μύκητες, όταν αναπτύσσονται σε υπόστρωμα με υψηλή συγκέντρωση πηγής άνθρακα, έχουν τη δυνατότητα να συσσωρεύουν λίπος σε σημαντικές ποσότητες, στο οποίο ενδέχεται να περιέχονται σε ποικίλα ποσά το λιπαρό οξύ γ-λινολενικό (GLA). Το συγκεκριμένο λιπαρό οξύ παρουσιάζει εξαιρετικό ενδιαφέρον εξαιτίας των φαρμακευτικών και διατροφικών ιδιοτήτων που διαθέτει. Ωστόσο, το κόστος της παραγωγής μικροβιακού ενδοκυτταρικού λίπους είναι υψηλό. Για το λόγο αυτό, το βιοτεχνολογικό ενδιαφέρον έχει στραφεί προς την αξιοποίηση υπολειμμάτων ως υποστρωμάτων για την καλλιέργεια αυτών των μικροοργανισμών. Αξίζει δε να σημειωθεί ότι τα προϊόντα υδρόλυσης των λιγνοκυτταρινούχων υλικών (π.χ. γλυκόζη και ξυλόζη) αποτελούν άριστο υπόστρωμα για την ανάπτυξη των μυκήτων, ενώ υπό δεδομένες συνθήκες καλλιέργειας δύναται να ευνοηθεί η συσσώρευση του ενδοκυτταρικού λίπους (Politino *et al*, 1997; Fakas *et al*, 2009; Zikou *et al*, 2013).

Η δυνατότητα αυτή βρίσκει εφαρμογή στην παρούσα ερευνητική μελέτη, η οποία έχει ως στόχο την αξιοποίηση προϊόντων υδρόλυσης λιγνοκυτταρινούχων υπολειμμάτων (ξυλόζη) προς μια εναλλακτική κατεύθυνση για την παραγωγή μικροβιακού λίπους και πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (PUFAs).

1.1.4 Παραγωγή βιολογικών καυσίμων πρώτης γενιάς

Ως γνωστόν, η ανησυχία της διεθνούς κοινότητας σχετικά με τις επιπτώσεις της αλόγιστης χρήσης των αποθεμάτων πετρελαίου, τόσο σε επίπεδο παγκόσμιας οικονομίας, όσο και σε επίπεδο περιβάλλοντος και κλιματικής αλλαγής, έστρεψε το ενδιαφέρον των ερευνητών προς την αναζήτηση εναλλακτικών τύπων καυσίμων, φιλικότερων προς το περιβάλλον. Το γεγονός αυτό οδήγησε στην άνθηση και την ανάπτυξη της βιομηχανίας παραγωγής βιολογικών καυσίμων πρώτης γενιάς, καταλαμβάνοντας ολοένα και περισσότερο χώρο στην παγκόσμια αγορά καυσίμων τις τελευταίες δεκαετίες. Ο όρος βιολογικά καύσιμα πρώτης γενιάς αναφέρεται στην παραγωγή εναλλακτικού τύπου καυσίμων από διαθέσιμες ενεργειακές καλλιέργειες πλούσιες σε σάκχαρα, καθώς επίσης και

σε βρώσιμες ή μη φυτικές καλλιέργειες με υψηλή περιεκτικότητα σε λίπος, μέσω της χρήσης συμβατικών μεθόδων καλλιέργειας. Από το σύνολο των βιολογικών καυσίμων πρώτης γενιάς, ευρείας χρήσεως και εφαρμογής τυγχάνουν το βιολογικό πετρέλαιο (biodiesel) και η βιολογική αιθανόλη (bioethanol).

Το βιολογικό πετρέλαιο αποτελεί το συνηθέστερα απαντώμενο βιολογικό καύσιμο στην Ευρώπη, με κυριότερες χώρες-παραγωγούς την Γερμανία και την Γαλλία, ενώ αξιοσημείωτες παραγωγικότητες εμφανίζουν τα τελευταία χρόνια χώρες όπως η Λιθουανία, η Πολωνία και η Ρουμανία. Χαρακτηριστικό είναι άλλωστε το γεγονός ότι η Ευρωπαϊκή Ένωση με κοινοτική οδηγία της (2003/30/EC) έθεσε ως στόχο για το έτος 2010 την χρήση βιολογικών καυσίμων για κάθε κράτος-μέλος σε ποσοστό 5.75% επί του συνόλου των καυσίμων κινήσεως.

Εξάλλου, η τεχνολογία που ακολουθείται για την παραγωγή βιολογικού πετρελαίου περιλαμβάνει την εστεροποίηση (trans-esterification) των τριγλυκεριδίων των φυτικών ελαίων (φοινικέλαιου, ηλιέλαιου, καλαμποκέλαιου, σογιέλαιου και ελαίου της ελαιοκράμβης) παρουσία βραχείας αλύσου αλκοόλης (συνηθέστερα μεθανόλης ή αιθανόλης), με τελικό προϊόν τους μεθυλεστέρες των λιπαρών οξέων. Η εν λόγω διεργασία δύναται να περιλαμβάνει τη χρήση χημικών καταλυτών (NaOH ή KOH), βιολογικών καταλυτών, ήτοι ενζύμων και ειδικότερα λιπασών, ενώ κατά περίπτωση η εν λόγω διεργασία τελείται και απουσία καταλυτών, με ταυτόχρονη εστεροποίηση των τριγλυκεριδίων και εστεροποίηση των λιπαρών οξέων (μέθοδος υπερκρίσιμης μεθανόλης) (Saka and Kusdiana, 2001; Papanikolaou and Aggelis, 2011; Papanikolaou, 2009). Αξίζει να σημειωθεί ότι κατά τη χημική ή ενζυμική διεργασία παραγωγής βιολογικού πετρελαίου, η μεθυλεστεροποίηση των λιπαρών υλών έχει ως απόρροια τη γένεση ενός απόνερου (απόβλητου), το οποίο είναι πλούσιο σε γλυκερόλη (2-10% κ. ο.). Το απόνερο αυτό μπορεί να συμπυκνωθεί και να καθαριστεί (μέχρις ενός ορίου, καθώς η διεργασία καθαρισμού γενικά είναι ιδιαίτερος ακριβή), ενώ η ποσότητα καθαρής γλυκερόλης (90% κ. β.) που δύναται να παραχθεί από 10 kg ελαίου το οποίο υφίσταται μεθανόλυση προκειμένου να παραχθεί βιολογικό πετρέλαιο είναι της τάξεως του 1 kg (Mu *et al.*, 2006; Amaral *et al.*, 2009; da Silva *et al.*, 2009; Papanikolaou *et al.*, 2009).

1.1.5 Το ζήτημα της βιομηχανικής γλυκερόλης

Λαμβάνοντας υπόψιν τα ανωτέρω, καθίσταται σαφές ότι η παραγωγή βιολογικών καυσίμων συγκεντρώνει μια σειρά από οφέλη, δίνοντας το έναυσμα για την αποδέσμευση της ανθρωπότητας από την αλόγιστη χρήση των υπό εξάντληση κοιτασμάτων πετρελαίου, καθώς επίσης και για την προστασία του περιβάλλοντος και τον περιορισμό του φαινομένου του θερμοκηπίου. Ωστόσο, η εν

λόγω διεργασία συνοδεύεται και από μια σειρά από προκλήσεις-ανησυχίες σχετικά με την βιωσιμότητα της. Συγκεκριμένα, η ραγδαία ανάπτυξη της βιομηχανίας παραγωγής βιολογικού πετρελαίου τις τελευταίες δεκαετίες, οδήγησε στην εναπόθεση τεράστιων αποθεμάτων βιομηχανικής γλυκερόλης, με άμεσο επακόλουθο την μείωση της τιμής της γλυκερόλης και την δημιουργία περιβαλλοντικών ανησυχιών. Σε οικονομικό επίπεδο, η μείωση της τιμής της γλυκερόλης επέφερε αρνητικές επιπτώσεις τόσο στην βιομηχανία παραγωγής γλυκερόλης, όσο και στην βιομηχανία παραγωγής βιολογικών καυσίμων, δεδομένου ότι η βιομηχανική γλυκερόλη κατέστη ένα απόβλητο, με μηδενικό ή και αρνητικό κόστος. Μάλιστα, εξαιτίας του γεγονότος ότι το εν λόγω απόβλητο δύναται να περιέχει πλήθος υπολειμμάτων, όπως αλκοόλη, άλατα, βαρέα μέταλλα ή ελεύθερα λιπαρά οξέα, καθίσταται υποχρεωτικό το στάδιο της εξυγίανσης του. πριν την αξιοποίηση της εναπομείνουσας γλυκερόλης σε διάφορες συμβατικές εφαρμογές (Johnson and Taconi, 2007; Papanikolaou, 2009; Papanikolaou and Aggelis, 2009; 2011). Ως εκ τούτου, η βιομηχανική γλυκερόλη δύναται να αποτελέσει μια πρώτη ύλη για την παραγωγή προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας, μέσω της αξιοποίησης της με χημικές και βιοτεχνολογικές μεθόδους.

Αναφορικά με τις χημικές μεθόδους αξιοποίησης της βιομηχανικής γλυκερόλης, αυτές δύναται να περιλαμβάνουν την μετατροπή της σε χημικά συστατικά ή καύσιμα, μέσω διαφόρων ειδών χημειο-επιλεκτικής κατάλυσης. Παραδείγματα τέτοιων καταλύσεων αποτελούν η επιλεκτική οξείδωση για την παραγωγή γλυκερικού οξέος, δι-υδρόξυ-ακετόνης ή μεσοξαλικού οξέος, η καταλυτική αφυδάτωση για την παραγωγή ακροεΐνης, η πυρόλυση και εξαέρωση της για την παραγωγή μονοξειδίου του άνθρακα και υδρογόνου, αλλά και η επιλεκτική *trans*-εστεροποίηση της γλυκερόλης για την παραγωγή μονογλυκεριδίων-γαλακτωματοποιητών (Johnson and Taconi, 2007). Ωστόσο, οι εν λόγω μέθοδοι δεν επιτρέπουν την απευθείας χρήση της βιομηχανικής γλυκερόλης, στη περίπτωση που στην τελευταία περιέχονται υψηλά ποσά διαφόρων υπολειμμάτων-ακαθαρσιών (Fan and Burton, 2009).

Αντιθέτως, μια από της πλέον ελπιδοφόρες μεθόδους αξιοποίησης της ακάθαρτης γλυκερόλης αποτελεί η δυνατότητα της βιομετατροπής της σε προϊόντα υψηλής προστιθέμενης αξίας, μέσω των μικροβιακών ζυμώσεων. Παραδείγματα τέτοιων προϊόντων αποτελούν η δι-υδρόξυ-ακετόνη, το ηλεκτρικό οξύ, το κιτρικό οξύ, το προπιονικό οξύ, το μικροβιακό λίπος, η αιθανόλη, τα πολύ-υδρόξυ-αλκανοϊκά οξέα καθώς επίσης και η 1,3-προπανοδιόλη (Papanikolaou and Aggelis, 2002; Lee *et al*, 2004; Ito *et al*, 2005; Roller *et al*, 2005; Yazdani and Gonzalez, 2007; Papanikolaou *et al*, 2008; Pyle *et al*, 2008; Amaral *et al*, 2009; da Suva *et al*, 2009; Andre *et al*, 2010; Fan *et al*, 2010; Chatzifragkou *et al*, 2011; Papanikolaou, 2009; Papanikolaou and Aggelis, 2009; 2011). Επιπλέον, είναι εφικτή η αναερόβια αποικοδόμηση της βιομηχανικής γλυκερόλης μέσω της διεργασίας της οξεογένεσης, με επόμενο στάδιο την μεθανογένεση, για την παραγωγή βιολογικού

αερίου, αποτελούμενου από μεθάνιο και διοξείδιο του άνθρακα (Antoni *et al*, 2007). Εξ' αυτών των κατευθύνσεων, το μεγαλύτερο ενδιαφέρον και ιδιαίτερος από πλευράς δυνατότητας εφαρμογής της διεργασίας σε βιομηχανική κλίμακα, συγκεντρώνει η βιοτεχνολογική μετατροπή της βιομηχανικής γλυκερόλης σε 1,3-προπανοδιόλη, συμπεριλαμβανομένων και άλλων δευτερευόντων προϊόντων όπως οξικό οξύ, βουτυρικό οξύ, αιθανόλη, 2,3-βουτανοδιόλη και υδρογόνο (Deckwer, 1995; Biebl *et al*, 1999; Zeng and Biebl, 2002; Zene and Sabra, 2011).

1.1.6 Η γλυκερόλη ως υπόστρωμα για την παραγωγή μικροβιακών λιπιδίων

Η βιομηχανική γλυκερόλη αποτελεί σημαντικό παραπροϊόν της βιομηχανίας βιολογικού πετρελαίου (biodiesel), που παράγεται σε ποσοστό 10 % επί του παραγόμενου προϊόντος. Η διαχείριση της αποτελεί μείζον πρόβλημα τόσο για την ίδια τη βιομηχανία, η οποία αναζητά εναλλακτικούς τρόπους αξιοποίησης της, όσο και για το περιβάλλον (Schorken and Kempers, 2009).

Η χρήση της γλυκερόλης ως υποστρώματος αύξησης των μικροοργανισμών είναι πιθανόν μια σημαντική πρόταση δεδομένου ότι ορισμένα μικροβιακά λιπίδια (Single Cell Oils - SCOs) είναι προϊόντα υψηλής προστιθέμενης αξίας, όπως αυτά που περιέχουν πολυακόρεστα λιπαρά οξέα. Τα λιπίδια αυτά είναι περιζήτητα από τη βιομηχανία τροφίμων, φαρμάκων και καλλυντικών. Εναλλακτικά, το παραγόμενο μικροβιακό έλαιο μπορεί να μετατραπεί σε βιολογικό πετρέλαιο ανακυκλώνοντας έτσι τη βιομηχανική γλυκερόλη.

Επιπλέον, η γλυκερόλη συνιστά άριστο υπόστρωμα για την καλλιέργεια μικροοργανισμών που δύναται να συνθέσουν βιοεπιφανειοδραστικούς παράγοντες παρουσία υδατοδιαλυτών υποστρωμάτων. Στην περίπτωση αυτή, η συντιθέμενη ποσότητα αυτών των ουσιών εκκρίνεται εξ ολοκλήρου στο μέσο καλλιέργειας.

1 .2. Βιοχημεία παραγωγής λιπιδίων

1.2.1. Ελαιογόνοι μικροοργανισμοί και μικροβιακό λίπος

Ως ελαιογόνοι νοούνται οι μικροοργανισμοί εκείνοι, οι οποίοι αναπτυσσόμενοι σε συγκεκριμένες συνθήκες περιβάλλοντος, δύναται να συσσωρεύσουν λίπος εντός των κυττάρων τους, σε ποσοστό μεγαλύτερο από 20% κατά βάρος επί ξηράς ουσίας. Μάλιστα, ορισμένοι μικροοργανισμοί είναι ικανοί να συσσωρεύσουν ενδοκυτταρικό λίπος έως και 70% w/w επί της ξηράς τους ουσίας (Ratledge, 2002). Η χρησιμοποίηση των δυνάμενων να παράξουν ενδοκυτταρικό

λίπος μικροοργανισμών (oleaginous ή oil-bearing microorganisms) έχει ήδη αναφερθεί από τον δεύτερο παγκόσμιο πόλεμο, επισταμένη όμως μελέτη των μικροοργανισμών αυτών πραγματοποιείται τα τελευταία 35 χρόνια (Aggelis *et al*, 1988; 1990, Ratledge, 1994; 2002, Certik and Shimizu, 1999, Αγγελής, 2007). Το ενδιαφέρον για την παραγωγή των λιπιδίων αυτών, καλουμένων και μικροβιακών ή μονοκυτταρικών λιπιδίων (microbial oils ή single cell oils) είναι μεγάλη καθώς αποτελούν πηγή σημαντικών λιπαρών οξέων που δεν απαντώνται συχνά στη φύση.

Το κυρίαρχο κλάσμα των μικροβιακών αποθησαυριστικών λιπιδίων συνίσταται από τριγλυκερίδια, τα οποία αντιπροσωπεύουν το 55-80% (w/w) του συνολικού κυτταρικού λίπους (Papanikolaou *et al*, 2001, Fakas *et al*, 2006, 2007). Τα μικροβιακά τριγλυκερίδια είναι φυτικού τύπου, δηλαδή η θέση sn2 της γλυκερόλης είναι εστεροποιημένη με ακόρεστο λιπαρό οξύ (Ratledge, 1994, Ratledge, 2004).

Για την παραγωγή μικροβιακών ελαίων πλούσιων σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα χρησιμοποιούνται ποικίλοι μικροοργανισμοί όπως μύκητες και ζύμες. Οι μύκητες που έχουν προσελκύσει το μεγαλύτερο ενδιαφέρον των ερευνητών για την βιοτεχνολογική παραγωγή απαραίτητων λιπαρών οξέων σε βιομηχανική κλίμακα, είναι οι Ζυγομύκητες που ανήκουν στην τάξη των *Mucorales* (Certik and Shimizu, 1999, Dyal and Narine, 2005). Η εκάστοτε σύνθεση του μικροβιακού λίπους είναι αποτέλεσμα γενετικών, αλλά και περιβαλλοντικών παραγόντων για κάθε ελαιογόνο μικροοργανισμό (Ratledge, 2004). Ωστόσο, ο κύριος λόγος ενδιαφέροντος για τα μικροβιακά έλαια έγκειται στην δυνατότητά τους να υποκαταστήσουν φυτικά ή ζωικά λίπη εξεζητημένης σύστασης και δομής, όπως έλαια πλούσια σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα σπανίως απαντώμενα στην φύση ή λίπη εξεζητημένης δομής τριγλυκεριδίων.

1.2.2. Συσσώρευση λιπιδίων “De novo”

Η “de novo” βιοσύνθεση λιπιδίων και η συσσώρευση τους στους ελαιογόνους μικροοργανισμούς είναι δευτερογενής μεταβολική διεργασία, καθώς λαμβάνει χώρα μετά την εξάντληση του αζώτου και σε θρεπτικό μέσο όπου ο άνθρακας βρίσκεται σε περίσσεια. Όταν το άζωτο της καλλιέργειας εξαντληθεί, οι ελαιογόνοι μικροοργανισμοί συνεχίζουν να αφομοιώνουν την πηγή άνθρακα μετατρέποντας την σε TAG’s, τα οποία συσσωρεύονται εντός των κυττάρων. Η βιοχημεία της “de novo” σύνθεσης λιπιδίων μπορεί να διακριθεί σε δύο μέρη : τον ενδιάμεσο κυτταρικό μεταβολισμό και την βιοσύνθεση των TAG’s. Ο σχηματισμός του Acetyl-CoA στους ελαιογόνους μικροοργανισμούς αποδίδεται στην παρουσία της ATP:κιτρικής λυάσης (ATP-CL), η

οποία δεν απαντάται στην πλειοψηφία των μη-ελαιογόνων μικροοργανισμών (Papanikolaou and Aggelis 2010; 2011a; 2011b).

Η εξάντληση της πηγής αζώτου στο θρεπτικό μέσο από το μικροοργανισμό οδηγεί σε μια σειρά αντιδράσεων με αποτέλεσμα το σχηματισμό του Acetyl-CoA. Έτσι, κατά την κατανάλωση του αζώτου ενεργοποιείται το ένζυμο AMP-απαμινάση με αποτέλεσμα την ταχύτατη πτώση της περιεκτικότητας του κυττάρου σε AMP και την παρεμπόδιση της δράσης του ενζύμου ισοκιτρική αφυδρογονάση. Με αυτόν τον τρόπο το κιτρικό οξύ δε μπορεί να μεταβολιστεί και συσσωρεύεται στο μιτοχόνδριο. Στη συνέχεια, το κιτρικό οξύ εισέρχεται στο κυτταρόπλασμα και διασπάται από την ATP:κιτρική λυάση (ATP-CL) σε Acetyl-CoA και οξαλοξικό οξύ. Έπειτα, το Acetyl-CoA χρησιμοποιείται ως προάγγελος για την βιοσύνθεση των λιπαρών οξέων, ενώ το οξαλοξικό οξύ μετατρέπεται μέσω της αφυδρογονάσης του μηλικού οξέος σε μηλικό, το οποίο στη συνέχεια χρησιμοποιείται στον κύκλο κιτρικού/μηλικού οξέος. Η αντίδραση που λαμβάνει χώρα είναι η εξής :

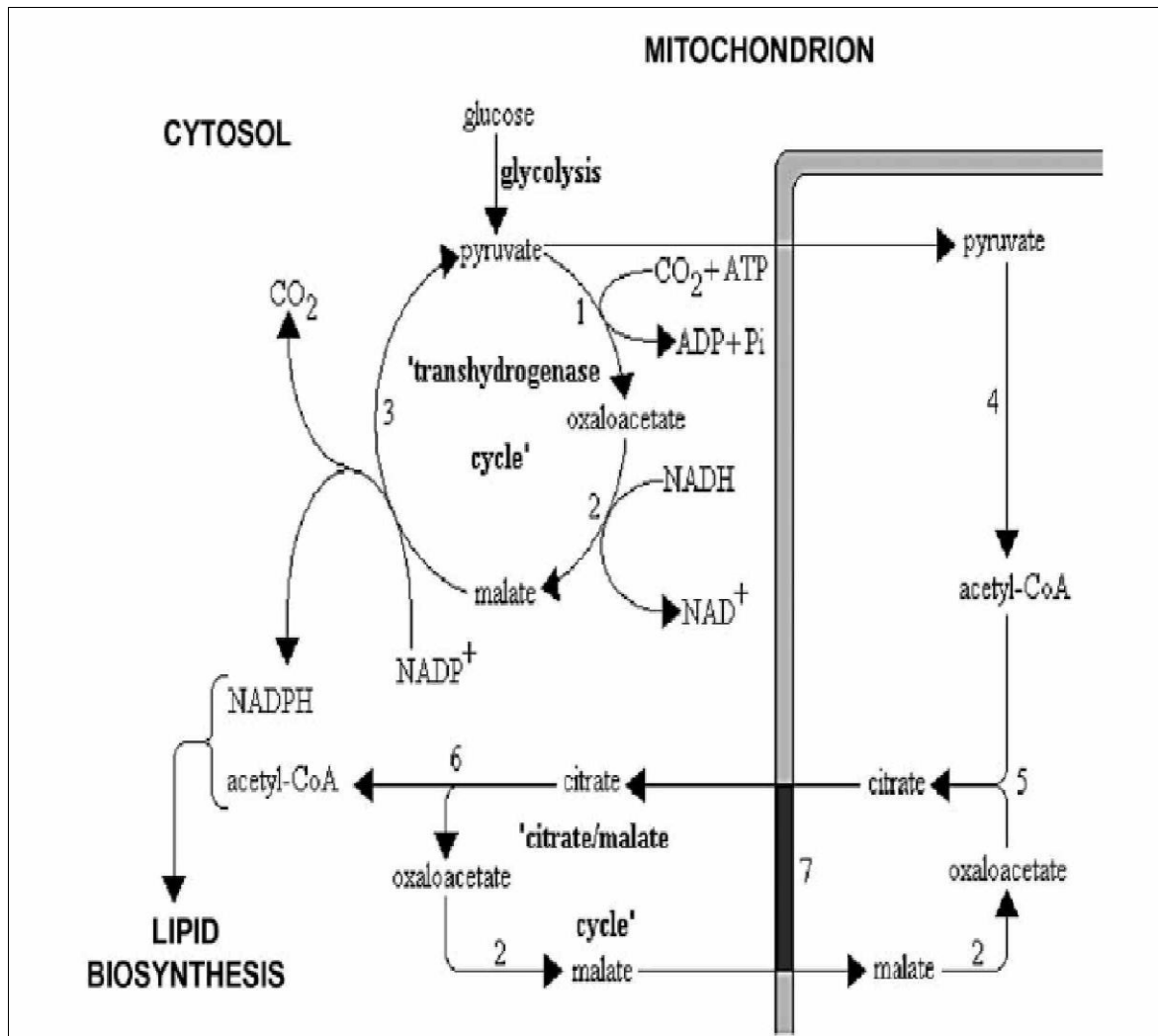


Για την βιοσύνθεση των λιπαρών οξέων, εκτός από την παραγωγή του Acetyl-CoA, είναι απαραίτητη η παροχή επαρκούς ποσότητας NADPH. Το μηλικό ένζυμο λειτουργεί ως προμηθευτής NADPH κατά την ακόλουθη εξίσωση :



Η δραστηριότητα του μηλικού ενζύμου απαντάται στην πλειοψηφία των ελαιογόνων μικροοργανισμών και αποτελεί ένα μεταβολικό σύμπλοκο, το οποίο δρα συνεργιστικά με την ATP:κιτρική λυάση και τη συνθάση των λιπαρών οξέων, έτσι ώστε να εξασφαλίζεται άμεση επικοινωνία

κατά τη μετατροπή του Acetyl-CoA σε λιπαρά οξέα. Τα λιπαρά οξέα που βιοσυντίθενται, εστεροποιούνται με γλυκερόλη σε τριγλυκερίδια και ενσωματώνονται μέσω του ενδοπλασματικού δικτύου σε σταγονίδια λιπαρών οξέων (Ratledge 2004; Papanikolaou and Aggelis 2011b).

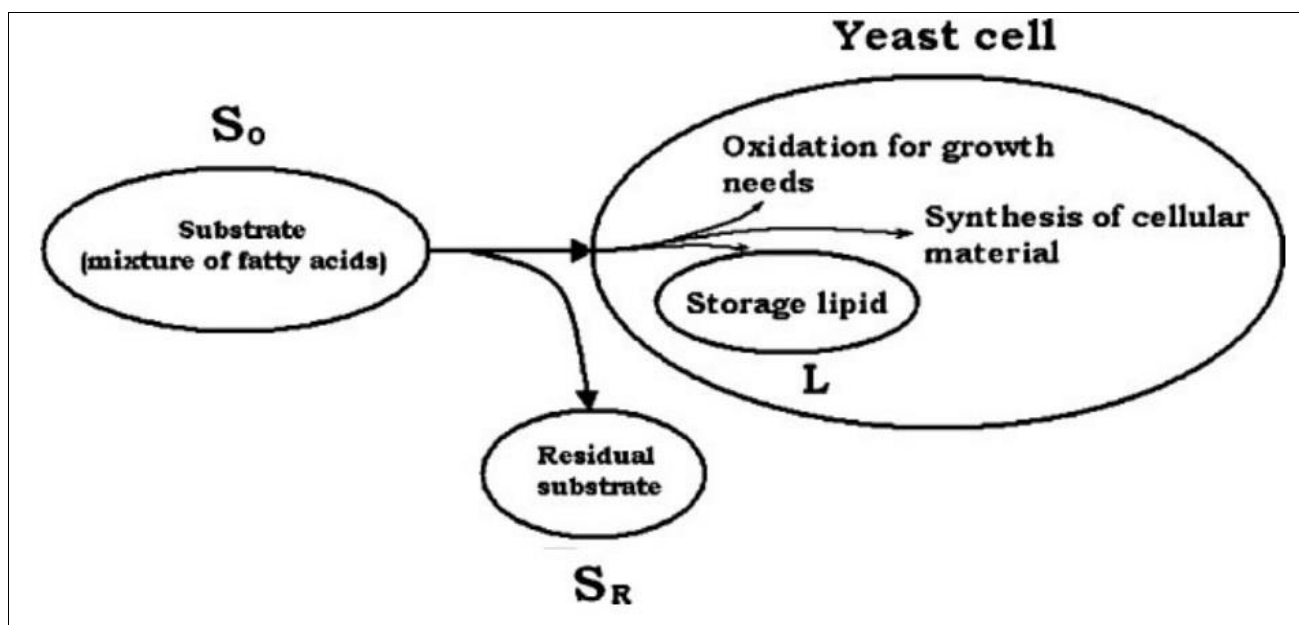


Εικόνα 1.2 . Συνεισφορά του κύκλου Krebs και του κύκλου κιτρικού/μηλικού οξέος στην παροχή Acetyl-CoA και NADPH στην διαδικασία λιπογένεσης στους ελαιογόνους μικροοργανισμούς.

Ένζυμα : 1. αποκαρβοξυλάση του πυροσταφυλικού οξέος, 2. αφυδρογονάση του μηλικού οξέος, 3.μηλικό ένζυμο, 4.αφυδρογονάση του πυροσταφυλικού οξέος, 5.κιτρική συνθάση, 6. ATP: κιτρική λύση, 7. ένζυμο υπεύθυνο για την λειτουργία του συστήματος μεταφοράς κιτρικού/ μηλικού οξέος μεταξύ μιτοχονδρίου και κυτταροπλάσματος (προσαρμογή απο Ratledge, 2004)

1.2.3. Συσσώρευση λιπιδίων "Ex novo"

Όταν κατά την καλλιέργεια ενός μικροοργανισμού χρησιμοποιείται ως πηγή άνθρακα κάποιο υδρόφοβο συστατικό (π.χ λιπαρή ύλη, n-αλκάνια), η συσσώρευση λιπιδίων είναι ανεξάρτητη της πηγής αζώτου και λαμβάνει χώρα ταυτοχρόνως με την κυτταρική αύξηση. Η τύχη των εξωκυτταρικών λιπαρών οξέων όταν αυτά ενσωματωθούν εντός του κυττάρων είναι είτε η πλήρης αποικοδόμηση τους προς Acetyl-CoA και συνακόλουθη είσοδο στον κύκλο του Krebs, είτε η μερική αποικοδόμηση τους προς σχηματισμό οργανικών ενδιάμεσων ενώσεων (αμινοξέα, οργανικά οξέα, μόρια ενδιάμεσης σύνθεσης νουκλεοξέων), είτε τέλος η αποθήκευσή τους εντός σταγονιδίων λίπους στο εσωτερικό των κυττάρων. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον κατά την ανάπτυξη των μικροοργανισμών σε υδρόφοβα υποστρώματα έχει η βιοτροποποίηση του υδρόφοβου υποστρώματος, αφού τα λιπαρά οξέα ή αλκάνια του υποστρώματος εισέρχονται εντός του κυττάρου. Ως εκ τούτου, παρατηρείται ενδεχομένως σημαντική τροποποίηση της σύστασης τόσο του υποστρώματος, όσο και του παραγόμενου ενδοκυτταρικού λίπους, με αποτέλεσμα ενίοτε την παραγωγή μικροβιακού λίπους ιδιαίτερης σύστασης (π.χ ανάλογο του λίπους του κακάο ή γ-λινολενικό οξύ) (Papanikolaou and Aggelis 2003b). Παρακάτω φαίνεται η βιομετατροπή του λίπους κατά την αύξηση μικροοργανισμών.



Εικόνα 1.3. Βιοτροποποίηση λίπους κατά την αύξηση ζύμης σε λιπαρά υλικά (Papanikolaou and Aggelis 2010).

Τα πρώτα λιπαρά οξέα που σχηματίζονται, σε όλους σχεδόν τους οργανισμούς, είναι το παλμιτικό και το στεατικό οξύ. Αυτά τα κορεσμένα λιπαρά οξέα τροποποιούνται περαιτέρω μέσω της δράσης ελονγκασών και αποκορεσμάσων για να προκύψουν τελικά τα διάφορα ακόρεστα και πολυακόρεστα λιπαρά οξέα μεγάλης αλειφατικής αλυσίδας. Το ποιά λιπαρά οξέα θα βρίσκονται σε υψηλότερες συγκεντρώσεις εξαρτάται, φυσικά, από τον κάθε μικροοργανισμό. Στις ελαιογόνες ζύμες, για παράδειγμα, τα λιπαρά οξέα ελαϊκό και λινελαϊκό (με 18 άτομα άνθρακα) και τα λιπαρά οξέα παλμιτικό και παλμιτελαϊκό (με 16 άτομα άνθρακα) βρίσκονται σε υψηλότερες συγκεντρώσεις. Το ίδιο ισχύει για την περίπτωση των Ζυγομυκήτων, στους οποίους το ελαϊκό βρίσκεται σε μεγαλύτερα ποσοστά, ακολουθούμενο από το λινελαϊκό και παλμιτικό οξύ. Στις ζύμες τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα συναντώνται σε χαμηλές συγκεντρώσεις, συνήθως κάτω από 10% . Μόνο σε κάποιους μύκητες και σε ορισμένα μικροφύκη τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα συναντώνται σε ποσοστό μεγαλύτερο από 20% επί των ολικών λιπιδίων. Γι' αυτό και το ερευνητικό ενδιαφέρον έχει στραφεί σε αυτούς τους μύκητες και τα μικροφύκη που συσσωρεύουν υψηλές ποσότητες τριγλυκεριδίων επί των οποίων είναι εστεροποιημένα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα.

1.2.4. Δομή και σύσταση των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (PUFAs)

Τα λιπαρά οξέα είναι οργανικές ενώσεις που αποτελούνται από αλυσίδες υδρογονανθράκων οι οποίες καταλήγουν σε μια καρβοξυλική ομάδα. Ανάλογα με τη φύση της ανθρακικής αλυσίδας, τα λιπαρά οξέα διακρίνονται σε κορεσμένα λιπαρά οξέα (διαθέτουν μόνο απλούς δεσμούς στο μόριο τους) και σε ακόρεστα λιπαρά οξέα (διαθέτουν τουλάχιστον ένα διπλό δεσμό στο μόριο τους). Τα ακόρεστα λιπαρά οξέα διακρίνονται σε μονοακόρεστα (έναν διπλό δεσμό) και σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFAs) όταν διαθέτουν περισσότερους διπλούς δεσμούς.

Πολλά από τα λιπαρά οξέα μπορούν να συντεθούν από τον ανθρώπινο οργανισμό *de novo*, όμως υπάρχει μια κατηγορία πολυακόρεστων λιπαρών οξέων, τα απαραίτητα λιπαρά οξέα (Essential Fatty Acids-EFAs), τα οποία δε μπορούν *de novo* να παραχθούν από τον άνθρωπο. Αυτά τα λιπαρά οξέα (EFAs) διακρίνονται σε δυο κύριες κατηγορίες: τα λιπαρά οξέα που ανήκουν στην ω-3 ομάδα (λινολενικός τύπος) και αυτά που ανήκουν στην ω-6 ομάδα (λινελαϊκός τύπος), ανάλογα με τη θέση του τελευταίου διπλού δεσμού σε σχέση με την τελική μεθυλική ομάδα. Η βιοσύνθεση των δυο βασικών αυτών ομάδων πολυακόρεστων λιπαρών οξέων αναλύεται παρακάτω. Η ομάδα ω-6 και ω-3 συντίθενται από το λινελαϊκό οξύ (C18:2. ω-6) και το α-λινολενικό οξύ (C18:3. ω-3). αντίστοιχα. Τόσο το λινελαϊκό όσο και το α-λινολενικό οξύ ανήκουν στα απαραίτητα λιπαρά οξέα (EFAs) και όπως αναφέρθηκε παραπάνω, δε μπορούν να συντεθούν *de novo* από τον άνθρωπο. Ωστόσο, τα

απαραίτητα αυτά λιπαρά οξέα συντίθενται στους φυτικούς οργανισμούς από τους οποίους ο άνθρωπος τα παραλαμβάνει μέσω της τροφής.

Το λινελαϊκό οξύ (C18:2, ω-6) και το α-λινολενικό οξύ (C18:3, ω-3) μετά την πρόσληψη τους, αποτελούν πρόδρομες ενώσεις για το σχηματισμό μακρομοριακών πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (Long Chain Polyunsaturated Fatty Acids. LC-PUFAs), που περιέχουν 20 ή και περισσότερα άτομα άνθρακα, καθώς και τρεις ή περισσότερους διπλούς δεσμούς (Ratledge and Wynn, 2006). Αξίζει να σημειωθεί ότι η σύνθεση των μακρομοριακών πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (LC-PUFAs) από τα απαραίτητα λιπαρά οξέα, που λειτουργούν ως προάγγελοι, λαμβάνει χώρα μόνο στα ζωικά κύτταρα, ενώ η σύνθεση τους στα φυτικά κύτταρα είναι αδύνατη. Επομένως, το ζωικό λίπος και ιδιαίτερα το ιχθυέλαιο αποτελεί κύρια πηγή παραγωγής μακρομοριακών πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (LC-PUFAs). Τα μακρομοριακά πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (LC-PUFAs) που προέρχονται τόσο από την ομάδα ω-3 όσο και από την ομάδα ω-6, αποτελούν κλειδιά για τη ρύθμιση της ρευστότητας των μεμβρανών και για άλλες λειτουργίες που σχετίζονται με αυτήν. Το λινελαϊκό οξύ (C18:2, ω-6) αποτελεί πρόδρομη ένωση για τη σύνθεση του γ-λινολενικού οξέος (GLA, C18:3, ω-6) και του αραχιδονικού οξέος (ARA, C20:4, ω-6), ενώ το α-λινολενικό οξύ (C18:3, ω-3) είναι προάγγελος για τη σύνθεση του εικοσιδυοεξανοϊκού οξέος (DHA, C22:6, ω-3) και του εικοσιπεντενοϊκού οξέος (EPA, C20:5, ω-3). Ο ρόλος του DHA στην ανάπτυξη του εγκεφάλου τονίζεται ιδιαίτερα, καθώς μια διατροφή πλούσια σε DHA συμβάλλει στην αύξηση του μεγέθους του εγκεφάλου και επομένως και στην ανάπτυξη της νοητικής ικανότητας.

Επίσης, το αραχιδονικό οξύ (ARA, C20:4, ω-6) και το διομο-γ-λινολενικό οξύ (C20:3, ω-6) είναι προάγγελοι της ω-6 ομάδας για τη σύνθεση των προσταγλανδινών, ενώ το εικοσιπεντενοϊκό οξύ (C20:5, ω-3) αποτελεί πρόδρομη ένωση της ομάδας ω-3 για τη σύνθεση επίσης των προσταγλανδινών (Ratledge and Wynn, 2006).

1.2.5. Ιδιότητες των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (PUFAs)

Τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (Polyunsaturated Fatty acids-PUFAs) παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον γιατί παίζουν σημαντικό ρόλο στη διατροφή και τη λειτουργία του ανθρώπινου οργανισμού. Οι κύριες πηγές που είναι πλούσιες σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα με 18 άτομα C (CIS PUFAs) είναι οι σπόροι κάποιων φυτών με μεγάλη περιεκτικότητα σε λινελαϊκό οξύ (C18:2, ω-6) και σε α-λινολενικό οξύ (C18:3, ω-3). Αντίθετα, τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFAs) με περισσότερα από 18 άτομα C στο μόριο τους δε μπορούν να συντεθούν από τα ανώτερα φυτικά είδη εξαιτίας της έλλειψης των απαιτούμενων ενζύμων (Certik and Shimizu, 1999). Ωστόσο, το λίπος των

ψαριών είναι πλούσιο σε λιπαρά οξέα της ομάδας ω-3. όπως το εικοσιπεντανοϊκό οξύ (EPA, C20:5, ω-3) και το εικοσιδυοεξανοϊκό οξύ (DHA, C22:6, ω-3).

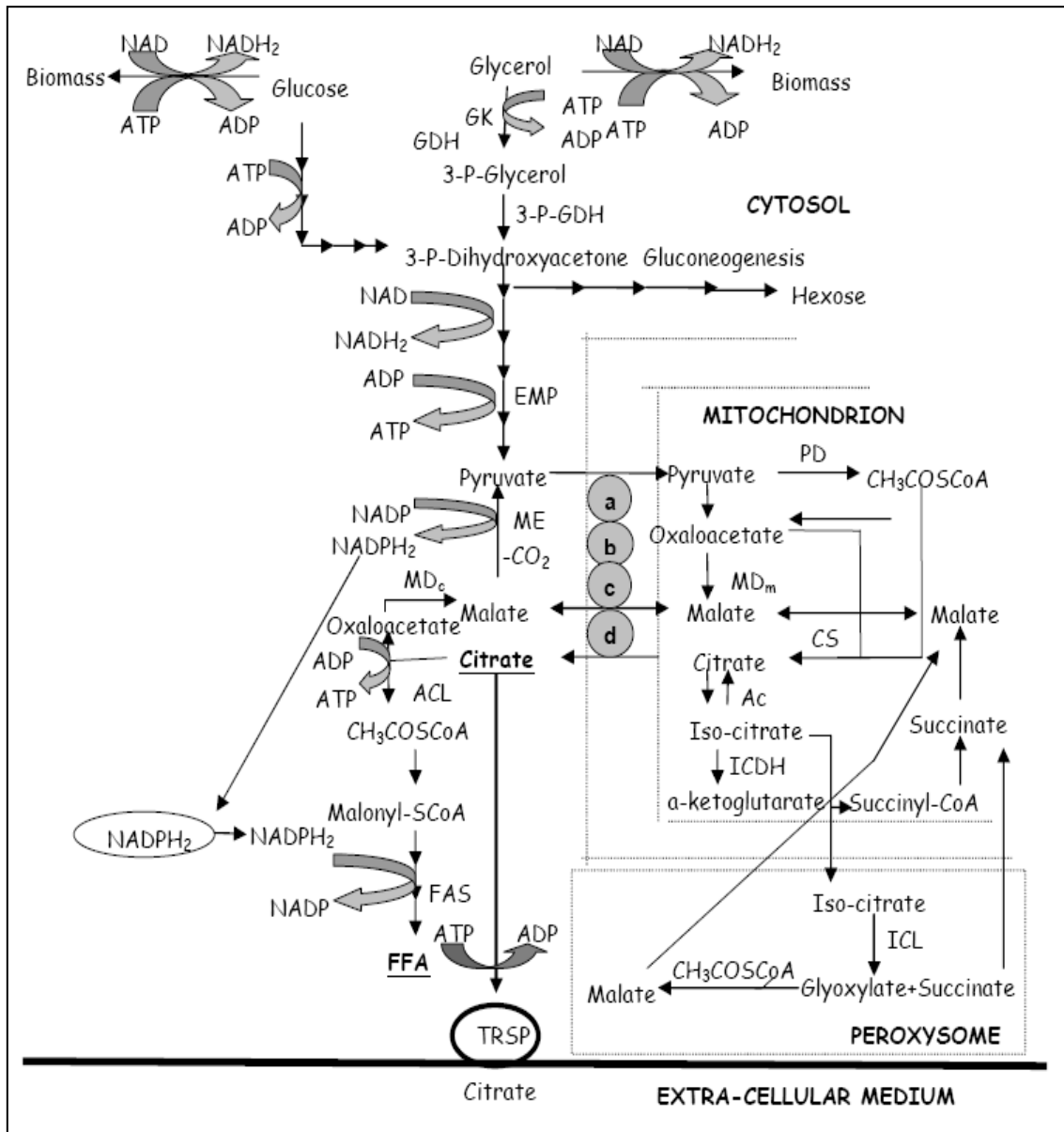
Παρά το γεγονός ότι σε γενικές γραμμές τα λιπίδια σε μεγάλες ποσότητες θεωρούνται επιβλαβή για τη υγεία του ανθρώπου, όταν λαμβάνονται με μέτρο αποτελούν απαραίτητα και ωφέλιμα συστατικά για μια ισορροπημένη διατροφή. Τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα με τα μοναδικά δομικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά που διαθέτουν, ξεχωρίζουν για δυο βασικές λειτουργίες. Συμβάλλουν στη ρύθμιση της δομής, της δυναμικής και της διαπερατότητας των μεμβρανών και επιπλέον, ελέγχουν την έκφραση διαφόρων γονιδίων επηρεάζοντας διάφορες διεργασίες, όπως τη βιοσύνθεση των λιπαρών οξέων και τη μεταφορά της χοληστερόλης στο ανθρώπινο σώμα. Επιπλέον, ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει ο ρόλος των ακόρεστων λιπαρών οξέων ως προάγγελοι για τη σύνθεση διαφόρων μεταβολιτών-ορμονών (προσταγλανδίνες, υδροξυ-λιπαρά οξέα και εικοσανοειδή) που ρυθμίζουν σημαντικές βιολογικές λειτουργίες (Certik and Shimizu, 1999). Είναι φανερό ότι η παρουσία των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων σε κάθε οργανισμό είναι απαραίτητη προκειμένου να τελεστούν σωστά όλες οι λειτουργίες. Επομένως, η έλλειψη τους σε έναν οργανισμό μπορεί να οδηγήσει σε ανωμαλίες του δέρματος, του νευρικού, του ανοσοποιητικού και του καρδιαγγειακού συστήματος, καθώς και σε νεφρικά, αναπνευστικά και ενδοκρινολογικά προβλήματα.

Έχουν πραγματοποιηθεί πολλές μελέτες που αφορούν στην σπουδαιότητα των ω-3 λιπαρών οξέων και την αναγκαιότητα πρόσληψής τους από τον άνθρωπο. Επιδημιολογικές έρευνες έδειξαν ότι μια διατροφή πλούσια σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα της ομάδας ω-3 συμβάλλει στην πρόληψη από σοβαρές ασθένειες, όπως έμφραγμα του μυοκαρδίου και βρογχικό άσθμα. Επιπλέον, έχει μελετηθεί ότι τα ω-3 πολυακόρεστα λιπαρά οξέα μπορεί να έχουν θετικά αποτελέσματα σε ασθένειες όπως η ψωρίαση, οι νοητικές ασθένειες και η ρευματοειδής αρθρίτιδα (Rubio-Rodriguez *et al*, 2010).

1.3. Βιοχημεία παραγωγής κιτρικού οξέως

Οι διεργασίες συσσώρευσης ενδοκυτταρικού λίπους και συσσώρευσης κιτρικού οξέος κατά τα πρώτα στάδια τους είναι βιοχημικά ταυτόσημες, και οι μικροοργανισμοί κατηγοροποιούνται σε αυτούς που δύναται να συνθέσουν λίπος και σε αυτούς οι οποίοι δύναται να συνθέσουν κιτρικό οξύ (Papanikolaou *et al*, 2002; 2006; 2008). Στην περίπτωση που το ένζυμο ATP:κιτρική λυάση απουσιάζει από έναν μικροοργανισμό ή είναι ανενεργό, η εξάντληση των αποθεμάτων αζώτου στο μέσο καλλιέργειας οδηγεί σε απέκκριση του παραγόμενου ενδοκυτταρικού κιτρικού οξέος. Στην

εικόνα που ακολουθεί απεικονίζεται η βιοσυσσώρευση λίπους στους ελαιογόνους μικροοργανισμούς, καθώς και η έκκριση κιτρικού οξέος κατά την καλλιέργεια τους σε γλυκόζη ή γλυκερόλη.



Εικόνα 1.4 Διάμεσος μεταβολισμός γλυκόζης και γλυκερόλης στους ελαιογόνους μικροοργανισμούς. Παραγωγή κιτρικού οξέος και/ ή μικροβιακού λίπους. a,b,c: Συστήματα μεταφοράς του πυροσταφυλικού οξέος από το κυτόπλασμα στο μιτοχόνδριο και του μηλικού οξέος αντιστρόφως, d: Σύστημα μεταφοράς του κιτρικού και του μηλικού οξέος μεταξύ κυτοπλάσματος και μιτοχονδρίου. EMP: Embden-Mayerhoff-Parnas (Papanikolaou, 2008).

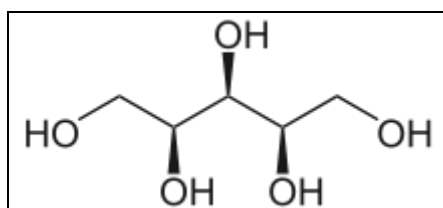
Κιτρικό οξύ συντίθεται ως μέρος του κύκλου του Krebs εντός του μιτοχονδρίου των ευκαρυωτικών κυττάρων. Σε ελαιογόνους μικροοργανισμούς, η συσσώρευση κιτρικού οξέος συσχετίζεται με την δραστηριότητα της ισοκιτρική αφυδρογονάση (ICDH) ως ένα συστατικό του κύκλου Krebs. Η ICDH εξαρτάται από την παρουσία της AMP, η συγκέντρωση της οποίας ρυθμίζεται από τη δραστηριότητα της AMP δεαμινάσης. Η δραστηριότητα της AMP δεαμινάσης ρυθμίζεται με την έναρξη του σημείου όπου στο μέσο ανάπτυξης έχουμε περιορισμό αζώτου (πιθανώς λόγω της ανάγκης για επιπλέον ιόντα αμμωνίου από τα ενδοκυτταρικά υλικά). Όταν το άζωτο έχει εξαντληθεί από το μέσο καλλιέργειας, τα κύτταρα εμφανίζουν αυξημένη συγκέντρωση AMP δεαμινάσης που ακολουθείται από τη μείωση του κυτταρικού περιεχομένου σε AMP (συμπεριλαμβανομένου του περιεχομένου της στο μιτοχόνδριο). Η μειωμένη περιεκτικότητα σε AMP στο μιτοχόνδριο σταματά τη δραστηριότητα της ICDH (εξαρτάται αυστηρά από AMP όσον αφορά τα κύτταρα ελαιογόνων μικροοργανισμών) με αποτέλεσμα το ισοκιτρικό να μην είναι σε θέση να μεταβολιστεί. Έτσι συσσωρεύεται στο μιτοχόνδριο και εξισορροπείται με κιτρικό οξύ (μέσω της ακονιτάσης). Ως εκ τούτου, το κιτρικό οξύ συσσωρεύεται στο μιτοχόνδριο και η εξαγωγή του στο κυτταρόπλασμα (σε αντάλλαγμα για μηλικό) παράγεται από ένα αποτελεσματικό σύστημα εκροής (που υπάρχει στην μιτοχονδριακή μεμβράνη).

Ωστόσο στην περίπτωση της ζύμης *Yarrowia lipolytica* καλλιεργούμενη σε γλυκερόλη ως μοναδική πηγή άνθρακα, σε περιοριστικές σε άζωτο συνθήκες που ευνοούν την σύνθεση λίπους ή/και την παραγωγή κιτρικού οξέος παράγαγε εξωκυτταρικά υψηλές ποσότητες κιτρικού οξέος κατά την ζύμωση σε φιάλες, ενώ αναπτυσσόμενος σε βιοαντιδραστήρα συνεχούς ροής καλλιέργειας με υψηλή ανάδευση και αερισμό, παράγαγε υψηλές ποσότητες ενδοκυτταρικού λίπους (Papanikolaou *et al*, 2002b; Papanikolaou and Aggelis, 2002).

1.4. Ξυλιτόλη και βιοχημεία παραγωγής της από ξυλόζη

Η ξυλιτόλη είναι ένα γλυκαντικό το οποίο χρησιμοποιείται ως ένα φυσικό υποκατάστατο της ζάχαρης. Βρίσκεται στις ίνες πολλών φρούτων και λαχανικών, και μπορεί να εξαχθεί από διάφορα μούρα, βρώμη, μανιτάρια, καθώς και από ινώδη υλικά, όπως φλούδες καλαμποκιού, ζαχαροκάλαμου και σημύδας. Η ξυλιτόλη είναι μια οργανική ένωση με τον χημικό τύπο $(\text{CHOH})_3(\text{CH}_2\text{OH})_2$ και είναι το μη χειρόμορφο από τα τέσσερα ισομερή της 1,2,3,4,5-πεντανο-πεντόλης. Είναι περίπου τόσο γλυκιά όσο η σουκρόζη, αλλά με μόνο τα δύο τρίτα της θερμιδικής αξίας. Όπως και με άλλα σάκχαρα, η υπερβολική κατανάλωση μπορεί να οδηγήσει σε προσωρινές γαστρεντερικές ανεπιθύμητες ενέργειες, όπως φούσκωμα, μετεωρισμός και διάρροια. Η ξυλιτόλη έχει ένα

χαμηλότερο όριο ημερήσιας πρόσληψης από ορισμένες αλκοόλες της ζάχαρης, αλλά είναι πιο εύκολα ανεκτή από άλλες, όπως τημανιτόλη και τησορβιτόλη (Derek and Stewart, 2008).



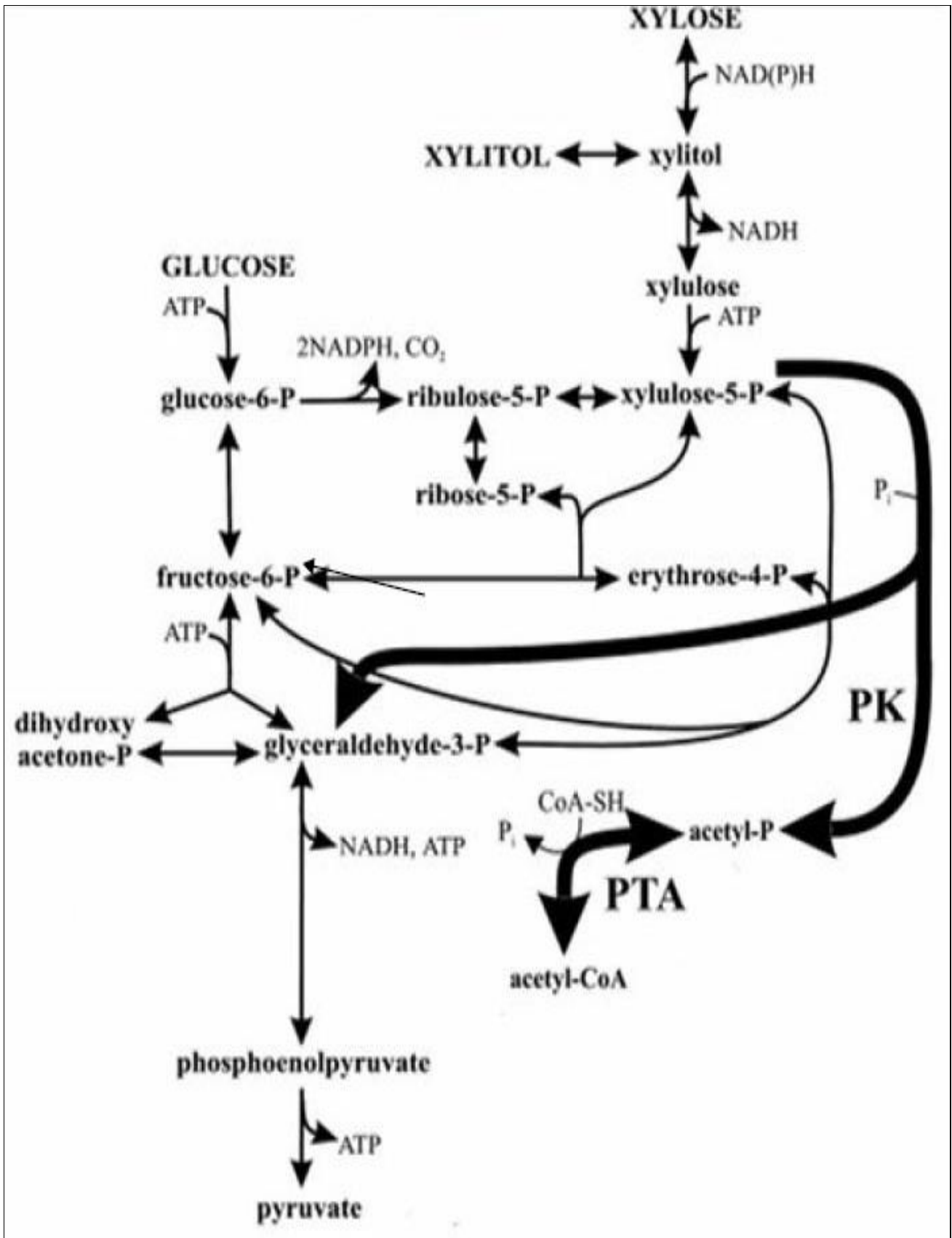
Σχήμα 1.1 Μοριακός Τύπος Ξυλιτόλης

(<http://sweetenersupplier.com>)

Στη βιομηχανία παράγεται από ανανεώσιμες πρώτες ύλες, όπως καλαμπόκι, αλλά και από λιγότερο περιβαλλοντικά βιώσιμες πηγές, όπως σκληρό ξύλο. Η ξυλιτόλη εμφανίζεται φυσικά και στο σώμα μας - στην πραγματικότητα, ένας μέσος ενήλικας άνθρωπος κατασκευάζει μέχρι και 15 γραμμάρια ξυλιτόλης καθημερινά κατά τη διάρκεια του κανονικού μεταβολισμού. Η καθαρή ξυλιτόλη είναι μια λευκή κρυσταλλική ουσία που μοιάζει και έχει γεύση όπως η ζάχαρη (Walfridsson *et al*, 1995).

Διάφορες μελέτες έδειξαν τα οφέλη που έχει η κατανάλωση ξυλιτόλης και στην υγιεινή των δοντιών. Για το λόγο αυτό, σήμερα η ξυλιτόλη χρησιμοποιείται ευρύτατα ως γλυκαντικό στις οδοντόστιγλες ή σε άλλα προϊόντα στοματικής υγιεινής, όπως οδοντόπαστες και στοματικά διαλύματα. Η παγκόσμια ζήτηση της ξυλιτόλης εκτιμάται σε πάνω από 100.000 τόνους, με τάση αύξησης λόγω των νέων προϊόντων που εισέρχονται στην αγορά και περιέχουν ξυλιτόλη (Douglas *et al*, 1988).

Η ξυλιτόλη είναι μία πολυουόλη με δομή αλυσίδας πέντε ατόμων άνθρακα, το οποίο είναι ένα ξεχωριστό γνώρισμα σε σχέση με τα κοινά σάκχαρα που έχουν έξι άτομα άνθρακα. Η μοριακή αυτή ιδιομορφία της ξυλιτόλης είναι υπεύθυνη για τα ευεργετικά χαρακτηριστικά της. Ενώ ο άνθρωπος και μερικοί άλλοι ανώτεροι οργανισμοί έχουν το κατάλληλο μεταβολικό μονοπάτι προκειμένου να χρησιμοποιήσουν τη ξυλιτόλη ως μια εναλλακτική πηγή ενέργειας, πολλοί μικροοργανισμοί (συμπεριλαμβανομένου και πολλών κοινών παθογόνων βακτηρίων) δεν μπορούν να μεταβολίσουν την ουσία αυτή. Επίσης, η ξυλιτόλη εμποδίζει την ικανότητα των βακτηρίων να προσκολλούνται σε ιστούς του σώματος, όπως στο στόμα και στις ρινικές οδούς. Η έρευνα σχετικά με τις χρήσεις της ξυλιτόλης εστιάστηκε στην υγιεινή των δοντιών, αλλά επεκτάθηκε και στο τομέα του διαβήτη, της θεραπείας τραυμάτων, της υγιεινής του αναπνευστικού συστήματος και στην απορρόφηση του ασβεστίου σε παθολογικές περιπτώσεις. Από την έρευνα αυτή έχουν προκύψει σημαντικά συμπεράσματα και πρακτικές εφαρμογές για τη ξυλιτόλη (Hatakeyama *et al*, 2002).



Εικόνα 1.5 Αποικοδόμηση της ξυλόζης μέσω της οδού κετολάσης και/ή των φωσφορικών πεντοζών

Γενικότερα ο μικροοργανισμός της ζύμωσης μας πρέπει να είναι σε θέση να ζυμώνει όλους τους παρόντες μονοσακχαρίτες και επιπλέον να αντέξει πιθανούς αναστολείς της υδρόλυσης. Έχουν βρεθεί μικροοργανισμοί που ζυμώνουν πεντόζες σε βακτήρια, ζύμες και μύκητες με τις ζύμες *Pichia stipitis*, *Candida shehatae*, and *Pachysolen tannophilus* να είναι οι περισσότερο υποσχόμενοι μικροοργανισμοί.

Σε ένα πρώτο επίπεδο, μέσω αντίδρασης καταλυόμενης από την NADH- ή NADPH- εξαρτώμενη αφυδρογονάση, θα αναχθεί σε ξυλιτόλη. Η ξυλιτόλη θα οξειδωθεί μέσω αντίδρασης καταλυόμενης από την NADH- ή NADPH- εξαρτώμενη αφυδρογονάση, σε ξυλουλόζη. Το μονοπάτι κετολάσης είναι πιο αποδοτικό καθώς αποδίδει 1,3 moles ακέτυλο-CoA ανά 100 g ξυλόζη σε σχέση με αυτό των φωσφορικών πεντοζών το οποίο αποδίδει 1,0 moles ακέτυλο-CoA ανά 100 g ξυλόζης.

1.5. Ελαιογόνοι μικροοργανισμοί

Γενικά όλοι οι μικροοργανισμοί συνθέτουν λιπίδια, ωστόσο για να θεωρηθεί ένας μικροοργανισμός ελαιογόνος θα πρέπει να μπορεί να συσσωρεύει στο κύτταρό του πάνω από 20% ^{w/w} λιπίδια σε ξηρό βάρος. Αυτό που κάνει αυτούς τους μικροοργανισμούς ιδιαίτερους δεν είναι κάποιος ιδιαίτερος μηχανισμός παραγωγής και συσσώρευσης λιπιδίων αλλά η μεγάλη ικανότητά τους να παράγουν συνεχώς Acetyl-CoA απευθείας στο κυτταρόπλασμα και η δυνατότητα του μικροοργανισμού να παρέχει επαρκείς ποσότητες NADPH, το οποίο είναι σημαντικό αναγωγικό μέσο κατά την σύνθεση λιπαρών οξέων. Οι μικροοργανισμοί αυτοί μπορούν να ανήκουν στις ζύμες, στους μύκητες, στα βακτήρια και στα μικροφύκη (Αγγελής, 2007). Μερικοί από αυτούς τους μικροοργανισμούς φαίνονται στον Πίνακα 1.2.

Πίνακας 1.2. Ελαιογόνοι μικροοργανισμοί και περιεκτικότητα σε λίπος

Μικροοργανισμοί	Περιεκτικότητα σε λάδι (% ξηρού βάρους)
Μικροφύκη	
<i>Botryococcus braunii</i>	25-75
<i>Cylindrotheca</i> sp.	16-37
<i>Chlorella</i> sp.	28-32
<i>Dunaliella salina</i>	47
<i>Isochrysis</i> sp.	25-33
<i>Nannochloris</i> sp.	20-35
<i>Nannochloropsis</i> sp.	21-68
<i>Neochloris oleoabundans</i>	35-54
<i>Nitzschia</i> sp.	45-47
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	20-30
<i>Schizochytrium</i> sp.	50-77
<i>Tetraselmis sueica</i>	15-23
Βακτήρια	
<i>Arthrobacter</i> sp.	>40
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	27-38
<i>Rhodococcus opacus</i>	24-25
<i>Bacillus alcalophilus</i>	18-24
Ζύμες	
<i>Candida curvata</i>	58
<i>Cryptococcus albidus</i>	65
<i>Lipomyces starkeyi</i>	64
<i>Rhodotorula glutinis</i>	72
Μύκητες	
<i>Aspergillus oryzae</i>	57
<i>Mortierella isabellina</i>	86
<i>Humicola lanuginose</i>	75
<i>Mortierella vinacea</i>	66

Πηγή: Αγγελής (2007)

Τα λιπίδια που συνθέτουν οι μικροοργανισμοί είναι γνωστά ως μικροβιακά λιπίδια ή μονοκυτταρικά λιπίδια (Single-Cell Oil, SCO). Αποτελούνται κυρίως από τριγλυκερίδια (TAG's) αλλά και από ελεύθερα λιπαρά οξέα, ουδέτερα λιπαρά οξέα (όπως μονοακυλογλυκερόλες, διακυλογλυκερόλες, και στερυλο-εστέρες), στερόλες και πολικά κλάσματα (όπως φωσφολιπίδια, σφιγγολιπίδια, γλυκολιπίδια) σε αξιοσημείωτες ποσότητες. Ανάλογα βέβαια με το υπόστρωμα αλλά και με τον μικροοργανισμό που χρησιμοποιείται αλλάζουν οι συγκεντρώσεις αυτών. Για παράδειγμα όσον αφορά τα υποστρώματα έχει παρατηρηθεί γενικά ότι οι ελαιογόνοι μικροοργανισμοί που αυξάνονται σε υδρόφοβα υποστρώματα παράγουν λιπίδια με μικρότερο ποσοστό τριγλυκεριδίων σε σχέση με αυτούς που αυξάνονται σε σάκχαρα (Papanikolaou and Aggelis, 2011).

Ακόμα τα λιπίδια των μυκήτων είναι πιο ακόρεστα σε σχέση με αυτά των ζυμών. Γι' αυτό ανάλογα με το τι λιπίδια θέλουμε να παράξουμε χρησιμοποιούμε τα κατάλληλα υποστρώματα και μικροοργανισμούς. Αν και τα τελευταία χρόνια η εξέλιξη της γενετικής μηχανικής έχει ως αποτέλεσμα την δημιουργία νέων βελτιωμένων στελεχών με περισσότερες ικανότητες και δυνατότητες. Το ενδιαφέρον των μικροβιακών λιπιδίων είναι μεγάλο, καθώς αυτά θεωρούνται άριστη πηγή πολυακόρεστων λιπαρών οξέων όπως π.χ. γ-λινολενικού, δίομο-γ-λινολενικού, αραχιδονικού, εικοσιπενταενοϊκού κ.ά. Αυτά τα λιπαρά οξέα χρησιμοποιούνται στην κλινική διατροφή και ως πρώτες ύλες για παρασκευή ειδικών τροφών και καλλυντικών. Από την άλλη πλευρά, μερικοί μικροοργανισμοί, κάτω από ορισμένες συνθήκες αύξησης, συσσωρεύουν λιπιδιακά αποθέματα των οποίων η δομή παρουσιάζει εξαιρετικό ενδιαφέρον, επειδή μοιάζει με τη δομή διαφόρων «εξωτικών» λιπών, όπως π.χ. του λίπους του κακάο, της φάλαινας κ.λ.π. Η παραγωγή των λιπών αυτών είναι περιορισμένη, επειδή προσκρούει σε φυσικούς περιορισμούς (όπως το λίπος ζωικών ειδών που είναι υπό εξαφάνιση) ή είναι προνόμιο ορισμένων μόνο χωρών (όπως το λίπος του κακάο). Τέλος, έχει βρεθεί ότι λιπίδια στους πλείστους ελαιογόνους μικροοργανισμούς έχουν δομή και σύνθεση παρόμοια με αυτήν των φυτικών ελαίων που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή βιοντίζελ και αποτελούν ιδανικούς υποψήφιους αντικαταστάτες αυτών. Η αυξανόμενη χρήση και ζήτηση των φυτικών ελαίων για παραγωγή βιοντίζελ έχει οδηγήσει σε αύξηση της τιμής τους αλλά και η άποψη ότι δεν είναι “ηθικό” να χρησιμοποιείται η αρόσιμη γη για παραγωγή ενέργειας (βιοντίζελ) αντί για παραγωγή τροφίμων την στιγμή που άνθρωποι πεθαίνουν από την πείνα καθιστά την αντικατάστασή τους απαραίτητη (Αγγελής, 2007).

Έρευνες σε ευρωπαϊκό και διεθνή επίπεδο έχουν δείξει ότι ο πληθυσμός της γής το 2050 θα ξεπερνάει τα 10 δισεκατομύρια. Οπότε είναι προφανές ότι η ανάγκες για τροφή και θρέψη του ανθρώπου θα είναι μεγάλες. Επίσης, οι ανάγκες σε ενέργεια το 2050, στρέφει όλους στην αξιοποίηση των μικροοργανισμών μέσω των ζυμώσεων για την παραγωγή βιοκαυσίμων και προϊόντων προστιθέμενης αξίας ώστε να ανταπεξέλθουν στις μελλοντικές ανάγκες.

1.6 Συμβολή των μικροοργανισμών στην Τεχνολογία αειφόρου ανάπτυξης

Μέσω της χρήση μικροοργανισμών στην επεξεργασία αποβλήτων και υπολειμμάτων αγροτοβιομηχανιών μπορεί να επιτευχθεί, εκτός από την απορρύπανση των αποβλήτων και παραγωγή προϊόντων προστιθέμενης αξίας. Κάτι τέτοιο επιτυγχάνεται με χρήση των αποβλήτων ή παραπροϊόντων των βιομηχανιών αυτών ως υποστρώματα ανάπτυξης διαφόρων μικροοργανισμών, με σκοπό την παραγωγή και εκμετάλλευση μεταβολικών προϊόντων τους, όπως είναι το μικροβιακό λίπος (Single-cell oil), η μικροβιακή πρωτεΐνη (Single-cell protein), οργανικά οξέα του κύκλου του Krebs (κυρίως κιτρικό οξύ) και διάφοροι μικροβιακοί διαλύτες (κυρίως 1,3-προπανοδιόλη και ακετόνης-βουτανόλης). Εκτός αυτού, μικροοργανισμοί καλλιεργούμενοι σε βιομηχανικά απόβλητα και παραπροϊόντα μπορούν να παράξουν μία μορφή βιολογικού καυσίμου, το λεγόμενο βιοντήζελ (biodiesel). Μία ακόμη μέθοδος αξιοποίησης των βιομηχανικών υπολειμμάτων, μέσω της χρήσης μικροοργανισμών είναι η θερμοφιλή βιοαποικοδόμηση, γνωστή και ως κομποστοποίηση, μέσω της οποίας παράγονται εδαφοβελτιωτικά.

1.6.1 Ανανεώσιμα υποστρώματα κατάλληλα για τη συσσώρευση μικροβιακού λίπους

Στην μέχρι στιγμής υπάρχουσα βιβλιογραφία έχει αναφερθεί χρησιμοποίηση πληθώρας ανανεώσιμων υποστρωμάτων ή υποστρωμάτων τύπου «αποβλήτων» ως πηγών άνθρακα από ελαιογόνους μικροοργανισμού: προκειμένου να παραχθεί μικροβιακό λίπος (Certik and Shimon, 1999, Fakas *et al*, 2006, 2007, 2008, Αγγελής, 2007). Τα υποστρώματα αυτά διακρίνονται σε υδρόφιλα και υδρόφοβα υποστρώματα.

Στα υδρόφιλα υποστρώματα ανήκουν τα διάφορα σακχαρούχα υποστρώματα, όπως μελάσες ζαχαροκάλαμου ή τεύτλων, χυμοί φρούτων, τυρόγαλα (περιέχει 3-8% λακτόζη) και άλλα υπολείμματα ή απόβλητα βιομηχανιών πλούσια σε σάκχαρα. Επίσης, στην κατηγορία των υδρόφιλων υποστρωμάτων κατατάσσονται τα διάφορα αμυλούχα απόβλητα και η ακατέργαστη βιομηχανική γλυκερόλη (ως παραπροϊόν ελαιουργικών βιομηχανιών και βιομηχανιών παραγωγής καυσίμου τύπου «μεθυλεστέρων») (Paranikolaou and Aggelis, 2002).

Όσον αφορά τα υδρόφοβα ανανεώσιμα υποστρώματα, στην κατηγορία αυτή περιλαμβάνονται λίπη και έλαια, συνήθως χαμηλής προστιθέμενης αξίας, όπως τα ζωικά λίπη (απόβλητα σφαγείων) και το έλαιο ελαιοκράμβης ή βιομηχανικά λιπαρά υπολείμματα και απόβλητα (π.χ. σάπωνες, στεαρίνες κ.λπ.). Επίσης, στα υδρόφοβα υποστρώματα ανήκουν διάφοροι υγροί υδρογονάνθρακες (με περισσότερα από 4 άτομα άνθρακα), η χρήση των οποίων όμως σταδιακά εγκαταλείπεται, λόγω εμφάνισης ορισμένων προβλημάτων, όπως είναι η λήψη ενίοτε πολύ χαμηλών τιμών του συντελεστή μεταφοράς οξυγόνου και η παραγωγή λίπους με ανεπιθύμητες οσμές.

Όπως αναφέρθηκε υπάρχουν θεμελιώδεις βιοχημικές διαφορές κατά την βιοσύνθεση λίπους σε σχέση το υπόστρωμα που χρησιμοποιείται. Όταν την μόνη πηγή άνθρακα και ενέργειας αποτελούν

υποστρώματα «τύπου σακχάρου», δηλαδή υποστρώματα που αποτελούνται από σάκχαρα ή παρομοίως μεταβολιζόμενα συστατικά (π.χ. άμυλο), η σύνθεση του μικροβιακού λίπους από τους ελαιογόνους μικροοργανισμούς ξεκινά μετά την εξάντληση της πηγής αζώτου στο μέσο της καλλιέργειας (το άζωτο αποτελεί περιοριστικό παράγοντα της λιποσυσσώρευσης). Αντίθετα, όταν η καλλιέργεια του μικροοργανισμού πραγματοποιείται σε υπόστρωμα τύπου «λιπαρών υλικών», δηλαδή ως πηγή άνθρακα χρησιμοποιείται κάποιο υδρόφοβο συστατικό, όπως λιπαρή ύλη ή n-αλκάντα, η λιποσυσσώρευση είναι ανεξάρτητη της πηγής αζώτου και λαμβάνει χώρα ταυτοχρόνως με την κυτταρική αύξηση (Papanikolaou *et al*, 2001, 2002. Papanikolaou and Aggelis, 2002, Papanikolaou and Aggelis, 2010; 2011a; 2011b). Πρέπει επίσης να σημειωθεί η αδυναμία παραγωγής ενδοκυτταρικού λίπους σε υποστρώματα που περιέχουν κυτταρινούχα υλικά ή μεθανόλη.

1.7 Σκοπός της πτυχιακής

Η παραγωγή του μικροβιακού λίπους είναι εξαιρετικά δαπανηρή και γίνονται σημαντικές προσπάθειες ώστε να μειωθεί το κόστος. Η αξιοποίηση των λιγνοκυτταρινούχων υπολειμμάτων για τη χρήση των υδρολυμένων προϊόντων τους (ξυλόζη) καθώς και η ακάθαρτη γλυκερόλη ως θρεπτικά υποστρώματα, αποτελεί μια εναλλακτική λύση. Η ξυλόζη και η γλυκερόλη αποτελούν εξαιρετικές πηγές άνθρακα για την καλλιέργεια και ανάπτυξη των ελαιογόνων μικροοργανισμών.

Κατά συνέπεια, στόχος της παρούσας ερευνητικής μελέτης είναι η διερεύνηση της φυσιολογικής συμπεριφοράς και της βιοσύνθεσης ενδοκυτταρικού λίπους των ζυμομύκητων *Rhodosporidium toruloides*, *Candida oleophila*, *Cryptococcus curvatus*, *Metschnikowia pulcherima*, *Yarrowia lipolytica* κατά την καλλιέργεια τους σε λιγνοκυτταρινούχα ανανεώσιμα υποστρώματα και ακάθαρτη γλυκερόλη, με απώτερο σκοπό την ανάπτυξη μικροβιακού λίπους, το οποίο θα μπορούσε να οδηγήσει στην παραγωγή εναλλακτικού καυσίμου βιολογικής προέλευσης (βιοντίζελ-biodiesel) (Αγγελής, 2007, Papanikolaou *et al*, 2007).

Κεφάλαιο 2

2.Υλικά και μέθοδοι

2.1 Βιολογικό υλικό

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν στελέχη των ζυμομυκήτων *Yarrowia lipolytica* (ACA-YC 5033, ACA-YC 5031, ACA-YC 5030, ACA-YC 5029, LGAM S(7)1 και LFMB20), *Rhodospiridium toruloides* (DSM 4444 και NRRL Y-27012), *Candida oleophila* ATCC 20177, *Candida curvata* NRRL-Y 1511, *Cryptococcus curvatus* ATCC 20509 και *Metschnikowia Pulcherima* LFMB1.

Τα παραπάνω στελέχη διατηρούνταν σε κεκλιμένους σωλήνες πεπληρωμένους με θρεπτικό μέσο YPD (1.0% εμπορική γλυκόζη, 1.0% yeast extract, 0.5% peptone και 2.0% agar,) και με θρεπτικό μέσο MEA (1.0% εμπορική γλυκόζη, 1.0% yeast extract, 0.5% peptone, 1.0% malt extract και 2.0% agar,) στην περίπτωση στελεχών του ζυμομύκητα *Rhodospiridium toruloides*, σε θερμοκρασία 4 °C. Η προκαλλιέργεια επωαζόταν 48 ώρες πριν τον εμβολιασμό του μικροοργανισμού στο θρεπτικό μέσο, ενώ η ανανέωση τους λάμβανε χώρα ανά τακτά χρονικά διαστήματα, προκειμένου να διατηρηθεί η ζωτικότητα τους. Επίσης ανανέωση των στελεχών πραγματοποιούνταν πριν από κάθε εμβολιασμό του θρεπτικού μέσου της καλλιέργειας, έτσι ώστε το εμβόλιο να είναι σε κάθε περίπτωση ηλικίας περίπου πέντε ημερών.

2.2 Θρεπτικό μέσο καλλιέργειας ζυμών

Όλες οι καλλιέργειες που πραγματοποιήθηκαν ήταν σε ζυμώσεις βυθού κλειστού τύπου, εντός κωνικών φιαλών των 250 mL, πληρωμένες κατά το 1/5 τους (50±1 mL) με θρεπτικό μέσο. Για τη διεξαγωγή των πειραμάτων, χρησιμοποιήθηκε στα θρεπτικά υποστρώματα ξυλόζη, την οποία προμηθευτήκαμε από την εταιρία Sigma-Aldrich με 98% καθαρότητα και γλυκερόλη καθαρότητας 82% που πήραμε από την εταιρία Πέττας (ακαθαρσίες).

Απαραίτητα στοιχεία για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών αποτελούν ο άνθρακας, το άζωτο, το οξυγόνο καθώς και ένας σημαντικός αριθμός μεταλλικών αλάτων. Ως πηγή άνθρακα χρησιμοποιήθηκαν η ξυλόζη και η γλυκερόλη. Πηγή αζώτου αποτέλεσε η πεπτόνη (peptone) 2 g/L και το εκχύλισμα ζύμης (yeast extract) 2 g/L ώστε να δημιουργηθούν περιοριστικές σε άζωτο

συνθήκες (nitrogen-limited). Το μίγμα αλάτων που προστέθηκε απεικονίζεται στον παρακάτω Πίνακα (2.1).

Πίνακας 2.1. Συγκεντρώσεις αλάτων στο θρεπτικό μέσο καλλιέργειας

Συστατικό	Συγκέντρωση (g/l)
KH_2HPO_4	7.00
Na_2HPO_4	2.50
$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	1.50
$\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$	0.15
$\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$	0.02
$\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$	0.06
$\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$	0.15

Πηγή: Papanikolaou *et al*, 2002

Για τη διεξαγωγή των πρώτων πειραμάτων χρησιμοποιήθηκε ξυλόζη σε συγκέντρωση 60 g/L και μετά την προσθήκη των αλάτων που προαναφέρθηκαν. Για τη διεξαγωγή της δεύτερης σειράς πειραμάτων, μαζί με την προσθήκη των αλάτων προστέθηκε γλυκερόλη σε συγκέντρωση 60 g/L ενώ η τρίτη σειρά πειραμάτων περιλάμβανε συνυποστρώματα ξυλόζης και γλυκερόλης σε συγκεντρώσεις 30 g/L και 30 g/L αντίστοιχα. Το pH του μέσου καλλιέργειας ήταν περίπου μετά την αποστείρωση 6.0. Τα μίγματα καλλιέργειας μεταφέρονταν σε κωνικές φιάλες των 250 mL, κάθε μια εκ των οποίων περιείχε 50 ± 1 mL θρεπτικού υλικού και τοποθετούνταν σε αυτόκλειστο για αποστείρωση (115°C, για 30 min). Μαζί με το συνολικό αριθμό φιαλών που αποστειρώνονταν, προσθέτονταν και δυο κωνικές φιάλες των 250 mL, πεπληρωμένες με σύσταση YPD που προαναφέρθηκε παραπάνω για εμβολιασμό της προκαλλιέργειας. Μετά την αποστείρωση των φιαλών, ακολουθούσε, υπό ασηπτικές συνθήκες, ο εμβολιασμός της προκαλλιέργειας από νωπό εμβόλιο (slant) του εκάστοτε χρησιμοποιούμενου ζυμομύκητα. Η ποσότητα του εμβολίου για κάθε φιάλη (1 mL), αντιστοιχούσε σε 10^5 - 10^7 cfu. Μετά τον εμβολιασμό, οι φιάλες τοποθετούνταν σε ανακινούμενο επωαστικό κλίβανο (New Brunswick Sc USA), στις 180 στροφές ανά λεπτό και θερμοκρασία $T=28^\circ\text{C}$. Οι ζυμώσεις με χρήση στελεχών του *Rhodospiridium toruloides* πραγματοποιούνταν σε $T=26^\circ\text{C}$.

2.3 Συνθήκες καλλιέργειας και ανάπτυξης

Οι συνθήκες είναι αυτές που προαναφέραμε, να σημειωθεί ότι το θρεπτικό μέσο ανάπτυξης των ζυμών ήταν ίδιο τόσο στους δοκιμαστικούς σωλήνες όσο και στην προκαλλιέργεια. Πιο συγκεκριμένα για όλα τα στελέχη χρησιμοποιήθηκαν τα εξής: 1.0% εμπορική γλυκόζη, 1.0% yeast extract, 0.5% peptone και 2.0% agar, στην περίπτωση των δοκιμαστικών σωλήνων για την αποθήκευση του μικροοργανισμού. Όσον αφορά τα στελέχη *Rhodospiridium toruloides* DSM 4444 και *Rhodospiridium toruloides* Y27012, το θρεπτικό υλικό περιλάμβανε πέραν των προαναφερθέντων και 1.0% malt extract. Οι προκαλλιέργειες όλων των στελεχών τοποθετήθηκαν σε ανακινούμενο επωαστικό κλίβανο (New Brunswick Sc, Usa; 180 rpm) , σε θερμοκρασία 28 °C και σε θερμοκρασία 26 °C για τη ζύμη *Rhodospiridium toruloides* DSM 4444 για 48 h.

Για την εξακρίβωση της καθαρότητας της καλλιέργειας, πέραν της άμεσης παρατήρησης νωπού δείγματος από την προκαλλιέργεια στο μικροσκόπιο, πραγματοποιήθηκε και χρώση Gram, ώστε να είναι πιο ευδιάκριτες τόσο οι ζύμες όσο και τα βακτήρια, που είναι συνήθως η κύρια περίπτωση επιμόλυνσης. Για το σκοπό αυτό, ακινητοποιημένο δείγμα από τις κωνικές σε αντικειμενοφόρο πλάκα, βάφτηκε μπλε με τη χρήση κρυσταλλικού ιώδους (Crystal Violet, Merck).

Οι καλλιέργειες πραγματοποιήθηκαν σε περιοριστικές σε άζωτο συνθήκες (nitrogen-limited).

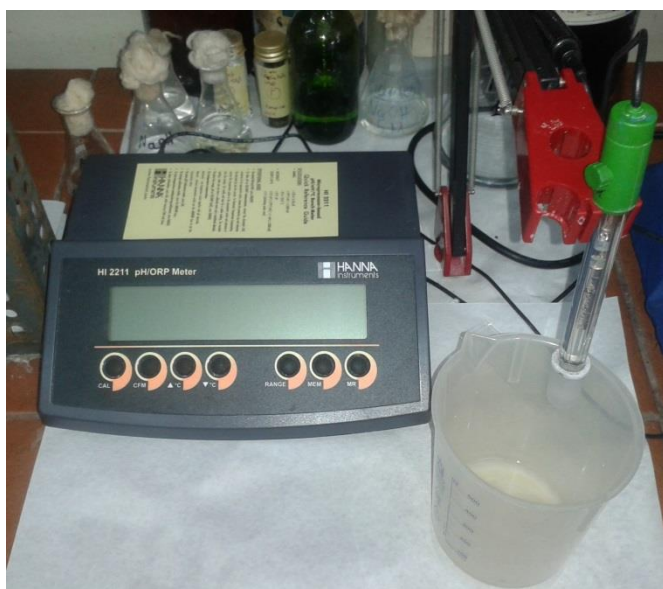


Εικόνα 2.1. Ζύμωση βυθού σε κωνική φιάλη

2.4 Χημικές αναλύσεις

2.4.1 Προσδιορισμός pH

Το pH της καλλιέργειας μετρήθηκε με pH-μετρο τύπου Hanna Instruments Hi 2211 pH meter. Να σημειωθεί ότι μετά τη μέτρηση εκάστοτε σημείου της κινητικής, πραγματοποιείται διόρθωση του pH του θρεπτικού μέσου της καλλιέργειας στις υπόλοιπες φιάλες όποτε κρινόταν απαραίτητο, ώστε το pH στο θρεπτικό να κυμαίνεται στην εύρος τιμών 5,0 – 6,0. Η διόρθωση του pH γίνονταν υπό ασηπτικές συνθήκες με διάλυμα καυστικού νατρίου (NaOH) 5M.



Εικόνα 2.2 pH-μετρο τύπου Hanna Instruments Hi 2211

2.4.2 Συλλογή βιομάζας

Η βιομάζα συλλέγονταν με φυγοκέντρηση σε φυγόκεντρο τύπου Heraeus Sepatech Suprafuge 320 (10000 rpm, 10 min, 4°C). Κατά την πρώτη φυγοκέντρηση το υπερκείμενο συλλεγόταν σε φιαλίδιο Falcon των 15 mL για να γίνουν οι περαιτέρω αναλύσεις, όπως αναφέρονται παρακάτω. Ακολουθούσε έκπλυση των κυττάρων με απιονισμένο νερό και δεύτερη φυγοκέντρηση κάτω από τις ίδιες συνθήκες. Στη συνέχεια, η βιομάζα μεταφέρονταν σε προζυγισμένα φιαλίδια McCartney και τοποθετούνταν στον φούρνο προς ξήρανση (90±5°C) μέχρι τη σταθεροποίηση του βάρους. Το ξηρό υπόλειμμα ζυγίστηκε τελικά σε ζυγό ακριβείας τύπου Sartorius basic, με ακρίβεια 4 δεκαδικών ψηφίων και εκφράστηκε σε g/L.



Εικόνα 2.3 Ζυγός ακριβείας τύπου Sartorius basic

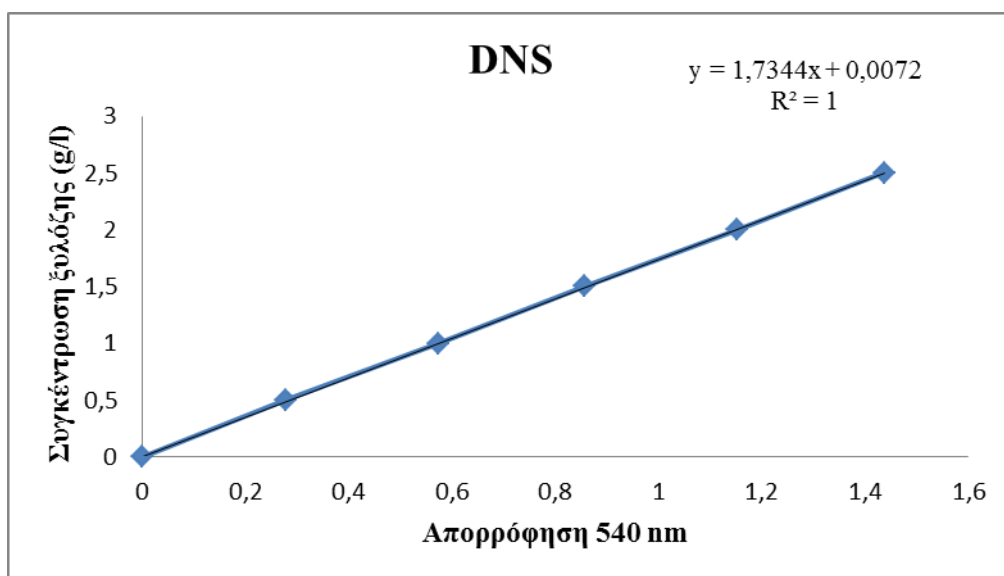
Εικόνα 2.4 Φυγόκεντρος τύπου Heraeus Sepatech Suprafuge 320

2.4.3 Προσδιορισμός αναγόντων σακχάρων

Ο προσδιορισμός της ξυλόζης πραγματοποιήθηκε με τη φωτομετρική μέθοδο του δινιτροσαλικυλικού οξέος (DNS) (Miller, 1959).

Εφαρμογή της μεθόδου:

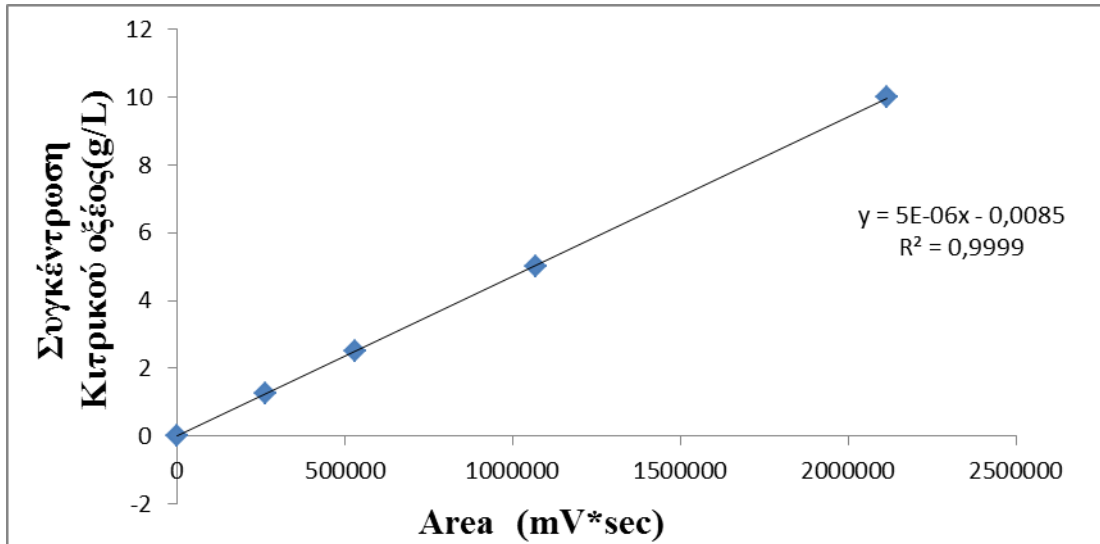
Σε 0.5 mL δείγματος προστίθενται 0.5 mL αντιδραστηρίου DNS και αναδεύονται. Στην συνέχεια μεταφέρονται τα δείγματα σε υδατόλουτρο (100°C) για 5 min ακριβώς και ψύχονται αμέσως με νερό (25°C). Έπειτα προστίθενται 5 mL απιονισμένο νερό, ακολουθεί ανάδευση και μέτρηση της απορρόφησης στα 540 nm. Η συγκέντρωση του δείγματος σε ανάγοντα σάκχαρα υπολογίστηκε με βάση την ακόλουθη καμπύλη αναφοράς, εκφρασμένη σε g/L ξυλόζης αντίστοιχα. Όλες οι απορροφήσεις μετρήθηκαν με φασματοφωτόμετρο τύπου Hitachi U-2000 Spectrophotometer.



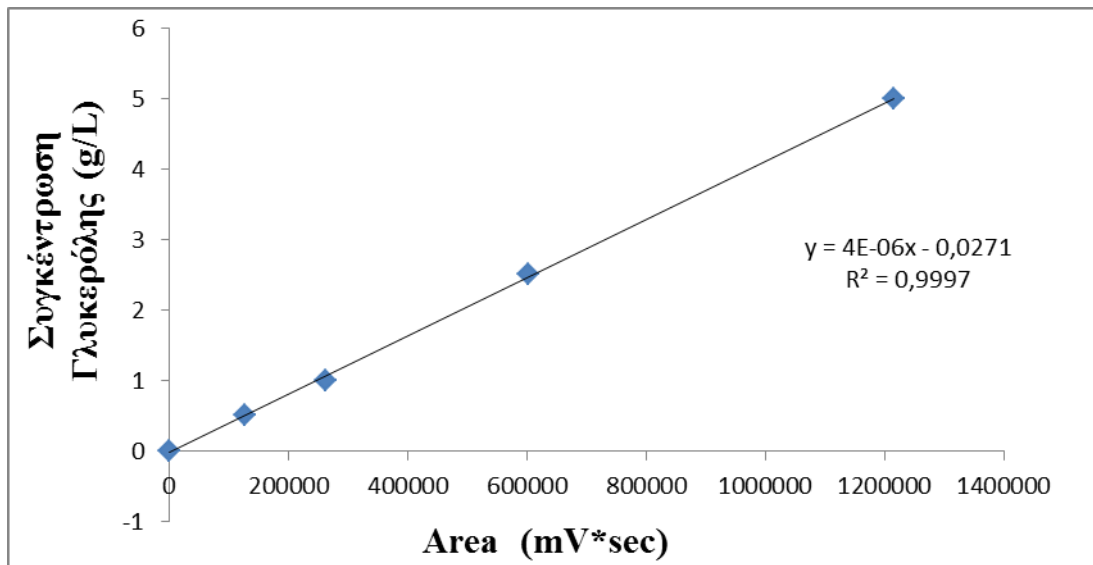
Διάγραμμα 2.1: Πρότυπη καμπύλη αναφοράς ξυλόζης με την μέθοδο DNS

2.4.4. Προσδιορισμός κιτρικού οξέος, γλυκερόλης, ξυλόζης και ξυλιτόλης

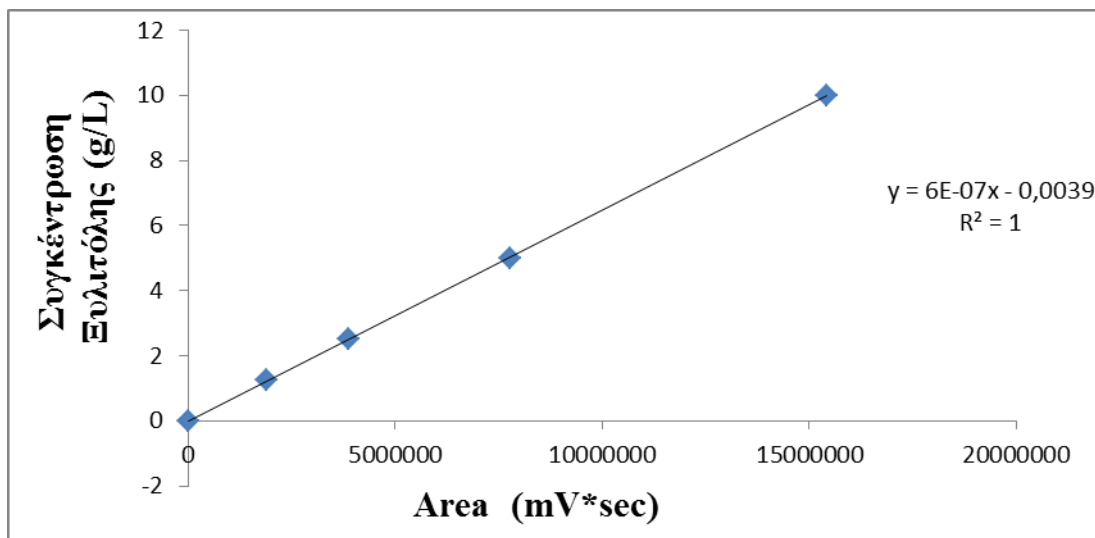
Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης του παραγόμενου (ολικού) κιτρικού οξέος, ξυλόζης, της γλυκερόλης και της ξυλιτόλης πραγματοποιήθηκε με την βοήθεια της Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Αποδόσεως (High Performance Liquid Chromatography, H.P.L.C.) σε σύστημα Waters 600E (Waters, Milford, MA, USA). Η ανίχνευση πραγματοποιήθηκε μέσω ανιχνευτή διαφορικού διαθλασίμετρου (RI Waters 410). Η ταυτοποίηση της κάθε ουσίας βασίστηκε στον χρόνο κατακράτησης, ο οποίος συγκρίθηκε με γνωστά δείγματα αυτής. Ως κινητή φάση χρησιμοποιήθηκε υδατικό διάλυμα H₂SO₄ (0.005 M) και η ροή της ρυθμίστηκε στα 0.6 mL/min. Η στήλη με την οποία έγινε ο διαχωρισμός του μίγματος ήταν τύπου Aminex HPX-87H (300 mm × 7.8 mm, Bio-Rad, California, USA) και θερμοκρασίας 65°C. Από τη στήλη περνούσαν 20 μL δείγματος και η διάρκεια της ανάλυσης ήταν 25 min. Η πρότυπη καμπύλη που χρησιμοποιήθηκε για τον ποσοτικό προσδιορισμό του κιτρικού οξέος, ξυλόζης, της γλυκερόλης και της ξυλιτόλης παρουσιάζεται παρακάτω.



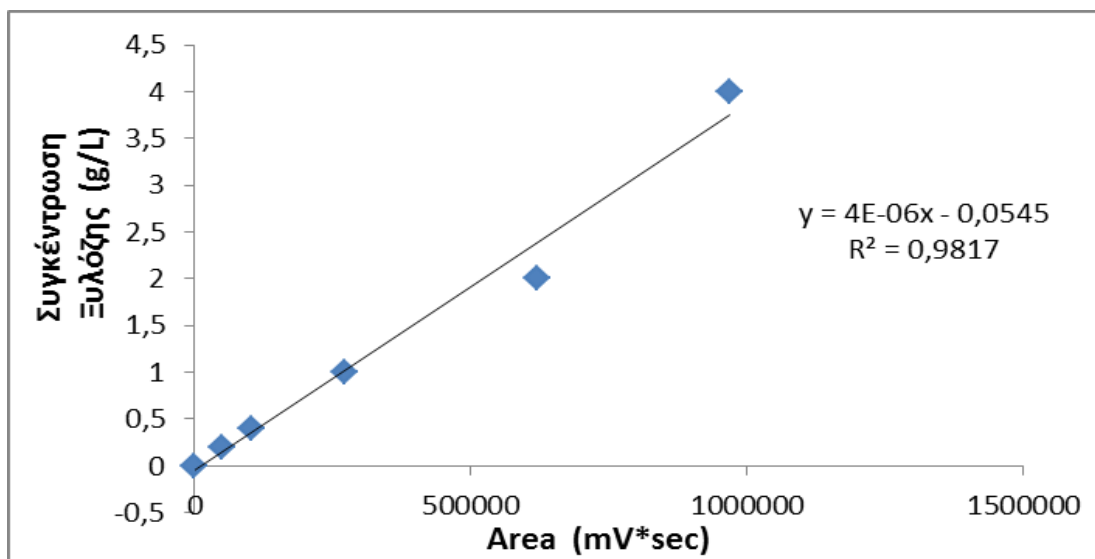
Γράφημα 2.1 Πρότυπη καμπύλη προσδιορισμού κιτρικού οξέος



Γράφημα 2.2 Πρότυπη καμπύλη προσδιορισμού γλυκερόλης



Γράφημα 2.3 Πρότυπη καμπύλη προσδιορισμού ξυλιτόλης



Γράφημα 2.4 Πρότυπη καμπύλη προσδιορισμού ξυλόζης.

2.4.5 Ποσοτικός και ποιοτικός προσδιορισμός παραγόμενου ενδοκυτταρικού λίπους

Για τον προσδιορισμό της παραγωγής ενδοκυτταρικού λίπους από τη ζύμη, μετά τη ζύγιση της βιομάζας προσθέτονταν ποσότητα λίγων ml μίγματος διαλυτών χλωροφορμίου (CHCl_3) – μεθανόλης (CH_3OH) σε αναλογία 2:1 (Folch *et al*, 1957; Papanikolaou *et al*, 2001). Με το χρησιμοποιούμενο μίγμα διαλυτών εκχυλίζεται το συνολικό μικροβιακό λίπος (αποθηκευτικά και δομικά λιπίδια). Ακολούθησε διήθηση της βιομάζας και συλλογή της σε προζυγισμένη φιάλη

εξάτμισης. Έπειτα χρησιμοποιήθηκε περιστροφικός εξατμιστήρας (Büchi rotavapor R-114) για την απομάκρυνση των διαλυτών. Στη φιάλη εξάτμισης παρέμενε το μικροβιακό λίπος το οποίο ζυγιζόταν και εκφραζόταν σε g ανά 1 g ξηράς μάζας ή/και σε g ανά L καλλιέργειας.



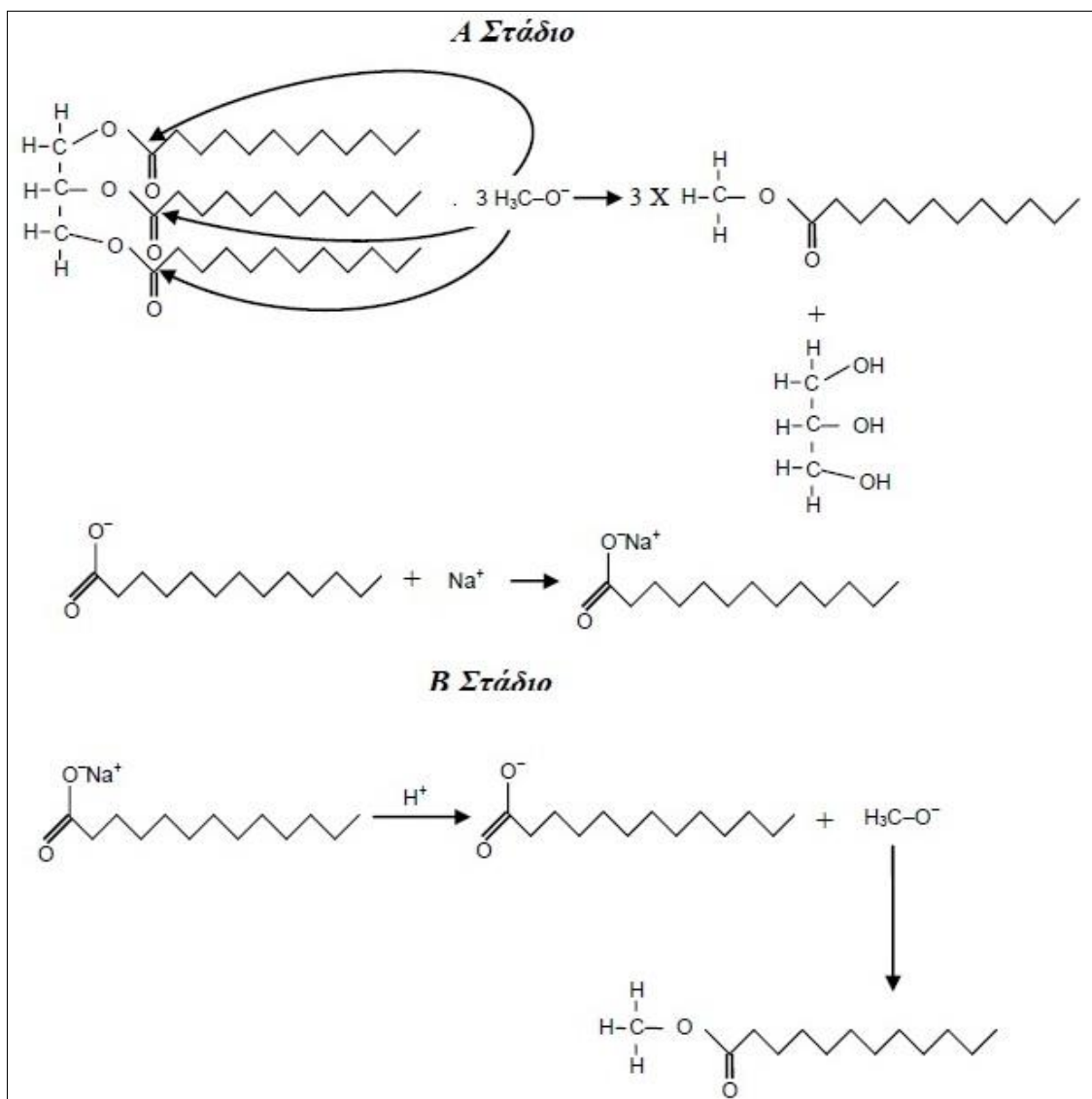
Εικόνα 2.5 Περιστροφικός εξατμιστήρας Büchi rotavapor R-114

2.4.6 Μεθυλεστεροποίηση

Εν συνεχεία, το κυτταρικό λίπος μετατράπηκε με μεθυλίωση στους αντίστοιχους μεθυλικούς εστέρες, με την γενικευμένη μέθοδο AFNOR (1959), όπως περιγράφεται από Papanikolaou *et al*, (2001) προκειμένου να γίνει ο ποιοτικός προσδιορισμός των λιπαρών οξέων που περιέχονται σε αυτό. Η εστεροποίηση πραγματοποιήθηκε σε δύο στάδια, το πρώτο σε αλκαλικό περιβάλλον και το δεύτερο σε όξινο. Κατά το πρώτο στάδιο έγινε η πυρηνόφιλη υποκατάσταση στο μόριο των τριγλυκεριδίων και των φωσφολιπιδίων, με τελικό προϊόν τους αντίστοιχους μεθυλεστέρες των λιπαρών οξέων. Παράλληλα, τα ήδη υπάρχοντα ελεύθερα λιπαρά οξέα αντέδρασαν με το διάλυμα του μεθανολικού νατρίου και παραλαλήφθησαν οι αντίστοιχοι σάπωνές τους. Στο δεύτερο στάδιο πραγματοποιήθηκε η μετατροπή των σαπώνων των λιπαρών οξέων προς τους αντίστοιχους μεθυλεστέρες.

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα εξής: διάλυμα μεθανολικού νατρίου ($\text{CH}_3\text{O}^-\text{Na}^+$) που περιείχε 1% μεταλλικό νάτριο σε μίγμα μεθανόλης και βενζολίου σε αναλογία 70:30 και μια μικρή ποσότητα φαινολοφθαλείνης, υδροχλωρική μεθανόλη (20 mL ακετυλοχλωρίδιο σε 250 mL μεθανόλης), κανονικό (ν-εξάνιο και άνυδρο θειικό νάτριο (Na_2SO_4)).

Μηχανισμός μεθυλεστεροποίησης



Εικόνα 2.6 Αντίδραση μεθυλεστεροποίησης η οποία τελείται σε δύο διακριτά στάδια, το πρώτο σε αλκαλικό περιβάλλον και το δεύτερο σε όξινο.

A στάδιο: Μετατροπή (πυρηνόφιλη υποκατάσταση) σε αλκαλικό περιβάλλον των γλυκεριδίων (μονο-, δι-, τρι- γλυκεριδίων, πολικών λιπιδίων) σε μεθυλεστέρες λιπαρών οξέων και ταυτόχρονη μετατροπή των ελεύθερων λιπαρών οξέων σε σάπωνες νατρίου. Η δημιουργία *trans* ισομερών αποτρέπεται σε αλκαλικό περιβάλλον.

B στάδιο: Σε όξινο περιβάλλον οι σάπωνες μετατρέπονται σε ελεύθερα λιπαρά οξέα και τα τελευταία, αντιδρώντας με μεθανόλη μετατρέπονται σε μεθυλεστέρες,

Εφαρμογή της μεθόδου

Πιο αναλυτικά η διαδικασία της μεθυλεστεροποίησης είχε ως εξής: αρχικά προστέθηκαν σε σφαιρική φιάλη μαζί με πέτρες βρασμού, 10 mL μεθανολικό νάτριο. Η φιάλη τοποθετήθηκε σε θερμαινόμενο μανδύα και συνδέθηκε με κάθετο ψυκτήρα (Εικόνα 2.8). Ο θερμαινόμενος μανδύας ανοίχθηκε και το περιεχόμενο της φιάλης αφέθηκε να βράσει για 20 min. Ακολούθησε το δεύτερο στάδιο κατά το οποίο προστέθηκε ποσότητα υδροχλωρικής μεθανόλης ($\text{CH}_3\text{OH} - \text{HCl}$) έως ότου το χρώμα του περιεχομένου της φιάλης μεταβληθεί από ροζ σε άσπρο και ο βρασμός συνεχίστηκε για άλλα 20 min. Μετά την ολοκλήρωση και του δεύτερου σταδίου προστέθηκε μικρή ποσότητα απιονισμένου νερού, με την οποία τερματίστηκε η αντίδραση και ακολούθησε η προσθήκη 5 mL εξάνιου. Το εξάνιο λόγω της υψηλής του συγγένειας παρασύρει στη μάζα του τους μεθυλεστέρες (εκχυλίζονται στο εξάνιο).

Για τον χωρισμό των δύο φάσεων χρησιμοποιήθηκε εκχυλιστική χοάνη με την οποία απομακρύνθηκε το νερό και συλλέχθηκε μόνο η φάση του εξάνιου (Εικόνα 2.7). Η τυχόν εναπομένουσα ποσότητα νερού απομακρύνθηκε με προσθήκη άνυδρου θειικού νατρίου.



Εικόνα 2.7 . Διαχωρισμός των δύο φάσεων, στην επάνω φάση που βρίσκεται το εξάνιο εκχυλίζονται οι μεθυλεστέρες των λιπαρών οξέων.



Εικόνα 2.8 . Οι φιάλες τοποθετημένες στους θερμαινόμενους μανδύες και η σύνδεσή τους με κάθετο ψυκτήρα.

2.4.7 Ανάλυση στον αέριο χρωματογράφο

Για τις αναλύσεις στον αέριο χρωματογράφο (8000 series FISIONS) πραγματοποιούνταν έκχυση 1 μL από το διάλυμα των μεθυλεστέρων, οι οποίοι είναι πιο πτητικοί από τα αντίστοιχα λιπαρά οξέα και μπορούν να προσδιοριστούν στον αέριο χρωματογράφο, με τη βοήθεια ειδικής σύριγγας. Οι συνθήκες του αέριου χρωματογράφου ήταν οι εξής:

- Θερμοκρασία εισαγωγέα 250 $^{\circ}\text{C}$
- Θερμοκρασία ανιχνευτή
- Φέρον αέριο He (ροή 1.38 mL/min) , H₂ (60 kPa) O₂ (110 kPa)
- Τύπος στήλης Fused silica WCOT :

1. CP-Sill 88 (0.2 μL)
2. Μήκος 50 m
3. Διάμετρος 0.32 mm
4. Πάχος επικάλυψης εσωτερικά που έρχεται σε επαφή με το δείγμα DF = 0.2 μm

Η θερμοκρασία της στήλης παρέμενε σταθερή στους 200 $^{\circ}\text{C}$ για 20 min. Η ταυτοποίηση των λιπαρών οξέων πραγματοποιήθηκε με βάση το χρόνο κατακράτησης των αντίστοιχων μεθυλεστέρων τους. Από το εμβαδόν της κάθε κορυφής προέκυπτε το ποσοστό του κάθε λιπαρού οξέος επί συνόλου λιπαρών οξέων.



Εικόνα 2.9 Αέριος χρωματογράφος

2.4.8 Προσδιορισμός ενδοπολυσακχαριτών (IPS)

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης των ενδοπολυσακχαριτών (IPS) έγινε σύμφωνα με το πρωτόκολλα των Liang κ.α (1999). Συγκεκριμένα, ποσότητα ξηρής βιομάζας 5 mg ζυγίστηκε σε ζυγό ακριβείας, εκχυλίστηκε χρησιμοποιώντας 10 mL 2,5 M HCL (Merck) στους 100 °C για 30 min. Στην συνέχεια ακολούθησε ρύθμιση του pH του εκχυλίσματος με 10 mL 2,5 NaOH (Merck). Οι IPS προσδιορίστηκαν στην συνέχεια ποσοτικά με τη φωτομετρική μέθοδο του δινιτροσαλικυλικού οξέος (DNS) (Mille, 1959) και εκφράστηκαν ως ισοδύναμα γλυκόζης (g/L).

Κεφάλαιο 3

3. Αποτελέσματα

3.1. Παραγωγή βιομάζας, κιτρικού οξέος, μικροβιακού λίπους, ενδοπολυσακχαριτών (IPS) και κατανάλωση υποστρώματος ξυλόζης

3.1.1 Γενική παρουσίαση αποτελεσμάτων

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη της βιοχημικής συμπεριφοράς (μικροβιακή αύξηση, παραγωγή βιομάζας, κατανάλωση υποστρώματος, παραγωγή λίπους, παραγωγή ενδοπολυσακχαριτών και παραγωγή κιτρικού οξέος) των στελεχών *Rhodospiridium toruloides* DSM 4444, *Rhodospiridium toruloides* Y27012, *Metschnikowia pulcherima* LFMB1, *Cryptococcus curvatus* ATCC 20509, *Candida oleophila* ATCC 20177, *Candida curvata* NRRL-Y 1511 και *Yarrowia lipolytica* ACA-YC 5029, *Yarrowia lipolytica* ACA-YC 5030, *Yarrowia lipolytica* ACA-YC 5031, *Yarrowia lipolytica* ACA-YC 5033, *Yarrowia lipolytica* LGAM S(7)1, *Yarrowia lipolytica* LFMB20 κατά την ανάπτυξή τους σε διάφορα υποστρώματα. Ο τεχνολογικός και, εν δυνάμει, βιομηχανικός στόχος της εργασίας ήταν η μελέτη των διεργασιών ζύμωσης για παραγωγή λιπιδίων, κυτταρικής μάζας και κιτρικού οξέος αξιοποιώντας τα σε βιομηχανική κλίμακα. Ως πηγή άνθρακα χρησιμοποιήθηκε η ξυλόζη και η γλυκερόλη σε συγκέντρωση 60 g/L ξεχωριστά σε κάθε ένα και σε συνυπόστρωμα με 50% συμμετοχή από την ξυλόζη και γλυκερόλη. Οι καλλιέργειες πραγματοποιήθηκαν σε ζυμώσεις βυθού και έλαβαν χώρα κάτω από αερόβιες συνθήκες (αναδευόμενες κωνικές φιάλες). Οι καλλιέργειες πραγματοποιήθηκαν σε περιοριστικές σε άζωτο συνθήκες (nitrogen-limited). Οι κωνικές με το θρεπτικό υπόστρωμα αποστειρώνονταν σε αυτόκλειστο (115 °C, για 30 min). Για κάθε ένα από τα στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν επιλέχθηκαν εκείνα που έδωσαν τα καλύτερα αποτελέσματα, όσον αφορά την παραγωγή λίπους, βιομάζας, κιτρικού οξέος και ενδοπολυσακχαριτών στο εκάστοτε υπόστρωμα για παρουσίαση και περαιτέρω συζήτηση σε διαγράμματα.

Στην παρούσα μελέτη διερευνήθηκαν οι κινητικές ανάπτυξης του μικροοργανισμού και απόδοσης σε προϊόν. Πιο συγκεκριμένα μελετήθηκε η παραγωγής βιομάζας (X), η απόδοση της βιομάζας σε σχέση με το καταναλωθέν υπόστρωμα ($Y_{X/S}$), η παραγωγή κιτρικού οξέος (Cit), η απόδοση παραχθέντος κιτρικού οξέος σε σχέση με την καταναλωθέν γλυκόζη ($Y_{Cit/S}$), η παραγωγή ενδοκυτταρικού λίπους (L), ο συντελεστής παραχθέντος λίπους σε σχέση με την παραγόμενη

βιομάζα (Y_{LX}), η παραγωγή ξυλιτόλης από τα υποστρώματα με συμμετοχή της ξυλόζης και η παραγωγή ενδοπολυσακχαριτών (IPS) καθώς και η % περιεκτικότητα τους στην παραγόμενη βιομάζα. Περαιτέρω μελετήθηκε η σύσταση σε λιπαρά οξέα του μικροβιακού λίπους.

Αρχικά μελετήθηκαν τα παραπάνω σε θρεπτικό υπόστρωμα που είχε ως πηγή άνθρακα την ξυλόζη σε αρχική συγκέντρωση 60 g/L. Στην συνέχεια παρατηρώντας και αξιολογώντας τα αποτελέσματα επιλέξαμε τα καλύτερα στελέχη και τα βάλουμε σε υπόστρωμα με πηγή άνθρακα την ακάθαρτη γλυκερόλη αρχικής συγκέντρωσης 60 g/L. Καταλήγοντας αξιολογώντας πάλι τα αποτελέσματα των ζυμώσεων μας επιλέξαμε κάποια ώστε να τα αξιολογήσουμε σε συνυπόστρωμα ξυλόζης και γλυκερόλης αρχικής συγκέντρωσης 60 g/L (50% ξυλόζη και 50% γλυκερόλη)

Από τον Πίνακα 1 που ακολουθεί, οι μέγιστες τιμές παραγωγής μικροβιακού λίπους κυτταρικής βιομάζας, κιτρικού οξέος, ενδοπολυσακχαριτών (IPS), ξυλιτόλης αλλά και οι αποδόσεις τους σε σχέση με την κατανάλωση του υποστρώματος (ξυλόζη) παρουσιάζονται παρακάτω.

Πίνακας 1. Συγκενρωτικός πίνακας αποτελεσμάτων των ζυμών που χρησιμοποιήθηκαν σε υπόστρωμα ξυλόζης αρχικής συγκέντρωσης 60 g/L. Παρουσιάζονται οι μέγιστες τιμές παραγωγής λίπους, βιομάζας, κιτρικού οξέος, ξυλιτόλης και ενδοπολυσακχαριτών (IPS) των ζυμών καθώς και οι αποδόσεις τους. Το κάθε σημείο είναι ο μέσος όρος δύο ανεξάρτητων επαναλήψεων.

	Fermentation time (h)	X (g L ⁻¹)	L (g L ⁻¹)	Citric acid (g L ⁻¹)	Xylitol (g L ⁻¹)	IPS (g L ⁻¹)	Xylose _{cons} (g L ⁻¹)	Y _{X/xylose} (g g ⁻¹)	Y _{L/X} (g g ⁻¹)	Y _{Cit/xylose} (g g ⁻¹)	Y _{xylitol/xylose} (g g ⁻¹)	% IPS
<i>Yarrowia lipolytica</i> ACA-YC 5029	384 ^{a, b, c, d, e}	0,84	0,20	2,12	3,24	0,16	22,4	0,038	0,242	0,094	0,145	19,1
<i>Yarrowia lipolytica</i> ACA-YC 5030	312 ^{a, c, d}	1,37	0,11	3,29	6,10	0,21	12,5	0,109	0,080	0,263	0,486	15,2
	120 ^b	0,68	0,15	3,10	4,24	0,09	9,4	0,073	0,219	0,330	0,451	13,6
	216 ^e	0,98	0,13	3,70	4,91	0,34	9,5	0,103	0,132	0,388	0,514	34,6
<i>Yarrowia lipolytica</i> ACA-YC 5031	216 ^{a, b, c, d, e}	0,74	0,11	2,12	3,88	0,24	15,5	0,048	0,149	0,137	0,250	32,4
<i>Yarrowia lipolytica</i> ACA-YC 5033	312 ^{a, b, c}	1,39	0,10	5,29	6,54	0,16	16,2	0,086	0,071	0,327	0,404	11,5
	216 ^{d, e}	0,99	0,09	3,79	6,61	0,27	11,5	0,087	0,093	0,329	0,547	26,7
<i>Yarrowia lipolytica</i> LFMB20	312 ^{a, c, d}	1,09	0,04	4,17	6,10	0,06	11,2	0,097	0,033	0,372	0,546	5,3
	120 ^b	0,70	0,10	2,25	1,76	0,05	5,2	0,135	0,143	0,413	0,338	6,4
	216 ^e	0,91	0,02	4,06	4,01	0,24	8,6	0,100	0,021	0,451	0,447	26,0
	312 ^{a, d}	1,05	0,06	4,03	5,06	0,05	13,8	0,076	0,057	0,292	0,366	4,8
<i>Yarrowia lipolytica</i> LGAM S(7)1	120 ^b	0,79	0,13	2,47	2,64	0,05	7,0	0,103	0,168	0,352	0,311	6,3
	216 ^{c, e}	1,00	0,08	4,23	3,27	0,14	8,4	0,105	0,080	0,492	0,391	14,4
	216 ^a	13,68	0,26	3,48	0,49	4,70	54,0	0,253	0,019	0,064	0,009	34,4
<i>Candida oleophila</i> ATCC 20177	264 ^{b, c}	12,21	0,91	4,50	0,37	4,42	54,1	0,226	0,075	0,083	0,007	36,2
	168 ^{d, e}	11,84	0,14	4,06	1,58	4,82	48,1	0,246	0,012	0,084	0,033	40,7
	408 ^{a, c, e}	15,62	3,15	6,77	2,14	4,78	54,9	0,284	0,202	0,123	0,039	39,7
<i>Metschnikowia Pulcherima</i> LFMB1	144 ^b	8,94	0,23	8,32	0,00	3,55	54,8	0,163	0,026	0,152	0,000	48,9
	216 ^{a, b, c, d, e}	6,95	0,45	7,94	0,00	3,40	24,3	0,287	0,064	0,327	0,000	30,6
<i>Rhodospiridium toruloides</i> DSM4444	264 ^{a, b, c}	15,52	3,58	0,00	3,12	1,66	57,8	0,269	0,231	0,000	0,054	10,7
	120 ^e	9,97	1,88	0,00	4,01	2,76	37,2	0,268	0,188	0,000	0,108	27,7
<i>Rhodospiridium toruloides</i> Y27012	264 ^{a, b, c}	5,55	0,60	0,00	4,33	1,70	26,8	0,207	0,109	0,000	0,162	17,7
	120 ^e	15,61	1,84	0,00	0,00	2,69	59,0	0,265	0,118	0,000	0,000	27,1
<i>Cryptococcus curvatus</i> ATCC 20509	144 ^{a, b, c, e}	11,84	1,33	0,00	0,00	3,21	40,1	0,295	0,112	0,000	0,000	26,2

X : η παραγόμενη βιομάζα (g/L), L : το παραγόμενο μικροβιακό λίπος (g/L), Citric acid : το παραγόμενο κιτρικό οξύ (g/L), Xylitol : η παραγόμενη ξυλιτόλη (g/L),

IPS : η παραγόμενη ποσότητα ενδοπολυσακχαριτών (g/L), Xylose_{cons} : Καταναλωθέν υπόστρωμα (g/L),

a : Μέγιστη τιμή παραγόμενης βιομάζας, b: Μέγιστη τιμή παραγόμενου μικροβιακού λίπους, c : Μέγιστη τιμή παραγόμενου κιτρικού οξέος

d : Μέγιστη τιμή παραγόμενης ξυλιτόλης, e : Μέγιστη τιμή παραγόμενων ενδοπολυσακχαριτών

$Y_{X/xylose}$: Συντελεστής απόδοσης παραγωγής βιομάζας ως προς την κατανάλωση υποστρώματος (g/g)

$(Y_{L/X})$: ο συντελεστής παραχθέντος λίπους σε σχέση με την παραγόμενη βιομάζα (g/g)

$Y_{Cit/xylose}$: Συντελεστής απόδοσης παραγωγής κιτρικού οξέος ως προς την κατανάλωση υποστρώματος (g/g)

$Y_{xylitol/xylose}$: Συντελεστής απόδοσης παραγωγής ξυλιτόλης ως προς την κατανάλωση υποστρώματος (g/g)

% IPS : % παραγόμενων ενδοπολυσακχαριτών ως προς την παραγόμενη βιομάζα

3.1.2 Παραγωγή βιομάζας, μικροβιακού λίπους και ενδοπολυσακχαριτών (IPS)

Στον συγκεντρωτικό πίνακα 1 παρατηρούμε πώς τα μέγιστα όσον αφορά την παραγωγή βιομάζας, λίπους και ενδοπολυσακχαριτών (IPS) ποικίλουν στο *Yarrowia lipolytica* ανάλογα με το στέλεχος. Στο *Yarrowia lipolytica* ACA-YC 5029 παρατηρούμε η μέγιστη τιμή βιομάζας να βρίσκεται στις 384 h με 0,84 g/L σε απόλυτη τιμή ενώ ο συντελεστή απόδοσης παραγωγής βιομάζας ως προς το καταναλωθέν υπόστρωμα ($Y_{X/S}$) έφθασε τα 0.04 g/g. Την ίδια στιγμή το παραχθέν μικροβιακό λίπος είχε τιμή 0,20 g/L ενώ ο συντελεστής παραγωγής μικροβιακού λίπους ως προς την παραγωγή βιομάζας ($Y_{L/X}$) έφθασε τα 0.24 g/g. Στο *Yarrowia lipolytica* ACA-YC 5030 το μέγιστο της μικροβιακής μάζας παρατηρείται στις 312 h με τιμή παραγωγής βιομάζας 1,37 g/L και συντελεστή απόδοσης παραγωγής βιομάζας ως προς το καταναλωθέν υπόστρωμα ($Y_{X/S}$) έφθασε τα 0.11 g/g. Η μέγιστη τιμή μικροβιακού λίπους παρουσιάστηκε στις 120 h με τιμή 0,15 g/L ενώ ο συντελεστής παραγωγής μικροβιακού λίπους ως προς την παραγωγή βιομάζας ($Y_{L/X}$) έφθασε τα 0.22 g/g. Η μέγιστη τιμή παραγωγής ενδοπολυσακχαριτών (IPS) παρουσιάστηκε στις 216 h με απόλυτη τιμή 0,34 g/L όπου η % αναλογία του στην παραγόμενη βιομάζα ήταν 34,5%. Στο *Yarrowia lipolytica* ACA-YC 5031 το μέγιστο της μικροβιακής μάζας και της παραγωγής μικροβιακού λίπους παρατηρείται στις 216 h με απόλυτη τιμή βιομάζας 0,74 g/L και συντελεστή απόδοσης παραγωγής βιομάζας ως προς το καταναλωθέν υπόστρωμα ($Y_{X/S}$) έφθασε τα 0.05 g/g και μικροβιακό λίπος με τιμή 0,11 g/L ενώ ο συντελεστής παραγωγής μικροβιακού λίπους ως προς την παραγωγή βιομάζας ($Y_{L/X}$) έφθασε τα 0.15 g/g.

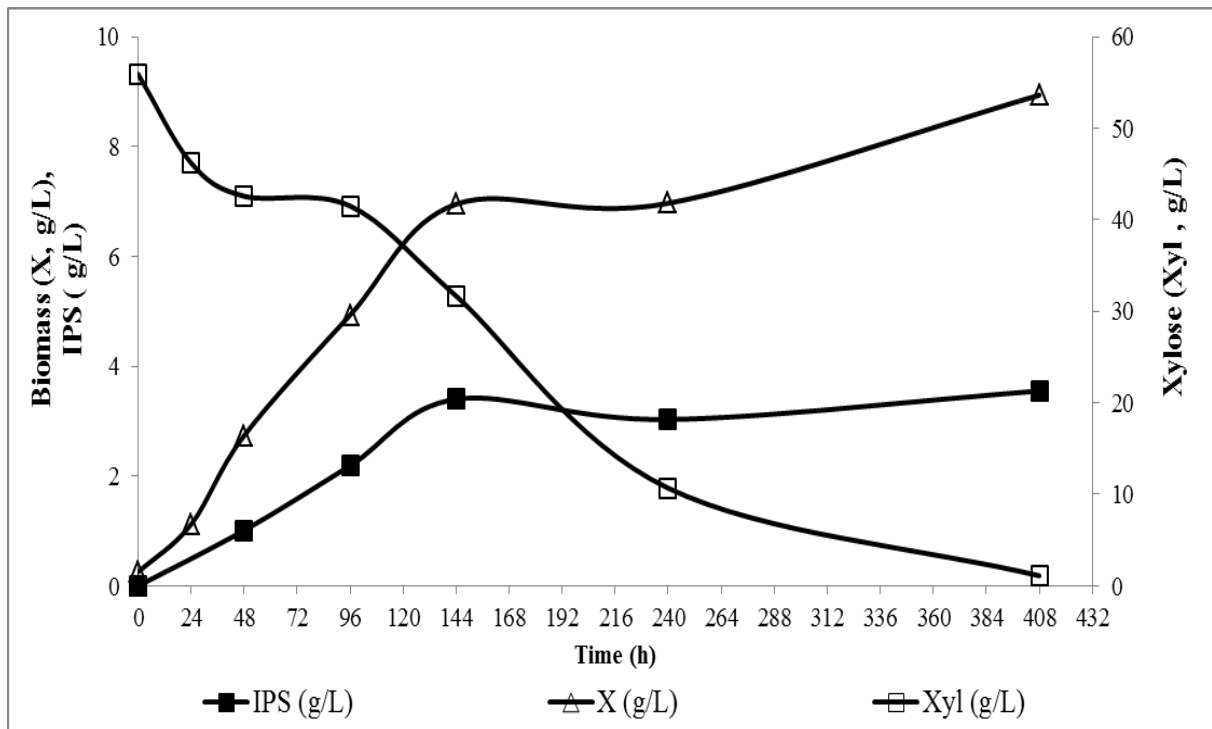
Συνεχίζοντας στο *Yarrowia lipolytica* ACA-YC 5033 το μέγιστο της μικροβιακής μάζας και της παραγωγής μικροβιακού λίπους παρατηρείται στις 312 h με απόλυτη τιμή βιομάζας 1,39 g/L και συντελεστή απόδοσης παραγωγής βιομάζας ως προς το καταναλωθέν υπόστρωμα ($Y_{X/S}$) έφθασε τα 0.07 g/g και μικροβιακό λίπος με τιμή 0,10 g/L ενώ ο συντελεστής παραγωγής μικροβιακού λίπους ως προς την παραγωγή βιομάζας ($Y_{L/X}$) έφθασε τα 0.33 g/g. Η μέγιστη τιμή παραγωγής ενδοπολυσακχαριτών (IPS) παρουσιάστηκε στις 216 h με απόλυτη τιμή 0,27 g/L όπου η % αναλογία του στην παραγόμενη βιομάζα ήταν 27%. Στο *Yarrowia lipolytica* LFMB20 το μέγιστο της μικροβιακής μάζας παρατηρείται στις 312 h με τιμή 1,09 g/L και συντελεστή απόδοσης παραγωγής βιομάζας ως προς το καταναλωθέν υπόστρωμα ($Y_{X/S}$) έφθασε τα 0.03 g/g. Η μέγιστη τιμή μικροβιακού λίπους παρουσιάστηκε στις 120 h με τιμή παραγωγής μικροβιακού λίπους 0,10 g/L ενώ ο συντελεστής απόδοσης παραγωγής μικροβιακού λίπους ως προς την παραγωγή βιομάζας ($Y_{L/X}$) έφθασε τα 0.63 g/g. Η μέγιστη τιμή παραγωγής ενδοπολυσακχαριτών (IPS) παρουσιάστηκε στις 216 h με απόλυτη τιμή 0,24 g/L όπου η % αναλογία του στην παραγόμενη βιομάζα ήταν 26%.

Προχωρώντας στο *Yarrowia lipolytica* LGAM S(7)1 το μέγιστο της μικροβιακής μάζας παρατηρείται στις 312 h με τιμή 1,05 g/L και συντελεστή απόδοσης παραγωγής βιομάζας ως προς το καταναλωθέν υπόστρωμα ($Y_{X/S}$) έφθασε τα 0.08 g/g. Η μέγιστη τιμή μικροβιακού λίπους παρουσιάστηκε στις 120 h με τιμή 0,13 g/L ενώ ο συντελεστής παραγωγής μικροβιακού λίπους ως προς την παραγωγή βιομάζας ($Y_{L/X}$) έφθασε τα 0,17 g/g. Η μέγιστη τιμή παραγωγής ενδοπολυσακχαριτών (IPS) παρουσιάστηκε στις 216 h με απόλυτη τιμή 0,14 g/L όπου η % αναλογία του στην παραγόμενη βιομάζα ήταν 14,5%.

Αλλάζοντας μικροοργανισμό, συγκεκριμένα η ζύμη *Candida oleophila* ATCC 20177 το μέγιστο της μικροβιακής μάζας παρατηρείται στις 216 h με τιμή 13,68 g/L και συντελεστή απόδοσης παραγωγής βιομάζας ως προς το καταναλωθέν υπόστρωμα ($Y_{X/S}$) έφθασε τα 0.25 g/g. Η μέγιστη τιμή μικροβιακού λίπους παρουσιάστηκε στις 264 h με τιμή 0,91 g/L ενώ ο συντελεστής παραγωγής μικροβιακού λίπους ως προς την παραγωγή βιομάζας ($Y_{L/X}$) έφθασε τα 0,08 g/g. Η μέγιστη τιμή παραγωγής ενδοπολυσακχαριτών (IPS) παρουσιάστηκε στις 168 h με απόλυτη τιμή 4,82 g/L όπου η % αναλογία του στην παραγόμενη βιομάζα ήταν 41%..

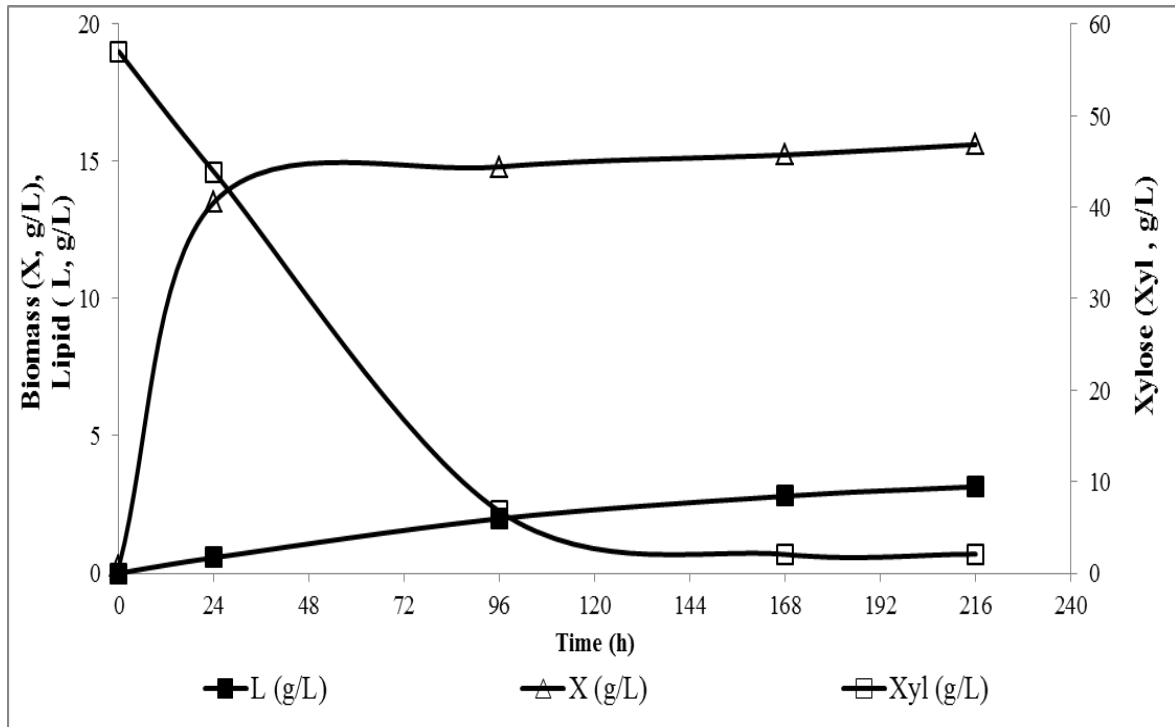
Συνεχίζοντας, στο μικροοργανισμό *Metschnikowia Pulcherrima* LFMB1 το μέγιστο της μικροβιακής μάζας και ενδοπολυσακχαριτών (IPS) παρατηρείται στις 216 h με τιμή παραγόμενης βιομάζας 13,68 g/L και συντελεστή απόδοσης παραγωγής βιομάζας ως προς το καταναλωθέν υπόστρωμα ($Y_{X/S}$) που έφθασε τα 0,25 g/g. Την ίδια ώρα η μέγιστη τιμή παραγωγής ενδοπολυσακχαριτών (IPS) είχε τιμή 3,55 g/L όπου η % αναλογία του στην παραγόμενη βιομάζα ήταν 49%.. Η μέγιστη τιμή μικροβιακού λίπους παρουσιάστηκε στις 144 h με τιμή 0,45 g/L ενώ ο συντελεστής παραγωγής μικροβιακού λίπους ως προς την παραγωγή βιομάζας ($Y_{L/X}$) έφθασε τα 0,23 g/g.

Ενδεικτικά η κινητική της παραγωγής βιομάζας, ενδοπολυσακχαριτών και της κατανάλωσης του υποστρώματος από τη ζύμη *Metschnikowia Pulcherrima* LFMB1 όταν αναπτύχθηκε σε θρεπτικό μέσο με ξυλόζη ως μόνη πηγή άνθρακα (60 g/L), παρουσιάζονται στο Γράφημα 1. Όπως φαίνεται από το Γράφημα 1 η κυτταρική αύξηση έλαβε την μέγιστη τιμή της 408 h μετά τον εμβολιασμό, φθάνοντας τα 8,94 g/L και συντελεστή απόδοσης ($Y_{X/S}$) ίσο με 0,16 g/g. Το μέγεθος των ενδοπολυσακχαριτών (IPS) έλαβε επίσης την μέγιστη τιμή του στις 408 h, φθάνοντας τα 3,55 g/L και στο σημείο αυτό η % αναλογία του ως προς την παραγόμενη βιομάζα ήταν 39,74 %. Το υπόστρωμα (ξυλόζη) μέχρι το τέλος της ζύμωσης είχε καταναλωθεί σχεδόν όλο.



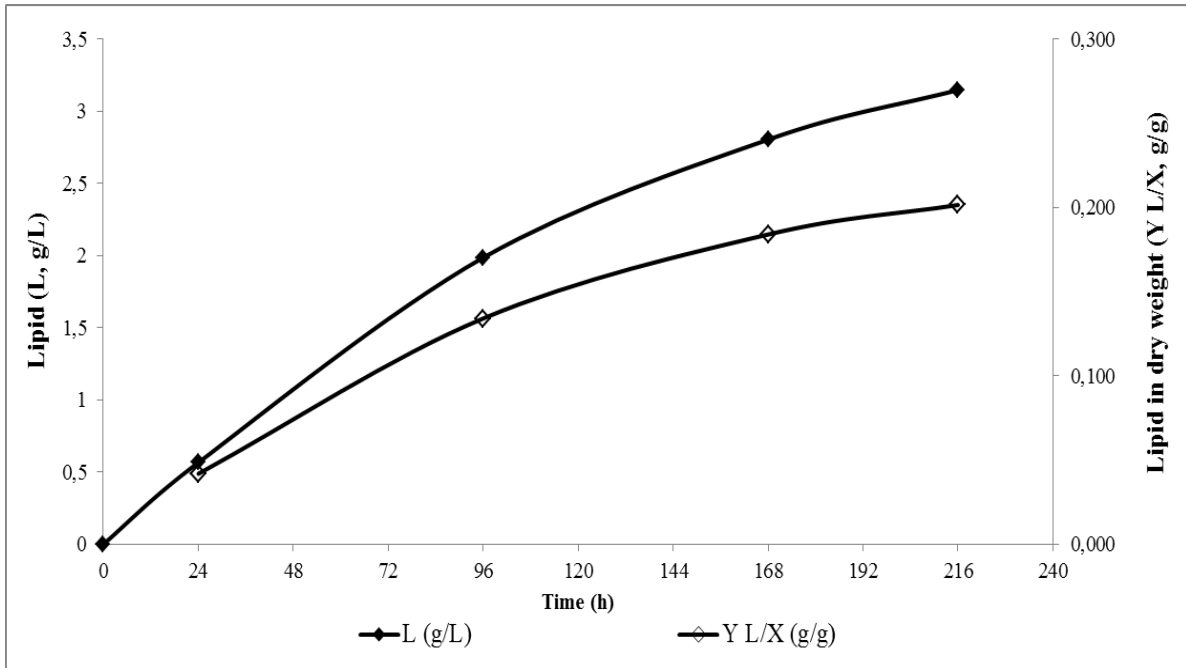
Γράφημα 1. Κινητική της παραγωγής βιομάζας, της κατανάλωσης υποστρώματος και της παραγωγής ενδοπολυσακχαριτών από τη ζύμη *Metschnikowia Pulcherrima* LFMB1 (60 g/L ξυλόζη). Το κάθε σημείο είναι ο μέσος όρος δύο ανεξάρτητων μετρήσεων.

Στην συνέχεια για τον μικροοργανισμό *Candida curvata* NRRL-Y 1511 η κινητική της παραγωγής βιομάζας, λίπους και της κατανάλωσης του υποστρώματος από τη ζύμη *Candida curvata* NRRL-Y 1511 όταν αναπτύχθηκε σε θρεπτικό μέσο με ξυλόζη ως μόνη πηγή άνθρακα (60 g/L), παρουσιάζονται στο Γράφημα 2. Όπως φαίνεται από το Γράφημα 2 η κυτταρική αύξηση έλαβε την μέγιστη τιμή της 216 h μετά τον εμβολιασμό, φθάνοντας τα 15,62 g/l και συντελεστή απόδοσης ($Y_{X/S}$) ίσο με 0,28 g/g. Το μικροβιακό λίπος (L) έλαβε επίσης την μέγιστη τιμή του στις 216 h, φθάνοντας τα 3,15 g/l και συντελεστή απόδοσης ($Y_{L/S}$) ίσο με 0,20 g/g Το υπόστρωμα (ξυλόζη) μέχρι το τέλος της ζύμωσης είχε καταναλωθεί σχεδόν όλο.



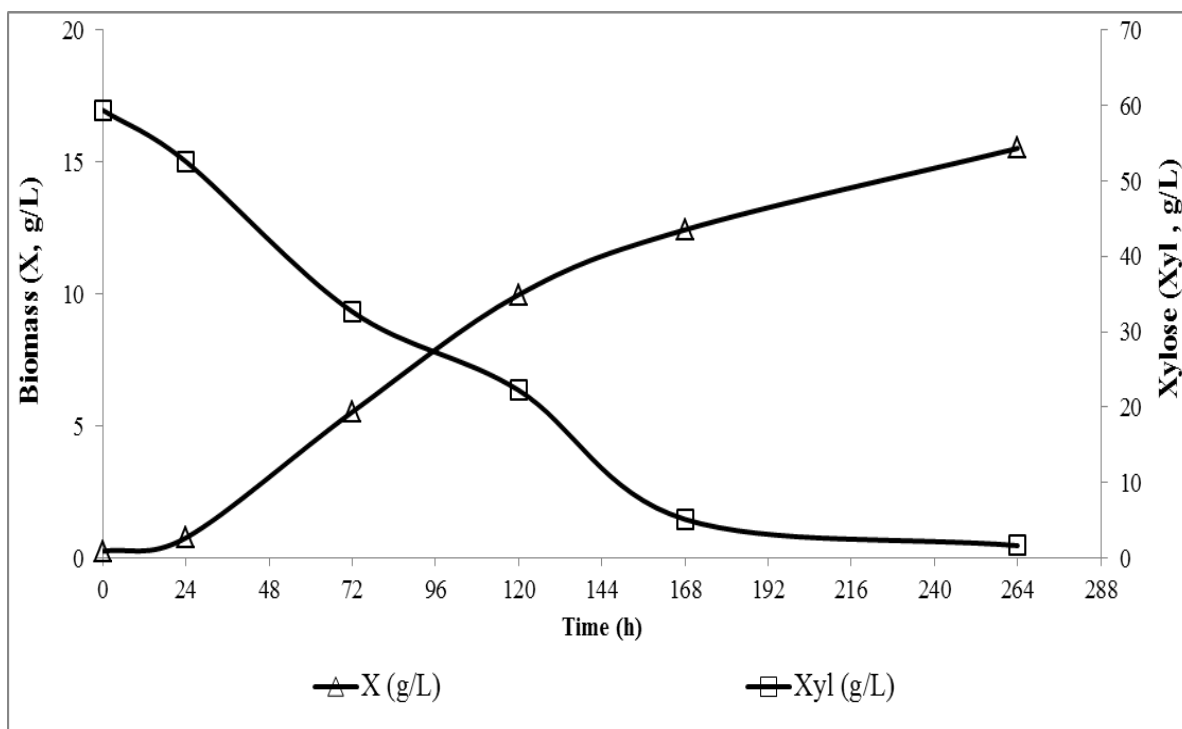
Γράφημα 2. Κινητική της παραγωγής βιομάζας, της κατανάλωσης υποστρώματος και της παραγωγής λίπους από τη ζύμη *Candida curvata* NRRL-Y 1511 (60 g/L ξυλόζη). Το κάθε σημείο είναι ο μέσος όρος δύο ανεξάρτητων μετρήσεων.

Η κινητική εξέλιξης του συντελεστή απόδοσης παραγωγής μικροβιακού λίπους ως προς την παραγωγή βιομάζας ($Y_{L/X}$) φαίνεται στο Γράφημα 3. Στις 216 h που είχαμε την μέγιστη συγκέντρωση μικροβιακού λίπους ο συντελεστή απόδοσης παραγωγής μικροβιακού λίπους ως προς την παραγωγή βιομάζας ($Y_{L/X}$) έφθασε τα 0,20 g/g. Αυτή ήταν και η μέγιστη τιμή στον συντελεστή παραγωγής μικροβιακού λίπους ως προς την παραγωγή βιομάζας ($Y_{L/X}$) που παρατηρήθηκε.



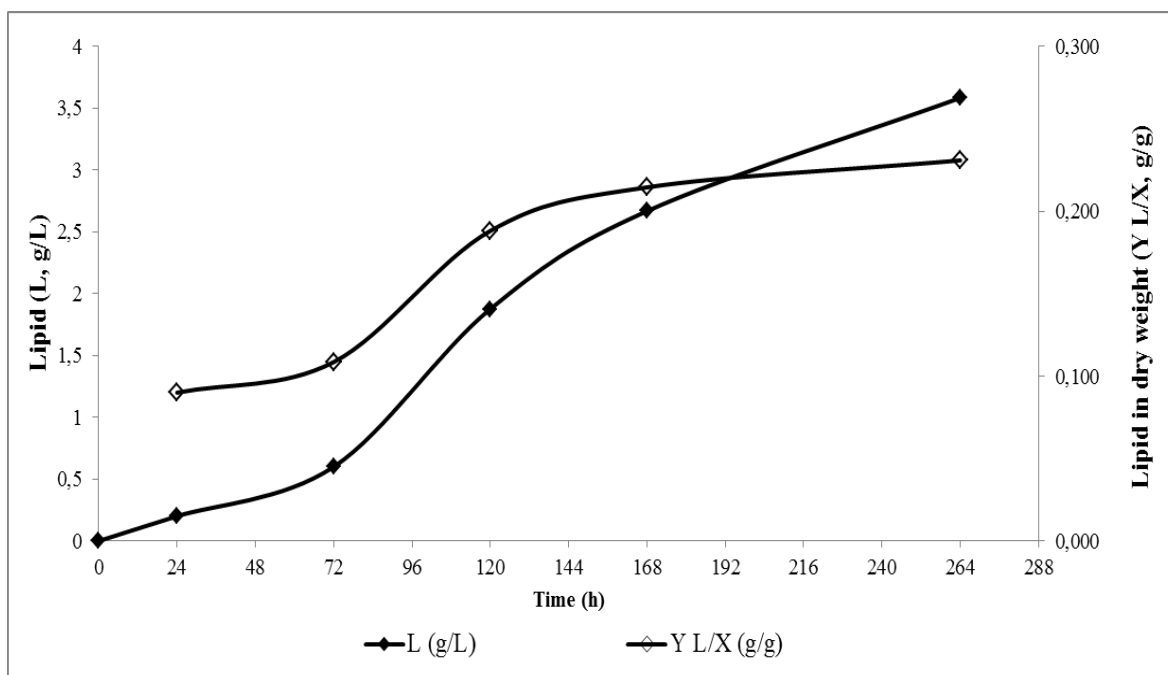
Γράφημα 3. Κινητική εξέλιξης του παραγόμενου μικροβιακού λίπους ως προς τη βιομάζα ($Y_{L/X}$) από τη ζύμη *Candida curvata* NRRL-Y 1511 (60 g/L ξυλόζη). Το κάθε σημείο είναι ο μέσος όρος δύο ανεξάρτητων μετρήσεων.

Πιο συγκεκριμένα μετά η κινητική της παραγωγής βιομάζας και της κατανάλωσης του υποστρώματος από τη ζύμη *Rhodosporidium toruloides* DSM 4444 όταν αναπτύχθηκε σε θρεπτικό μέσο με ξυλόζη ως μόνη πηγή άνθρακα (60 g/L), παρουσιάζονται στο Γράφημα 4. Όπως φαίνεται από το Γράφημα 4 η κυτταρική αύξηση έλαβε την μέγιστη τιμή της 264 h μετά τον εμβολιασμό, φθάνοντας τα 15,52 g/L και συντελεστή απόδοσης ($Y_{X/S}$) ίσο με 0,27 g/g. Το υπόστρωμα (ξυλόζη) μέχρι το τέλος της ζύμωσης είχε καταναλωθεί σχεδόν όλο.



Γράφημα 4. Κινητική της παραγωγής βιομάζας και της κατανάλωσης υποστρώματος από τη ζύμη *Rhodosporidium toruloides* DSM 4444 (60 g/L ξυλόζη). Το κάθε σημείο είναι ο μέσος όρος δύο ανεξάρτητων μετρήσεων.

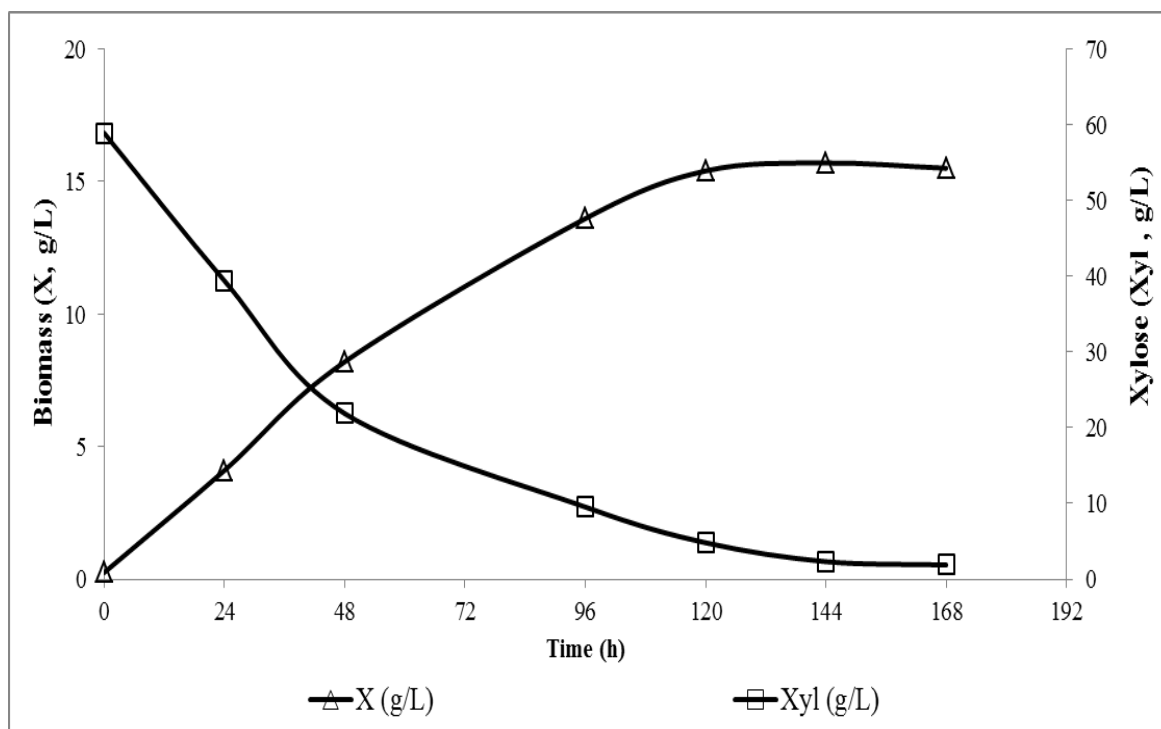
Η κινητική εξέλιξης του συντελεστή απόδοσης παραγωγής μικροβιακού λίπους ως προς την παραγωγή βιομάζας ($Y_{L/X}$) φαίνεται στο Γράφημα 5. Στις 264 h που είχαμε την μέγιστη συγκέντρωση μικροβιακού λίπους ο συντελεστή παραγωγής μικροβιακού λίπους ως προς την παραγωγή βιομάζας ($Y_{L/X}$) έφθασε τα 0.23 g/g. Αυτή ήταν και η μέγιστη τιμή στον συντελεστή παραγωγής μικροβιακού λίπους ως προς την παραγωγή βιομάζας ($Y_{L/X}$) που παρατηρήθηκε σε αυτή τη ζύμωση.



Γράφημα 5. Κινητική εξέλιξης του παραγόμενου μικροβιακού λίπους ως προς τη βιομάζα ($Y_{L/X}$) από τη ζύμη *Rhodosporidium toruloides* DSM 4444 (60 g/L ξυλόζη). Το κάθε σημείο είναι ο μέσος όρος δύο ανεξάρτητων μετρήσεων.

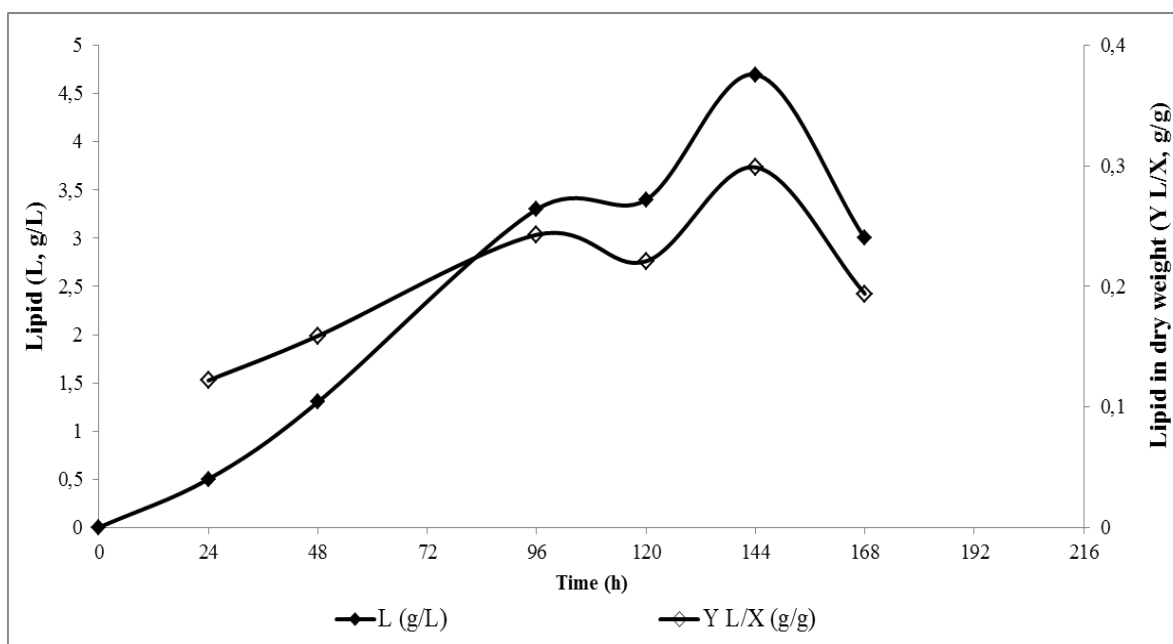
Συνεχίζοντας στο *Rhodosporidium toruloides* Y27012 το μέγιστο της μικροβιακής μάζας και της παραγωγής μικροβιακού λίπους παρατηρείται στις 364 h με απόλυτη τιμή βιομάζας 15,61 g/L και συντελεστή απόδοσης παραγωγής βιομάζας ως προς το καταναλωθέν υπόστρωμα ($Y_{X/S}$) έφθασε τα 0,26 g/g και μικροβιακό λίπος με τιμή 1,84 g/L ενώ ο συντελεστής παραγωγής μικροβιακού λίπους ως προς την παραγωγή βιομάζας ($Y_{L/X}$) έφθασε τα 0,12 g/g. Η μέγιστη τιμή παραγωγής ενδοπολυσακχαριτών (IPS) παρουσιάστηκε στις 120 h με απόλυτη τιμή 3,21 g/L όπου η % αναλογία του στην παραγόμενη βιομάζα ήταν 27%.

Η κινητική της παραγωγής βιομάζας και της κατανάλωσης του υποστρώματος από τη ζύμη *Cryptococcus curvatus* ATCC 20509 όταν αναπτύχθηκε σε θρεπτικό μέσο με ξυλόζη ως μόνη πηγή άνθρακα (60 g/L), παρουσιάζονται στο Γράφημα 6. Όπως φαίνεται από το Γράφημα 6 η κυτταρική αύξηση έλαβε την μέγιστη τιμή της 144 h μετά τον εμβολιασμό, φθάνοντας τα 15,7 g/l και συντελεστή απόδοσης ($Y_{X/S}$) ίσο με 0,28 g/g. Το υπόστρωμα (ξυλόζη) μέχρι το τέλος της ζύμωσης είχε καταναλωθεί σχεδόν όλο.



Γράφημα 6. Κινητική της παραγωγής βιομάζας και της κατανάλωσης υποστρώματος από τη ζύμη *Cryptococcus curvatus* ATCC 20509 (60 g/L ξυλόζη). Το κάθε σημείο είναι ο μέσος όρος δύο ανεξάρτητων μετρήσεων.

Η κινητική εξέλιξης του συντελεστή παραγωγής μικροβιακού λίπους ως προς την παραγωγή βιομάζας ($Y_{L/X}$) φαίνεται στο Γράφημα 7. Στις 144 h που είχαμε την μέγιστη συγκέντρωση μικροβιακού λίπους ο συντελεστή παραγωγής μικροβιακού λίπους ως προς την παραγωγή βιομάζας ($Y_{L/X}$) έφθασε τα 0,30 g/g. Αυτή ήταν και η μέγιστη τιμή στον συντελεστή παραγωγής μικροβιακού λίπους ως προς την παραγωγή βιομάζας ($Y_{L/X}$) που παρατηρήθηκε.



Γράφημα 7. Κινητική εξέλιξης του παραγόμενου μικροβιακού λίπους ως προς τη βιομάζα ($Y_{L/X}$) από τη ζύμη *Cryptococcus curvatus* ATCC 20509 (60 g/L ξυλόζη). Το κάθε σημείο είναι ο μέσος όρος δύο ανεξάρτητων μετρήσεων.

3.1.3 Κιτρικό οξύ και λοιποί μεταβολίτες

Βάση του πίνακα 1 παρατηρούμε πώς τα μέγιστα όσον αφορά την παραγωγή κιτρικού οξέος ποικίλουν στο *Yarrowia lipolytica* ανάλογα με το στέλεχος. Στο *Yarrowia lipolytica* ACA-YC 5030 παρατηρούμε η μέγιστη τιμή κιτρικού οξέος να βρίσκεται στις 312 h με 3,29 g/L σε απόλυτη τιμή ενώ ο συντελεστή απόδοσης παραγωγής κιτρικού οξέος ως προς το καταναλωθέν υπόστρωμα ($Y_{X/S}$) έφθασε τα 0,263 g/g. Παρατηρούμε επίσης παραγωγή ξυλιτόλης όπου την ίδια ώρα είχε την μέγιστη τιμή της με τιμή 6,10 g/L ενώ ο συντελεστής απόδοσης παραγωγής ξυλιτόλης ως προς την κατανάλωση υποστρώματος ($Y_{Xylitol/Xylose}$) έφθασε τα 0,48 g/g.

Στο *Yarrowia lipolytica* ACA-YC 5033 παρατηρούμε η μέγιστη τιμή κιτρικού οξέος να βρίσκεται στις 312 h με 5,29 g/L σε απόλυτη τιμή ενώ ο συντελεστή απόδοσης παραγωγής κιτρικού οξέος ως προς το καταναλωθέν υπόστρωμα ($Y_{X/S}$) έφθασε τα 0,33 g/g. Παρατηρούμε επίσης παραγωγή ξυλιτόλης όπου στις 216 h είχε την μέγιστη τιμή της με τιμή 6,61 g/L ενώ ο συντελεστής απόδοσης παραγωγής ξυλιτόλης ως προς την κατανάλωση υποστρώματος ($Y_{Xylitol/Xylose}$) έφθασε τα 0,58 g/g.

Στο *Yarrowia lipolytica* LFMB20 παρατηρούμε η μέγιστη τιμή κιτρικού οξέος να βρίσκεται στις 312 h με 4,17 g/L σε απόλυτη τιμή ενώ ο συντελεστή απόδοσης παραγωγής κιτρικού οξέος ως προς το καταναλωθέν υπόστρωμα ($Y_{X/S}$) έφθασε τα 0,372 g/g. Παρατηρούμε επίσης παραγωγή ξυλιτόλης όπου στις 216 h είχε την μέγιστη τιμή της με τιμή 4,01 g/L ενώ ο συντελεστής απόδοσης παραγωγής ξυλιτόλης ως προς την κατανάλωση υποστρώματος ($Y_{Xylitol/Xylose}$) έφθασε τα 0,46 g/g.

Στο *Yarrowia lipolytica* LGAM S(7)1 παρατηρούμε η μέγιστη τιμή κιτρικού οξέος να βρίσκεται στις 216 h με 4,23 g/L σε απόλυτη τιμή ενώ ο συντελεστή απόδοσης παραγωγής κιτρικού οξέος ως προς το καταναλωθέν υπόστρωμα ($Y_{X/S}$) έφθασε τα 0,492 g/g. Παρατηρούμε επίσης παραγωγή ξυλιτόλης όπου στις 216 h είχε την μέγιστη τιμή της με τιμή 3,27 g/L ενώ ο συντελεστής απόδοσης παραγωγής ξυλιτόλης ως προς την κατανάλωση υποστρώματος ($Y_{Xylitol/Xylose}$) έφθασε τα 0,39 g/g.

Αλλάζοντας μικροοργανισμό στη ζύμη *Candida oleophila* ATCC 20177 παρατηρούμε ότι η μέγιστη τιμή παραγωγής κιτρικού οξέος είναι στις 264 h με τιμή 4,50 g/L σε απόλυτη τιμή ενώ ο συντελεστή απόδοσης παραγωγής κιτρικού οξέος ως προς το καταναλωθέν υπόστρωμα ($Y_{X/S}$) έφθασε τα 0,08 g/g. Παρατηρούμε επίσης μικρή παραγωγή ξυλιτόλης όπου στις 168 h είχε την μέγιστη τιμή της με τιμή 1,58 g/L ενώ ο συντελεστής απόδοσης παραγωγής ξυλιτόλης ως προς την κατανάλωση υποστρώματος ($Y_{Xylitol/Xylose}$) έφθασε τα 0,03 g/g.

Στον μικροοργανισμό *Metschnikowia Pulcherrima* LFMB1 παρατηρούμε ότι η μέγιστη τιμή παραγωγής κιτρικού οξέος είναι στις 408 h με τιμή 8,32 g/L σε απόλυτη τιμή ενώ ο συντελεστή απόδοσης παραγωγής κιτρικού οξέος ως προς το καταναλωθέν υπόστρωμα ($Y_{Cit/S}$) έφθασε τα 0,15 g/g. Δεν παρατηρείται παραγωγή ξυλιτόλης όπως στα υπόλοιπα.

3.1.4 Μελέτη της σύστασης του μικροβιακού λίπους (FAMES)

Από τον Πίνακα 2 που ακολουθεί συγκεντρώνεται η σύσταση των ζυμών που μελετήθηκαν στην ξυλόζη με αρχική συγκέντρωση 60g/L.

Πίνακας 2. Σύσταση μικροβιακού λίπους των ζυμών (60 g/l ξυλόζη.)

Στέλεχος	Time (h)	Λιπαρά οξέα % κ.β.						
		C14:0	C16:0	Δ^9 C16:1	C18:0	C18:1	$\Delta^{9,12}$ C18:2	C18:3
<i>Yarrowia lipolytica</i> ACA- YC 5030	120	0,7	19,8	2,2	2,2	53,7	20,1	1,3
	312	0,5	24,3	0,8	1,4	60,4	11,2	1,4
<i>Yarrowia lipolytica</i> ACA- YC 5033	216	0,8	18,8	1,6	1,4	56,5	20,0	0,9
	312	0,6	23,4	0,4	0,9	64,2	9,4	1,1
<i>Yarrowia lipolytica</i> LGAM S(7)1	120	0,5	28,1	1,2	1,4	49,9	18,1	0,8
	312	0,4	32,0	0,8	0,8	60,2	4,8	1,0
<i>Candida oleophila</i> ATCC 20177	96	0,9	20,6	1,8	1,8	58,3	15,4	1,2
	312	0,4	20,4	0,6	1,3	56,0	20,0	1,3
<i>Rhodospiridium</i> <i>toruloides</i> DSM4444	72	2,0	27,7	4,4	9,0	47,0	8,5	1,4
	120	2,2	29,5	0,6	7,0	51,6	7,7	1,5
	264	1,7	26,0	0,7	8,2	51,5	10,0	1,8
<i>Rhodospiridium</i> <i>toruloides</i> Y27012	120	1,6	28,4	0,5	6,9	53,7	7,5	1,3
	264	1,4	25,8	0,6	9,1	52,1	9,3	1,7
<i>Metschnikowia</i> <i>Pulcherrima</i> LFMB1	48	0,8	25,2	8,5	0	46,1	19,3	0,1
	144	0,7	20,3	7,7	5,1	49,8	16,1	0,3
	240	0,5	17,1	5,1	14,5	48,9	13,4	0,5
	408	0,3	16,3	7,6	18,2	45,1	10,9	1,6

Η σύσταση των μικροβιακών λιπιδίων των ζυμών *Yarrowia lipolytica* ACA-YC 5030 και *Yarrowia lipolytica* ACA-YC 5033, τα οποία αναπτύχθηκαν σε υπόστρωμα με συγκέντρωση 60 g/l, μελετήθηκε και καταγράφηκε με τη βοήθεια του αέριου χρωματογράφου. Από τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στον Πίνακα 2, είναι εμφανές ότι το λιπαρό οξύ που επικρατεί είναι το ελαϊκό (C18:1) σε ποσοστό που φθάνει 53,7 % κ.β και 56,5 % κ.β αντίστοιχα στην αρχή της ζύμωσης και ολοκληρώνεται με ποσοστό 60,4 % κ.β και 64,2 % κ.β. Σε σημαντική ποσότητα παρατηρούμε επίσης και το παλμιτικό (C16:0) το οποίο αυξάνεται κατά την διάρκεια της ζύμωσης και ολοκληρώνεται σε ποσοστό 24,3 % κ.β. και 23,4 % κ.β αντίστοιχα. Προχωρώντας ενώ παρουσιάζεται σε υψηλά ποσοστά το λινελαϊκό (C18:2) 20,1% κ.β και 20% κ.β αντίστοιχα, στην συνέχεια της ζύμωσης 11,2 % κ.β και 9,4% κ.β αντίστοιχα.

Αντίστοιχα ήταν τα αποτελέσματα για το *Yarrowia lipolytica* LGAM S(7)1 η μόνη διαφορά που παρατηρείται μια μικρή αύξηση του παλμιτικού (C16:0) από 28,1 % κ.β. σε 32 % κ.β. στο τέλος της ζύμωσης μας.

Η σύσταση των μικροβιακών λιπιδίων της ζύμης *Candida oleophila* ATCC 20177, τα οποία αναπτύχθηκαν σε υπόστρωμα με συγκέντρωση 60 g/l, μελετήθηκε και καταγράφηκε με τη βοήθεια του αέριου χρωματογράφου. Από τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στον Πίνακα 2, είναι εμφανές ότι το λιπαρό οξύ που επικρατεί είναι το ελαϊκό (C18:1) σε ποσοστό που φθάνει 58,3 % κ.β στην αρχή της ζύμωσης και ολοκληρώνεται με ποσοστό 56,0 % κ.β. Σε σημαντική ποσότητα παρατηρούμε επίσης το λινελαϊκό (C18:2) και το παλμιτικό (C16:0) τα οποία μειώνονται κατά την διάρκεια της ζύμωσης και ολοκληρώνονται σε ποσοστό 20 % κ.β. και 20,4% κ.β. αντίστοιχα.

Η σύσταση των μικροβιακών λιπιδίων της ζύμης *Rhodospiridium toruloides* Y27012, η οποία αναπτύχθηκε σε υπόστρωμα με συγκέντρωση 60 g/l, μελετήθηκε και καταγράφηκε με τη βοήθεια του αέριου χρωματογράφου. Από τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στον Πίνακα 2, είναι εμφανές ότι το λιπαρό οξύ που επικρατεί είναι το ελαϊκό (C18:1) σε ποσοστό που φθάνει 53.7 % κ.β. Σε σημαντική ποσότητα παρατηρούμε επίσης και το παλμιτικό (C16:0). Και τα δυο δεν παρουσιάζουν ιδιαίτερες μεταβολές. Σε μικρότερο ποσοστό εμφανίζονται το στεατικό (C18:0), του οποίου το ποσοστό αυξάνεται όσο προχωρά η ζύμωση, και το λινελαϊκό (C18:2), του οποίου το ποσοστό δεν έχει μεγάλη μεταβολή όσο προχωρά η ζύμωση. Το παλμιτελαϊκό (C16:1) παρουσιάζει αύξηση μέχρι το τέλος της ζύμωσης αυξάνεται λίγο πάνω στο αρχικό του ποσοστό. Επίσης σε πολύ μικρά ποσοστά παρατηρούμε το α-λινελαϊκό (C18:3) που αυξάνεται με μικρό ρυθμό κατά την διάρκεια της ζύμωσης και το μυριστικό (C14:0) που δεν αλλάζει ιδιαίτερα το χαμηλό ποσοστό του.

Η σύσταση των μικροβιακών λιπιδίων της ζύμης *Rhodospiridium toruloides* DSM 4444, η οποία αναπτύχθηκε σε υπόστρωμα με συγκέντρωση 60 g/l, μελετήθηκε και καταγράφηκε με τη βοήθεια του αέριου χρωματογράφου. Από τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στον Πίνακα 2,

είναι εμφανές ότι το λιπαρό οξύ που επικρατεί είναι το ελαϊκό (C18:1) σε ποσοστό που φθάνει 51.6 % κ.β. Σε σημαντική ποσότητα παρατηρούμε επίσης και το παλμιτικό (C16:0). Και τα δυο δεν παρουσιάζουν ιδιαίτερες μεταβολές. Σε μικρότερο ποσοστό εμφανίζονται το λινελαϊκό (C18:2), του οποίου το ποσοστό αυξάνεται όσο προχωρά η ζύμωση, και το στεατικό (C18:0), του οποίου το ποσοστό δεν έχει μεγάλη μεταβολή όσο προχωρά η ζύμωση. Το παλμιτελαϊκό (C16:1) παρουσιάζει μείωση μέχρι το τέλος της ζύμωσης φθάνοντας το 0,7 % κ.β. Επίσης σε πολύ μικρά ποσοστά παρατηρούμε το α-λινελαϊκό (C18:3) που αυξάνεται με μικρό ρυθμό κατά την διάρκεια της ζύμωσης και το μυριστικό (C14:0) που δεν αλλάζει ιδιαίτερα το χαμηλό ποσοστό του.

Η σύσταση των μικροβιακών λιπιδίων της ζύμης *Metschnikowia Pulcherrima* LFMB1, η οποία αναπτύχθηκε σε υπόστρωμα με συγκέντρωση 60 g/l, μελετήθηκαν και καταγράφηκαν με τη βοήθεια του αέριου χρωματογράφου. Από τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στον Πίνακα 2, είναι εμφανές ότι το λιπαρό οξύ που επικρατεί είναι το ελαϊκό (C18:1) σε ποσοστό 45,1 % κ.β. στο τέλος της ζύμωσης. Σε σημαντική ποσότητα από την αρχή έως το τέλος της ζύμωσης παρατηρούμε επίσης και το παλμιτικό (C16:0) και το λινελαϊκό (C18:2). Και τα δύο παρουσιάζουν μείωση από την αρχή της ζύμωσης ενώ αυξάνουν πάλι προς το τέλος της ζύμωσης. Παρατηρούμε την ύπαρξη του στεατικού (C18:0) σε ποσοστό 14,5% κ.β. στις 240h ενώ δείχνει να αυξάνεται μέχρι το τέλος της ζύμωσης. Σε μικρότερα ποσοστά παρατηρούμε και το παλμιτελαϊκό (C16:1) που παρουσιάζεται στη ζύμωση με φθίνοντα ρυθμό ενώ αυξάνει πάλι προς το τέλος της ζύμωσης.

3.2. Παραγωγή βιομάζας, κιτρικού οξέος, μικροβιακού λίπους, ενδοπολυσακχαριτών (IPS) και κατανάλωση υποστρώματος γλυκερόλης

3.2.1 Γενική παρουσίαση αποτελεσμάτων

Όπως αναφέρθηκε και πιο πάνω στην παρούσα μελέτη διερευνήθηκαν οι κινητικές ανάπτυξης του μικροοργανισμού και απόδοσης σε προϊόν. Πιο συγκεκριμένα μελετήθηκε η παραγωγή βιομάζας (X), η απόδοση της βιομάζας σε σχέση με το καταναλωθέν υπόστρωμα ($Y_{X/S}$), η παραγωγή κιτρικού οξέος (Cit), η απόδοση παραχθέντος κιτρικού οξέος σε σχέση με την καταναλωθέν γλυκερόλη ($Y_{Cit/S}$), η παραγωγή ενδοκυτταρικού λίπους (L), ο συντελεστής παραχθέντος λίπους σε σχέση με την παραγόμενη βιομάζα ($Y_{L/X}$) και η παραγωγή ενδοπολυσακχαριτών (IPS) καθώς και η % περιεκτικότητα τους στην παραγόμενη βιομάζα. Περαιτέρω μελετήθηκε η σύσταση σε λιπαρά οξέα του μικροβιακού λίπους.

Από τον Πίνακα 3 που ακολουθεί συγκεντρώνονται οι μέγιστες τιμές παραγωγής μικροβιακού λίπους κυτταρικής βιομάζας, κιτρικού οξέος, ενδοπολυσακχαριτών (IPS), αλλά και οι αποδόσεις τους σε σχέση με την κατανάλωση του υποστρώματος (γλυκερόλη) παρουσιάζονται παρακάτω.

Πίνακας 2. Συγκεντρωτικός πίνακας αποτελεσμάτων των ζυμών που χρησιμοποιήθηκαν σε υπόστρωμα γλυκερόλης αρχικής συγκέντρωσης 60 g/L. Παρουσιάζονται οι μέγιστες τιμές παραγωγής λίπους, βιομάζας, κιτρικού οξέος και ενδοπολυσακχαριτών (IPS) των ζυμών καθώς και οι αποδόσεις τους. Το κάθε σημείο είναι ο μέσος όρος δύο ανεξάρτητων επαναλήψεων.

	Fermentation	X	L	Citric acid	IPS	GloI _{cons}	Y _{X/GloI}	Y _{L/X}	Y _{Cit/GloI}	% IPS
	time (h)	(g L ⁻¹)	(g L ⁻¹)	(g L ⁻¹)	(g L ⁻¹)	(g L ⁻¹)	(g g ⁻¹)	(g g ⁻¹)	(g g ⁻¹)	
<i>Yarrowia lipolytica</i> ACA- YC 5033	216 ^{a, c}	13,79	0,46	18,64	5,94	41,3	0,306	0,034	0,414	43,1
	144 ^b	11,22	0,84	14,92	5,4	40,5	0,277	0,075	0,368	48,2
	193 ^d	12,90	0,60	17,26	6,18	40,98	0,298	0,046	0,399	47,9
<i>Metschnikowia</i>	288 ^{a, c, d}	15,96	0,50	8,94	6,62	40,5	0,394	0,032	0,221	41,5
<i>Pulcherima</i> LFMB1	144 ^b	11,24	0,57	7,28	1,77	37,8	0,297	0,051	0,193	15,7
<i>Candida oleophila</i> ATCC 20177	192 ^{a, c, d}	24,11	0,27	6,88	12,6	57,3	0,421	0,011	0,120	52,2
	72 ^b	12,67	0,50	6,62	3,11	28,6	0,442	0,039	0,231	24,5
<i>Rhodosporidium</i> <i>toruloides</i> Y27012	192 ^{a, c}	20,67	2,07	0,00	4,52	57,3	0,361	0,100	0,000	21,9
	144 ^{b, d}	19,17	3,47	0,00	5,07	52,4	0,366	0,181	0,000	26,4
<i>Rhodosporidium</i> <i>toruloides</i> DSM4444	193 ^{a, c, d}	16,44	2,31	0,00	4,07	48,8	0,337	0,140	0,000	24,8
	95 ^b	11,16	2,82	0,00	3,01	23,1	0,482	0,253	0,000	27,0
<i>Cryptococcus curvatus</i> ATCC 20509	193 ^a	26,64	2,25	0,00	5,40	50,1	0,532	0,084	0,000	20,46
	121 ^{b, d}	16,76	2,36	0,00	5,45	36,0	0,466	0,141	0,000	32,5
	47 ^c	5,832	0,38	0,00	2,10	14,7	0,397	0,065	0,000	36,01

X : η παραγόμενη βιομάζα (g/L), L : το παραγόμενο μικροβιακό λίπος (g/L), Citric acid : το παραγόμενο κιτρικό οξύ (g/L),

IPS : η παραγόμενη ποσότητα ενδοπολυσακχαριτών (g/L) , GloI_{cons} : Καταναλωθέν υπόστρωμα (g/L) ,

a : Μέγιστη τιμή παραγόμενης βιομάζας , b: Μέγιστη τιμή παραγόμενου μικροβιακού λίπους, c : Μέγιστη τιμή παραγόμενου κιτρικού οξέος

d : Μέγιστη τιμή παραγόμενων ενδοπολυσακχαριτών ,

Y_{X/GloI} : Συντελεστής απόδοσης παραγωγής βιομάζας ως προς την κατανάλωση υποστρώματος (g/g)

Y_{L/X} : Ο συντελεστής παραγωγής μικροβιακού λίπους ως προς την παραγωγή βιομάζας (g/g)

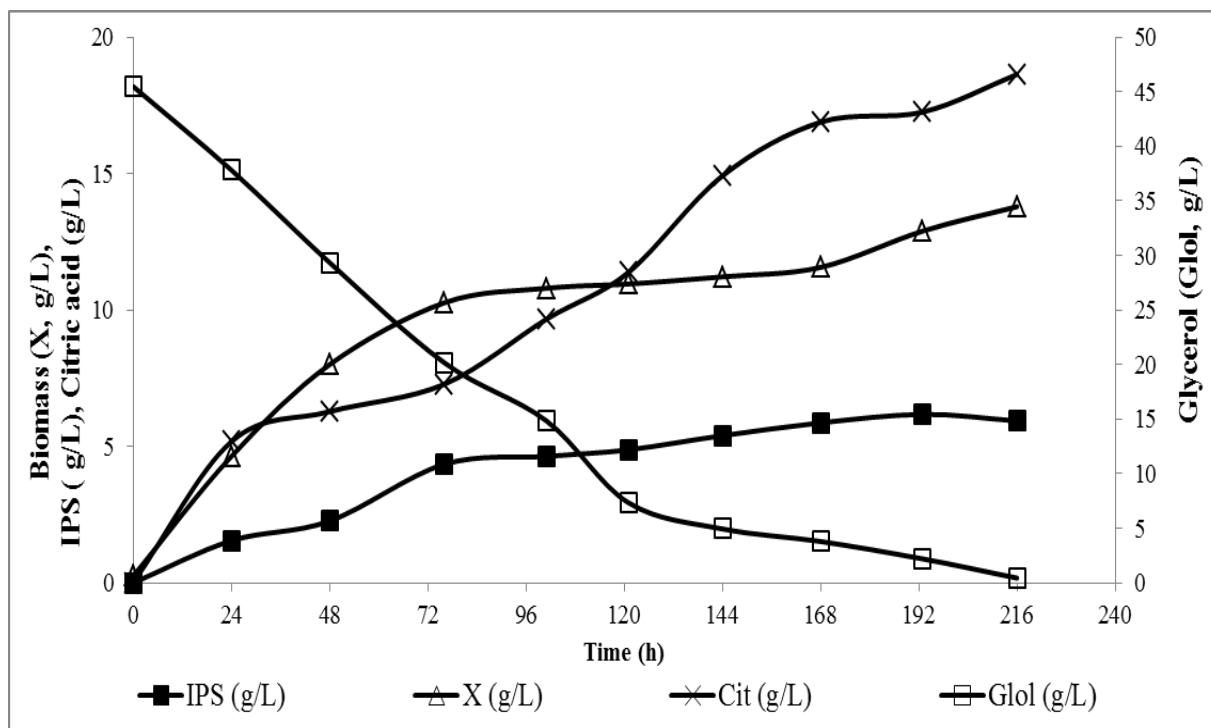
Y_{Cit/GloI} : Συντελεστής απόδοσης παραγωγής κιτρικού οξέος ως προς την κατανάλωση υποστρώματος (g/g)

% IPS : % παραγόμενων ενδοπολυσακχαριτών ως προς την παραγόμενη βιομάζα

3.2.2 Παραγωγή βιομάζας, μικροβιακού λίπους και ενδοπολυσακχαριτών (IPS)

Στον συγκεντρωτικό πίνακα 3 παρατηρούμε τα μέγιστα όσον αφορά την παραγωγή βιομάζας, λίπους και ενδοπολυσακχαριτών (IPS) των διαφόρων ζυμών. Στο *Yarrowia lipolytica* ACA-YC 5033 παρατηρούμε η μέγιστη τιμή βιομάζας να βρίσκεται στις 216 h με 13,79 g/L σε απόλυτη τιμή ενώ ο συντελεστή απόδοσης παραγωγής βιομάζας ως προς το καταναλωθέν υπόστρωμα ($Y_{X/S}$) έφθασε τα 0,31 g/g. Η μέγιστη τιμή μικροβιακού λίπους παρουσιάστηκε στις 144 h με τιμή 0,84 g/L ενώ ο συντελεστής παραγωγής μικροβιακού λίπους ως προς την παραγωγή βιομάζας ($Y_{L/X}$) έφθασε τα 0,08 g/g. Η μέγιστη τιμή παραγωγής ενδοπολυσακχαριτών (IPS) παρουσιάστηκε στις 193 h με απόλυτη τιμή 6,18 g/L όπου η % αναλογία του στην παραγόμενη βιομάζα ήταν 48%.

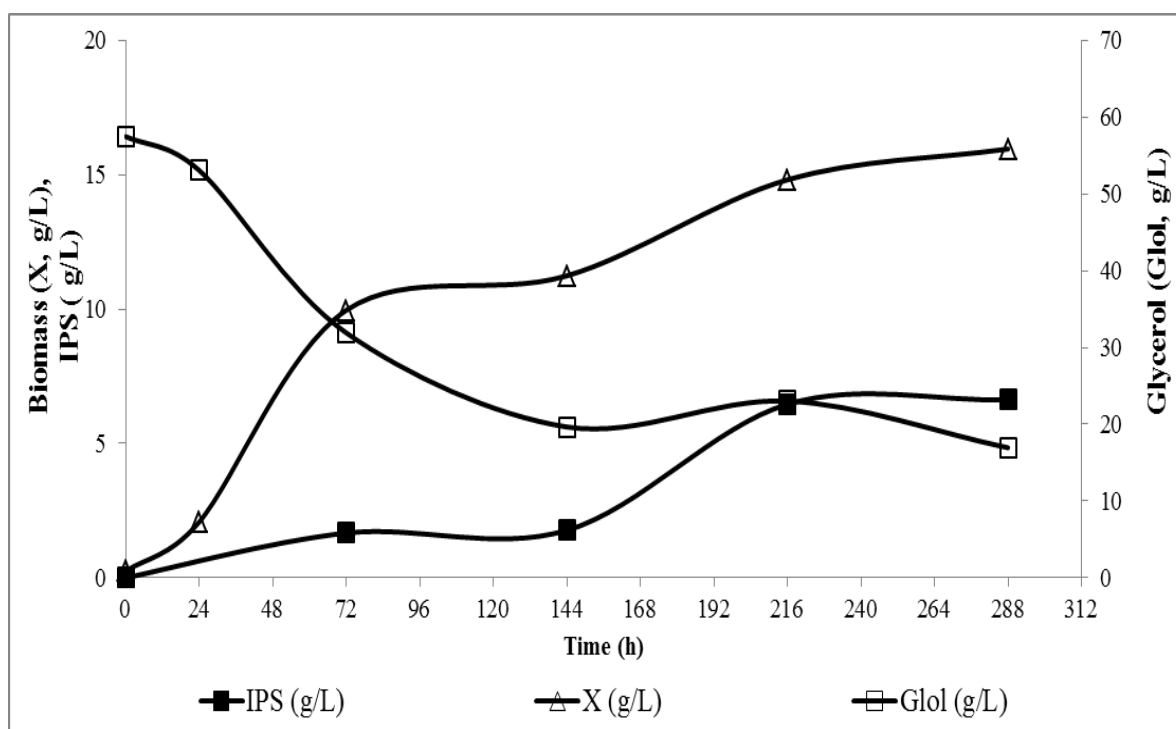
Ενδεικτικά η κινητική της παραγωγής βιομάζας, ενδοπολυσακχαριτών (IPS) και της κατανάλωσης του υποστρώματος από τη ζύμη *Yarrowia lipolytica* 5033 όταν αναπτύχθηκε σε θρεπτικό μέσο με γλυκερόλη ως μόνη πηγή άνθρακα (50 g/l), παρουσιάζονται στο Γράφημα 8. Όπως φαίνεται από το Γράφημα 8 η κυτταρική αύξηση έλαβε την μέγιστη τιμή της 216 h μετά τον εμβολιασμό, φθάνοντας τα 13,79 g/L και συντελεστή απόδοσης ($Y_{X/S}$) ίσο με 0,33 g/g. Το μέγεθος των ενδοπολυσακχαριτών (IPS) έλαβε την μέγιστη τιμή του στις 193 h, φθάνοντας τα 6,18 g/L σε απόλυτη τιμή με 47,86% της παραγόμενης βιομάζας. Το υπόστρωμα (γλυκερόλη) μέχρι το τέλος της ζύμωσης είχε καταναλωθεί σχεδόν όλο αφήνοντας 4 g/L.



Γράφημα 8. Κινητική της παραγωγής βιομάζας, κιτρικού οξέος, της κατανάλωσης υποστρώματος και της παραγωγής ενδοπολυσακχαριτών από τη ζύμη *Yarrowia lipolytica* ACA-YC 5033 (50 g/L γλυκερόλη). Όλα τα σημεία είναι ο μέσος όρος δύο ανεξάρτητων επαναλήψεων.

Στον μικροοργανισμό *Metschnikowia Pulcherima* LFMB1 παρατηρούμε η μέγιστη τιμή βιομάζας και ενδοπολυσακχαριτών (IPS) να βρίσκεται στις 288 h με βιομάζα 15,96 g/L σε απόλυτη τιμή ενώ ο συντελεστή απόδοσης παραγωγής βιομάζας ως προς το καταναλωθέν υπόστρωμα ($Y_{X/S}$) έφθασε τα 0,40 g/g. Την ίδια στιγμή το ύψος των ενδοπολυσακχαριτών (IPS) να έχει τιμή 6,62 g/L όπου η % αναλογία του στην παραγόμενη βιομάζα ήταν 41,5%. Η μέγιστη τιμή μικροβιακού λίπους παρουσιάστηκε στις 144 h με τιμή 0,57 g/L ενώ ο συντελεστής παραγωγής μικροβιακού λίπους ως προς την παραγωγή βιομάζας ($Y_{L/X}$) έφθασε τα 0,05 g/g.

Ενδεικτικά η κινητική της παραγωγής βιομάζας, ενδοπολυσακχαριτών και της κατανάλωσης του υποστρώματος από τη ζύμη *Metschnikowia Pulcherrima* LFMB1 όταν αναπτύχθηκε σε θρεπτικό μέσο με γλυκερόλη ως μόνη πηγή άνθρακα (60 g/L), παρουσιάζονται στο Γράφημα 9. Όπως φαίνεται από το Γράφημα 9 η κυτταρική αύξηση έλαβε την μέγιστη τιμή της 288 h μετά τον εμβολιασμό, φθάνοντας τα 15.96 g/L και συντελεστή απόδοσης ($Y_{X/S}$) ίσο με 0,39 g/g. Το μέγεθος των ενδοπολυσακχαριτών (IPS) έλαβε επίσης την μέγιστη τιμή του στις 288 h, φθάνοντας τα 6,62 g/l με 41,50% της παραγόμενης βιομάζας. Το υπόστρωμα (γλυκερόλη) μέχρι την τελευταία μέτρηση μας στις 288 h είχε αφήσει 16,95 g/L.

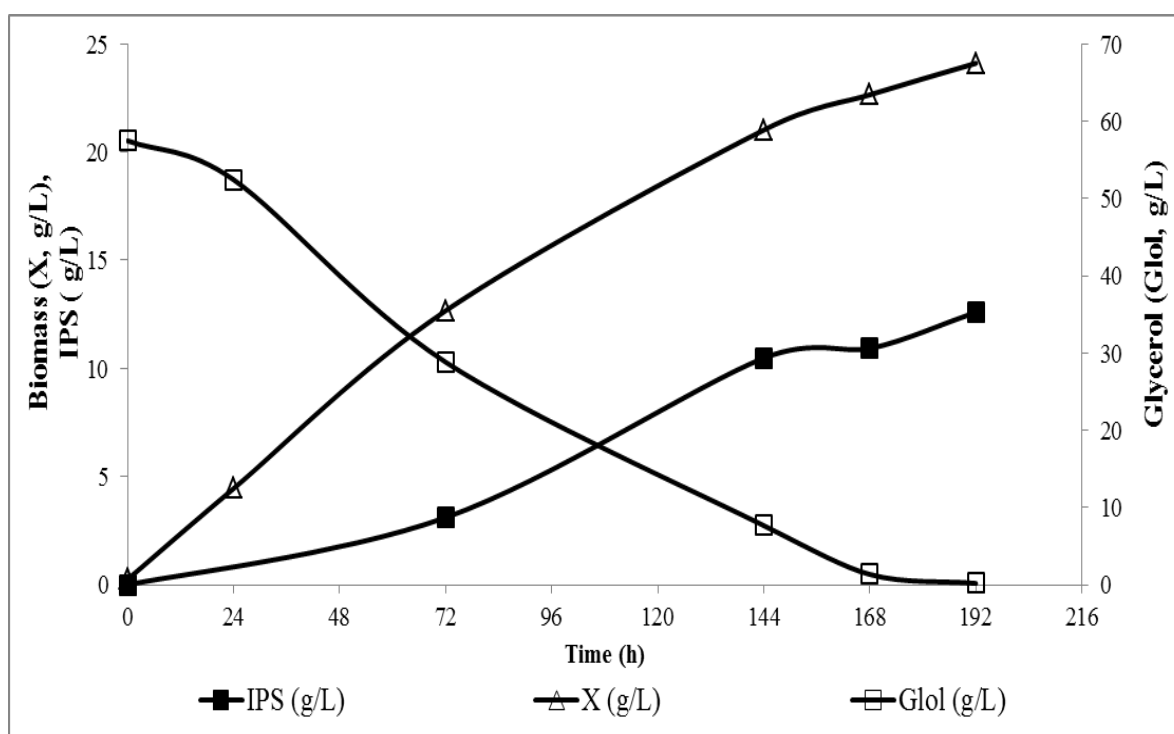


Γράφημα 9. Κινητική της παραγωγής βιομάζας, της κατανάλωσης υποστρώματος και της παραγωγής ενδοπολυσακχαριτών από τη ζύμη *Metschnikowia Pulcherrima* LFMB1 (60 g/L γλυκερόλη). Όλα τα σημεία είναι ο μέσος όρος δύο ανεξάρτητων επαναλήψεων.

Στην ζύμη *Candida oleophila* ATCC 20177 παρατηρούμε η μέγιστη τιμή βιομάζας και ενδοπολυσακχαριτών (IPS) να βρίσκεται στις 192 h με βιομάζα 24,11 g/L σε απόλυτη τιμή ενώ ο

συντελεστή απόδοσης παραγωγής βιομάζας ως προς το καταναλωθέν υπόστρωμα ($Y_{X/S}$) έφθασε τα 0,42 g/g. Την ίδια στιγμή το ύψος των ενδοπολυσακχαριτών (IPS) να έχει τιμή 12,6 g/L όπου η % αναλογία του στην παραγόμενη βιομάζα ήταν 52 %. Η μέγιστη τιμή μικροβιακού λίπους παρουσιάστηκε στις 72 h με τιμή 2,58 g/L ενώ ο συντελεστής παραγωγής μικροβιακού λίπους ως προς την παραγωγή βιομάζας ($Y_{L/X}$) έφθασε τα 0,20 g/g

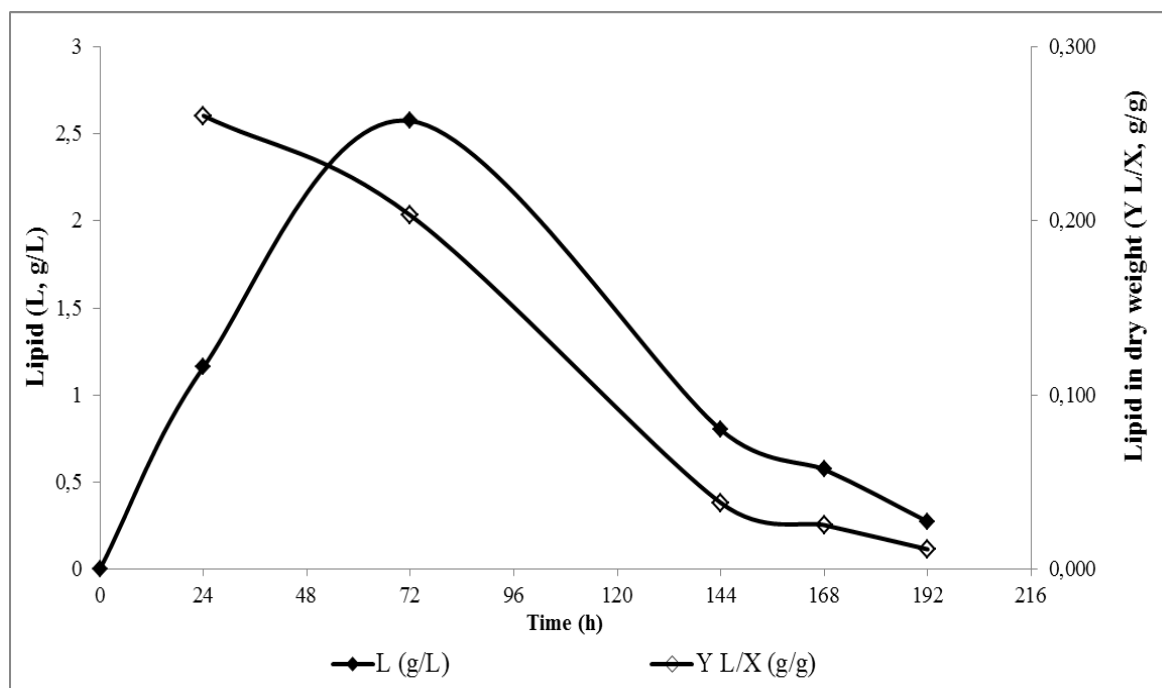
Ενδεικτικά η κινητική της παραγωγής βιομάζας, ενδοπολυσακχαριτών και της κατανάλωσης του υποστρώματος από τη ζύμη *Candida oleophila* ATCC 20177 όταν αναπτύχθηκε σε θρεπτικό μέσο με γλυκερόλη ως μόνη πηγή άνθρακα (60 g/L), παρουσιάζονται στο Γράφημα 10. Όπως φαίνεται από το Γράφημα 10 η κυτταρική αύξηση έλαβε την μέγιστη τιμή της 192 h μετά τον εμβολιασμό, φθάνοντας τα 24,11 g/l και συντελεστή απόδοσης ($Y_{X/S}$) ίσο με 0,42 g/g. Το μέγεθος των ενδοπολυσακχαριτών (IPS) έλαβε επίσης την μέγιστη τιμή του στις 192 h, φθάνοντας τα 12,60 g/L με 52,60% της παραγόμενης βιομάζας. Το υπόστρωμα (γλυκερόλη) μέχρι την τελευταία μέτρηση μας στις 192 h είχε καταναλωθεί όλο.



Γράφημα 10. Κινητική της παραγωγής βιομάζας, της κατανάλωσης υποστρώματος και της παραγωγής ενδοπολυσακχαριτών από τη ζύμη *Candida oleophila* ATCC 20177 (60 g/L γλυκερόλη). Όλα τα σημεία είναι ο μέσος όρος δύο ανεξάρτητων επαναλήψεων.

Η κινητική εξέλιξης του συντελεστή απόδοσης παραγωγής μικροβιακού λίπους ως προς την παραγωγή βιομάζας ($Y_{L/X}$) φαίνεται στο Γράφημα 11. Ο συντελεστής έφθασε τα 0,26 g/g στις 24 h και απόλυτη τιμή λίπους 1,18 g/L, που ήταν και η μέγιστη τιμή του συντελεστή ενώ ακολούθησε

0,20 g/g στις 72 h με 2,58 g/L που ήταν η μεγαλύτερη τιμή του λίπους σε απόλυτες τιμές . Μέχρι το τέλος της ζύμωσης παρουσίασε μείωση φθάνοντας τα 0,011 g/g και 0,27 g/L.



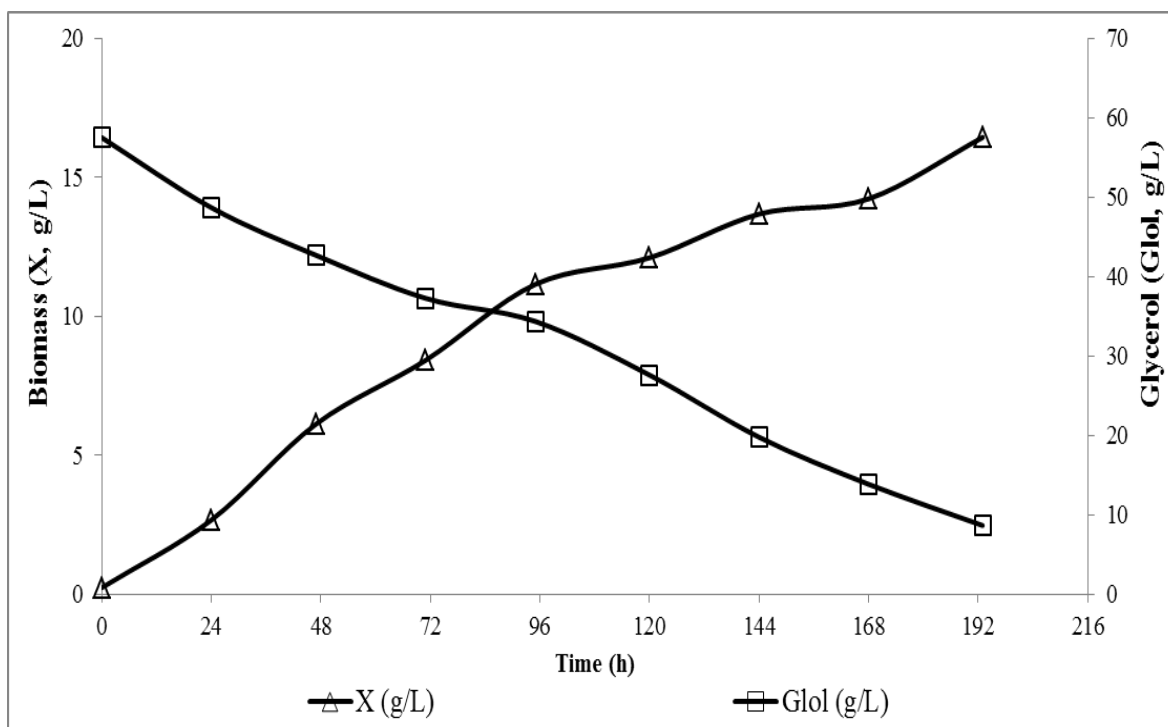
Γράφημα 11. Κινητική εξέλιξης του παραγόμενου μικροβιακού λίπους ως προς τη βιομάζα ($Y_{L/X}$) από τη ζύμη *Candida oleophila* ATCC 20177 (60 g/l γλυκερόλη). Κάθε σημείο είναι ο μέσος όρος δύο ανεξάρτητων μετρήσεων.

Στον μικροοργανισμό *Rhodospiridium toruloides* Y27012 παρατηρούμε η μέγιστη τιμή βιομάζας να βρίσκεται στις 192 h με βιομάζα 20,68 g/L σε απόλυτη τιμή ενώ ο συντελεστή απόδοσης παραγωγής βιομάζας ως προς το καταναλωθέν υπόστρωμα ($Y_{X/S}$) έφθασε τα 0,36 g/g. Η μέγιστη τιμή μικροβιακού λίπους και ενδοπολυσακχαριτών (IPS) παρουσιάστηκε στις 144 h με τιμή 3,47 g/L ενώ ο συντελεστής παραγωγής μικροβιακού λίπους ως προς την παραγωγή βιομάζας ($Y_{L/X}$) έφθασε τα 0,17 g/g. Την ίδια στιγμή το ύψος των ενδοπολυσακχαριτών (IPS) να έχει τιμή 5,07 g/L όπου η % αναλογία του στην παραγόμενη βιομάζα ήταν 26,5 %.

Στη ζύμη *Rhodospiridium toruloides* DSM4444 παρατηρούμε η μέγιστη τιμή βιομάζας και ενδοπολυσακχαριτών (IPS) να βρίσκεται στις 193 h με βιομάζα 16,44 g/L σε απόλυτη τιμή ενώ ο συντελεστή απόδοσης παραγωγής βιομάζας ως προς το καταναλωθέν υπόστρωμα ($Y_{X/S}$) έφθασε τα 0,34 g/g. Την ίδια στιγμή το ύψος των ενδοπολυσακχαριτών (IPS) να έχει τιμή 4,07 g/L όπου η % αναλογία του στην παραγόμενη βιομάζα ήταν 25%. Η μέγιστη τιμή μικροβιακού λίπους παρουσιάστηκε στις 95 h με τιμή 2,82 g/L ενώ ο συντελεστής παραγωγής μικροβιακού λίπους ως προς την παραγωγή βιομάζας ($Y_{L/X}$) έφθασε τα 0,25 g/g.

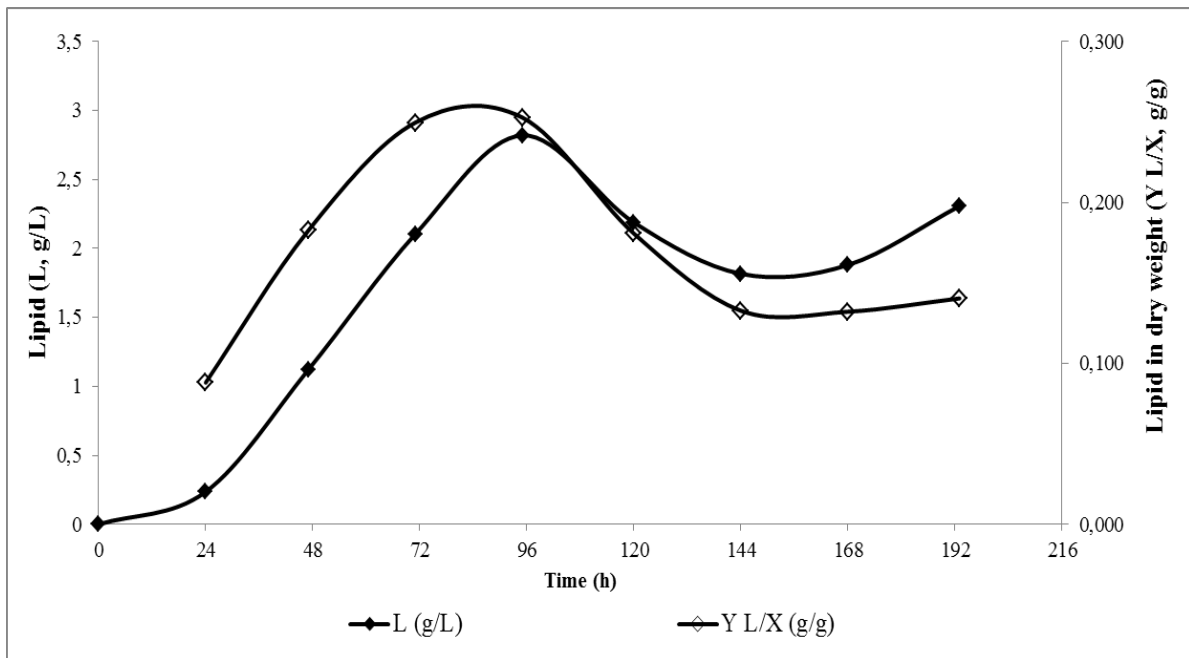
Ενδεικτικά η κινητική της παραγωγής βιομάζας και της κατανάλωσης του υποστρώματος από τη ζύμη *Rhodospiridium toruloides* DSM 4444 όταν αναπτύχθηκε σε θρεπτικό μέσο με

γλυκερόλη ως μόνη πηγή άνθρακα (60 g/L), παρουσιάζονται στο Γράφημα 12. Όπως φαίνεται από το Γράφημα 12 η κυτταρική αύξηση έλαβε την μέγιστη τιμή της 193 h μετά τον εμβολιασμό, φθάνοντας τα 16.44 g/L και συντελεστή απόδοσης ($Y_{X/S}$) ίσο με 0,34 g/g. Το υπόστρωμα (γλυκερόλη) μέχρι την τελευταία μέτρηση μας στις 193 h δεν είχε καταναλωθεί όλο αφήνοντας 8,70 g/L.



Γράφημα 12. Κινητική της παραγωγής βιομάζας και της κατανάλωσης υποστρώματος από τη ζύμη *Rhodospiridium toruloides* DSM 4444 (60 g/L γλυκερόλη). Όλα τα σημεία είναι ο μέσος όρος δύο ανεξάρτητων επαναλήψεων.

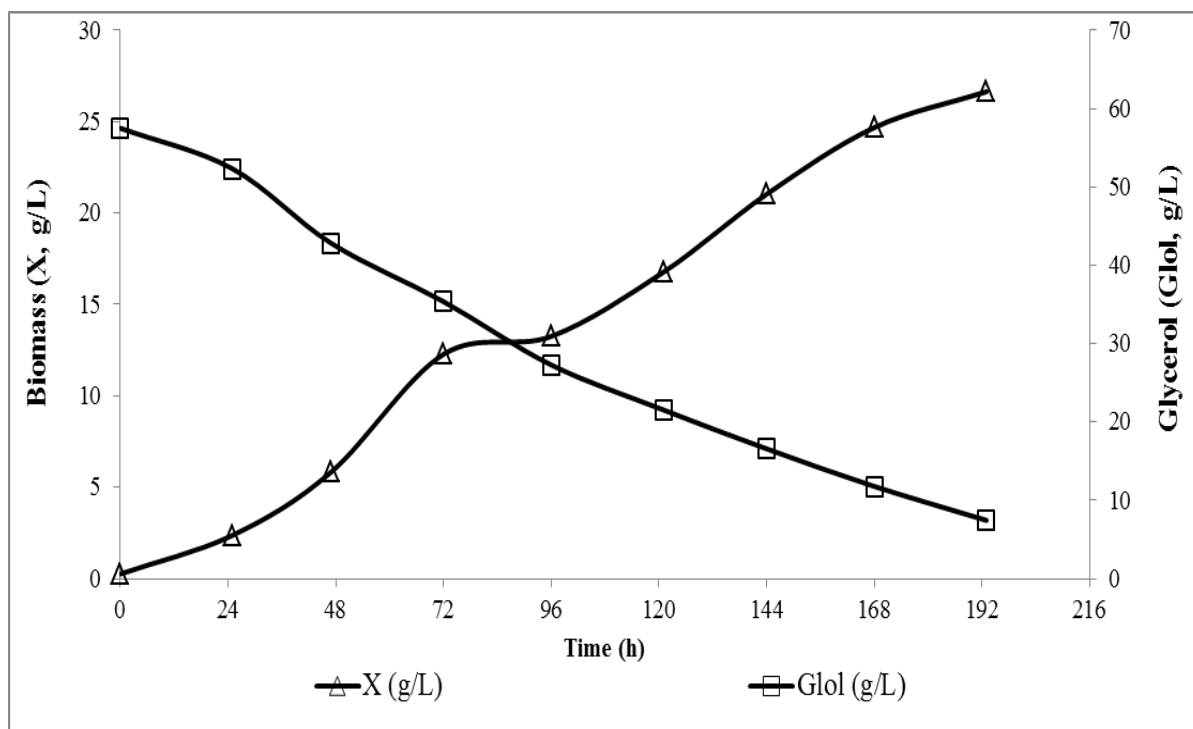
Η κινητική εξέλιξης του συντελεστή απόδοσης παραγωγής μικροβιακού λίπους ως προς την παραγωγή βιομάζας ($Y_{L/X}$) φαίνεται στο Γράφημα 13. Ο συντελεστής έφθασε τα 0,25 g/g στις 95 h και απόλυτη τιμή λίπους 2,82 g/L, που ήταν και η μέγιστη τιμή του συντελεστή. Μέχρι τις 168 h παρουσίασε μείωση τόσο στο συντελεστή απόδοσης παραγωγής μικροβιακού λίπους ως προς την παραγωγή βιομάζας όσο και σε απόλυτες τιμές φθάνοντας 0,06 g/g και 0,89 g/L αντίστοιχα. Μέχρι τις 193 h που ολοκληρώσαμε την ζύμωση μας παρουσίασε αύξηση φθάνοντας τα 0,14 g/g και 2.31 g/L αντίστοιχα.



Γράφημα 13. Κινητική εξέλιξης του παραγόμενου μικροβιακού λίπους ως προς τη βιομάζα ($Y_{L/X}$) από τη ζύμη *Rhodosporidium toruloides* DSM 4444 (60 g/L γλυκερόλη). Όλα τα σημεία είναι ο μέσος όρος δύο ανεξάρτητων επαναλήψεων.

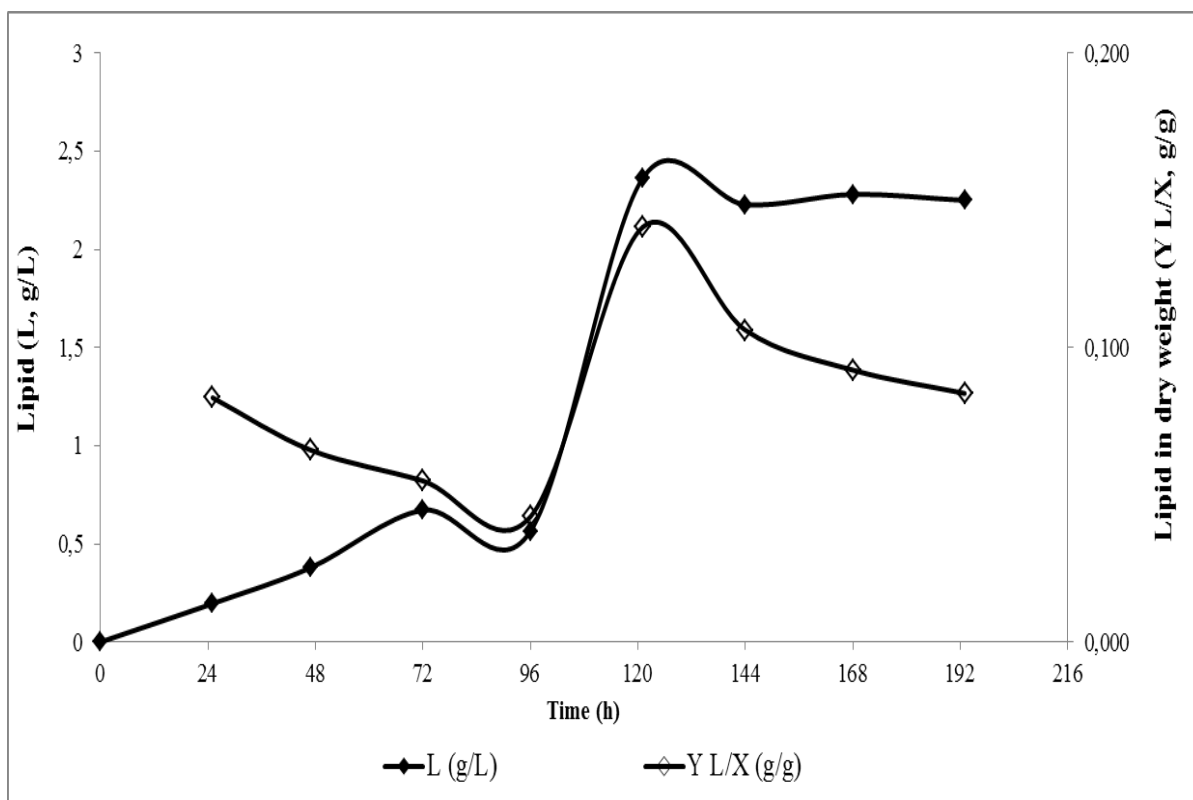
Στο *Cryptococcus curvatus* ATCC 20509 παρατηρούμε η μέγιστη τιμή βιομάζας να βρίσκεται στις 193 h με βιομάζα 26,64 g/L σε απόλυτη τιμή ενώ ο συντελεστή απόδοσης παραγωγής βιομάζας ως προς το καταναλωθέν υπόστρωμα ($Y_{X/S}$) έφθασε τα 0,53 g/g. Η μέγιστη τιμή μικροβιακού λίπους και ενδοπολυσακχαριτών (IPS) παρουσιάστηκε στις 121 h με τιμή για το λίπος 2,82 g/L ενώ ο συντελεστής παραγωγής μικροβιακού λίπους ως προς την παραγωγή βιομάζας ($Y_{L/X}$) έφθασε τα 0,14 g/g. Την ίδια στιγμή το ύψος των ενδοπολυσακχαριτών (IPS) να έχει τιμή 5,45 g/L όπου η % αναλογία του στην παραγόμενη βιομάζα ήταν 32,5 %.

Ενδεικτικά η κινητική της παραγωγής βιομάζας και της κατανάλωσης του υποστρώματος από τη ζύμη *Cryptococcus curvatus* ATCC 20509 όταν αναπτύχθηκε σε θρεπτικό μέσο με γλυκερόλη ως μόνη πηγή άνθρακα (60 g/L), παρουσιάζονται στο Γράφημα 14. Όπως φαίνεται από το Γράφημα 14 η κυτταρική αύξηση έλαβε την μέγιστη τιμή της 193 h μετά τον εμβολιασμό, φθάνοντας τα 26,64 g/L και συντελεστή απόδοσης ($Y_{X/S}$) ίσο με 0,53 g/g. Η μέγιστη τιμή του συντελεστή απόδοσης ($Y_{X/S}$) 0,56 g/g στις 72 h με παραγωγή βιομάζας 12,27 g/l. Το υπόστρωμα (γλυκερόλη) μέχρι την τελευταία μέτρηση μας στις 193 h δεν είχε καταναλωθεί όλο αφήνοντας 7,44 g/L.



Γράφημα 14. Κινητική της παραγωγής βιομάζας και της κατανάλωσης υποστρώματος από τη ζύμη *Cryptococcus curvatus* ATCC 20509 (60 g/L γλυκερόλη). Όλα τα σημεία είναι ο μέσος όρος δύο ανεξάρτητων επαναλήψεων.

Η κινητική εξέλιξης του συντελεστή απόδοσης παραγωγής μικροβιακού λίπους ως προς την παραγωγή βιομάζας ($Y_{L/X}$) φαίνεται στο Γράφημα 15. Ο συντελεστής έφθασε τα 0,14 g/g στις 121 h και απόλυτη τιμή λίπους 2,36 g/L, που ήταν και η μέγιστη τιμή του συντελεστή. Μέχρι τις 96 h παρουσίασε μείωση τόσο στο συντελεστή απόδοσης παραγωγής μικροβιακού λίπους ως προς την παραγωγή βιομάζας όσο και σε απόλυτες τιμές φθάνοντας 0,043 g/g και 0,56 g/L αντίστοιχα. Το επόμενο 24ωρο μέχρι τις 121 h παρουσίασε απότομη αύξηση φθάνοντας τις μέγιστες τιμές τις ζύμωσης που αναφέραμε παραπάνω. Μέχρι τις 193 h που ολοκληρώσαμε την ζύμωση μας παρουσίασε μείωση φθάνοντας τα 0,084 g/g και 2,25 g/L.



Γράφημα 15. Κινητική εξέλιξης του παραγόμενου μικροβιακού λίπους ως προς τη βιομάζα ($Y_{L/X}$) από τη ζύμη *Cryptococcus curvatus* ATCC 20509 (60 g/L, γλυκερόλη). Όλα τα σημεία είναι ο μέσος όρος δύο ανεξάρτητων επαναλήψεων.

3.2.3 Κιτρικό οξύ

Βάση του πίνακα 3 παρατηρούμε πώς τα μέγιστα όσον αφορά την παραγωγή κιτρικού οξέος ποικίλουν ανάλογα με το μικροοργανισμό. Στη ζύμη *Yarrowia lipolytica* ACA-YC 5033 παρατηρούμε η μέγιστη τιμή κιτρικού οξέος να βρίσκεται στις 216 h με 18,64 g/L σε απόλυτη τιμή ενώ ο συντελεστή απόδοσης παραγωγής κιτρικού οξέος ως προς το καταναλωθέν υπόστρωμα ($Y_{Cit/S}$) έφθασε τα 0,414 g/g.

Στον μικροοργανισμό *Metschnikowia Pulcherrima* LFMB1 παρατηρούμε η μέγιστη τιμή κιτρικού οξέος να βρίσκεται στις 288 h με 8,94 g/L σε απόλυτη τιμή ενώ ο συντελεστή απόδοσης παραγωγής κιτρικού οξέος ως προς το καταναλωθέν υπόστρωμα ($Y_{Cit/S}$) έφθασε τα 0,22 g/g.

Στη ζύμη *Candida oleophila* ATCC 20177 παρατηρούμε η μέγιστη τιμή κιτρικού οξέος να βρίσκεται στις 192 h με 6,88 g/L σε απόλυτη τιμή ενώ ο συντελεστή απόδοσης παραγωγής κιτρικού οξέος ως προς το καταναλωθέν υπόστρωμα ($Y_{Cit/S}$) έφθασε τα 0,12 g/g.

3.2.4 Μελέτη της σύστασης του μικροβιακού λίπους (FAMES)

Από τον Πίνακα 4 που ακολουθεί συγκεντρώνεται η σύσταση των ζυμών που μελετήθηκαν στην γλυκερόλη με αρχική συγκέντρωση 60 g/L.

Πίνακας 4. Σύσταση μικροβιακού λίπους των ζυμών (60 g/L γλυκερόλη,)

Στέλεχος	Time (h)	Λιπαρά οξέα % κ.β.						
		C14:0	C16:0	^{Δ9} C16:1	C18:0	C18:1	^{Δ9,12} C18:2	C18:3
<i>Yarrowia lipolytica</i> ACA- YC 5033	24	5,8	15,6	4,9	3,4	43,7	25,8	0,8
	48	5,2	14,1	6,4	6,9	46,5	20,2	0,8
	76	5,3	14,9	6,6	8,9	46,1	17,1	1,1
	121	5,5	14,2	7,3	8,9	47,2	15,5	1,4
	168	5,9	16,2	6,5	9,1	43,9	15,4	3,0
	193	2,4	15,6	8,1	7,6	49,2	14,9	2,2
	216	1,5	15,8	10,8	5,4	49,2	15,0	2,3
<i>Metschnikowia Pulcherrima</i> LFMB1	24	1,2	19,8	4,5	4,9	49,6	19,4	0,5
	72	1,3	16,7	5,6	4,4	55,7	15,5	0,8
	216	0,8	17,7	7,7	0,0	59,4	14,5	0,0
	288	0,6	15,6	8,0	0,0	59,5	16,2	0,0
<i>Candida oleophila</i> ATCC 20177	24	0,6	14,1	2,0	6,3	57,3	16,8	2,8
	72	0,6	16,2	0,5	9,5	59,2	13,6	0,4
	192	0,5	24,6	0,4	15,5	56,4	2,2	0,4
<i>Rhodospiridium toruloides</i> Y27012	72	2,3	36,1	1,0	7,6	41,5	10,1	1,4
	144	1,6	31,4	0,7	10,3	44,2	10,3	1,4
	168	1,9	33,4	0,7	9,6	43,0	10,0	1,5
	192	1,9	33,5	0,0	10,0	43,0	10,1	1,5
<i>Rhodospiridium toruloides</i> DSM4444	47	1,2	25,1	0,6	9,1	51,0	11,2	1,8
	71	2,2	22,7	2,0	9,4	47,8	14,0	2,0
	120	1,4	26,1	0,8	9,9	50,3	9,9	1,6
	193	1,5	26,6	0,6	10,3	49,5	10,1	1,4
<i>Cryptococcus curvatus</i> ATCC 20509	47	0,5	19,8	0,4	11,6	46,9	20,3	0,4
	72	0,6	21,8	1,8	5,8	54,5	14,9	0,6
	96	0,4	27,8	3,3	5,7	48,8	13,5	0,5
	193	0,4	30,2	3,5	4,2	48,7	12,7	0,4

Η σύσταση των μικροβιακών λιπιδίων της ζύμης *Yarrowia lipolytica* ACA-YC 5033, η οποία αναπτύχθηκε σε υπόστρωμα με συγκέντρωση 50 g/L, μελετήθηκε και καταγράφηκε με τη βοήθεια του αέριου χρωματογράφου. Από τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στον Πίνακα 4, είναι εμφανές ότι το λιπαρό οξύ που επικρατεί είναι το ελαϊκό (C18:1) σε ποσοστό που φθάνει 49,2 % κ.β. Σε σημαντική ποσότητα παρατηρούμε επίσης και το λινελαϊκό (C18:2) το οποίο μειώνεται καθ'όλη την πορεία της ζύμωσης. Αντίθετα συμβαίνει στο στεατικό (C18:0), παρατηρούμε να αυξάνεται και να μειώνεται προς το τέλος της ζύμωσης. Σε μικρότερο ποσοστό εμφανίζονται το παλμιτικό (C16:0), του οποίου το ποσοστό μειώνεται και αυξάνεται εναλλάξ σε κάθε 24ωρο όσο προχωρά η ζύμωση. Το παλμιτελαϊκό (C16:1) παρουσιάζει αύξηση κατά την διάρκεια της ζύμωσης να πέφτει γύρω στις 168h και να αρχίζει πάλι να αυξάνει το ποσοστό του μέχρι το τέλος της ζύμωσης.

Η σύσταση των μικροβιακών λιπιδίων της ζύμης *Metschnikowia Pulcherrima* LFMB1, η οποία αναπτύχθηκε σε υπόστρωμα με συγκέντρωση 60 g/L, μελετήθηκε και καταγράφηκε με τη βοήθεια του αέριου χρωματογράφου. Από τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στον Πίνακα 4, είναι εμφανές ότι το λιπαρό οξύ που επικρατεί είναι το ελαϊκό (C18:1) σε ποσοστό που φθάνει 59.5 % κ.β. παρουσιάζοντας αυξημένα ποσοστά καθώς προχωράει η ζύμωση. Σε σημαντική ποσότητα παρατηρούμε επίσης και το λινελαϊκό (C18:2) το οποίο μειώνεται καθόλη την πορεία της ζύμωσης και αυξάνεται προς το τέλος. Στο στεατικό (C18:0), παρατηρούμε να μειώνεται το ποσοστό ενώ από το σημείο 216 h ως το τέλος της ζύμωσης δεν υπάρχει καθόλου. Σε μεγάλο ποσοστό εμφανίζεται το παλμιτικό (C16:0), του οποίου το ποσοστό μειώνεται και αυξάνεται εναλλάξ σε κάθε μέτρηση-σημείο όσο προχωρά η ζύμωση. Το παλμιτελαϊκό (C16:1) παρουσιάζει αύξηση σε όλη την πορεία της ζύμωσης φθάνοντας το 8% κ.β στις 288 h.

Η σύσταση των μικροβιακών λιπιδίων της ζύμης *Candida oleophila* ATCC 20177, η οποία αναπτύχθηκε σε υπόστρωμα με συγκέντρωση 60 g/L, μελετήθηκε και καταγράφηκε με τη βοήθεια του αέριου χρωματογράφου. Από τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στον Πίνακα 4, είναι εμφανές ότι το λιπαρό οξύ που επικρατεί είναι το ελαϊκό (C18:1) σε ποσοστό που φθάνει 59,2 % κ.β. τις 72 h χωρίς να αλλάζει πολύ η αναλογία του σε όλη τη ζύμωση. Σε σημαντική ποσότητα παρατηρούμε επίσης και το λινελαϊκό (C18:2) το οποίο μειώνεται καθόλη την πορεία της ζύμωσης ενώ παρουσιάζεται σε πολύ χαμηλό ποσοστό 2,2 % κ.β προς το τέλος της ζύμωσης τις 192 h. Στο στεατικό (C18:0), και το παλμιτικό (C16:0), παρατηρούμε να αυξάνονται φθάνοντας 15,5 και 24,6 % κ.β. αντίστοιχα. Το παλμιτελαϊκό (C16:1) και το α-λινελαϊκό (C18:3) παρουσιάζονται στην αρχή της ζύμωσης σε πολύ μικρό ποσοστό ενώ δεν παρουσιάζονται στα υπόλοιπα σημεία μας.

Η σύσταση των μικροβιακών λιπιδίων της ζύμης *Rhodospiridium toruloides* DSM 4444, η οποία αναπτύχθηκε σε υπόστρωμα με συγκέντρωση 60 g/L, μελετήθηκε και καταγράφηκε με τη

βοήθεια του αέριου χρωματογράφου. Από τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στον Πίνακα 4, είναι εμφανές ότι το λιπαρό οξύ που επικρατεί είναι το ελαιϊκό (C18:1) σε ποσοστό που φθάνει 51,0 % κ.β. τις 47 h χωρίς να αλλάζει πολύ η αναλογία του σε όλη τη ζύμωση. Σε σημαντική ποσότητα παρατηρούμε επίσης και το παλμιτικό (C16:0) το οποίο μειώνεται μέχρι τις 72 h και αυξάνεται μέχρι το τέλος της ζύμωσης. Το λινελαϊκό (C18:2), το παλμιτελαϊκό (C16:1) και το α-λινελαϊκό (C18:3) , αυξάνονται μέχρι τις πρώτες 72 ώρες ενώ μειώνονται έως το τέλος της ζύμωσης τις 193 h. Το στεατικό (C18:0), παρατηρούμε να αυξάνεται φθάνοντας το 10,3% κ.β.. Αντίστοιχες διαφορές παρουσιάζει και το *Rhodospiridium toruloides* Y27012.

Η σύσταση των μικροβιακών λιπιδίων της ζύμης *Cryptococcus curvatus* ATCC 20509, η οποία αναπτύχθηκε σε υπόστρωμα με συγκέντρωση 60 g/L, μελετήθηκε και καταγράφηκε με τη βοήθεια του αέριου χρωματογράφου. Από τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στον Πίνακα 4, είναι εμφανές ότι το λιπαρό οξύ που επικρατεί είναι το ελαιϊκό (C18:1) σε ποσοστό που φθάνει 54,5 % κ.β. τις 72 h. Σε σημαντική ποσότητα παρατηρούμε επίσης και το παλμιτικό (C16:0) το οποίο αυξάνεται μέχρι το τέλος της ζύμωσης φθάνοντας το ποσοστό 30,2 % κ.β.. Το στεατικό (C18:0) και το λινελαϊκό (C18:2), μειώνονται κατά την διάρκεια της ζύμωσης ξεκινώντας από 11,6 % κ.β. και 20,3% κ.β. έως τα ποσοστά 4.2 % κ.β. και 12.7 % κ.β. αντίστοιχα στις 193 h. Το παλμιτελαϊκό (C16:1) δεν υπάρχει στα πρώτα 24ωρα της ζύμωσης μας ενώ παρουσιάζει αύξηση από τις 72 h μέχρι το τέλος της ζύμωσης φθάνοντας ένα μικρό ποσοστό 3.5 % κ.β.. Παρατηρούμε ένα ποσοστό 0.4 % κ.β. α-λινελαϊκο (C18:3) και μυριστικό (C14:0) στο τέλος της ζύμωσης που δεν άλλαξε ιδιαίτερα στην πορεία της ζύμωσης.

3.3. Παραγωγή βιομάζας, κιτρικού οξέος, μικροβιακού λίπους, ενδοπολυσακχαριτών (IPS) και κατανάλωση σε συνυποστρώματα ξυλόζης & γλυκερόλης

3.3.1 Γενική παρουσίαση αποτελεσμάτων

Όπως αναφέρθηκε και πιο πάνω στην παρούσα μελέτη διερευνήθηκαν οι κινητικές ανάπτυξης του μικροοργανισμού και απόδοσης σε προϊόν. Πιο συγκεκριμένα μελετήθηκε η παραγωγή βιομάζας (X), η απόδοση της βιομάζας σε σχέση με το καταναλωθέν υπόστρωμα ($Y_{X/S}$), η παραγωγή κιτρικού οξέος (Cit), η απόδοση παραχθέντος κιτρικού οξέος σε σχέση με την καταναλωθέν γλυκόζη ($Y_{Cit/S}$), η παραγωγή ενδοκυτταρικού λίπους (L), ο συντελεστής παραχθέντος λίπους σε σχέση με την παραγόμενη βιομάζα ($Y_{L/X}$), η παραγωγή ξυλιτόλης με συμμετοχή της ξυλόζης και η παραγωγή ενδοπολυσακχαριτών (IPS) καθώς και η % περιεκτικότητα τους στην παραγόμενη βιομάζα. Περαιτέρω μελετήθηκε η σύσταση σε λιπαρά οξέα του μικροβιακού λίπους.

Από τον Πίνακα 5 που ακολουθεί συγκεντρώνονται οι μέγιστες τιμές παραγωγής μικροβιακού λίπους κυτταρικής βιομάζας, κιτρικού οξέος, ενδοπολυσακχαριτών (IPS), ξυλιτόλης αλλά και οι αποδόσεις τους σε σχέση με την κατανάλωση του υποστρώματος (ξυλόζης & γλυκερόλης) παρουσιάζονται παρακάτω.

Πίνακας 5. Συγκεντρωτικός πίνακας αποτελεσμάτων των ζυμών που χρησιμοποιήθηκαν σε συνυπόστρωμα ξυλόζης και γλυκερόλης (50% ξυλόζης-50% γλυκερόλης) αρχικής συγκέντρωσης 60 g/L. Παρουσιάζονται οι μέγιστες τιμές παραγωγής λίπους, βιομάζας, κιτρικού οξέος, ξυλιτόλης και ενδοπολυσακχαριτών (IPS) των ζυμών καθώς και οι αποδόσεις τους. Το κάθε σημείο είναι ο μέσος όρος δύο ανεξάρτητων επαναλήψεων.

	Fermentation time (h)	X (g L ⁻¹)	L (g L ⁻¹)	Citric acid (g L ⁻¹)	Xylitol (g L ⁻¹)	IPS (g L ⁻¹)	Xylose _{cons} (g L ⁻¹)	GloI _{cons} (g L ⁻¹)	T.S.cons (g L ⁻¹)	Y _{X/T.S.cons} (g g ⁻¹)	Y _{L/X} (g g ⁻¹)	Y _{Cit/T.S.cons} (g g ⁻¹)	Y _{xylitol/xylose} (g g ⁻¹)	% IPS
<i>Cryptococcus curvatus</i> ATCC 20509	168 ^{a, c}	11,29	1,81	5,12	0,44	3,72	26,0	19,5	45,6	0,248	0,160	0,113	0,017	32,9
	76 ^{b, d}	10,65	3,01	4,88	0,47	2,33	24,9	5,8	30,7	0,347	0,283	0,159	0,019	21,9
	144 ^e	11,07	2,60	4,84	0,44	4,87	26,0	15,2	41,2	0,269	0,235	0,118	0,017	44,0
<i>Candida oleophila</i> ATCC 20177	144 ^a	13,65	0,61	4,51	0,00	5,82	25,6	15,7	41,2	0,331	0,045	0,109	0,000	42,7
	76 ^b	8,10	1,31	5,17	0,00	4,89	13,6	7,3	20,87	0,388	0,161	0,248	0,000	60,4
	48 ^c	4,97	0,65	5,40	0,00	1,89	7,1	4,7	11,8	0,420	0,131	0,456	0,000	38,0
	121 ^e	10,61	1,14	3,58	0,00	5,93	23,0	15,6	38,6	0,275	0,107	0,093	0,000	55,9
<i>Rhodosporidium</i> <i>toruloides</i> DSM4444	193 ^a	16,84	2,18	4,47	1,54	3,25	25,6	26,6	52,2	0,323	0,130	0,086	0,060	19,3
	168 ^{b, e}	14,88	3,44	4,97	2,01	4,43	25,6	24	49	0,301	0,231	0,101	0,079	23,8
	121 ^c	10,50	2,60	5,75	2,77	2,54	23,1	14,7	37,8	0,278	0,248	0,152	0,120	24,2
	48 ^d	4,44	1,07	5,07	2,94	1,61	12,6	7,8	20,4	0,218	0,241	0,249	0,233	36,4

X : η παραγόμενη βιομάζα (g/L), L : το παραγόμενο μικροβιακό λίπος (g/L), Citric acid : το παραγόμενο κιτρικό οξύ (g/L), Xylitol : η παραγόμενη ξυλιτόλη (g/L),

IPS : η παραγόμενη ποσότητα ενδοπολυσακχαριτών (g/L) , Xylose_{cons} : Καταναλωθέν υπόστρωμα ξυλόζης,

GloI_{cons} : Καταναλωθέν υπόστρωμα γλυκερόλης , T.S._{cons} : Συνολικό καταναλωθέν υπόστρωμα

a : Μέγιστη τιμή παραγόμενης βιομάζας , b: Μέγιστη τιμή παραγόμενου μικροβιακού λίπους, c : Μέγιστη τιμή παραγόμενου κιτρικού οξέος ,

d : Μέγιστη τιμή παραγόμενης ξυλιτόλης , e : Μέγιστη τιμή παραγόμενων ενδοπολυσακχαριτών

Y_{X/T.S.cons} : Συντελεστής απόδοσης παραγωγής βιομάζας ως προς την συνολική κατανάλωση υποστρώματος (g/g)

Y_{LX} : Ο συντελεστής παραγωγής μικροβιακού λίπους ως προς την παραγωγή βιομάζας (g/g)

Y_{Cit/ T.S.cons} : Συντελεστής απόδοσης παραγωγής κιτρικού οξέος ως προς την συνολική κατανάλωση υποστρώματος (g/g)

Y_{xylitol/xylose} : Συντελεστής απόδοσης παραγωγής ξυλιτόλης ως προς την κατανάλωση υποστρώματος (g/g)

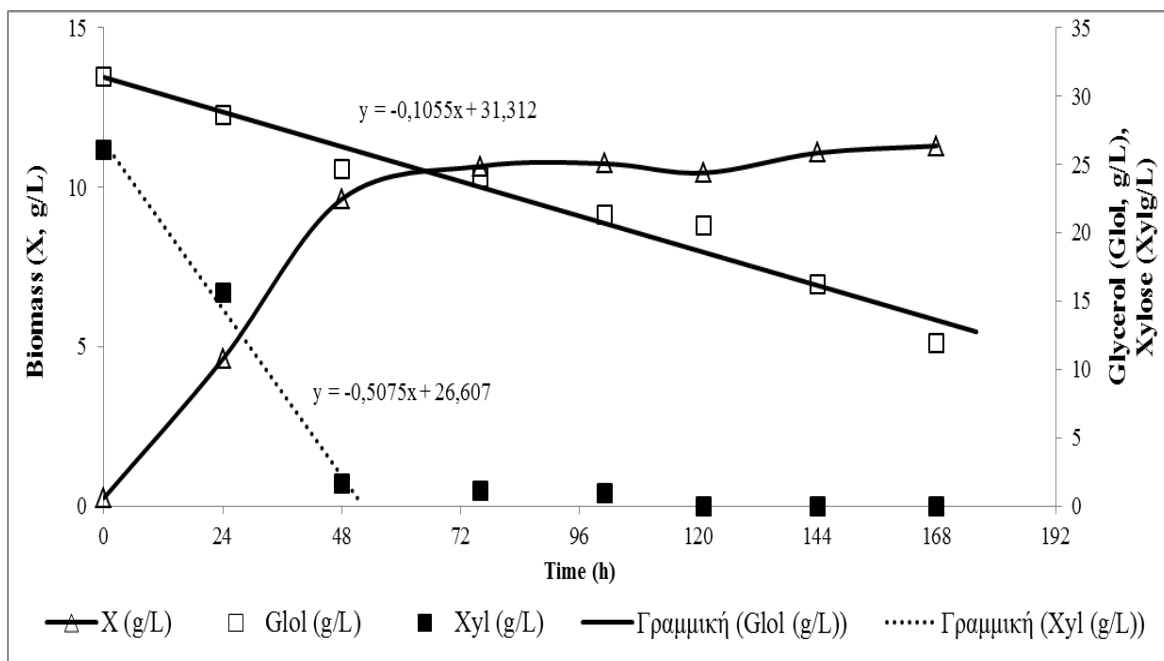
% IPS : % παραγόμενων ενδοπολυσακχαριτών ως προς την παραγόμενη βιομάζα

3.3.2 Παραγωγή βιομάζας, μικροβιακού λίπους και ενδοπολυσακχαριτών (IPS) και εξειδίκευση στην κατανάλωσης γλυκερόλης και και ξυλόζης

Στον συγκεντρωτικό πίνακα 5 παρατηρούμε τα μέγιστα όσον αφορά την παραγωγή βιομάζας, λίπους και ενδοπολυσακχαριτών (IPS) των διαφόρων ζυμών. Στο *Cryptococcus curvatus* ATCC 20509 παρατηρούμε η μέγιστη τιμή βιομάζας να βρίσκεται στις 168 h με 11,29 g/L σε απόλυτη τιμή ενώ ο συντελεστή απόδοσης παραγωγής βιομάζας ως προς το καταναλωθέν υπόστρωμα ($Y_{X/S}$) έφθασε τα 0,25 g/g. Η μέγιστη τιμή μικροβιακού λίπους παρουσιάστηκε στις 76 h με τιμή 3,01 g/L ενώ ο συντελεστής παραγωγής μικροβιακού λίπους ως προς την παραγωγή βιομάζας ($Y_{L/X}$) έφθασε τα 0,28 g/g. Η μέγιστη τιμή παραγωγής ενδοπολυσακχαριτών (IPS) παρουσιάστηκε στις 144 h με απόλυτη τιμή 4,87 g/L όπου η % αναλογία του στην παραγόμενη βιομάζα ήταν 44%.

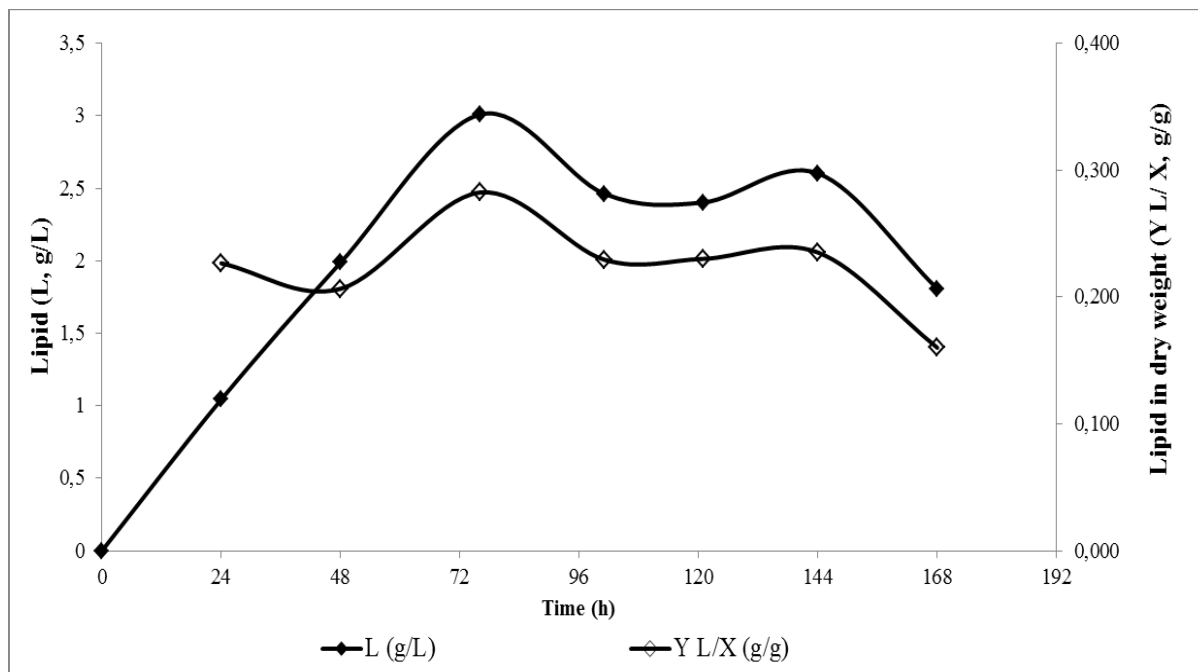
Ενδεικτικά η κινητική της παραγωγής βιομάζας και της κατανάλωσης του υποστρώματος από τη ζύμη *Cryptococcus curvatus* ATCC 20509 όταν αναπτύχθηκε σε θρεπτικό μέσο με ξυλόζη και γλυκερόλη ως μόνη πηγή άνθρακα (50%-50%, 60 g/L), παρουσιάζονται στο Γράφημα 16. Όπως φαίνεται από το Γράφημα 16 η κυτταρική αύξηση έλαβε την μέγιστη τιμή της 168 h μετά τον εμβολιασμό, φθάνοντας τα 11,29 g/l και συντελεστή απόδοσης ($Y_{X/S}$) ίσο με 0,25 g/g. Η μέγιστη τιμή του συντελεστή απόδοσης ($Y_{X/S}$) 0,35 g/g στις 48 h με παραγωγή βιομάζας 9,62 g/l. Το πρώτο υπόστρωμα (γλυκερόλη) μέχρι την τελευταία μέτρηση μας στις 193 h δεν είχε καταναλωθεί όλο αφήνοντας 11,88 g/L. Αντίθετα το δεύτερο υπόστρωμα (ξυλόζη) την από τις πρώτες 100 h κιάλας είχε καταναλωθεί όλο.

Από το συντελεστή κλίσης των ευθειών για την κατανάλωση των υποστρωμάτων ,που στην περίπτωση αυτή της ξυλόζης είναι μεγαλύτερος από της γλυκερόλης (0,5075 και 0,1055 αντίστοιχα) παρατηρούμε ότι η ζύμη *Cryptococcus curvatus* ATCC 20509 δείχνει να προτιμά περισσότερο το υπόστρωμα της ξυλόζης και να το καταναλώνει με πολύ μεγαλύτερο ρυθμό. Αυτό το δείχνει και η κλίση των ευθειών με την κλίση της ευθείας της γλυκερόλης να είναι πολύ μικρότερη από αυτή της ξυλόζης.



Γράφημα 15. Κινητική της παραγωγής βιομάζας και της κατανάλωσης υποστρώματος από τη ζύμη *Cryptococcus curvatus* ATCC 20509 (60 g/l 50% γλυκερόλη και 50% ξυλόζη).

Η κινητική εξέλιξης του συντελεστή παραγωγής μικροβιακού λίπους ως προς την παραγωγή βιομάζας ($Y_{L/X}$) φαίνεται στο Γράφημα 17. Ο συντελεστής έφθασε τα 0,28 g/g στις 76 h και απόλυτη τιμή λίπους 3,01 g/L, που ήταν και η μέγιστη τιμή του συντελεστή και της παραγωγής λίπους στην ζύμωση. Μέχρι τις 48 h παρουσίασε μικρή μείωση στο συντελεστή παραγωγής μικροβιακού λίπους ως προς την παραγωγή βιομάζας φθάνοντας 0,21 g/g. Το επόμενο 24ωρο παρουσίασε απότομη αύξηση φθάνοντας τις μέγιστες τιμές της ζύμωσης που αναφέραμε παραπάνω. Μέχρι τις 121 h που ολοκληρώσαμε την ζύμωση μας παρουσίασε μείωση φθάνοντας τα 0,21 g/g και 2,10 g/L. Στις 144 h παρουσίασε αύξηση τόσο του συντελεστή παραγωγής μικροβιακού λίπους ως προς την παραγωγή βιομάζας όσο και σε απόλυτη τιμή φθάνοντας 0,24 g/g και 2,604 g/L αντίστοιχα. Τέλος στις 168 h παρουσίασε μείωση 0,16 g/g και 1,808 g/L αντίστοιχα.

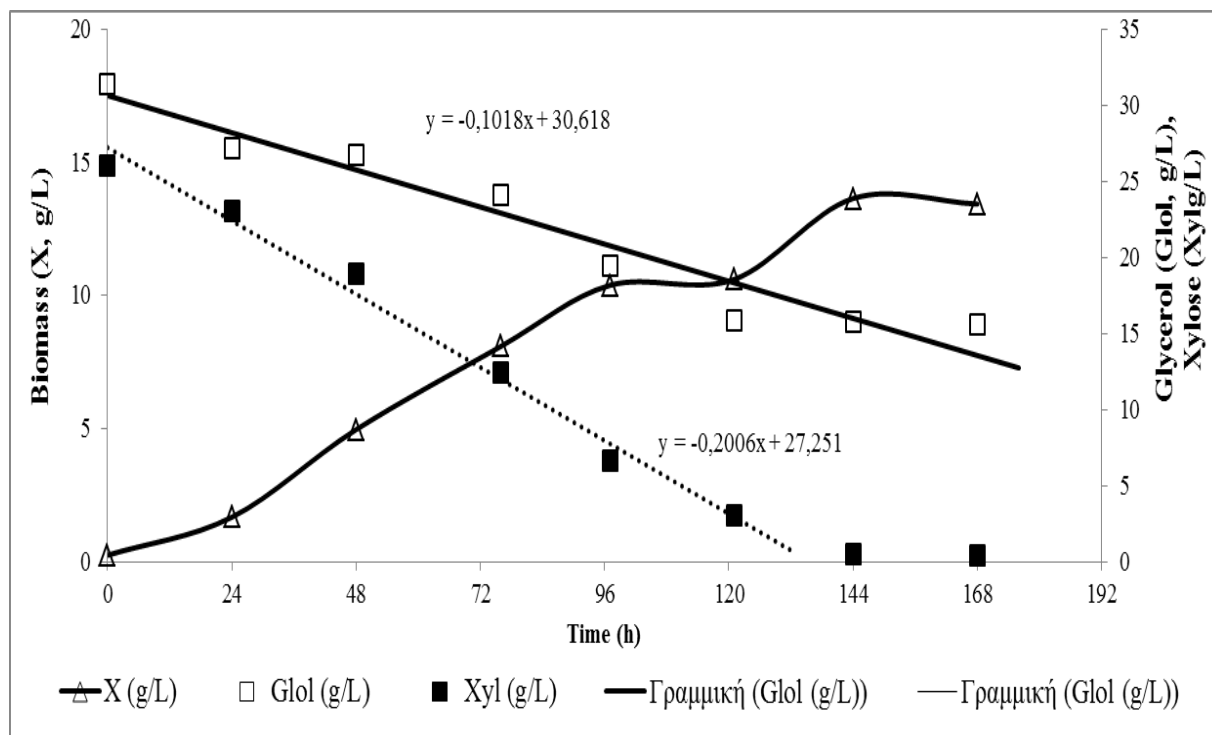


Γράφημα 17. Κινητική εξέλιξης του παραγόμενου μικροβιακού λίπους ως προς τη βιομάζα ($Y_{L/X}$) από τη ζύμη *Cryptococcus curvatus* ATCC 20509 (60 g/l, 50% γλυκερόλη και 50% ξυλόζη). Όλα τα σημεία είναι ο μέσος όρος δύο ανεξάρτητων μετρήσεων.

Στη ζύμη *Candida oleophila* ATCC 20177 παρατηρούμε η μέγιστη τιμή βιομάζας να βρίσκεται στις 144 h με 13,65 g/L σε απόλυτη τιμή ενώ ο συντελεστή απόδοσης παραγωγής βιομάζας ως προς το καταναλωθέν υπόστρωμα ($Y_{X/S}$) έφθασε τα 0,33 g/g. Η μέγιστη τιμή μικροβιακού λίπους παρουσιάστηκε στις 76 h με τιμή 1,31 g/L ενώ ο συντελεστής παραγωγής μικροβιακού λίπους ως προς την παραγωγή βιομάζας ($Y_{L/X}$) έφθασε τα 0,16 g/g. Η μέγιστη τιμή παραγωγής ενδοπολυσακχαριτών (IPS) παρουσιάστηκε στις 121 h με απόλυτη τιμή 5,93 g/L όπου η % αναλογία του στην παραγόμενη βιομάζα ήταν 56%.

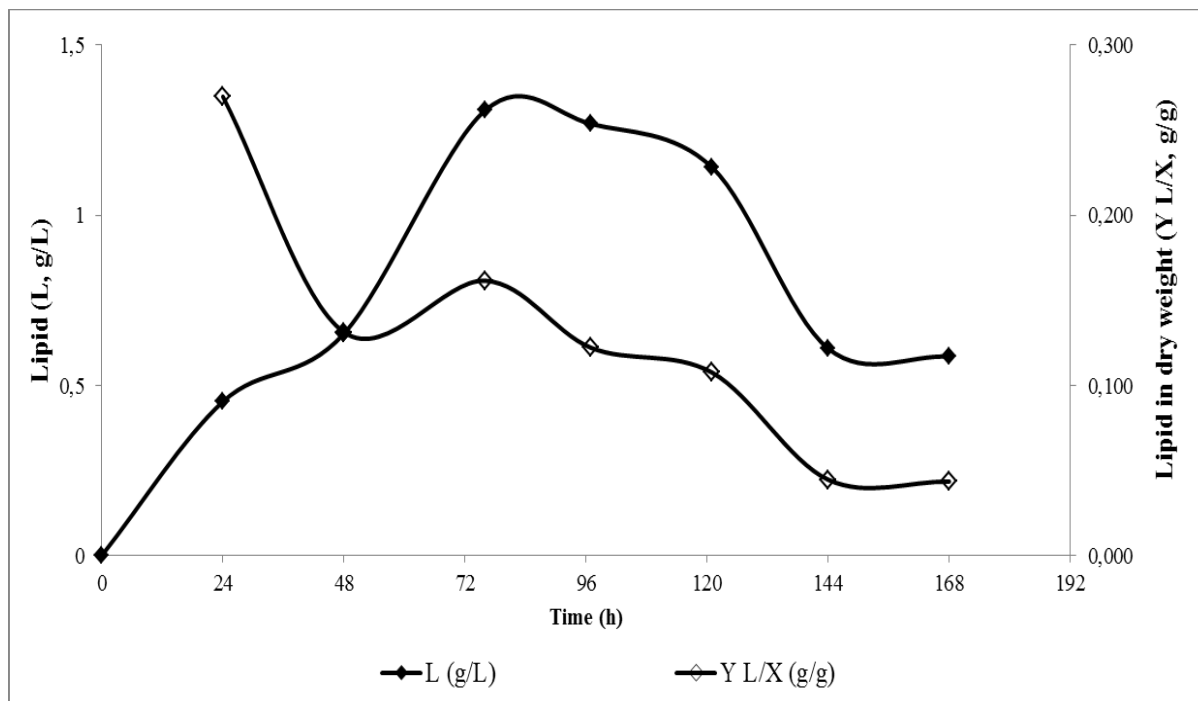
Ενδεικτικά η κινητική της παραγωγής βιομάζας και της κατανάλωσης του υποστρώματος από τη ζύμη *Candida oleophila* ATCC 20177 όταν αναπτύχθηκε σε θρεπτικό μέσο με ξυλόζη και γλυκερόλη ως μόνη πηγή άνθρακα (50%-50%, 60 g/L), παρουσιάζονται στο Γράφημα 18. Όπως φαίνεται από το Γράφημα 18 η κυτταρική αύξηση έλαβε την μέγιστη τιμή της 144 h μετά τον εμβολιασμό, φθάνοντας τα 13,65 g/l και συντελεστή απόδοσης ($Y_{X/S}$) ίσο με 0,33 g/g. Η μέγιστη τιμή του συντελεστή απόδοσης ($Y_{X/S}$) παρουσιάστηκε με τιμή 0,42 g/g στις 48 h με παραγωγή βιομάζας 4,97 g/l. Το πρώτο υπόστρωμα (γλυκερόλη) μέχρι την τελευταία μέτρηση μας στις 168 h δεν είχε καταναλωθεί όλο αφήνοντας 15,58 g/L. Αντίθετα το δεύτερο υπόστρωμα (ξυλόζη) την από τις 144 h κιάλας είχε καταναλωθεί όλο. Από το συντελεστή κλίσης των ευθειών για την κατανάλωση των υποστρωμάτων, που στην περίπτωση αυτή της ξυλόζης είναι μεγαλύτερος από της γλυκερόλης (0.2006 και 0.1018 αντίστοιχα) παρατηρούμε ότι ο *Candida oleophila* ATCC 20177 δείχνει να προτιμά περισσότερο το υπόστρωμα της ξυλόζης και να το καταναλώνει με πολύ

μεγαλύτερο ρυθμό. Αυτό το δείχνει και η κλίση των ευθειών με την κλίση της ευθείας της γλυκερόλης να είναι πολύ μικρότερη από αυτή της ξυλόζης.



Γράφημα 18. Κινητική της παραγωγής βιομάζας και της κατανάλωσης υποστρώματος από τη ζύμη *Candida oleophila* ATCC 20177 (60 g/l 50% γλυκερόλη και 50% ξυλόζη). Όλα τα σημεία είναι ο μέσος όρος δύο ανεξάρτητων μετρήσεων.

Η κινητική εξέλιξης του συντελεστή παραγωγής μικροβιακού λίπους ως προς την παραγωγή βιομάζας (Y_{LX}) φαίνεται στο Γράφημα 19. Ο συντελεστής έφθασε τα 0,27 g/g στις 24 h και απόλυτη τιμή λίπους 0,452 g/L, που ήταν και η μέγιστη τιμή του συντελεστή στην ζύμωση. Μέχρι τις 48 h παρουσίασε μείωση στο συντελεστή απόδοσης παραγωγής μικροβιακού λίπους ως προς την παραγωγή βιομάζας φθάνοντας 0,13 g/g. Το επόμενο 24ωρο παρουσίασε αύξηση φθάνοντας τις μέγιστες τιμές παραγωγής λίπους της ζύμωσης σε απόλυτη τιμή 1,308 g/L στις 76 h και συντελεστή 0,16 g/g. Μέχρι τις 168 h που ολοκληρώσαμε την ζύμωση μας ,παρουσίασε μείωση καταλήγοντας τα 0,043 g/g και 0,584 g/L αντίστοιχα.

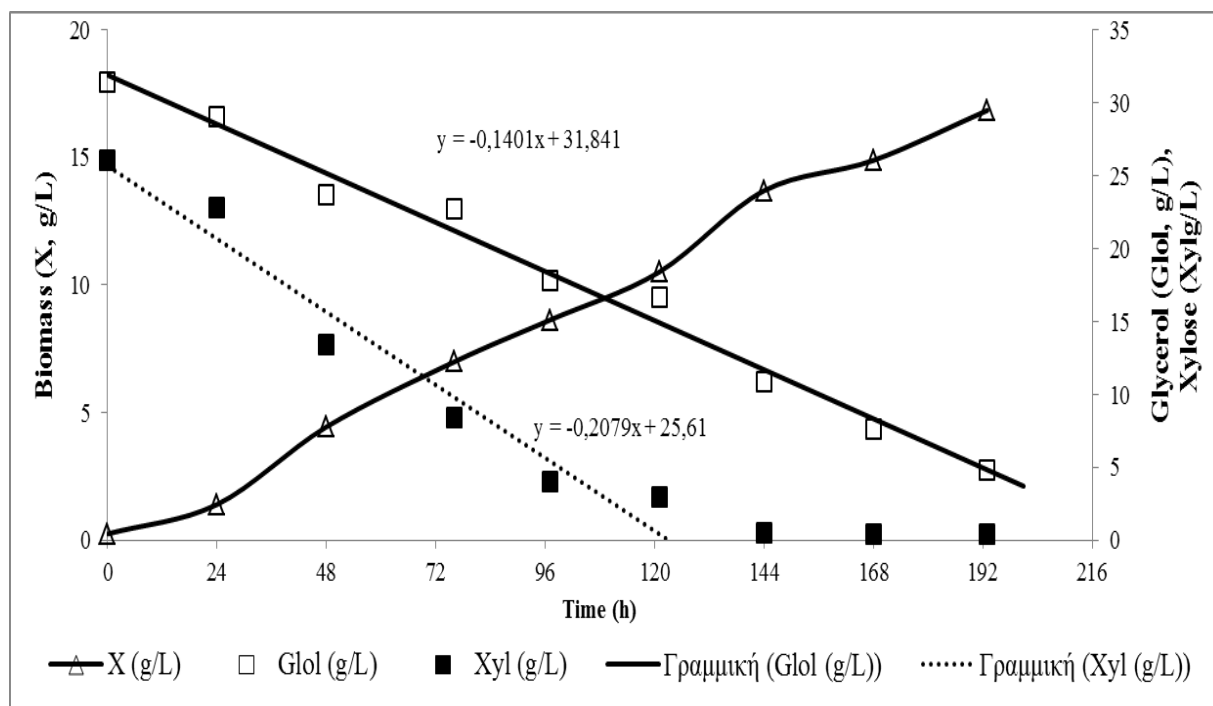


Γράφημα 19. Κινητική εξέλιξης του παραγόμενου μικροβιακού λίπους ως προς τη βιομάζα ($Y_{L/X}$) από τη ζύμη *Candida oleophila* ATCC 20177 (60 g/l, 50% γλυκερόλη και 50% ξυλόζη). Όλα τα σημεία είναι ο μέσος όρος δύο ανεξάρτητων μετρήσεων.

Στον μικροοργανισμό *Rhodosporidium toruloides* DSM4444 παρατηρούμε η μέγιστη τιμή βιομάζας να βρίσκεται στις 193 h με 16,84 g/L σε απόλυτη τιμή ενώ ο συντελεστή απόδοσης παραγωγής βιομάζας ως προς το καταναλωθέν υπόστρωμα ($Y_{X/S}$) έφθασε τα 0,32 g/g. Η μέγιστη τιμή μικροβιακού λίπους και ενδοπολυσακχαριτών (IPS) παρουσιάστηκε στις 168 h με τιμή για το μικροβιακό λίπος 3,44 g/L ενώ ο συντελεστής παραγωγής μικροβιακού λίπους ως προς την παραγωγή βιομάζας ($Y_{L/X}$) έφθασε τα 0,23 g/g. Εκείνη την ώρα μέγιστη τιμή παραγωγής ενδοπολυσακχαριτών (IPS) είχε τιμή 4,43 g/L όπου η % αναλογία του στην παραγόμενη βιομάζα ήταν 24%.

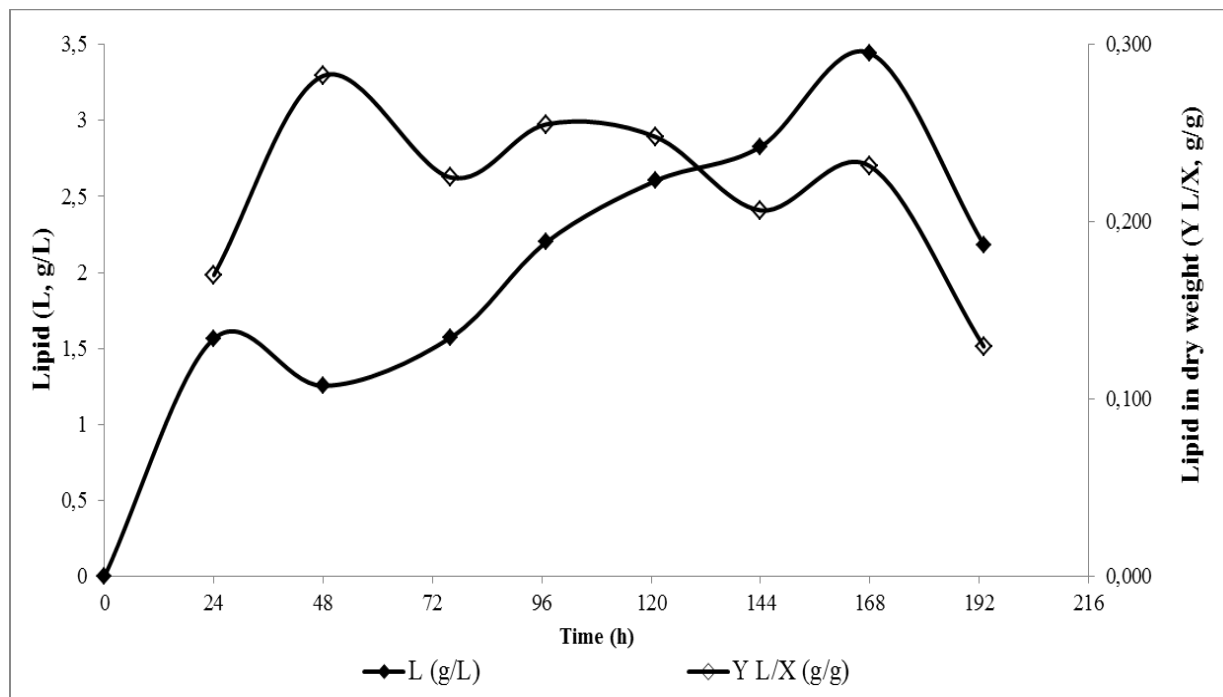
Ενδεικτικά η κινητική της παραγωγής βιομάζας και της κατανάλωσης του υποστρώματος από τη ζύμη *Rhodosporidium toruloides* DSM 4444 όταν αναπτύχθηκε σε θρεπτικό μέσο με ξυλόζη και γλυκερόλη ως μόνη πηγή άνθρακα (50%-50%, 60 g/l), παρουσιάζονται στο Γράφημα 20. Όπως φαίνεται από το Γράφημα 20 η κυτταρική αύξηση έλαβε την μέγιστη τιμή της 193 h μετά τον εμβολιασμό, φθάνοντας τα 16,84 g/L και συντελεστή απόδοσης ($Y_{X/S}$) ίσο με 0,32 g/g όπου ήταν και η μεγαλύτερη τιμή του. Το πρώτο υπόστρωμα (γλυκερόλη) μέχρι την τελευταία μέτρηση μας στις 168 h δεν είχε καταναλωθεί όλο αφήνοντας 4,84 g/L. Αντίθετα το δεύτερο υπόστρωμα (ξυλόζη) την από τις 144 h κιόλας είχε καταναλωθεί όλο. Από το συντελεστή κλίσης των ευθειών για την κατανάλωση των υποστρωμάτων που στην περίπτωση αυτή της ξυλόζης είναι μεγαλύτερος από της γλυκερόλης (0.2079 και 0.1401 αντίστοιχα) παρατηρούμε ότι ο μικροοργανισμός *Rhodosporidium*

toruloides DSM 4444 δείχνει να προτιμά περισσότερο την ξυλόζη. Αυτό το δείχνει και η κλίση των ευθειών με την κλίση της ευθείας της ξυλόζης να είναι μεγαλύτερη από αυτή της γλυκερόλης.



Γράφημα 19. Κινητική της παραγωγής βιομάζας και της κατανάλωσης υποστρώματος από τη ζύμη *Rhodosporidium toruloides* DSM 4444 (60 g/l 50% γλυκερόλη και 50% ξυλόζη). Όλα τα σημεία είναι ο μέσος όρος δύο ανεξάρτητων μετρήσεων.

Η κινητική εξέλιξης του συντελεστή απόδοσης παραγωγής μικροβιακού λίπους ως προς την παραγωγή βιομάζας ($Y_{L/X}$) φαίνεται στο Γράφημα 21. Ο συντελεστής έφθασε τα 0,25 g/g στις 121 h και απόλυτη τιμή λίπους 2,604 g/L, που ήταν και η μέγιστη τιμή του συντελεστή στην ζύμωση. Μέχρι τις 48 h παρουσίασε αύξηση στο συντελεστή απόδοσης παραγωγής μικροβιακού λίπους ως προς την παραγωγή βιομάζας φθάνοντας 0,18 g/g. Το επόμενο 24ωρο παρουσίασε μείωση με απόδοση 0,10 g/g. Μέχρι τις 121 h ώρες παρουσίασε αύξηση του συντελεστή, ενώ τα επόμενα δύο 24ωρα παρουσίασε μείωση και αύξηση αντίστοιχα 0,21 g/g και 0,23 g/g. Στις 168 h παρατηρήθηκε η μέγιστη τιμή παραγωγής μικροβιακού λίπους με τιμή 3,444 g/L. Μέχρι τις 193 h που ολοκληρώσαμε την ζύμωση μας, παρουσίασε μείωση καταλήγοντας τα 0,13 g/g και 2,184 g/L αντίστοιχα.



Γράφημα 21. Κινητική εξέλιξης του παραγόμενου μικροβιακού λίπους ως προς τη βιομάζα ($Y_{L/X}$) από τη ζύμη *Rhodosporidium toruloides* DSM 4444 (60 g/l, 50% γλυκερόλη και 50% ξυλόζη). Όλα τα σημεία είναι ο μέσος όρος δύο ανεξάρτητων μετρήσεων.

3.3.3 Κιτρικό οξύ και λοιποί μεταβολίτες

Βάση του πίνακα 5 παρατηρούμε πώς τα μέγιστα όσον αφορά την παραγωγή κιτρικού οξέος ποικίλουν ανάλογα με το μικροοργανισμό. Στον μικροοργανισμό *Cryptococcus curvatus* ATCC 20509 παρατηρούμε η μέγιστη τιμή κιτρικού οξέος να βρίσκεται στις 168 h με 5,12 g/L σε απόλυτη τιμή ενώ ο συντελεστή απόδοσης παραγωγής κιτρικού οξέος ως προς το καταναλωθέν υπόστρωμα ($Y_{Cit/S}$) έφθασε τα 0,11 g/g. Παρατηρούμε επίσης μια πολύ μικρή ποσότητα παραγόμενης ξυλιτόλης με μέγιστη τιμή στις 76 h σε απόλυτη τιμή 0,47 g/L ενώ ο συντελεστής απόδοσης της παραγωγής ξυλιτόλης ως προς το καταναλωθέν υπόστρωμα (ξυλόζη) έφθασε τα 0,16 g/g.

Στο *Candida oleophila* ATCC 20177 παρατηρούμε η μέγιστη τιμή κιτρικού οξέος να βρίσκεται στις 48 h με 5,40 g/L σε απόλυτη τιμή ενώ ο συντελεστή απόδοσης παραγωγής κιτρικού οξέος ως προς το καταναλωθέν υπόστρωμα ($Y_{Cit/S}$) έφθασε τα 0,46 g/g.

Στο *Rhodosporidium toruloides* DSM 4444 παρατηρούμε η μέγιστη τιμή κιτρικού οξέος να βρίσκεται στις 121 h με 5,75 g/L σε απόλυτη τιμή ενώ ο συντελεστή απόδοσης παραγωγής κιτρικού οξέος ως προς το καταναλωθέν υπόστρωμα ($Y_{Cit/S}$) έφθασε τα 0,15 g/g. Παρατηρούμε επίσης μια ποσότητα παραγόμενης ξυλιτόλης με μέγιστη τιμή στις 48 h σε απόλυτη τιμή 2,94 g/L ενώ ο συντελεστής απόδοσης της παραγωγής ξυλιτόλης ως προς το καταναλωθέν υπόστρωμα (ξυλόζη) έφθασε τα 0,23 g/g.

3.3.4 Μελέτη της σύστασης του μικροβιακού λίπους (FAMES)

Από τον Πίνακα 6 που ακολουθεί συγκεντρώνεται η σύσταση των ζυμών που μελετήθηκαν στα συνηποστρώματα ξυλόζης & γλυκερόλης με αρχική συγκέντρωση 60g/L.

Πίνακας 6. Σύσταση μικροβιακού λίπους των ζυμών (60 g/L ξυλόζη & γλυκερόλη)

Στέλεχος	Time (h)	Λιπαρά οξέα % κ.β.						
		C14:0	C16:0	^{Δ9} C16:1	C18:0	C18:1	^{Δ9,12} C18:2	C18:3
<i>Candida oleophila</i> ATCC 20177	48	0,6	15,1	1,9	3,4	62,0	15,3	1,7
	97	0,6	14,0	1,0	4,0	64,9	14,7	0,8
	144	0,4	12,4	1,8	5,3	72,6	7,5	0,0
<i>Rhodospiridium turuloides</i> DSM4444	48	1,0	19,6	1,1	4,3	57,7	15,2	1,1
	97	1,4	25,1	0,8	6,3	55,1	9,9	1,3
	144	1,4	24,8	0,7	8,2	55,0	8,6	1,2
	193	1,6	26,8	0,7	8,5	52,8	8,4	1,1
<i>Cryptococcus curvatus</i> ATCC 20509	24	0,0	34,8	0,0	0,0	42,0	23,2	1,1
	48	0,0	35,2	6,9	5,4	48,8	3,7	0,5
	101	0,4	23,8	3,1	4,7	59,5	8,1	0,4
	144	0,2	26,0	0,6	14,1	50,5	7,6	1,0

Η σύσταση των μικροβιακών λιπιδίων της ζύμης *Cryptococcus curvatus* ATCC 20509, η οποία αναπτύχθηκε σε υπόστρωμα με συγκέντρωση 60 g/L (50% ξυλόζη και 50% γλυκερόλη), μελετήθηκε και καταγράφηκε με τη βοήθεια του αέριου χρωματογράφου. Από τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στον Πίνακα 6, είναι εμφανές ότι το λιπαρό οξύ που επικρατεί είναι το ελαϊκό (C18:1) σε ποσοστό που φθάνει 59,5 % κ.β. τις 101 h. Σε σημαντική ποσότητα παρατηρούμε επίσης και το παλμιτικό (C16:0) το οποίο αυξάνεται τις πρώτες 48 h ενώ μειώνεται μέχρι το τέλος της ζύμωσης καταλήγοντας στο ποσοστό 26,0 % κ.β.. Το στεατικό (C18:0), αυξάνεται κατά την διάρκεια της ζύμωσης έως το ποσοστό 14,1 % κ.β. στις 144 h. Το παλμιτελαϊκό (C16:1) το λινελαϊκό (C18:2) και το α-λινελαϊκό (C18:3) μειώνονται κατά την πορεία της ζύμωσης ενώ αξίζει να σημειωθεί ότι το μυριστικό και το παλμιτελαϊκό δεν συμμετέχουν το πρώτο 24ωρο της ζύμωσης καθόλου.

Η σύσταση των μικροβιακών λιπιδίων της ζύμης *Candida oleophila* ATCC 20177, η οποία αναπτύχθηκε σε υπόστρωμα με συγκέντρωση 60 g/L (50% ξυλόζη και 50% γλυκερόλη), μελετήθηκε και καταγράφηκε με τη βοήθεια του αέριου χρωματογράφου. Από τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στον Πίνακα 6, είναι εμφανές ότι το λιπαρό οξύ που επικρατεί είναι το ελαϊκό

(C18:1) σε ποσοστό που φθάνει 72,6 % κ.β. τις 144 h παρουσιάζοντας συνεχή αύξηση. Σε σημαντική ποσότητα παρατηρούμε επίσης και το παλμιτικό (C16:0) το οποίο παρουσιάζει μείωση από τις πρώτες 48 h μέχρι το τέλος της ζύμωσης καταλήγοντας στο ποσοστό 12,4 % κ.β.. Το λινελαϊκό (C18:2) και το α-λινελαϊκό (C18:3), μειώνονται κατά την διάρκεια της ζύμωσης ξεκινώντας από 15,3 % κ.β. και 1,7 % κ.β. έως τα ποσοστά 7,5 % κ.β. και 0 % κ.β. αντίστοιχα στις 144 h. Το στεατικό (C18:0) παρουσιάζει αύξηση του ποσοστού του φθάνοντας το 5,3 % κ.β. στις 144h. Το παλμιτελαϊκό (C16:1) μειώνεται μέχρι τις 97 h και αυξάνει το ποσοστό του μέχρι τις 144 h της ζύμωσης.

Η σύσταση των μικροβιακών λιπιδίων της ζύμης *Rhodospiridium toruloides* DSM 4444, η οποία αναπτύχθηκε σε υπόστρωμα με συγκέντρωση 60 g/L (50% ξυλόζη και 50% γλυκερόλη), μελετήθηκε και καταγράφηκε με τη βοήθεια του αερίου χρωματογράφου. Από τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στον Πίνακα 6, είναι εμφανές ότι το λιπαρό οξύ που επικρατεί είναι το ελαϊκό (C18:1) σε ποσοστό που φθάνει 57.7 % κ.β. τις 48 h. Σε σημαντική ποσότητα παρατηρούμε επίσης και το παλμιτικό (C16:0) το οποίο παρουσιάζει αύξηση από τις πρώτες 48 h μέχρι τις 97 h, μικρή μείωση έως τις 144 h και αύξηση μέχρι το τέλος της ζύμωσης με ποσοστό που καταλήγει σε 26.8 % κ.β στις 193 h. Το λινελαϊκό (C18:2) και το παλμιτελαϊκό (C16:1), μειώνονται κατά την διάρκεια της ζύμωσης ξεκινώντας από 15.2 % κ.β και 1.1 % κ.β. έως τα ποσοστά 8.4 % κ.β. και 0.7 % κ.β αντίστοιχα στις 193 h. Το στεατικό (C18:0) και μυριστικό (C14:0) παρουσιάζουν αύξηση του ποσοστού τους φθάνοντας το 8.5 % κ.β. και 1.6 % κ.β. αντίστοιχα στις 193h. Τέλος το α-λινελαϊκό (C18:3) δεν παρουσιάζει μεγάλη αλλαγή κυμαίνοντας τα ποσοστά του 1.1-1.3 % κ.β.

Κεφάλαιο 4

4. Συμπεράσματα

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη της μικροβιακής αύξησης, της παραγωγής βιομάζας, της κατανάλωσης υποστρώματος, της παραγωγής λίπους και κιτρικού οξέος των στελεχών καθώς και η σύσταση των μεθυλεστέρων του λίπους των μικροοργανισμών που κατά την ανάπτυξή τους σε λιγνοκυτταρινούχα σάκχαρα (ξυλόζη) και σε υποστρώματα με βάση την ακάθαρτη γλυκερόλη. Περαιτέρω μίγματα συνυποστρωμάτων ξυλόζης και γλυκερόλης χρησιμοποιήθηκαν σε ορισμένους από τους μικροοργανισμούς προκειμένου να μελετηθεί η συμπεριφορά τους παρουσία και των δύο θρεπτικών υποστρωμάτων. Ο τεχνολογικός και, εν δυνάμει, βιομηχανικός στόχος της εργασίας ήταν η μελέτη της συμπεριφοράς των ζυμών σε διάφορα υποστρώματα, σε διεργασίες ζύμωσης για παραγωγή λιπιδίων, κυτταρικής μάζας, κιτρικού οξέος, ενδοπολυσακχαριτών και λοιπών μεταβολίτων. Ως πηγή άνθρακα χρησιμοποιήθηκαν σε συγκεντρώσεις 60 g/l η ξυλόζη, γλυκερόλη και συνυπόστρωμα ξυλόζης & γλυκερόλης. Οι καλλιέργειες πραγματοποιήθηκαν σε ζυμώσεις βυθού και έλαβαν χώρα κάτω από αερόβιες συνθήκες (αναδευόμενες κωνικές φιάλες). Στο τέλος αξιολογήθηκαν τα αποτελέσματα των ζυμών εκτενέστερα και η συμπεριφορά που είχαν οι μικροοργανισμοί σε κάθε υπόστρωμα συγκριτικά.

Διερευνήθηκαν οι κινητικές ανάπτυξης του μικροοργανισμού και απόδοσης σε προϊόν. Πιο συγκεκριμένα μελετήθηκε η παραγωγής βιομάζας (X), η απόδοση της βιομάζας σε σχέση με το καταναλωθέν υπόστρωμα ($Y_{X/S}$), η παραγωγή κιτρικού οξέος (Cit), η απόδοση παραχθέντος κιτρικού οξέος σε σχέση με το καταναλωθέν υπόστρωμα ($Y_{Cit/S}$), η παραγωγή ενδοκυτταρικού λίπους (L), ο συντελεστής παραχθέντος λίπους σε σχέση με την παραχθείσα βιομάζα ($Y_{L/X}$) και η παραγωγή ενδοπολυσακχαριτών (IPS). Περαιτέρω μελετήθηκε η σύσταση σε λιπαρά οξέα του μικροβιακού λίπους.

Ως γενικό συμπέρασμα, αξίζει να τονιστεί ότι όλοι οι μικροοργανισμοί που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη, βρέθηκαν ικανοί να αποικοδομήσουν την ακάθαρτη ξυλόζη και γλυκερόλη, ως πηγή άνθρακα και ενέργειας, ανεξάρτητα αν βρισκόταν μόνη της ή σε συνυπόστρωμα.

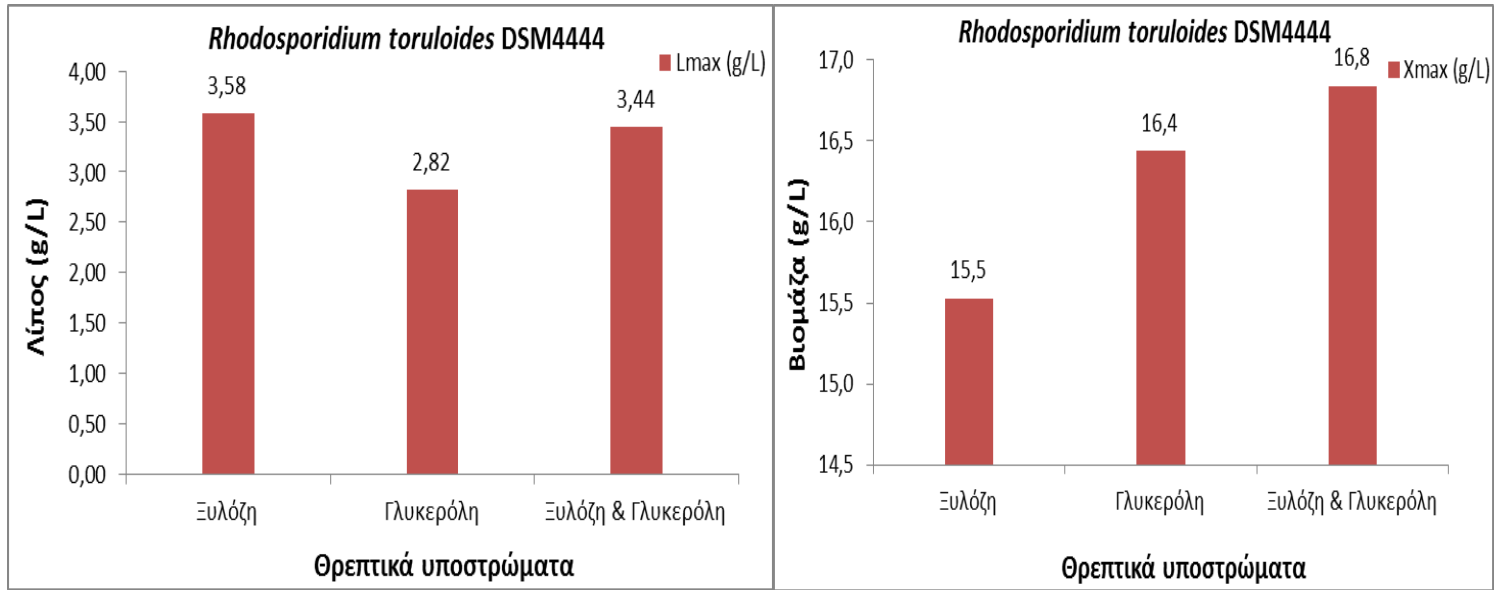
Όσον αφορά το στέλεχος *Rhodosporidium toruloides* DSM 4444, αυτό αναπτύχθηκε σε αποστειρωμένα υποστρώματα με αρχικές συγκεντρώσεις 60 g/L ξυλόζης, 60 g/L γλυκερόλης, 60 g/L ξυλόζης & γλυκερόλης (50%-50%) και περιοριστικές στο άζωτο συνθήκες. Όπως φαίνεται και στα παρακάτω συγκεντρωτικά γραφήματα όπου παρουσιάζονται οι μέγιστες τιμές παραγωγής βιομάζας

και μικροβιακού λίπους, η μεγαλύτερη ποσότητα μικροβιακού λίπους σημειώθηκε στα 60 g/L αρχικής συγκέντρωσης υποστρώματος στην ξυλόζη και ήταν 3,58 g/L και ο συντελεστής παραχθέντος λίπους σε σχέση με την παραχθείσα βιομάζα $Y_{L/X} = 0.23$ g/g. Ακολούθησε το συνυπόστρωμα ξυλόζης & γλυκερόλης με μέγιστη τιμή παραγωγής μικροβιακού λίπους 3,44 g/L, συντελεστή παραχθέντος λίπους σε σχέση με την παραχθείσα βιομάζα $Y_{L/X} = 0,23$ και τρίτο το υπόστρωμα γλυκερόλης με μέγιστη τιμή μικροβιακού λίπους 2,82 g/L και τιμή $Y_{L/X} = 0.25$.

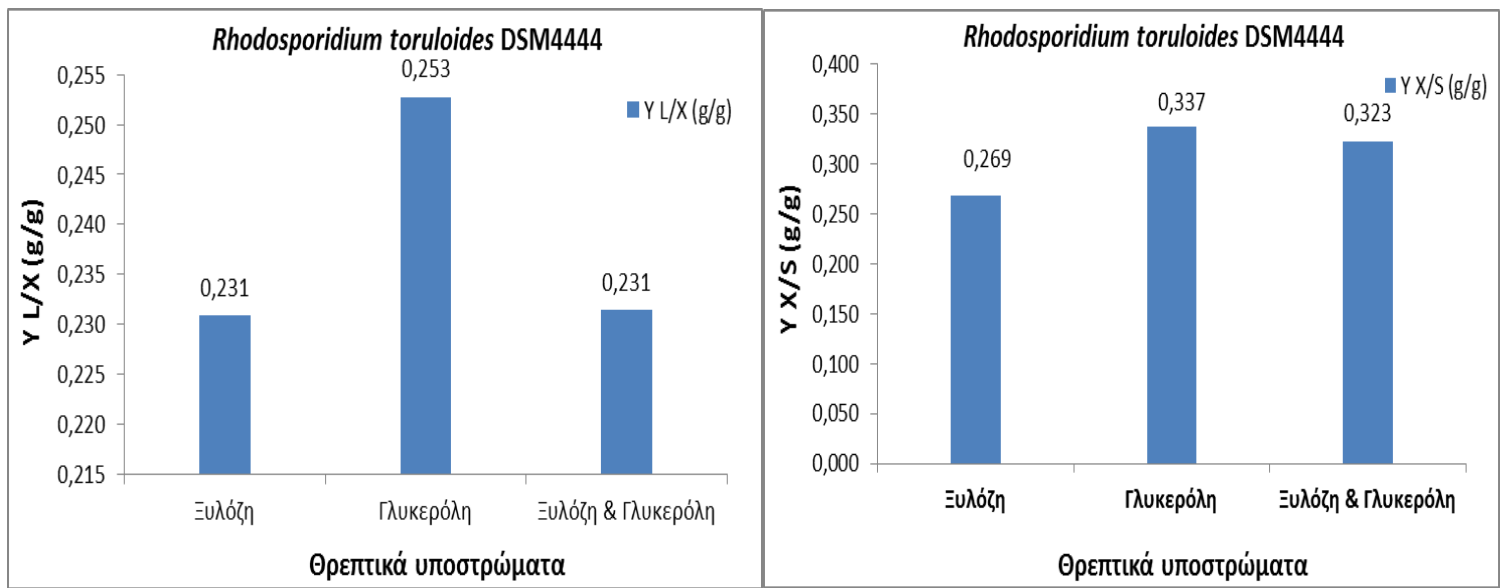
Ωστόσο, δεν ήταν αντίστοιχη η παραγωγή βιομάζας. Η μεγαλύτερη συγκέντρωση βιομάζας παρατηρήθηκε στα 60 g/L αρχικής συγκέντρωσης υποστρώματος στο θρεπτικό υπόστρωμα ξυλόζης και γλυκερόλης (50%-50%) με τιμή 16,8 g/L συντελεστή απόδοσης $Y_{X/S} = 0.32$ g/g. Ακολούθησαν με σειρά το υπόστρωμα γλυκερόλης και ξυλόζης με μέγιστες τιμές βιομάζας 16,4 g/L και 15,5 g/L και συντελεστή απόδοσης $Y_{X/S} = 0.34$ g/g και $Y_{X/S} = 0.27$ g/g αντίστοιχα.

Συμπερασματικά φάνηκε πως διαφέρει η παραγωγή βιομάζας και μικροβιακού λίπους ανάλογα το υπόστρωμα που χρησιμοποιήσαμε. Στο συγκεκριμένο πείραμα η ζύμη *Rhodospiridium toruloides* DSM 4444 έδειξε να προτιμά την κατανάλωση ξυλόζης ως πηγή άνθρακα δείχνοντας ακόμα πώς όταν αναμιγνύεται με ξυλόζη σε συνυπόστρωμα αλλάζει η συμπεριφορά του παράγοντας περισσότερη βιομάζα (8%) αφού έχει δύο πηγές άνθρακα να απορροφήσει ενώ όσον αφορά την παραγωγή μικροβιακού λίπους βλέπουμε πώς προτιμά σκέτη την ξυλόζη και λιγότερο την γλυκερόλη.

Αντίστοιχες έρευνες σε αυτά τα υποστρώματα δεν έχουν γίνει όμως η προτίμηση στην καθαρή ξυλόζη του μικροοργανισμού από ότι σε συνυπόστρωμα ξυλόζης & γλυκερόλης ίσως υποδηλώνει την πιθανή ύπαρξη παρεμπόδισης εκ του υποστρώματος (Li *et al*, 2007). Στην βιβλιογραφία δεν υπάρχει αντίστοιχη έρευνα σε ξυλόζη, γλυκερόλη και συνυπόστρωμα, ωστόσο για τις συγκεκριμένες συνθήκες (60 g/L ξυλόζη) ο συντελεστής παραχθέντος μικροβιακού λίπους ως προς την παραγόμενη βιομάζα $Y_{L/X} = 0.23$ g/g , στο συνυπόστρωμα (60 g/L, 50%-50%) με $Y_{L/X} = 0.23$ g/g και στην γλυκερόλη (60 g/L) με $Y_{L/X} = 0.25$ g/g μπορεί να θεωρηθούν χαμηλοί σε σχέση με άλλες έρευνες σε καλλιέργειες σε φιάλες (Li *et al*, 2006; Zhao *et al*, 2010; Moreton,1988).



Γράφημα 23 & 24 Συγκριτικός πίνακας παραγωγής μικροβιακού λίπους και η παραγωγή μικροβιακής μάζας ως προς το καταναλωθέν θρεπτικό υπόστρωμα.



Γράφημα 25 & 26 Συγκριτικός πίνακας του συντελεστή απόδοσης παραγωγής μικροβιακού λίπους και ο συντελεστής απόδοσης ως προς την παραγόμενη βιομάζα.

Πίνακας 7. Παραγωγή μικροβιακού λίπους από το *Rhodospiridium toruloides*

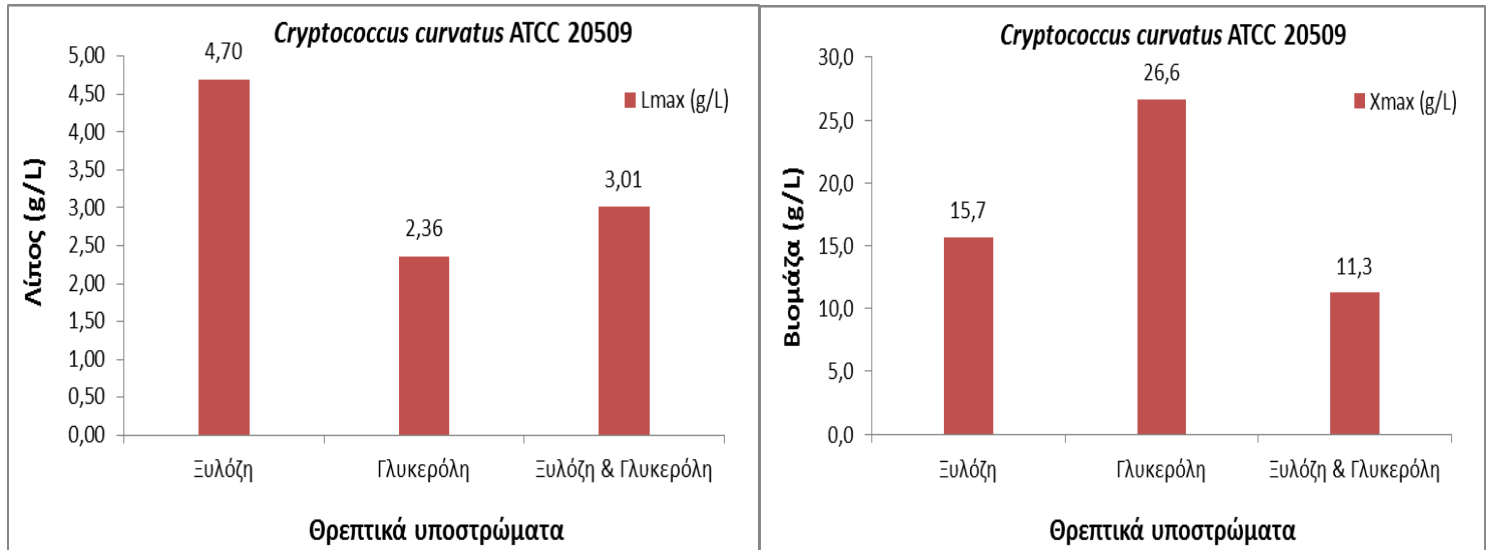
Στέλεχος	X (g/l)	$Y_{L/X}$ (g/g)	Τύπος ζύμωσης	Υπόστρωμα	Αναφορά
<i>Rhodospiridium toruloides</i>	8,0	0.42	Shake-flasks	Glucose	Moreton, 1988
<i>Rhodospiridium toruloides</i>	7,0	0.27	Shake-flasks	Fructose	Moreton, 1988
<i>Rhodospiridium toruloides</i>	5.8	0.34	Shake-flasks	Glycerol (pure)	Moreton, 1988
<i>Rhodospiridium toruloides</i>	12.5	0.43	Batch bioreactor	Glucose	Moreton, 1988
<i>Rhodospiridium toruloides</i>	15,0	0.62	Shake-flasks	Glucose	Hu <i>et al</i> , 2009
<i>Rhodospiridium toruloides</i>	101,6	0,68	Fed batch bioreactor	Glucose	Li <i>et al</i> , 2007
<i>Rhodospiridium toruloides</i>	18,2	0,72	Shake-flasks	Glucose	Li <i>et al</i> , 2006
<i>Rhodospiridium toruloides</i>	8,3	0.42	Batch bioreactor	Xylose	Moreton, 1988
<i>Rhodospiridium toruloides</i>	106,5	0,68	Fed batch bioreactor	Glucose	Li <i>et al</i> , 2007
<i>Rhodospiridium toruloides</i>	54,5	0,60	Fed batch bioreactor	Glucose	Xin Zhao <i>et al</i> , 2011
<i>Rhodospiridium toruloides</i> DSM 4444	15,5	0.23	Shake-flasks	Xylose	Παρούσα μελέτη
<i>Rhodospiridium toruloides</i> DSM 4444	16,4	0.25	Shake-flasks	Glycerol	Παρούσα μελέτη
<i>Rhodospiridium toruloides</i> DSM 4444	16,8	0.23	Shake-flasks	Xylose-Glycerol 50%-50%	Παρούσα μελέτη

Πιο συγκεκριμένα, ο ζυμομύκητας *Cryptococcus curvatus* ATCC 20509 αυξήθηκε κανονικά στα υποστρώματα της ακάθαρτης ξυλόζης και γλυκερόλης ενώ έδειξε να μην προτιμάει να βρίσκεται σε συνυποστρώματα όπως αυτό της ξυλόζης και γλυκερόλης σε αναλογία 50%- 50%. Γενικότερα μπορεί να λεχθεί πως στην περίπτωση του ζυμομύκητα *Cryptococcus curvatus* ATCC 20509, η ξυλόζη και η γλυκερόλη αποτελούν ιδανικά υποστρώματα ανάπτυξης, ως η μοναδική πηγή άνθρακα για την παραγωγή μικροβιακού λίπους και βιομάζας.

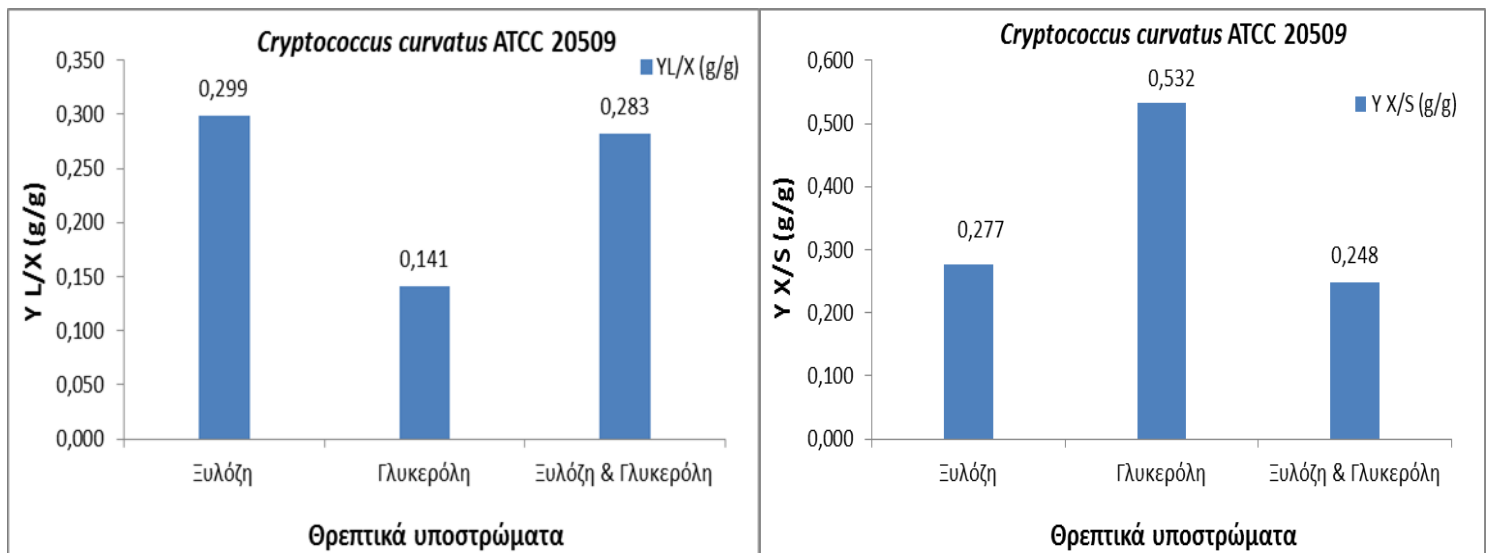
Στην παρούσα μελέτη, όταν η μόνη πηγή άνθρακα ήταν η ξυλόζη (60 g/L), η μέγιστη τιμή ενδοκυτταρικού λίπους έφθασε τα 4,70 g/L με $Y_{L/X} = 0,30$ ενώ όταν αναμειγνυόταν με ακάθαρτη γλυκερόλη με αρχική συγκέντρωση 60 g/L (50%-50% συμμετοχή) έφτανε τα 3,01 g/L με $Y_{L/X} = 0,28$ g/g. Αντίθετα όταν η πηγή άνθρακα ήταν μόνο η γλυκερόλη με αρχική συγκέντρωση (60 g/L), η

μέγιστη τιμή ενδοκυτταρικού λίπους έφθασε τα 2,36 g/L με $Y_{L/X} = 0,14$ g/g. Η παραγωγή μικροβιακού λίπους ήταν σαφώς περισσότερη στο θρεπτικό μέσο της ξυλόζης που δεν περιείχε μίξη με άλλη πηγή άνθρακα ενώ παρατηρήθηκε μεγάλη και εξίσου ισότιμη συσσώρευση μικροβιακού λίπους όταν η πηγή άνθρακα των θρεπτικών υποστρωμάτων ήταν σε συνυπόστρωμα ξυλόζης και γλυκερόλης, για τον ζυμομύκητα *Cryptococcus curvatus* ATCC 20509.

Επιπρόσθετα ο ζυμομύκητας *Cryptococcus curvatus* ATCC 20509 φάνηκε να αξιοποιεί την πηγή άνθρακα (ξυλόζη – γλυκερόλη) ανεξαρτήτως αρχικής συγκέντρωσης για την παραγωγή μεγάλης ποσότητας βιομάζας. Η μέγιστη ποσότητα βιομάζας για τις ζυμώσεις με πηγή άνθρακα την ξυλόζη (60 g/L) έφθασε τα 15,7 g/L με $Y_{x/s} = 0,28$ g/g ενώ με την γλυκερόλη τα 26,6 g/L με $Y_{x/s} = 0,53$ g/g. Αντίθετα, συγκριτικά με αυτά τα υποστρώματα είχαμε μικρότερη παραγωγή βιομάζας στο συνυπόστρωμα με πηγή άνθρακα τις ξυλόζη και γλυκερόλη (50%-50%) όπου έφθασε τα 11,3 g/L με $Y_{x/s} = 0,25$ g/g. Φάνηκε ότι ο ζυμομύκητας *Cryptococcus curvatus* καταναλώνοντας γλυκερόλη ως πηγή άνθρακα παράγει μεγαλύτερες συγκεντρώσεις βιομάζας σε σύγκριση με την ξυλόζη ως πηγή άνθρακα ενώ σε συνυπόστρωμα ξυλόζης και γλυκερόλης δείχνει να είναι ακόμα μικρότερη η παραγωγή βιομάζας πράγμα που καταλαβαίνουμε δεν προτιμά να βρίσκονται και τα δύο μαζί σαν πηγή άνθρακα ως προς την παραγωγή βιομάζας. Στη διεθνή βιβλιογραφία υπάρχουν αρκετές μελέτες στις οποίες στελέχη του ζυμομύκητα *Cryptococcus curvatus* ATCC 20509 καταναλώνουν μεγάλη ποικιλία υποστρωμάτων (γλυκόζη, λακτόζη, ξυλόζη, γλυκερόλη, αιθανόλη). Συγκεκριμένα οι Evans and Ratledge (1983) παρήγαγαν σε συνεχή καλλιέργεια και υπόστρωμα ξυλόζης με το ίδιο στέλεχος 15 g/L βιομάζα και μέγιστη παραγωγή λίπους 5,6 g/L με $Y_{L/X} = 0,37$ g/g.



Γράφημα 27 & 28 Συγκριτικός πίνακας παραγωγής μικροβιακού λίπους και η παραγωγή μικροβιακής μάζας ως προς το καταναλωθέν θρεπτικό υπόστρωμα.



Γράφημα 29 & 30 Συγκριτικός πίνακας του συντελεστή απόδοσης παραγωγής μικροβιακού λίπους και ο συντελεστής απόδοσης ως προς την παραγόμενη βιομάζα.

Πίνακας 9. Παραγωγή μικροβιακού λίπους από *Cryptococcus curvatus*

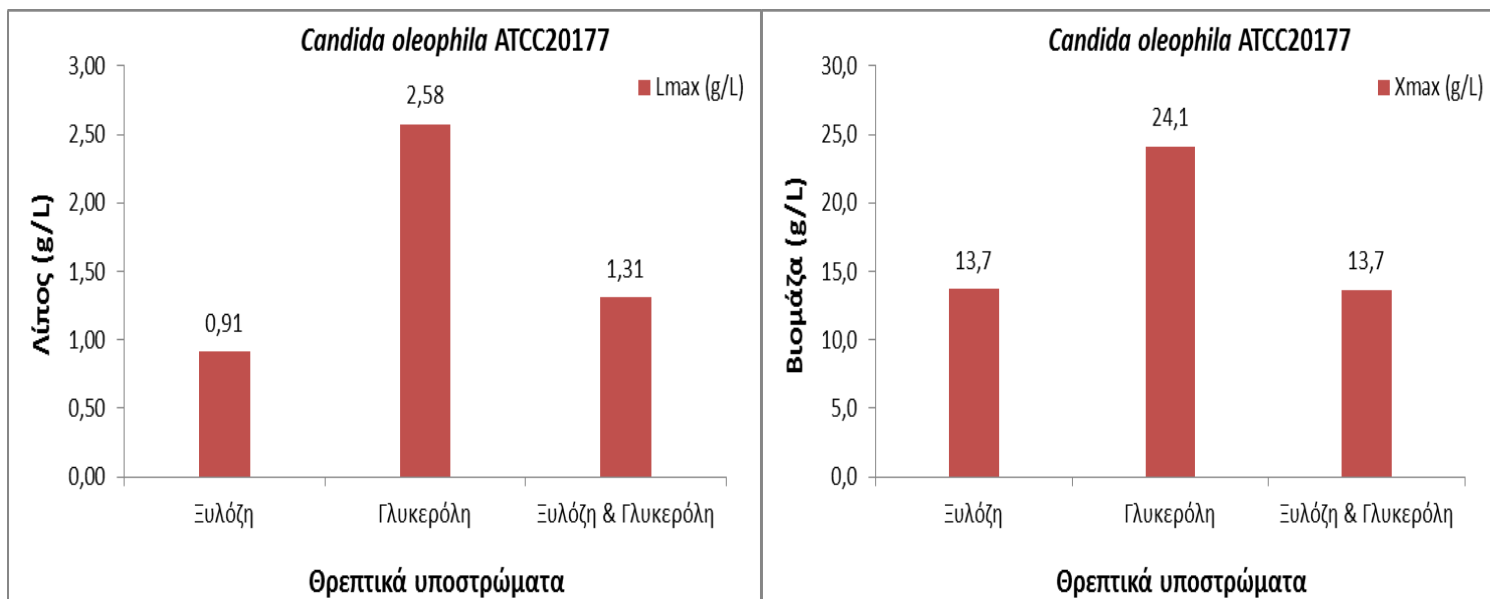
Στέλεχος	X (g/l)	$Y_{L/X}$ (g/g)	Τύπος ζύμωσης	Υπόστρωμα	Αναφορά
<i>Cryptococcus curvatus</i>	32,9	0,53	Fed batch bioreactor	Glycerol (raw)	Liang <i>et al</i> , 2010
<i>Cryptococcus curvatus</i>	118,0	0,25	Fed batch bioreactor	Glycerol (pure)	Meesters <i>et al</i> , 1996
<i>Cryptococcus curvatus</i>	91,0	0,32	Fed batch air lift bioreactor	Glycerol (pure)	Meesters <i>et al</i> , 1996
<i>Cryptococcus curvatus</i>	15	0,37	Single stage continuous	Xylose	Evans and Ratledge, 1983
<i>Cryptococcus curvatus</i>	21,6	0,36	Batch bioreactor	Whey	Ykema <i>et al</i> , 1988
<i>Cryptococcus curvatus</i>	85,0	0,35	Continuous recycling	Whey	Ykema <i>et al</i> , 1988
<i>Cryptococcus curvatus</i>	15	0,37	Single stage continuous	Xylose	Evans and Ratledge, 1983
<i>Cryptococcus curvatus</i>	13,5	0,29	Single stage continuous	Glucose	Evans and Ratledge, 1983
<i>Cryptococcus curvatus</i> ATCC 20509	15,7	0,30	Shake-flasks	Xylose	Παρούσα μελέτη
<i>Cryptococcus curvatus</i> ATCC 20509	26,6	0,14	Shake-flasks	Glycerol (raw)	Παρούσα μελέτη
<i>Cryptococcus curvatus</i> ATCC 20509	11,3	0,28	Shake-flasks	Glycerol-Xylose 50%-50%	Παρούσα μελέτη

Προχωρώντας, και συγκρίνοντας ο ζυμομύκητας *Candida oleophila* ATCC 20177 αυξήθηκε κανονικά στα υποστρώματα της ξυλόζης και της ακάθαρτης γλυκερόλης ενώ έδειξε να μην προτιμάει να βρίσκεται σε συνυποστρώματα όπως αυτό της ξυλόζης και γλυκερόλης σε αναλογία 50%- 50% πόσο μάλλον στην ξυλόζη. Γενικότερα μπορεί να λεχθεί πως στην περίπτωση του ζυμομύκητα *Candida oleophila* ATCC 20177, η γλυκερόλη αποτελεί το ιδανικό υπόστρωμα ανάπτυξης, ως η μοναδική πηγή άνθρακα για την παραγωγή μικροβιακής βιομάζας.

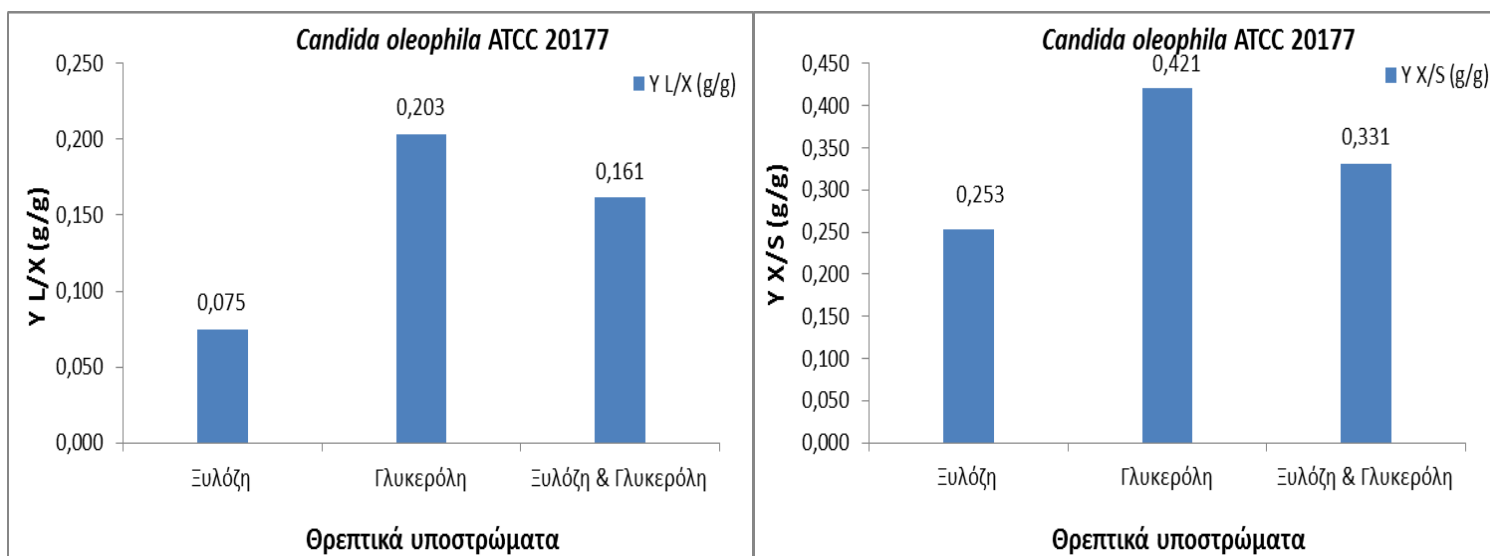
Στην παρούσα μελέτη, όταν η μόνη πηγή άνθρακα ήταν η ξυλόζη (60 g/L), η μέγιστη τιμή ενδοκυτταρικού λίπους έφθασε τα 0,91 g/L με $Y_{L/X} = 0,08$ g/g ενώ όταν αναμειγνυόταν με ακάθαρτη

γλυκερόλη με αρχική συγκέντρωση 60 g/L (50%-50% συμμετοχή) έφτανε τα 1,31 g/L με $Y_{L/X} = 0,16$ g/g. Αντίθετα όταν η πηγή άνθρακα ήταν μόνο η γλυκερόλη με αρχική συγκέντρωση (60 g/L), η μέγιστη τιμή ενδοκυτταρικού λίπους έφθασε τα 2,58 g/L με $Y_{L/X} = 0,20$ g/g. Η παραγωγή μικροβιακού λίπους ήταν σαφώς περισσότερη στο θρεπτικό μέσο της γλυκερόλης που δεν περιείχε μίξη με άλλη πηγή άνθρακα ενώ παρατηρήθηκε μεγάλη συσσώρευση μικροβιακού λίπους όταν η πηγή άνθρακα των θρεπτικών υποστρωμάτων ήταν σε συνυπόστρωμα ξυλόζης και γλυκερόλης, για τον ζυμομύκητα *Candida oleophila* ATCC 20177.

Επιπρόσθετα ο ζυμομύκητας *Candida oleophila* ATCC 20177 φάνηκε να αξιοποιεί την πηγή άνθρακα (ξυλόζη – γλυκερόλη) ανεξαρτήτως αρχικής συγκέντρωσης για την παραγωγή μεγάλης ποσότητας βιομάζας. Η μέγιστη ποσότητα βιομάζας για τις ζυμώσεις με πηγή άνθρακα την ξυλόζη(60 g/L) έφθασε τα 13,7 g/L με $Y_{x/s} 0,25$ g/g ενώ με την γλυκερόλη τα 24,1 g/L. με $Y_{x/s} 0,42$ g/g Αντίθετα, συγκριτικά με αυτά τα υποστρώματα είχαμε μικρότερη παραγωγή βιομάζας στο συνυπόστρωμα με πηγή άνθρακα τις ξυλόζη και γλυκερόλη (50%-50%) όπου έφθασε τα 13,7 g/L με $Y_{x/s} 0,33$ g/g . Φάνηκε ότι ο ζυμομύκητας *Candida oleophila* ATCC 20177 καταναλώνοντας γλυκερόλη ως πηγή άνθρακα παράγει μεγαλύτερες συγκεντρώσεις βιομάζας σε σύγκριση με την ξυλόζη ως πηγή άνθρακα ενώ σε συνυπόστρωμα ξυλόζης και γλυκερόλης δείχνει να είναι ισότιμη η παραγωγή βιομάζας πράγμα που καταλαβαίνουμε δεν έχει διαφορά με σκέτη ξυλόζη ως προς την παραγωγή βιομάζας. Στη διεθνή βιβλιογραφία υπάρχουν αρκετές μελέτες στις οποίες στελέχη του ζυμομύκητα *Candida oleophila* ATCC 20177 καταναλώνουν υποστρώματα σε διάφορες αρχικές συγκεντρώσεις (γλυκόζη, γλυκερόλη,) αλλά όχι με ξυλόζη. Συγκεκριμένα οι Chatzifragkou *et al* (2011) παρήγαγαν σε παρόμοιο πείραμα και υπόστρωμα γλυκερόλης με το ίδιο μικροοργανισμό 9,4 g/L βιομάζα και παραγωγή λίπους με $Y_{L/X} = 0,15$ g/g οπότε βρίσκονται σε συμφωνία.



Γράφημα 31 & 32 Συγκριτικός πίνακας παραγωγής μικροβιακού λίπους και η παραγωγή μικροβιακής μάζας ως προς το καταναλωθέν θρεπτικό υπόστρωμα.



Γράφημα 33 & 34 Συγκριτικός πίνακας του συντελεστή απόδοσης παραγωγής μικροβιακού λίπους και ο συντελεστής απόδοσης ως προς την παραγόμενη βιομάζα.

Πίνακας 10. Παραγωγή μικροβιακού λίπους από *Candida oleophila*

Στέλεχος	X (g/l)	$Y_{L/X}$ (g/g)	Τύπος ζύμωσης	Υπόστρωμα	Αναφορά
<i>Candida oleophila</i>	8,0	0.42	Shake-flasks	Glycose	Anastassiadis, 2005
<i>Candida oleophila</i>	9,4	0,15	Shake-flasks	Glycerol (raw)	Chatzifragkou <i>et al</i> , 2011
<i>Candida oleophila</i> ATCC 20177	13,7	0,075	Shake-flasks	Xylose	Παρούσα μελέτη
<i>Candida oleophila</i> ATCC 20177	24,1	0,20	Shake-flasks	Glycerol (raw)	Παρούσα μελέτη
<i>Candida oleophila</i> ATCC 20177	13,7	0,16	Shake-flasks	Xylose & Glycerol	Παρούσα μελέτη

Στην παρούσα πτυχιακή μελέτη εξετάστηκε η συμπεριφορά ακόμα πολλών στελεχών του ζυμομύκητα *Yarrowia lipolytica* σε υπόστρωμα ξυλόζης (60 g/L) και το πιο αποδοτικό από αυτά το *Yarrowia lipolytica* ACA-YC 5033 και σε υπόστρωμα γλυκερόλης (60 g/L). Παρατηρήθηκε μικρή παραγωγή βιομάζας (περίπου 1 g/L) από όλα τα στελέχη στο υπόστρωμα της ξυλόζης. Παρόλα αυτά αξιοσημείωτο είναι η παραγωγή ξυλιτόλης σε ποσότητες (6-7 g/L) όταν η μόνη πηγή άνθρακα ήταν η ξυλόζη. Αντίστοιχη έρευνα σε αυτό το υπόστρωμα δεν υπάρχει στην διεθνή βιβλιογραφία. Αυτό αποτελεί πρωτοπορία και είναι ένα πολύ χρήσιμο ερευνητικό αποτέλεσμα που θα αξιοποιηθεί στο μέλλον έπειτα από εκτενέστερη μελέτη πάνω στα λιγνοκυταρινούχα υποστρώματα. Ακόμα, συμπερασματικά μπορούμε να πούμε για το υπόστρωμα γλυκερόλης πως το προτιμά και αξιοποιεί την κατανάλωση του υποστρώματος παράγοντας 13,79 g/L βιομάζα με συντελεστή απόδοσης βιομάζας ως προς το καταναλωθέν υπόστρωμα 0,33 g/g έπειτα από 216h. Την ίδια στιγμή παράγει λίπος σε απόλυτη τιμή 0,46 g/L με συντελεστή παραγωγής μικροβιακού λίπους ως προς την παραγόμενη βιομάζα 0,03 g/g. Επιπλέον, είχαμε μια παραγωγή κιτρικού οξέος με τιμή 10,64 g/L κιτρικού οξέος όπου είναι μια αξιοσημείωτη παραγωγή, ωστόσο είναι χαμηλότερη σε σύγκριση με τις υψηλότερες τιμές του κιτρικού οξέος που έχουν επιτευχθεί (50-150 g/L) από την καλλιέργεια διαφόρων στελεχών του *Yarrowia lipolytica* σε μια πληθώρα πηγών άνθρακα και συνθηκών ζύμωσης (Papanikolaou *et al*, 2006). Τις πρώτες ώρες της ζύμωσης, ο μικροοργανισμός κατανάλωσε σχεδόν όλο το άζωτο και κατά την περίοδο αυτή η κατανάλωση της γλυκερόλης οδήγησε κυρίως στην παραγωγή βιομάζας, καθώς όπως παρατηρήθηκε η παραγωγή κιτρικού οξέος ήταν μηδαμινή. Όπως επιβεβαιώνεται και από την βιβλιογραφία (Papanikolaou *et al*, 2002; 2006; 2010) η παραγωγή κιτρικού οξέος ενισχύθηκε όταν εξαντλήθηκε το άζωτο.

Σύμφωνα με αντίστοιχο πείραμα σε κωνικές φιάλες που μελετήθηκε διαφορετικό όμως στέλεχος του *Yarrowia lipolytica* από τους Andre' *et al*, (2009) σε γλυκερόλη τα αποτελέσματα για την παραγωγή βιομάζας είναι κοντά με της παρούσας πτυχιακής μελέτης όπως και ο συντελεστής παραγωγής λίπους (5,4 g/L και 0,02 g/g αντίστοιχα).

Περαιτέρω μελετήθηκε η σύσταση του μικροβιακού λίπους των στελεχών *Yarrowia lipolytica* ACA-YC 5030, *Yarrowia lipolytica* ACA-YC 5033, *Yarrowia lipolytica* LGAM S(7)1. Η σύσταση του μικροβιακού λίπους που προήλθε από τη ζύμη *Yarrowia lipolytica* μοιάζει σε όλα τα στελέχη. Το μικροβιακό λίπος αποτελούνταν από το ελαϊκό (C18:1), το λινελαϊκό (C18:2), και το παλμιτικό (C16:0). Σε όλες τις ζυμώσεις το λιπαρό οξύ που κυριάρχησε ήταν το ελαϊκό σε ποσοστό από 49% κ.β. έως και 72% κ.β., με τάση να αυξάνει κατά την διάρκεια της ζύμωσης. Τα υπόλοιπα λιπαρά οξέα εμφανίστηκαν σε μικρότερα ποσοστά. Πιο συγκεκριμένα το παλμιτικό κυμάνθηκε από 22% κ.β. έως 30% και ήταν το λιπαρό οξύ με το μεγαλύτερο ποσοστό μετά το ελαϊκό. Το λινελαϊκό εμφάνισε την τάση να συσσωρεύεται τις πρώτες ώρες και έπειτα να μειώνεται φθάνοντας στο τέλος της ζύμωσης να απουσιάζει.

Συμπερασματικά διαπιστώνουμε πώς η σύσταση του μικροβιακού λίπους εξαρτάται από το στέλεχος το οποίο θα χρησιμοποιήσουμε όσον αφορά στις παρατηρήσεις μας στο θρεπτικό υπόστρωμα ξυλόζης με αρχική συγκέντρωση 60g/L. Δεν διαφέρουν σημαντικά αλλά παρατηρείται διαφορά στις αναλογίες όσο προχωράει η ζύμωση.

Η παραγωγή λιπιδίων από ελαιογόνους μικροοργανισμοί θεωρείται ως μια πολλά υποσχόμενη περίπτωση παραγωγής βιοντίζελ, διότι η σύνθεση του συγκεκριμένου λίπους σε λιπαρά οξέα είναι παρόμοια με εκείνη των φυτικών ελαίων (Huang *et al*, 2009). Ακόμα τα μικροβιακά λιπίδια είναι πλούσια σε συγκεκριμένα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα, και συχνά χρησιμοποιούνται σε συμπληρώματα διατροφής καθώς και στη βρεφική διατροφή (Ratledge, 2002; Spolaore, 2006). Οι μικροοργανισμοί έχουν πολλά πλεονεκτήματα σε σχέση με τα φυτά για την παραγωγή λιπιδίων, όπως σύντομους κύκλους ζωής, απαιτείται λιγότερη εργασία, μικρότερες απαιτήσεις χώρου, τόπου, εποχής και κλίματος.

Απο την άλλη η παραγωγή κιτρικού οξέος καθώς και διαφόρων άλλων οργανικών οξέων όπως το α-κετογλουταρικό και γλουκονικό θεωρείται εξίσου σημαντική εφόσον είναι απαραίτητα στην βιομηχανία τροφίμων και φαρμάκων (Burden and Eveleigh 1990; Buzzini and Vaughan-Martini 2006).

Η παρούσα μελέτη αποτελεί μία ακόμη απόδειξη της δυνατότητας ανάπτυξης και εφαρμογής της αειφόρου τεχνολογίας. Η χρήση των αγροτικών και βιομηχανικών παραπροϊόντων και αποβλήτων ως θρεπτικά υποστρώματα για την παραγωγή προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον λόγω της αλματώδους αύξησης όλων των τομέων παραγωγής και

διότι τα διάφορα αυτά απόβλητα και παραπροϊόντα παράγονται σε πολύ μεγάλες ποσότητες, με αποτέλεσμα η διαχείρισή τους να αποτελεί δυσεπίλυτο πρόβλημα για τη βιομηχανία (Peters, 2007). Παρά τον μεγάλο αριθμό μελετών που έχει εμφανιστεί στη διεθνή βιβλιογραφία σχετικά με την αξιοποίηση των αγροτοβιομηχανικών αποβλήτων, το ερευνητικό ενδιαφέρον γύρω απ' τα ζητήματα της βιομετατροπής τους συνεχίζεται αμείωτο (Peters, 2007). Η βιομετατροπή αγροτοβιομηχανικών παραπροϊόντων και αποβλήτων σε λιπίδια φαρμακευτικού και διατροφικού ενδιαφέροντος είναι τεχνολογία μέγιστης αιχμής με εξαιρετική οικονομική σημασία.

Σε μελλοντικές έρευνες θα μπορούσε να μελετηθεί η συμπεριφορά των μικροοργανισμών σε διαφορετικές αναλογίες λιγνοκυτταρινούχων υποστρωμάτων και αποβλήτων καθώς και διαφορετικές αρχικές συγκεντρώσεις. Επίσης ενδιαφέρον θα παρουσίαζε η χρήση άλλων πηγών άνθρακα ή ο συνδυασμός του αποβλήτου με άλλα απόβλητα. Τέλος, θα μπορούσε να μελετηθεί η βιοχημική συμπεριφορά και άλλων μικροοργανισμών κατά την ανάπτυξή τους στα συγκεκριμένα θρεπτικά υποστρώματα.

Βιβλιογραφία

- Ageitos, J. M., Vallejo, J. A., Veiga-Crespo, P. & Villa, T. G., (2011). *Oily yeasts as oleaginous cell factories*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 90, 1219–1227.
- Aggelis G.G., Gavala H.N., Lyberatos G., (2001). Combined and separate aerobic and anaerobic boitreatment of green olive debittering wastewater. Journal of Agricultural Engineering Research. 80: 283-292.
- Aggelis, G., Komaitis, M., Papanikolaou, S., Papadopoulos, G., (1995a). *A mathematical model for the study of lipid accumulation in oleaginous microorganisms. I: Lipid accumulation during growth of Mucor circinelloides CBS 172-27 on a vegetable oil*. Grasas y aceites. 46, 169-173.
- Aggelis, G., Komaitis, M., Papanikolaou, S., Papadopoulos, G., (1995b). *A mathematical model for the study of lipid accumulation in oleaginous microorganisms. II: Study of cellular lipids of Mucor circinelloides during growth on a vegetable oil*. Grasas y aceites. 46, 245-250.
- Aggelis, G., Komaitis, M., (1999). *Enhancement of single-cell oil production by Yarrowia lipolytica growing in the presence of Teuchrium polium L. aqueous extract*. Biotechnol. Lett. 1999, 21, 747-749.
- Aggelis, G., Sourdis, J., (1997). *Prediction of lipid accumulation-degradation in oleaginous microorganisms growing on vegetable oils*. Antonie van Leeuwenhoek. 72, 159-165.
- André, A., Chatzifragkou, A., Diamantopoulou, P., Sarris, D., Philippoussis, A., Galiotou-Panayotou, M., Komaitis, M., Papanikolaou, S., (2009). *Biotechnological conversions of bio-diesel-derived crude glycerol by Yarrowia lipolytica strains*. Eng Life Sci 2009, 9, 468-478..
- Athenstaedt, K., Jolivet, P., Boulard, C., Zivy, M., Negroni, L., Nicaud, J. M., Chardot, T., (2006). *Lipid particle composition of the yeast Yarrowia lipolytica depends on the carbon source*. Proteomics. 6: 1450-1459.
- Barnett, J. A., Payne, R. W., Yarrow, D., (1990). *Yeasts: Characteristics and identification*. Cambridge University Press, Cambridge. pp. 683 – 684.
- Barth, G., Gaillardin, C., (1997). *Physiology and genetics of the dimorphic fungus Yarrowia lipolytica*. FEMS Microbiol Rev. 19, 219-237.
- Barth, G., Gaillardin, C., (1996). *Yarrowia lipolytica*. In *Nonconventional yeasts in biotechnology*, Springer. pp 313-388.

- Belitz H.-D., Grosch. W., Schieberle. P., (2004).** *Food Chemistry*. Copyright Springer Verlag Berlin Heidelberg..
- Beopoulos, A., Nicaud, J. M. & Gaillardin, C., (2011).** *An overview of lipid metabolism in yeasts and its impact on biotechnological processes*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 90: 1193–1206.
- Brenes M. and Garrido A., (1998).** *Regeneracion de salmueras de aveitunas verdes estilo espanol con resinas cambiadorzs de iones*. Grasas Aceites Seville. 39:96-101.
- Burden, D.W., Eveleigh, D.E., (1990).** *Yeasts diverse substrates and products*. In: Spencer DM (ed) Yeasts technology. Springer Berlin Heidelberg New York. pp 199 – 127.
- Burden, D.; Eveleigh, D., (1990).** *Yeasts-diverse substrates and products*. In Yeast technology, Spencer, J.; Spencer, D., Eds. Springer. pp 199-227.
- Casaregola, S., Feynerol, C., Diez, M., Fournier, P., Gaillardin, C., (1997).** *Genomic organization of the yeast Yarrowia lipolytica*. Cromosoma. 106, 380 – 390.
- Casaregola, S., Neuvéglise, C., Lépingle, A., Bon, E., Feynerol, C., Artiguenave, F., Wincker, P., Gaillardin, C., (2000).** *Genomic Exploration of the Hemiascomycetous Yeasts: 17. Yarrowia lipolytica*. FEBS Lett. 487, 95-100.
- Demain, A.; Phaff, H.; Kurtzman, C., (1998).** *The industrial and agricultural significance of yeasts. The yeasts, a taxonomic study, 4th edn*. Elsevier, Amsterdam. 13-20.
- Domínguez, A., Ferminan, E., Gaillardin, C. (2000).** *Yarrowia lipolytica : an organism amenable to genetic manipulation as a model for anylizing dimirphism in fungi. Dimorphism in Human Pathogenic and Apathogenic Yeasts* (Ernst J.F. & Schmidt A.), pp. 151 – 172.
- Evans, C. T. & Ratledge, C., (1984).** *Influence of nitrogen metabolism on lipid accumulation by Rhodosporidium toruloides CBS 14*. J. Gen. Microbiol. 130, 1705–1710.
- Fickers, P., Benetti, P. H., Wache, Y., Marty, A., Mauersberger, S., Smit, M., Nicaud, J-M., (2005).** *Hydrophobic substrate utilisation by the yeast Yarrowia lipolytica, and its potential applications*. FEMS Yeast Res. 5, 527-543
- Folch, J., Lees, M., Stanley, GH. S., (1957).** *A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues*. J Biol Chem 1957, 226:497–509.
- Garrido A., (1975).** *Tratamiento de las aguas residuals de la industria del aderezo. Metodos para su eliminacion o reacondicionamiento para su postierior empleo*. Grasas Aceites Seville. 26: 237-244.
- Goodwin, T.W., (1980).** *Fungi. In The biochemistry of carotenoids*. Vol. 1. Plants. Edited by T.W. Goodwin. Chapman and Hall, London. pp. 257-290.

- Green, J. H., Paskell, S. L., Goldmintz, D., (1976).** *Lipolytic fermentations of stickwater by Geotrichum candidum and Candida lipolytica.* Appl Environ Microbiol. 31, 569-575.
- Hu, C., Zhao, X., Zhao, J., Wu, S. & Zhao, Z. K., (2009).** *Effects of biomass hydrolysis by-products on oleaginous yeast Rhodosporidium toruloides.* Bioresource Technol. 100, 4843–4847.
- Kamzolova, S. V., Shishkanova, N. V., Morgunov, I. G., Finogenova, T. V., (2003).** *Oxygen requirements for growth and citric acid production of Yarrowia lipolytica.* FEMS Yeast Res 2003, 3, 217-22.
- Kurtzman. C.P., Fell. J.W., (1998).** *The yeasts : A taxonomy study.* Elsevier, Amsterdam 1998.
- Li Y. H., Liu B., Zhao Z. B., Bai F.W., (2006).** *Optimized culture medium and fermentation conditions for lipid production by Rhodosporidium toruloides.* Chin J Biotechnol 22(4):650–656.
- Li, Y., Zhao, Z. & Bai, F., (2007).** *High-density cultivation of oleaginous yeast Rhodosporidium toruloides Y4 in fed-batch culture.* Enzyme Microb. Technol. 41, 312–317 (2007).
- Liu, H., (2002).** *Co-regulation of pathogenesis with dimorphism and phenotypic switching in Candida albicans, a commensal and a pathogen.* Int J Med Microbiol. 2002, 292, 299-311.
- Liu, H., (2001).** *Transcriptional control of dimorphism in Candida albicans.* Curr Opin Microbiol 2001, 4, 728-735.
- Lopez, M. C., Nicaud, J.-M., Skinner, H. B., Vergnolle, C., Kader, J. C., Bankaitis, V. A., Gaillardin, C., (1994).** *A phosphatidylinositol / phosphatidylcholine transfer protein is required for differentiation of the dimorphic yeast Yarrowia lipolytica from the yeast to the mycelial form.* J Cell Biol 1994, 125, 113-127.
- Luo, Y.-S., Nicaud, J.-M., Van Veldhoven, P. P., Chardot, T., (2002).** *The acyl-CoA oxidases from the yeast Yarrowia lipolytica: characterization of Aox2p.* Arch Biochem Biophys 2002, 407, 32-38.
- Mayersberger, S., Ohkuma., W. H., Takagi, M., (1996).** *Candida maltosa in : Nonconventional Yeasts in Biotechnology* (Wolf, K., Ed.), A Handbook, pp. 411 – 580. Springer, Berlin, Heidelberg, New York.
- Miller, G. L., (1959).** *Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar.* Anal Chem 1959, 31, 426-428.
- Misawa N., Shimada H., (1997).** *Metabolic engineering for the production of carotenoids in non-carotenogenic bacteria and yeasts.* J. Biotechnol., 59(3): 169-181.

- Mličková, K., Luo, Y., Andrea, S., Peč, P., Chardot, T., Nicaud, J.-M., (2004a).** *Acyl-CoA oxidase, a key step for lipid accumulation in the yeast Yarrowia lipolytica.* Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. 28, 81-85
- Mličková, K., Roux, E., Athenstaedt, K., d'Andrea, S., Daum, G., Chardot, T., Nicaud, J.-M., (2004b).** *Lipid accumulation, lipid body formation, and acyl coenzyme A oxidases of the yeast Yarrowia lipolytica.* Appl Environ Microbiol, 70, 3918-3924.
- Montet, D., Ratomahenina, R., Ba, A., Pina, M., Graille, J., (1983).** *Production of single cell protein from vegetable oils.* J Ferment Technol 1983, 61, 417-420.
- Montet, D., Ratomahenina, R., Galzy, P. (1985).** *A study of the influence of the growth media on the fatty acid composition in Candida lipolytica.* Biotechnology Letters. 7(10), 733 – 736.
- Montet, D., Ratomahenina, R., Pina, M., Graille, J., Galzy, P. (1985).** *Purification and characterization of a lipase from Candida curvata Lodder and Kreger-van Rij CBS 570.* Fette Seifen Anstrichm. 87, 181 – 185 .
- Moresi, M., (1994).** *Effect of glucose concentration on citric acid production by Yarrowia lipolytica.* J Chem Technol Biotechnol , 60, 387-395
- Moreton, R., (1988).** In *Single cell oil*, Moreton, R., Ed. Longmans: 1988; pp 1-32.
- Murphy, D. J., (2001).** *The biogenesis and functions of lipid bodies in animals, plants and microorganisms.* Prog Lipid Res 2001, 40, 325-438.
- Papanikolaou, S., Aggelis, G., (2011a).** *Lipids of oleaginous yeasts. Part I: Biochemistry of single cell oil production.* Eur J Lipid Sci Technol 113, 1031-1051.
- Papanikolaou, S., Aggelis, G., (2011b).** *Lipids of oleaginous yeasts. Part II: Technology and potential applications.* Eur J Lipid Sci Technol, 113, 1052-1073.
- Papanikolaou, S., Aggelis, G., (2010).** *Yarrowia lipolytica: A model microorganism used for the production of tailor-made lipids.* Eur J Lipid Sci Technol 2010, 112, 639-654.
- Papanikolaou, S., Aggelis, G., (2003a).** *Selective uptake of fatty acids by the yeast Yarrowia lipolytica.* Eur J Lipid Sci Technol. 2003a, 105, 651-655.
- Papanikolaou, S., Aggelis, G., (2003b).** *Modeling lipid accumulation and degradation in Yarrowia lipolytica cultivated on industrial fats.* Curr Microbiol 2003b, 46, 398-402.
- Papanikolaou, S., Aggelis, G., (2002).** *Lipid production by Yarrowia lipolytica growing on industrial glycerol in a single-stage continuous culture.* Bioresour Technol 2002, 82, 43-49.
- Papanikolaou, S., Aggelis, G.,(2011a).** *Lipids of oleaginous yeasts. Part I: Biochemistry of single cell oil production.* Eur J Lipid Sci Technol, 113(8), 1031-1051.
- Papanikolaou, S., & Aggelis, G.,(2011b).** *Lipids of oleaginous yeasts. Part II: Technology and potential applications.* Eur J Lipid Sci Technol, 113(8), 1052-1073.

- Papanikolaou, S., Chevalot, I., Galiotou-Panayotou, M., Komaitis, M., Marc, I., Aggelis, G., (2007).** *Industrial derivative of tallow: a promising renewable substrate for microbial lipid, single-cell protein and lipase production by Yarrowia lipolytica.* Electron J Biotechnol 2007, 10, 425-435.
- Papanikolaou, S., Chevalot, I., Komaitis, M., Marc, I., Aggelis, G., (2002a).** *Single cell oil production by Yarrowia lipolytica growing on an industrial derivative of animal fat in batch cultures.* Appl Microbiol Biotechnol 2002a, 58, 308-312.
- Papanikolaou, S., Chevalot, I., Komaitis, M., Aggelis, G., Marc, I., (2001).** *Kinetic profile of the cellular lipid composition in an oleaginous Yarrowia lipolytica capable of producing a cocoa-butter substitute from industrial fats.* Antoine van Leeuwenhoek 2001, 80, 215-224.
- Papanikolaou, S., Fakas, S., Fick, M., Chevalot, I., Galiotou-Panayotou, M., Komaitis, M., et al (2008).** *Biotechnological valorisation of raw glycerol discharged after bio-diesel (fatty acid methyl esters) manufacturing process: Production of 1, 3-propanediol, citric acid and single cell oil.* Biomass and Bioenergy, 32(1), 60-71.
- Papanikolaou, S., Galiotou-Panayotou, M., Fakas, S., Komaitis, M., Aggelis, G., (2008a).** *Citric acid production by Yarrowia lipolytica cultivated on olive-mill wastewater-based media.* Bioresour Technol 2008a, 99, 2419-2428.
- Papanikolaou, S., Galiotou-Panayotou, M., Chevalot, I., Komaitis, M., Marc, I., Aggelis, G., (2006).** *Influence of glucose and saturated free-fatty acid mixtures on citric acid and lipid production by Yarrowia lipolytica.* Curr Microbiol 2006, 52, 134-142.
- Papanikolaou, S., Komaitis, M., Aggelis, G., (2004b).** *Single cell oil (SCO) production by Mortierella isabellina grown on high-sugar content media.* Bioresour Technol 2004b, 95, 287-291.
- Papanikolaou, S., Muniglia, L., Chevalot, I., Aggelis, G., Marc, I., (2002b).** *Yarrowia lipolytica as a potential producer of citric acid from raw glycerol.* J Appl Microbiol 2002b, 92, 737-44.
- Paramithiotis, S., Muller, M. R. A., Ehrmann, M. A., Tsakalidou, E., Seiler, H., Vogel, R., Kalantzopoulos, G., (2000).** *Polyphasic identification of wild yeast strains isolated from Greek sourdoughs.* Syst Appl Microbiol 2000, 23, 156-64.
- Perrier, V., Dubreucq, E., and Galzy, P., (1995).** *Fatty acids and carotenoid composition of Rhodotorula strains.* Arch. Microbiol. 164: 173-179. PMID:7668929.
- Politino, M., Tonzi, S. M., Burnett, W. V., Romancik, G. & Usher, J. J., (1997).** *Purification and characterization of a cephalosporin esterase from Rhodosporidium toruloides.* Appl. Environ. Microbiol. 63, 4807–4811 (1997).

- Ratledge C., (2002).** *Regulation of lipid accumulation in oleaginous microorganisms.* Biochemical Society Trans, 2002; 32:1047–1050.
- Ratledge, C., (2004).** *Fatty acid biosynthesis in microorganisms being used for single cell oil production.* Biochimie 2004, 86, 807-815.
- Ruiz-Herrera, J., Sentandreu, R., (2002).** *Different effectors of dimorphism in Yarrowia lipolytica.* Arch Microbiol 2002, 178, 477-483.
- Sarris, D., (2013).** *Biotechnological treatment of olive mill wastewaters-based media: production of added-value compounds with the use of strains of yeasts Yarrowia lipolytica and Saccharomyces cerevisiae.* PhD Thesis, Department of food science and technology, Agricultural University Of, Athens, 2013.
- Sarris, D., Galiotou-Panayotou, M., Koutinas, A. A., Komaitis, M., & Papanikolaou, S., (2011).** *Citric acid, biomass and cellular lipid production by Yarrowia lipolytica strains cultivated on olive mill wastewater-based media.* J Chem Technol Biotechnol, 86, 1439-1448. doi: 10.1002/jctb.2658
- Sarris, D., Giannakis, M., Philippoussis, A., Komaitis, M., Koutinas, A. A., & Papanikolaou S. (2013).** *Conversions of olive mill wastewater-based media by Saccharomyces cerevisiae through sterile and non-sterile bioprocesses.* J Chem Technol Biotechnol, 88, 958-969. doi: 10.1002/jctb.3931
- Sarris, D., Kotseridis, Y., Linga, M., Galiotou-Panayotou, M., & Papanikolaou, S. (2009).** *Enhanced ethanol production, volatile compound biosynthesis and fungicide removal during growth of a newly isolated Saccharomyces cerevisiae strain on enriched pasteurized grape musts.* Eng Life Sci, 9(1), 29-37.
- Sarris, D., Matsakas, L., Aggelis, G., Koutinas, A. A., & Papanikolaou, S. (2014).** *Aerated vs non-aerated conversions of molasses and olive mill wastewaters blends into bioethanol by Saccharomyces cerevisiae under non-aseptic conditions.* Ind Crops Prod, 56, 83-93.
- Sinigaglia, M., Lanciotti, R., Guerzoni, M. E., (1994).** *Biochemical and physiological characteristics of Yarrowia lipolytica strains in relation to isolation source.* Can J Microbiol 1994, 40, 54-59.
- Spolaore, P., Cassan, C.J., Duran, E., Isambert, A., (2006).** *Commercial applications of microalgae.* J Biosci Bioeng 101(2):87–96.
- Suzzi, G., Lanorte, M., Galgano, F., Andrighetto, C., Lombardi, A., Lanciotti, R., Guerzoni, M., (2001).** *Proteolytic, lipolytic and molecular characterisation of Yarrowia lipolytica isolated from cheese.* Int J Food Microbiol 2001, 69, 69-77.

- Szabo, R., Štofáníková, V., (2002).** *Presence of organic sources of nitrogen is critical for filament formation and pH-dependent morphogenesis in Yarrowia lipolytica.* FEMS Microbiol Lett 2002, 206, 45-50.
- Van der Walt, J., Von Arx, J., (1980).** *The yeast genus Yarrowia gen. nov.* Antonie van Leeuwenhoek 1980, 46, 517-521.
- Vega, R., Domínguez, A., (1986).** *Cell wall composition of the yeast and mycelial forms of Yarrowia lipolytica.* Arch Microbiol 1986, 144, 124-130.
- Wang, H., Le Dall, Wache, Y., Laroche, P., Belin, J.M., Gaillardin, C., Nicaud, J.-M. (1999).** *Evaluation of acyl coenzymw A oxidase isozyme function in the n-alkane-assimilating yeast Yarrowia lipolytica.* Bacteriol. 181, 5140 – 5148.
- Zhao, X., Wu, S., Hu, C., Wang, Q., Hua, Y., Zhao, K. Z., (2010).** *Lipid production from Jerusalem artichoke by Rhodosporidium toruloides Y4.* J Ind Microbiol Biotechnol (2010) 37:581–585.
- Zinjarde, S. S., Pant, A., (2002).** *Emulsifier from a tropical marine yeast, Yarrowia lipolytica NCIM 3589.* J Basic Microbiol 2002, 42, 67-73.
- Zhu, Z., Zhang, S., Liu, H., Shen, H., Lin, X., Yang, F., Zhou, J. Y., Jin, G., Ye, M., Zou, H., Zhao, K, Z., (2012).** *A multi-omic map of the lipid-producing yeast Rhodosporidium toruloides.* Nature Communications 3, Article number: 1112, 2012