



**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ**  
**Π.Μ.Σ. «ΕΠΙΣΤΗΜΗ & ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ &**  
**ΔΙΑΤΡΟΦΗ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ»**  
**Κατεύθυνση «Βιοδιεργασίες Τροφίμων & Βιοδυλιστήρια»**  
**Εργαστήριο Μικροβιολογίας & Βιοτεχνολογίας Τροφίμων**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ**

Μεταπτυχιακός φοιτητής : Δημήτρης Μ. Ψαριανός

Επιβλέπων καθηγητής : Σεραφείμ Παπανικολάου, Επίκουρος καθηγητής

*«Παραγωγή κυτταρικής μάζας και μικροβιακών λιπιδίων κατά την αύξηση του μικροοργανισμού *Cryptococcus curvatus* σε υποστρώματα με βάση την ξυλόζη»*



Lipid production by *Cryptococcus curvatus*

Αθήνα, 2014

## **Μεταπτυχιακή διατριβή**

**<<Παραγωγή κυτταρικής μάζας και μικροβιακών λιπιδίων κατά την αύξηση του μικροοργανισμού *Cryptococcus curvatus* σε υποστρώματα με βάση την ξυλόζη>>**

**Μεταπτυχιακός φοιτητής: Δημήτριος Μ. Ψαριανός**

**Τριμελής επιτροπή:**

**Σεραφείμ Παπανικολάου, Επίκουρος καθηγητής (Επιβλέπων)**

**Αποστόλης Κουτίνας, Επίκουρος καθηγητής**

**Ελευθέριος Δροσινός, Αναπληρωτής καθηγητής**

## **ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

Στην εκπόνηση της παρούσας ερευνητικής μελέτης που πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο της Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, στα πλαίσια του ΠΜΣ <<Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου>> έλαβα σημαντική βοήθεια για την ολοκλήρωσή της από συναδέλφους και καθηγητές. Έτσι, αισθάνομαι την ανάγκη να ευχαριστήσω θερμά τον κ. Παπανικολάου Επίκουρο Καθηγητή και επιβλέποντα της πτυχιακής μου μελέτης, για την υποστήριξη και την καθοδήγηση σε όλη την διάρκεια της εκπόνησης της ερευνητικής μελέτης. Εν συνεχεία οφείλω θερμές ευχαριστίες στον κ. Σαρρή Δημήτριο για την πολύτιμη βοήθεια του τόσο στην διεξαγωγή της πειραματικής διαδικασίας όσο και στη συγγραφή της μελέτης. Επίσης, αξίζει να εκφράσω τις ευχαριστίες μου σε όσους έγιναν αρωγοί και συνέβαλαν με οποιονδήποτε τρόπο για την εκπόνηση της συγκεκριμένης ερευνητικής μελέτης, έστω και σε μικρή κλίμακα και κυρίως την οικογένειά μου για την αμέριστη συμπαράστασή της κατά τη διάρκεια της διεξαγωγής της μεταπτυχιακής μελέτης.

## Πίνακας περιεχομένων

Περίληψη.....	5
Abstract.....	6
1.Εισαγωγή.....	7
1.1. Λιγνοκυτταρινούχα υποστρώματα .....	7
1.1.1. Σύσταση λιγνοκυτταρινούχων υποστρωμάτων.....	8
1.1.2 Παραγωγή λιγνοκυτταρινούχων υποστρωμάτων.....	9
1.1.3. Αξιοποίηση λιγνοκυτταρινούχων υπολειμμάτων.....	10
1.1.4 Παραγωγή βιολογικών καυσίμων πρώτης γενιάς.....	11
1.2. Βιοχημεία παραγωγής λιπιδίων.....	12
1.2.1. Ελαιογόνοι μικροοργανισμοί και μικροβιακό λίπος.....	12
1.2.2. Συσσώρευση λιπιδίων ‘‘De novo’’ .....	13
1.2.3. Συσσώρευση λιπιδίων ‘‘Ex novo’’ .....	14
1.2.4. Δομή και σύσταση των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (PUFAs).....	15
1.2.5. Ιδιότητες των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (PUFAs).....	16
1.3 Αξιοποίηση των μικροοργανισμών στην Τεχνολογία αειφόρου ανάπτυξης.....	17
1.3.1 Η συσσώρευση του μικροβιακού λίπους σε κατάλληλα ανανεώσιμα υποστρώματα.....	17
1.4 Σκοπός της πτυχιακής.....	18
2. Υλικά και μέθοδοι.....	19
2.1 Βιολογικό υλικό.....	19
2.2 Θρεπτικό μέσο καλλιέργειας ζυμών.....	19
2.3 Συνθήκες καλλιέργειας και ανάπτυξης.....	20
2.4 Χημικές αναλύσεις.....	20
2.4.1 Προσδιορισμός pH.....	20
2.4.2 Συλλογή βιομάζας.....	20
2.4.3 Ποσοτικός και ποιοτικός προσδιορισμός παραγόμενου ενδοκυτταρικού λίπους.....	21
2.4.4 Μεθυλεστεροποίηση.....	21
2.4.5 Ανάλυση στον αέριο χρωματογράφο.....	22
2.4.6 Προσδιορισμός ενδοπολυσακχαριτών (IPS).....	23
3.Αποτελέσματα.....	24
3.1 Παραγωγή βιομάζας, μικροβιακού λίπους, ενδοπολυσακχαριτών (IPS) και κατανάλωση υποστρώματος ξυλόζης.....	24
3.1.1 Γενική παρουσίαση αποτελεσμάτων.....	24
3.1.2 Μελέτη της σύστασης του μικροβιακού λίπους (FAMES).....	34
4. Συμπεράσματα.....	36
Βιβλιογραφία.....	40

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Συγκεκριμένα σκοπός είναι η αύξηση του μικροοργανισμού σε ανακινούμενες φιάλες (υπό ασηπτικές συνθήκες) με συνθετικά υποστρώματα αυξανόμενης συγκέντρωσης ξυλόζης (εύρεση ορίων αντοχής του στελέχους/πιθανή καταστολή του μεταβολισμού από υψηλή συγκέντρωση υποστρώματος) και η αριστοποίηση των συνθηκών ζύμωσης. Τέλος, θα πραγματοποιηθεί κλιμάκωση μεγέθους της επιλεγμένης ζύμωσης με τα επιθυμητά αποτελέσματα σε καλλιέργειες σε βιοαντιδραστήρες.

Το στέλεχος του ζυμομύκητα που θα χρησιμοποιηθεί είναι το *Cryptococcus curvatus* NRRL Y 1511. Αρχικά θα αυξηθεί σε καλλιέργειες σε ανακινούμενες φιάλες υπό ασηπτικές συνθήκες (σε συγκεκριμένο pH και θερμοκρασία), πεπληρωμένες με συνθετικά υποστρώματα με βάση την ξυλόζη. Οι αρχικές συγκεντρώσεις της ξυλόζης θα είναι αυξανόμενες με το σκεπτικό αφενός της παραγωγής μεγαλύτερης ποσότητας μονοκυτταρικού λίπους και αφετέρου της εύρεσης του ορίου τυχούσας καταστολής του μεταβολισμού λόγω συγκέντρωσης υποστρώματος. Μετά την αριστοποίηση των συνθηκών ζύμωσης, θα επιλεγεί η καλλιέργεια εκείνη με τα επιθυμητά αποτελέσματα προς κλιμάκωση μεγέθους και ζυμώσεις σε βιοαντιδραστήρα.

Κατά τη δειγματοληψία (μετά τη μέτρηση του pH και της ποσότητας του διαλελυμένου οξυγόνου), θα πραγματοποιηθεί στο μέσο της ζύμωσης διαχωρισμός της παραγόμενης βιομάζας από το υπερκείμενο υγρό με φυγοκέντριση. Θα υπολογιστεί η ποσότητα της βιομάζας με μέθοδο ξηρού βάρους. Από την ξηρή βιομάζα θα πραγματοποιηθεί εκχύλιση, με χρήση διαλύτη, του παραγόμενου ενδοκυτταρικού λίπους και έπειτα θα υπολογισθεί η ποσότητά του μετά την εξάτμιση του διαλύτη. Επίσης, θα μελετηθεί η σύσταση του παραγόμενου λίπους, μέσω της ανάλυσης του προφίλ των λιπαρών οξέων που εμπεριέχονται σε αυτό. Αυτό θα πραγματοποιηθεί μέσω της μεθυλεστεροποίησης των λιπαρών οξέων και της ανάλυσής τους με αέρια χρωματογραφία. Τέλος θα πραγματοποιηθούν και αναλύσεις στο υπερκείμενο υγρό της ζύμωσης με υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης για την εύρεση της κατανάλωσης του υποστρώματος και την παραγωγή τυχόν μεταβολιτών.

Τα σημαντικότερα αποτελέσματα που καταγράφηκαν ήταν η αυξανόμενη συγκέντρωση της βιομάζας συναρτήσει της συγκεντρώσεως του υποστρώματος με την μέγιστη τιμή της να σημειώνεται στην ζύμωση των 110 g/L και ήταν 26,44 g/L. Στον βιοαντιδραστήρα η τιμή της βιομάζας ανήλθε σε 21,64 g/L. Επίσης, η μέγιστη τιμή του λίπους καταγράφηκε στην ζύμωση των 75 g/L και ήταν 3,78 g/L και για τον βιοαντιδραστήρα η συγκέντρωση του λίπους ανερχόταν σε 3,12 g/L. Τέλος, ο ρυθμός παραγωγής βιομάζας ήταν μέγιστος στην ζύμωση των 25 g/L και η τιμή του ήταν  $YX/S = 0,522$  g/L, ενώ ο ρυθμός παραγωγής λίπους γίνεται μέγιστος στη ζύμωση των 75 g/L και η τιμή του είναι  $YL/X = 0,204$  g/L. Για την ζύμωση των 80 g/L στον βιοαντιδραστήρα, οι τιμές του ρυθμού παραγωγής βιομάζας και του ρυθμού παραγωγής λίπους ήταν 0,34 και 0,144, αντίστοιχα.

Το επιστημονικό πεδίο της μεταπτυχιακής διατριβής σχετίζεται με την πραγματοποίηση ζυμώσεων σε λιγνοκυτταρινούχα υποστρώματα και ειδικά με βάση την ξυλόζη. Δηλαδή πρόκειται για μία συνδυαστική εφαρμογή της ενζυμολογίας με τον κλάδο της βιοτεχνολογίας.

Λέξεις κλειδιά αποτελούν οι ακόλουθες: ζυμώσεις, *Cryptococcus curvatus*, λιγνοκυτταρινούχα υποστρώματα, ξυλόζη,

Tags: fermentations, *Cryptococcus curvatus*, lignocellulose substrates, xylose.

## ABSTRACT

Specifically the purpose is to increase the micro-organism in shake flasks (under aseptic conditions) with synthetic substrates increasing concentration xylose (Finding strength limits of the strain / possible suppressing the metabolism of high substrate concentration) and optimization of fermentation conditions. Finally, we performed scaling size of the selected fermentation with the desired results in cultures in bioreactors.

The yeast strain used is *Cryptococcus curvatus* NRRL Y 1511. Initially will grow in cultures in shake flasks under aseptic conditions (in particular pH and temperature), filled with synthetic substrates based on xylose. The initial concentrations of xylose is growing on the grounds both production greater amount unicellular fat and secondly of finding the limit arbitrary suppression of metabolism due to substrate concentration. After the optimization of fermentation conditions, will be selected by culturing the one with the desired effects for scaling size and bioreactor fermentations.

When sampling (after measuring the pH and the amount of dissolved oxygen), will be held in the fermentation medium separation of biomass produced from the supernatant by centrifugation. We will calculate the amount of biomass dry weight method. From the dry biomass extraction performed using solvent, the produced intracellular fat and will then calculate the quantity after evaporation of the solvent. Also, we will study the composition of fat produced by the analysis of fatty acid profiles contained therein. This will be done through the methyl-esterification of fatty acids and their analysis by gas chromatography. Finally we realized and analysis in the supernatant of fermentation by high pressure liquid chromatography to find the consumption of substrate and produce any metabolites.

The most significant results were recorded the increasing concentration of the biomass as a function of substrate concentration with a maximum value can be noted in the fermentation of 110 g / L and was 26,44 g / L. In the bioreactor the value of the biomass was 21,64 g / L. Also, the maximum value of the fat was recorded to the fermentation 75 g / L and it was 3,78 g / L and the concentration of the bioreactor fat amounted to 3,12 g / L. Finally, the biomass production rate was highest in the fermentation of 25 g / L and the price was  $YX / S = 0,522$  g / L, while the fat production rate becomes maximum in the fermentation of 75 g / L and the price is  $YL / X = 0,204$  g / L. For the fermentation of 80 g / L in the bioreactor, the values of the rate of biomass production and fat production rate was 0.34 and 0.144, respectively.



## Κεφάλαιο 1

### 1.Εισαγωγή

#### 1.1. Λιγνοκυτταρινούχα υποστρώματα και ξυλόζη

Στα θρεπτικά μέσα απαντώνται πηγές άνθρακα, νιτρικών, αλλά και άλλων ανόργανων συστατικών. Η πηγή του άνθρακα, αποτελεί την σημαντικότερη για τα θρεπτικά υποστρώματα, αφού συναντάται σε αυτά στις υψηλότερες συγκεντρώσεις. Διάφορα πρωτογενή υλικά που χρησιμοποιούνται ως πηγές άνθρακα, αλλά και κάποιες πρώτες ύλες που αξιοποιούνται ως θρεπτικά μέσα, συντελούν στην παραγωγή προϊόντων, όπως βιοκαύσιμα και άλλα βιολογικά υλικά, μέσω βιομηχανικών ζυμώσεων. Μερικές περιπτώσεις, είναι οι υδατάνθρακες προερχόμενοι από καλλιέργειες πλούσιες σε σάκχαρα ή άμυλο. Επίσης, τα λίπη και τα έλαια αποτελούν μοναδική πηγή άνθρακα, και κάποιες φορές σε συνδυασμό με υδατάνθρακες, αλλά και οι αλκοόλες και άλλα οργανικά συστατικά χρησιμεύουν ως πηγή άνθρακα (Botes, 1999).

Οι λιγνοκυτταρινούχες ύλες, έχουν αποτελέσει τα τελευταία χρόνια, πεδίο έρευνας, αφού είναι άφθονες στο φυσικό περιβάλλον και είναι δυνατή η βιο-αποικοδόμηση τους. Είναι κατάλληλες για την αξιοποίησή τους ως λιγνοκυτταρινούχα υποστρώματα. Τέτοιες είναι, το γρασίδι, το ξύλο και τα γεωργικά και δασικά υπολείμματα (Koutinas *et al*, 2014). Πρέπει να δοθεί ιδιαίτερη έμφαση στα γεωργικά υπολείμματα, των οποίων ο όγκος αυξάνει διαρκώς, με αποτέλεσμα την υποβάθμιση του φυσικού περιβάλλοντος. Όμως, με την αξιοποίησή τους ως πηγών λιγνοκυτταρινούχων υποστρωμάτων, θα συντελέσουν στην παραγωγή προϊόντων για την διατροφή ανθρώπων και ζώων, για την παραγωγή βιοκαυσίμων, καθώς και για την δημιουργία προϊόντων κομποστοποίησης (Leung, 2001).

#### ΞΥΛΟΖΗ

Η ξυλόζη είναι το κυριότερο συστατικό των ημικυτταρινών και το δεύτερο σε αφθονία σάκχαρο μετά την γλυκόζη. Ύστερα από όξινη ή ενζυμική υδρόλυση της ξυλάνης παραλαμβάνεται η ξυλόζη. Η ξυλόζη είναι μία πεντόζη, η δομή της οποίας αποτελείται από 5 άτομα άνθρακα. Κάποιοι μικροοργανισμοί την χρησιμοποιούν ως πηγή άνθρακα. Ο μεταβολισμός της ξυλόζης αποτελείται από διαφορετικά μονοπάτια σε σχέση με αυτά που περιλαμβάνονται στον καταβολισμό της γλυκόζης.

Για τον μεταβολισμό της ξυλόζης, είναι απαραίτητο να χρησιμοποιούνται αερόβιες συνθήκες, όμως οι περισσότερες ζύμες λειτουργούν με την κυτταρική αναπνοή. Η ζύμωση της ξυλόζης για την



παραγωγή αιθανόλης, έχει μικρές αποδόσεις. Μία λύση αποτελεί η μετατροπή της ξυλόζης σε ξυλουλόζη. Ο καταβολισμός της ξυλόζης είναι δύσκολος, αφού ο αριθμός των ζυμών που δύνανται να την καταβολίσουν είναι περιορισμένος.

Η χρήση των γενετικά τροποποιημένων μικροοργανισμών μπορεί να αυξήσει την παραγωγή της αιθανόλης και να ελαττώσει το κόστος της.

Προς το παρόν, τα τροποποιημένα βακτήρια απαιτούν ουδέτερο pH είναι χαρακτηριστικό των περισσότερων ζυμών. Ωστόσο, το ουδέτερο PH, τα χαμηλά επίπεδα παραγωγής αιθανόλης, ο σχηματισμός παραπροϊόντων, το τοξικό περιβάλλον, λόγω της υψηλής συγκέντρωσης αιθανόλης αποτελούν μειονεκτήματα για την εφαρμογή ζυμώσεων σε βιομηχανική κλίμακα.

### **1.1.1. Σύσταση λιγνοκυτταρινούχων υποστρωμάτων**

Η εκατοστιαία σύσταση των λιγνοκυτταρινούχων υποστρωμάτων είναι η ακόλουθη: 10-30% λιγνίνη, 20-40% ημικυτταρίνη και 30-60% κυτταρίνη. Όσον αφορά την λιγνίνη πρόκειται για φαινολικό πολυμερές, ενώ οι κυτταρίνες και οι ημικυτταρίνες, είναι μακρομόρια, αποτελούμενα από διάφορα σάκχαρα. Στις περισσότερες περιπτώσεις είναι άγνωστη η ακριβής σύσταση και δομή των μορίων των ετεροπολυσακχαριτών, αφού αποτελούνται από πλήθος ανόμοιων απλών σακχάρων και σε κάποια εντοπίζεται ένας αριθμός παράγωγων των μονοσακχαριτών

Μεταξύ των κυριότερων ομοπολυσακχαριτών, συγκαταλέγεται και η κυτταρίνη, η οποία είναι ένα ινώδες, δύσκαμπτο και αδιάλυτο μακρομόριο, που βρίσκεται στα κυτταρικά τοιχώματα των φυτών. Αποτελεί δε την κύρια μάζα κάθε ξυλώδους τμήματος των φυτών, αλλά και της κύριας μάζας του ξύλου και μάλιστα υπολογίζεται ότι με την συγκεκριμένη μορφή απαντάται το 50% του άνθρακα της φυτικής βιομάζας του γήινου οικοσυστήματος. Το είδος των γλυκοζιτικών δεσμών, το οποίο απαντάται στο μόριο της κυτταρίνης είναι υπεύθυνο για τις ιδιαίτερες φυσικοχημικές της ιδιότητες. Ως προς την χημική της δομή η κυτταρίνη αποτελεί ένα γραμμικό πολυμερές της γλυκόζης, που τα μονομερή της συνδέονται μεταξύ τους με  $\beta(1-4)$  γλυκοζιτικούς δεσμούς, ενώ το άμυλο και το γλυκογόνο συνδέονται με  $\alpha(1-4)$  δεσμούς. Άρα, οι δομικοί και οι αποταμιευτικοί πολυσακχαρίτες διαφέρουν ως προς το είδος του γλυκοζιτικού δεσμού και όχι ως προς το σάκχαρο που περιέχεται σε αυτούς.

Τα περισσότερα θηλαστικά διαθέτουν τα απαραίτητα ένζυμα για την υδρόλυση των  $\alpha(1-4)$  γλυκοζιτικών δεσμών, όμως δεν μπορούν να υδρολύσουν τους  $\beta(1-4)$  γλυκοζιτικούς δεσμούς, διότι απουσιάζουν τα αντίστοιχα ένζυμα. Άρα, η γλυκόζη που περιέχεται στην κυτταρίνη δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως πηγή ενέργειας, εκτός βέβαια από τους φυτοφάγους οργανισμούς, που

διαθέτουν το ένζυμο κυτταρινάση, το οποίο καταλύει την αντίδραση υδρόλυσης της κυτταρίνης με αποτέλεσμα την παραγωγή γλυκόζης.

Στην κατηγορία των ετεροπολυσακχαριτών ανήκουν οι ημικυτταρίνες, που αποτελούνται από τα μόρια της D-γλυκόζης, D-ξυλόζης, L-αραβινόζης και D-γλυκουρονικού οξέος. Η ομάδα των ημικυτταρινών είναι συστατικά που απαντώνται μεταξύ των κενών που υπάρχουν στην κυτταρίνη μεταξύ των κυτταρικών τοιχωμάτων των φυτών. Το μοριακό τους βάρος είναι μικρότερο σε σχέση με αυτό της κυτταρίνης. Αποτελούνται από μικρές και διακλαδισμένες αλυσίδες, οι οποίες άλλοτε έχουν 5 άτομα άνθρακα (π.χ. ξυλόζη και αραβινόζη), και άλλοτε και 6 άτομα άνθρακα (γαλακτόζη, γλυκόζη και μαννόζη). Ανάλογα με την πηγή προέλευσης τους, οι ημικυτταρίνες με 5 άτομα άνθρακα, προέρχονται από ξυλεία φυλλοβόλων, ενώ η ξυλεία κωνοφόρων αποτελείται από ημικυτταρίνες με 6 άτομα άνθρακα. Η υδρόλυση της κυτταρίνης είναι δυσκολότερη σε σχέση με των ημικυτταρινών .

(Gardini *et al*, 2001).

Η λιγνίνη είναι ένα ετερομερές, αδιάλυτο στο νερό , το οποίο αποτελείται 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 κάλυμα στο κυτταρικό τοίχωμα των φυτικών οργανισμών. Με αυτό τον τρόπο παρέχεται στο κυτταρικό τοίχωμα μηχανική υποστήριξη, αδιαπερατότητα και αντίσταση στις προσβολές από μικροοργανισμούς και στο οξειδωτικό στρες.

### **1.1.2 Δημιουργία λιγνοκυτταρινούχων υποστρωμάτων**

Οι λιγνοκυτταρινούχες ύλες χαρακτηρίζονται από την αντίστασή τους στην υδρόλυση και την ανοικοδόμηση των ενζύμων. Έτσι, πρέπει να πραγματοποιηθούν οι κατάλληλοι χειρισμοί , ώστε να μετατραπούν σε υποστρώματα που δύνανται να αποικοδομηθούν, δηλαδή ακολουθώντας την διαδικασία απομάκρυνσης της λιγνίνης (Li *et al*, 2006). Όμως, πρέπει να αποφευχθεί η ανάκτηση των προϊόντων υδρόλυσης (π.χ. οι αντιδράσεις ανοικοδόμησης των μονοσακχαριτών οδηγούν στο σχηματισμό φουρφουράλης ή 5-υδροξυμεθυλοφουρφουράλης) (Peters, 2007). Η διαδικασία ανάκτησης των λιγνοκυτταρινούχων υλών, περιλαμβάνει μια σειρά ενεργειών:

- 1) προεπεξεργασία (μηχανική, χημική ή βιολογική)
- 2) υδρόλυση των πολυμερών για την παραγωγή αφομοιώσιμων σακχάρων (π.χ εξόζες, πεντόζες)
- 3) χρήση των παραπάνω ενώσεων προς παραγωγή χημικών προϊόντων ή ως υποστρωμάτων ανάπτυξης μικροοργανισμών.
- 4) διαχωρισμός και καθαρισμός

Στη συνέχεια, θα πραγματοποιηθεί η διαδικασία της υδρολύσεως, μέσω της οποίας η κυτταρίνη και οι ημικυτταρίνες γίνονται απλά σάκχαρα με 6 και 5 άτομα άνθρακα, αντίστοιχα.

Η σύσταση του μίγματος των σακχάρων που προκύπτει κατά την υδρόλυση αποτελείται κυρίως από ξυλόζη και γλυκόζη (Matsuo *et al* , 2001).

Η διαδικασία της υδρόλυσης γίνεται με φυσικές χημικές ή και ενζυμικές μεθόδους, οι οποίες συνδυάζονται συνήθως με τις χημικές. Τα προϊόντα της υδρολύσεως αφού υποστούν καθαρισμό, κατόπιν χρησιμοποιούνται στις βιομηχανικές ζυμώσεις ως πηγή άνθρακα.

Οι μύκητες κυρίως αποικοδομούν τις λιγνοκυτταρινούχες ύλες, ιδιαίτερα κατά την φάση ανάπτυξης του μυκελλίου τους. Διαθέτουν δύο είδη εξωκυτταρικών ενζυμικών συστημάτων, το υδρολυτικό, το οποίο με την παραγωγή των υδρολασών, διασπά τους πολυσακχαρίτες και το εξωκυτταρικό και οξειδωτικό, το οποίο λύει τους φαινολικούς δακτυλίους της λιγνίνης (Sanchez, 2009).

Τα υπολείμματα της παραπάνω διαδικασίας, που βρίσκονται σε στερεά μορφή, μπορεί να χρησιμοποιηθούν ως πηγές ενέργειας (Peters, 2007)

Διεργασίες υδρόλυσης λιγνοκυτταρινούχων υλών έχουν εξελιχθεί τα τελευταία χρόνια, ώστε να παραχθούν αφομοιώσιμα σάκχαρα, που θα αξιοποιούνται ως πηγές άνθρακα για τις βιομηχανικές ζυμώσεις. Αυτές που έχουν αναπτυχθεί κυρίως είναι η διεργασία Bergius-Rheinau και η διεργασία Scholler-Tornesch . Παλαιότερα, η ζύμωση ακετόνης-βουτανόλης-αιθανόλης (Acetone-Butanol-Ethanol) αποτελούσε την κύρια μέθοδο για τις βιομηχανικές ζυμώσεις. Χρησιμοποιούνταν τα γεωργικά υπολείμματα, ως πρώτες ύλες και τα προϊόντα ήταν η βουτανόλη και η ακετόνη (Jones, 2001).

### **1.1.3. Χρήση λιγνοκυτταρινούχων υλών**

Όπως προαναφέρθηκε, τα λιγνοκυτταρινούχα υπολείμματα πρέπει να υποστούν κάποιες διεργασίες ώστε να παραχθούν από αυτά προϊόντα υψηλής προστιθέμενης αξίας. Η χρήση τους ως πρώτες ύλες για την παραγωγή αιθανόλης, για τις χαρτοβιομηχανίες, την παραγωγή compost, την καλλιέργεια εδώδιμων μανιταριών και την διατροφή των ζώων είναι μόνο μερικές από τις εφαρμογές τους στην καθημερινή ζωή (Sanchez. 2009).

Η επιστημονική έρευνα για την εύρεση εναλλακτικών πηγών ενέργειας από βιολογικά καύσιμα έχει προκύψει από την διαρκώς αυξανόμενη υποβάθμιση του φυσικού περιβάλλοντος.. Η χρήση της αιθανόλης ως χημική πρώτη ύλη ή και πρόσθετο για βενζίνη, έχει ως αποτέλεσμα την μείωση της εκπομπής αερίων ρύπων, που συμβάλλουν στην καταπολέμηση του φαινομένου του θερμοκηπίου και την ελάττωση της ατμοσφαιρικής ρύπανσης (Mosier *et al*, 2005).

Το κόστος της βιο-αποικοδόμησης της αιθανόλης, τα τελευταία χρόνια, έχει ελαττωθεί σημαντικά με αποτέλεσμα να μην καθίσταται οικονομικά ασύμφορη μέθοδος.

Μία σημαντική εφαρμογή που συντελεί στην παραγωγή προϊόντων εδώδιμων για τον άνθρωπο, αποτελεί η καλλιέργεια μανιταριών. Πολλά λιγνοκυτταρινούχα υπολείμματα μπορούν να αποτελέσουν υποστρώματα ανάπτυξης μανιταριών, όπως τα στάχυα των δημητριακών, τα φύλλα μπανάνας, πολτός από καφέ κτλ. Αξιοσημείωτη είναι η δυνατότητα κάποιων μικροοργανισμών να μετατρέπουν την κυτταρίνη και άλλα σάκχαρα των φυτικών οργανισμών σε πηγές άνθρακα και ενέργειας για τα μηρυκαστικά ζώα, όπως το προπιονικό, το βουτυρικό και το οξικό οξύ (Montet D. *et al*, 1985; Koutinas *et al*, 2014).

Η αξιοποίηση των λιγνοκυτταρινούχων υπολειμμάτων μπορεί να δώσει πολλά χρήσιμα προϊόντα που χρησιμοποιούν ως πηγή άνθρακα την γλυκόζη όπως, οργανικά οξέα, αμινοξέα, βιταμίνες και πλήθος σακχάρων από βακτήρια και μύκητες (ξανθίνες) (Sanchez. 2009). Ακόμα, από την εκμετάλλευση των λιγνοκυτταρινούχων υπολειμμάτων παράγεται το μικροβιακό λίπος και λιπίδια που περιέχουν πολυακόρεστα λιπαρά οξέα, που δεν απαντώνται συχνά στη φύση. το λιπαρό οξύ γ-λινολενικό (GLA) μπορεί να παραχθεί κυρίως από μύκητες, οι οποίοι αναπτυσσόμενοι σε υποστρώματα υψηλής συγκεντρώσεως σε πηγή άνθρακα, συσσωρεύουν λίπος μέσα στο οποίο υπάρχει και το ανωτέρω οξύ. Το ενδιαφέρον για τους οργανισμούς αυτούς εστιάζεται κυρίως στις φαρμακευτικές και διατροφικές ιδιότητες τους, αλλά το κόστος είναι απαγορευτικό για την παραγωγή ενδοκυτταρικού μικροβιακού λίπους. Επομένως, η επιστημονική μελέτη στρέφει το ενδιαφέρον της στην εκμετάλλευση των λιγνοκυτταρινούχων υλών μετά την υδρόλυση στην χρήση αυτών ως υποστρωμάτων ανάπτυξης μικροοργανισμών, που στις κατάλληλες συνθήκες μπορεί να παράγουν και ενδοκυτταρικό λίπος. (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 εκμετάλλευση προϊόντων υδρόλυσης λιγνοκυτταρινούχων υπολειμμάτων (ξυλόζη) προς την παραγωγή μικροβιακού λίπους.

#### **1.1.4 βιολογικά καύσιμα πρώτης γενιάς**

Τα τελευταία χρόνια, εξαιτίας ραγδαίας μείωσης των αποθεμάτων του πετρελαίου και της εξαιρετικά σημαντικής ρύπανσης που προκαλεί στο φυσικό περιβάλλον προβάλλει επιτακτική η ανάγκη εύρεσης λύσεων μέσω εναλλακτικών πηγών ενέργειας. Έτσι, δημιουργήθηκαν τα πρώτα βιολογικά καύσιμα πρώτης γενιάς, που προέρχονται από την επεξεργασία ενεργειακών καλλιεργειών, οι οποίες είναι πλούσιες σε σάκχαρα και κάποιες σε λιπαρά. Αποτέλεσμα των παραπάνω είναι το βιολογικό πετρέλαιο και η βιολογική αιθανόλη.

Στην Ευρώπη ευρείας χρήσεως βιολογικό καύσιμο είναι το βιολογικό πετρέλαιο που παράγεται κυρίως από την Γερμανία και την Γαλλία. Πρόσφατα παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση στην παραγωγικότητα της Λιθουανίας, Πολωνίας και Ρουμανίας

Η μέθοδος παραγωγής βιολογικού πετρελαίου περιλαμβάνει την εστεροποίηση (trans-esterification) των τριγλυκεριδίων των φυτικών ελαίων παρουσία αλκοόλης (συνηθέστερα μεθανόλης ή αιθανόλης), με τελικό προϊόν τους μεθυλεστέρες των λιπαρών οξέων. Η συγκεκριμένη διεργασία τελείται από βιολογικούς καταλύτες, δηλαδή ένζυμα που καλούνται λιπάσες ή και με χημικούς καταλύτες. Τέλος, μπορεί να μην υπάρχει καταλύτης και η αντίδραση να τελείται ταυτόχρονα με εστεροποίηση τριγλυκεριδίων και λιπαρών οξέων (μέθοδος υπερκρίσιμης μεθανόλης) (Saka and Kusdiana, 2001; Papanikolaou and Aggelis, 2011; Papanikolaou, 2009). Από τις ανωτέρω διεργασίες που περιγράφηκαν, προκύπτει ένα υγρό απόβλητο το οποίο είναι πλούσιο σε γλυκερόλη (2-10% κ. ο.). Το υγρό απόβλητο συμπυκνώνεται και καθαρίζεται, προκύπτει ποσότητα καθαρής γλυκερόλης (90% κ. β.) η οποία δίνει από 10 kg ελαίου 1kg βιολογικού πετρελαίου (Mu *et al.*, 2006; Amaral *e.t*)

## **1.2. Βιοχημεία παραγωγής λιπιδίων**

### **1.2.1. Ελαιογόνοι μικροοργανισμοί και μικροβιακό λίπος**

Οι ελαιογόνοι μικροοργανισμοί είναι εκείνοι, οι οποίοι όταν αναπτυχθούν στις κατάλληλες συνθήκες περιβάλλοντος, μπορούν να συσσωρεύουν λίπος εντός των κυττάρων τους, σε ποσοστό μεγαλύτερο από 20% κατά βάρος επί ξηράς ουσίας. Κάποιοι μικροοργανισμοί δύνανται να συσσωρεύουν λίπος εντός των κυττάρων τους της τάξεως του 70% w/w επί της ξηράς τους ουσίας (Ratledge, 2002). Η αξιοποίηση των μικροοργανισμών που παράγουν ενδοκυτταρικό λίπος (oleaginous ή oil-bearing microorganisms) συμβαίνει εδώ και αρκετά χρόνια, όμως η συστηματική μελέτη τους ξεκίνησε σχετικά πρόσφατα, δηλαδή 35 χρόνια. (Aggelis *et al*, 1988; 1990, Ratledge, 1994; 2002, Certik and Shimizu, 1999, Αγγελής, 2007). Εξαιτίας της περιεκτικότητάς τους σε λιπαρά οξέα, τα οποία σπάνια συναντώνται στη φύση, μικροβιακών ή μονοκυτταρικών λιπιδίων (microbial oils ή single cell oils).

Το μεγαλύτερο μέρος των μικροβιακών αποθησαυριστικών λιπιδίων αποτελείται από τριγλυκερίδια, που είναι της τάξεως του 55-80% (w/w) επί της συνολικής ποσότητας κυτταρικού λίπους (Papanikolaou *et al*, 2001, Fakas *et al*, 2006, 2007). Τα μικροβιακά τριγλυκερίδια είναι φυτικού τύπου. (Ratledge, 1994, Ratledge, 2004).

Οι μύκητες και οι ζύμες είναι υπεύθυνοι για την παραγωγή μικροβιακών ελαίων πλούσιων σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα. Ειδικότερα, στους Ζυγομύκητες που ανήκουν στην τάξη των *Mucorales* έχει εστιαστεί το ερευνητικό ενδιαφέρον, προκειμένου να επιτευχθεί η παραγωγή απαραίτητων λιπαρών οξέων (Certik and Shimizu, 1999, Dyal and Narine, 2005). Τα μικροβιακά έλαια προσελκύουν το ερευνητικό ενδιαφέρον διότι τείνουν 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. Η σύνθεση των μικροβιακών λιπών εξαρτάται από γενετικούς και περιβαλλοντικούς παράγοντες ελαιογόνων μικροοργανισμών.

### 1.2.2. Συσσώρευση λιπιδίων “De novo”

Η “de novo” βιοσύνθεση λιπιδίων και η συσσώρευση τους στους ελαιογόνους μικροοργανισμούς, λαμβάνει χώρα μετά την εξάντληση του αζώτου και σε θρεπτικό μέσο όπου ο άνθρακας είναι σε περίσσεια, άρα αποτελεί δευτερογενή μεταβολική διεργασία. Αφού το άζωτο καταναλωθεί πλήρως, η πηγή άνθρακα μεταβολίζεται από τους ελαιογόνους μικροοργανισμούς και μετατρέπεται σε TAG’s που συσσωρεύονται ενδοκυτταρικά. 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).

Όταν εξαντληθεί η πηγή του αζώτου του θρεπτικού μέσου από το μικροοργανισμό πραγματοποιείται μια σειρά αντιδράσεων με αποτέλεσμα το σχηματισμό του Acetyl-CoA. Με την κατανάλωση της πηγής του αζώτου, προκαλείται η ενεργοποίηση του ενζύμου AMP-απαμινάση, με αποτέλεσμα την ελάττωση της συγκέντρωσης της AMP στο κύτταρο την παρεμπόδιση της δράσης του ενζύμου ισοκιτρική αφυδρογονάση. Αυτό έχει ως συνέπεια την συσσώρευση στο μιτοχόνδριο του κιτρικού οξέος, αφού δεν μπορεί να μεταβολιστεί. Ακολουθεί, η είσοδος του κιτρικού οξέος στο κυτταρόπλασμα και η διάσπαση του από την ATP:κιτρική λυάση (ATP-CL) σε Acetyl-CoA και οξαλοξικό οξύ. Στη συνέχεια, το Acetyl-CoA χρησιμοποιείται ως πρόδρομος για την βιοσύνθεση των λιπαρών οξέων, ενώ το οξαλοξικό οξύ μετατρέπεται μέσω της αφυδρογονάσης του μηλικού οξέος σε μηλικό, το οποίο στη συνέχεια εισέρχεται στον κύκλο κιτρικού/μηλικού οξέος. Η αντίδραση που λαμβάνει χώρα είναι η εξής: **Κιτρικό οξύ + CoA + ATP → CH<sub>3</sub>COSCoA + οξαλοξικό οξύ + ADP + Pi**

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 : **Μηλικό οξύ + NADP+ πυροσταφυλικό + CO<sub>2</sub> + NADPH**

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).

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

### 1.2.3. Συσσώρευση λιπιδίων "Ex novo"

Η συσσώρευση λιπιδίων δεν εξαρτάται από την πηγή του αζώτου και πραγματοποιείται ταυτοχρόνως με την κυτταρική αύξηση, όταν κατά την καλλιέργεια ενός μικροοργανισμού χρησιμοποιείται ως πηγή άνθρακα κάποιο υδρόφοβο συστατικό (π.χ λιπαρή ύλη, n-αλκάνια). Τα εξωκυτταρικά λιπαρά οξέα αφού ενσωματωθούν ενδοκυτταρικά μπορούν να ακολουθήσουν τις εξής διεργασίες: την πλήρη αποικοδόμηση τους προς Acetyl-CoA και την είσοδο τους στον κύκλο του Krebs, είτε την μερική αποικοδόμηση τους προς σχηματισμό οργανικών ενδιάμεσων ενώσεων (αμινοξέα, οργανικά οξέα, μόρια ενδιάμεσης σύνθεσης νουκλεοξέων), ή τη αποθήκευσή τους εντός σταγονιδίων λίπους στο εσωτερικό των κυττάρων. Η διεργασία της βιοτροποποίησης του υδρόφοβου υποστρώματος παρουσιάζει ενδιαφέρον, αφού τα λιπαρά οξέα ή αλκάνια του υποστρώματος αφομοιώνονται από τα κύτταρα. Επομένως, παρατηρείται πιθανότατα τροποποίηση της σύστασης του υποστρώματος 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). 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) (Paranikolaou and Aggelis 2003b).

Στους οργανισμούς, τα πρώτα λιπαρά οξέα που σχηματίζονται είναι το παλμιτικό και το στεατικό οξύ. Αυτά τα κορεσμένα λιπαρά οξέα μέσω της δράσης ενζύμων όπως ελονγκασών και αποκορεσμάσων, τροποποιούνται για να προκύψουν τελικά τα διάφορα ακόρεστα και πολυακόρεστα λιπαρά οξέα μεγάλης αλειφατικής αλυσίδας. Οι συγκεντρώσεις των λιπαρών οξέων εξαρτώνται, 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. Έτσι, 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 διακρίνονται σε κορεσμένα και σε ακόρεστα λιπαρά οξέα. Η διαφοροποίηση τους συνίσταται στην φύση της ανθρακικής αλυσίδας τους. Έτσι, τα κορεσμένα λιπαρά οξέα, έχουν μόνο απλούς δεσμούς στο μόριο τους, ενώ τα ακόρεστα έχουν τουλάχιστον έναν διπλό δεσμό. Περαιτέρω, τα ακόρεστα λιπαρά οξέα διακρίνονται σε μονοακόρεστα και σε πολυακόρεστα. Η διάκριση τους γίνεται με βάση τον αριθμό των διπλών δεσμών, δηλαδή τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα διαθέτουν περισσότερους από έναν διπλό δεσμό, ενώ τα μονοακόρεστα μόνο έναν..

Η πλειονότητα των λιπαρών οξέων μπορεί να συντεθεί *de novo* από τον ανθρώπινο οργανισμό, όμως υπάρχει μια κατηγορία πολυακόρεστων λιπαρών οξέων, τα απαραίτητα λιπαρά οξέα (Essential Fatty Acids-EFAs), τα οποία δεν δύναται να παραχθούν *de novo* από τον ανθρώπινο οργανισμό. Τα απαραίτητα λιπαρά οξέα (EFAs) ανάλογα με τη θέση του τελευταίου διπλού δεσμού σε σχέση με την τελική μεθυλική ομάδα καθορίζουν εάν ανήκουν στην ω-3 ομάδα (λινολενικός τύπος) ή στην ω-6 ομάδα (λινελαϊκός τύπος). Η ομάδα ω-6 συντίθεται από το λινελαϊκό οξύ (C18:2. ω-6) και η ω-



3 ομάδα από το  $\alpha$ -λινολενικό οξύ (C18:3,  $\omega$ -3). Το λινελαϊκό και το  $\alpha$ -λινολενικό οξύ ανήκουν στα απαραίτητα λιπαρά οξέα (EFAs), τα οποία δεν συντίθενται *de novo* από τον άνθρωπο, αλλά παράγονται από τους φυτικούς οργανισμούς και η πρόσληψη τους από τον άνθρωπο γίνεται μέσω της κατανάλωσης τους ως τροφής.

Το λινελαϊκό οξύ (C18:2,  $\omega$ -6) και το  $\alpha$ -λινολενικό οξύ (C18:3,  $\omega$ -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). Η σύνθεση των μακρομοριακών πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (LC-PUFAs) από τα απαραίτητα λιπαρά οξέα, συμβαίνει μόνο στα ζωικά κύτταρα, και όχι στα φυτικά κύτταρα. Επομένως, το ζωικό λίπος και ιδιαίτερα το ιχθυέλαιο αποτελεί κύρια πηγή παραγωγής μακρομοριακών πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (LC-PUFAs). Η ρευστότητα των μεμβρανών και άλλες λειτουργίες της ρυθμίζονται από τα μακρομοριακά πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (LC-PUFAs) που προέρχονται τόσο από την ομάδα  $\omega$ -3 όσο και από την ομάδα  $\omega$ -6. Το  $\gamma$ -λινολενικό οξύ (GLA, C18:3,  $\omega$ -6) και το αραχιδονικό οξύ (ARA, C20:4,  $\omega$ -6), παράγονται από το λινελαϊκό οξύ (C18:2,  $\omega$ -6) ενώ το  $\alpha$ -λινολενικό οξύ (C18:3,  $\omega$ -3) είναι υπεύθυνο για την παραγωγή του εικοσιδυοεξανοϊκού οξέος (DHA, C22:6,  $\omega$ -3) και του εικοσιπεντενοϊκού οξέος (EPA, C20:5,  $\omega$ -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,  $\omega$ -6) και το διομο- $\gamma$ -λινολενικό οξύ (C20:3,  $\omega$ -6) είναι προάγγελοι της  $\omega$ -6 ομάδας για τη σύνθεση των προσταγλανδινών, ενώ το εικοσιπεντενοϊκό οξύ (C20:5,  $\omega$ -3) αποτελεί πρόδρομη ένωση της ομάδας  $\omega$ -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) θεωρούνται σημαντικά για τη διατροφή του ανθρώπου. Οι κύριες πηγές των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων με 18 άτομα C (CIS PUFAs) είναι οι σπόροι κάποιων φυτών με μεγάλη περιεκτικότητα σε λινελαϊκό οξύ (C18:2,  $\omega$ -6) και σε  $\alpha$ -λινολενικό οξύ (C18:3,  $\omega$ -3). Ωστόσο, τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFAs) με περισσότερα από 18 άτομα C στο μόριο τους εξαιτίας της απουσίας των απαραίτητων ενζύμων δεν δύναται να παραχθούν από τα ανώτερα φυτικά είδη (Certik and Shimizu, 1999). Το λίπος των ψαριών χαρακτηρίζεται από την υψηλή περιεκτικότητά του σε λιπαρά οξέα της ομάδας  $\omega$ -3, όπως το εικοσιπεντανοϊκό οξύ (EPA, C20:5,  $\omega$ -3) και το εικοσιδυοεξανοϊκό οξύ (DHA, C22:6,  $\omega$ -3). Ως

γνωστόν, τα λιπίδια σε υψηλές συγκεντρώσεις, είναι επιζήμια για την ανθρώπινη υγεία, όμως όταν λαμβάνονται στις κατάλληλες ποσότητες είναι ωφέλιμα. Τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα συμβάλλουν στη ρύθμιση της δομής, της δυναμικής και της διαπερατότητας των μεμβρανών, ελέγχουν την έκφραση διαφόρων γονιδίων επηρεάζοντας διάφορες διεργασίες, όπως τη βιοσύνθεση των λιπαρών οξέων και τη μεταφορά της χοληστερόλης στο ανθρώπινο σώμα. Τα ακόρεστα λιπαρά οξέα λειτουργούν ως πρόδρομες ενώσεις για τη σύνθεση διαφόρων μεταβολιτών-ορμονών (προσταγλανδίνες, υδροξυ-λιπαρά οξέα και εικοσανοειδή) που ρυθμίζουν σημαντικές βιολογικές λειτουργίες (Certik and Shimizu, 1999). Μία δίαιτα φτωχή σε λιπίδια μπορεί να επιφέρει πλήθος προβλημάτων στην ανθρώπινη υγεία.

Πλήθος ερευνών έχουν αποδείξει την σπουδαιότητα μιας δίαιτας πλούσιας σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα της ομάδας ω-3, αφού συμβάλλει στην πρόληψη από σοβαρές ασθένειες, όπως έμφραγμα του μυοκαρδίου και βρογχικό άσθμα. Αλλά και μπορεί να έχει ευεργετική επίδραση σε ασθένειες όπως η ψωρίαση, οι νοητικές ασθένειες και η ρευματοειδής αρθρίτιδα (Rubio-Rodriguez).

### **1.3 Αξιοποίηση των μικροοργανισμών στην Τεχνολογία αειφόρου ανάπτυξης**

Τα απόβλητα βιομηχανιών, καθώς και τα αγροτογεωργικά υπολείμματα, εκτός της απορρύπανσης που υφίστανται παράγουν και ένα πλήθος χρήσιμων προϊόντων, τα οποία προκύπτουν από την καλλιέργεια των μικροοργανισμών με χρήση υποστρωμάτων ανάπτυξης τα ανωτέρω απόβλητα με απώτερο σκοπό την αξιοποίηση των μεταβολικών τους προϊόντων, 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). Επίσης, οι μικροοργανισμοί, δύνανται να παράξουν ένα βιοκαύσιμο, ευρέως διαδεδομένο και ως βιολογικό πετρέλαιο (biodiesel), καθώς και εδαφοβελτιωτικά, μέσω της μεθόδου της θερμόφιλης βιοαποικοδόμησης, μέσω της καλλιέργειας αυτών στα απόβλητα και παραπροϊόντα των βιομηχανιών.

#### **1.3.1 Η συσσώρευση του μικροβιακού λίπους σε κατάλληλα ανανεώσιμα υποστρώματα.**

Υπάρχει μία διάκριση υδρόφιλων και υδρόφοβων υποστρωμάτων. Αυτά, τα λεγόμενα και ανανεώσιμα υποστρώματα, χρησιμοποιούνται ως πηγές άνθρακα από τους ελαιογόνους μικροοργανισμούς (Certik and Shimon, 1999, Fakas *et al*, 2006, 2007, 2008, Αγγελής, 2007).

Στα λεγόμενα υδρόφιλα υποστρώματα συμπεριλαμβάνονται τα σακχαρούχα υποστρώματα, δηλαδή όσα είναι πλούσια σε σάκχαρα, όπως τυρόγαλα, μελάσες ζαχαροκάλαμου, αλλά και διάφορα αμυλούχα απόβλητα, όπως και η βιομηχανική γλυκερόλη (Papanikolaou and Aggelis, 2002).

Στα υδρόφοβα υποστρώματα, κατατάσσονται τα ζωικά λίπη, το έλαιο ελαιοκράμβης και βιομηχανικά λιπαρά υπολείμματα, όπως σάπωνες και στεαρίνες. Ακόμα, χρησιμοποιούνταν ως υδρόφοβα υποστρώματα, υγροί υδρογονάνθρακες, των οποίων η χρήση σταδιακά εγκαταλείφθηκε, λόγω της παρουσίασης διαφόρων προβλημάτων.

Αξιοσημείωτες είναι οι βιοχημικές διαφορές κατά την βιοσύνθεση του λίπους, ανάλογα με το χρησιμοποιούμενο υπόστρωμα. Έτσι, στην περίπτωση που χρησιμοποιούνται ως μοναδική πηγή άνθρακα τα σακχαρούχα υποστρώματα, τότε η έναρξη της παραγωγής του μικροβιακού λίπους, γίνεται μετά την εξάντληση της πηγής του αζώτου στο θρεπτικό μέσο.

Ενώ, στα υδρόφοβα υποστρώματα, που ως κύρια πηγή άνθρακα θεωρούνται οι περιεχόμενες λιπαρές ύλες, η σύνθεση του μικροβιακού λίπους πραγματοποιείται ανεξάρτητα από την πηγή του αζώτου και είναι ταυτόχρονη με την κυτταρική αύξηση (Papanikolaou *et al*, 2001, 2002. Papanikolaou and Aggelis, 2002, Papanikolaou and Aggelis, 2010; 2011a; 2011b). Στα κυτταρινούχα υλικά ή την μεθανόλη δεν συμβαίνει παραγωγή ενδοκυτταρικού λίπους.

Τα λιγνοκυτταρινούχα σάκχαρα αποτελούν μια πρώτη ύλη χαμηλής αξίας, η οποία βρίσκεται σε αφθονία στη φύση και μπορεί να αποτελέσει εν δυνάμει υπόστρωμα μικροβιακών ζυμώσεων για την παραγωγή διαφόρων μεταβολικών προϊόντων. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζεται στα μικροβιακά λιπίδια (ειδικά δε σε εκείνα που παράγονται από μικροοργανισμούς που έχουν αυξηθεί σε χαμηλής αξίας υποστρώματα), καθώς μπορούν να παρουσιάσουν σύσταση παρόμοια με εκείνη διαφόρων «εξωτικών» λιπών (π.χ. βούτυρο του κακάο) που δεν απαντώνται σε μεγάλη ποσότητα στη φύση και έχουν υψηλή προστιθέμενη αξία. Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η αύξηση ενός στελέχους του ζυμομύκητα *Cryptococcus curvatus* σε συνθετικά υποστρώματα με πηγή άνθρακα την ξυλόζη για την παραγωγή βιομάζας και κατ'επέκταση ενδοκυτταρικού λίπους σε υψηλές συγκεντρώσεις. Το λίπος αυτό ενδέχεται να έχει σύσταση κατάλληλη για την παραγωγή βιοντήζελ ή/και για να χρησιμοποιηθεί στη βιομηχανία τροφίμων και στη φαρμακευτική.

#### **1.4. Σκοπός της πτυχιακής**

Σκοπός της παρούσας ερευνητικής μελέτης είναι η καλλιέργεια του μικροοργανισμού *Cryptococcus curvatus* σε ανανεώσιμα λιγνοκυτταρινούχα υποστρώματα (ξυλόζη), που αποτελεί βασική πηγή άνθρακα, με απώτερο σκοπό την παραγωγή μικροβιακού λίπους, που θα χρησιμοποιηθεί για την βιομηχανία τροφίμων και φαρμάκων, αλλά και την παραγωγή βιολογικών καυσίμων (βιοντήζελ).

## Κεφάλαιο 2

### 2.Υλικά και μέθοδοι

#### 2.1 Βιολογικό υλικό

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν στέλεχος του ζυμομύκητα *Cryptococcus curvatus* ATCC . 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.). 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 ( $50 \pm 1$  mL) με θρεπτικό μέσο. Για τη διεξαγωγή των πειραμάτων, χρησιμοποιήθηκε στα θρεπτικά υποστρώματα ξυλόζη.

Απαραίτητα στοιχεία για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών αποτελούν ο άνθρακας, το άζωτο, το οξυγόνο καθώς και ένας σημαντικός αριθμός μεταλλικών αλάτων. Ως πηγή άνθρακα χρησιμοποιήθηκε η ξυλόζη. 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).

Για τη διεξαγωγή των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκε ξυλόζη σε συγκέντρωση 25, 75 και 110 g/L και μετά την προσθήκη των αλάτων που προαναφέρθηκαν. 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  $50 \pm 1$  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 χρησιμοποιούμενου ζυμομύκητα. Η ποσότητα του εμβολίου για κάθε

φιάλη (1 mL), αντιστοιχούσε σε 105-107 cfu. Μετά τον εμβολιασμό, οι φιάλες τοποθετούνταν σε ανακινούμενο επωαστικό κλίβανο (New Brunswick Sc USA), στις 180 στροφές ανά λεπτό και θερμοκρασία  $T=28^{\circ}\text{C}$ .

### **2.3 Συνθήκες καλλιέργειας και ανάπτυξης**

Οι συνθήκες είναι αυτές που προαναφέραμε, να σημειωθεί ότι το θρεπτικό μέσο ανάπτυξης της ζύμης ήταν ίδιο τόσο στους δοκιμαστικούς σωλήνες όσο και στην προκαλλιέργεια. Πιο συγκεκριμένα 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. Οι προκαλλιέργειες τοποθετήθηκαν σε ανακινούμενο επωαστικό κλίβανο (New Brunswick Sc, Usa; 180 rpm) , σε θερμοκρασία 28 οC.

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).

### **2.4 Χημικές αναλύσεις**

#### **2.4.1 Προσδιορισμός pH**

Το pH της καλλιέργειας μετρήθηκε με pH-μετρο τύπου Hanna Instruments Hi 2211 pH meter. Το pH στο θρεπτικό έπρεπε να κυμαίνεται στο εύρος τιμών 5,0 – 6,0.

#### **2.4.2 Συλλογή βιομάζας**

Η βιομάζα συλλέγονταν με φυγοκέντρηση σε φυγόκεντρο τύπου Heraeus Sepatech Suprafuge 320 (10000 rpm, 10 min, 4oC). 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 ( $90\pm 5^{\circ}\text{C}$ ) 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.

#### **2.4.3 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<sub>3</sub>) – μεθανόλης (CH<sub>3</sub>OH) 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 40 εξάτμισης. Έπειτα χρησιμοποιήθηκε περιστροφικός εξάτμιστήρας (Büchi rotavapor R-114) για την απομάκρυνση των διαλυτών. Στη φιάλη εξάτμισης παρέμενε το μικροβιακό λίπος το οποίο ζυγίζοταν και εκφραζόταν σε g ανά 1 g ξηράς μάζας ή/και σε g ανά L καλλιέργειας.

#### **2.4.4 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 (CH<sub>3</sub>O-Na<sup>+</sup>) που περιείχε 1% μεταλλικό νάτριο σε μίγμα μεθανόλης και βενζολίου σε αναλογία 70:30 και μια μικρή ποσότητα φαινολοφθαλεΐνης, υδροχλωρική μεθανόλη (20 mL ακετυλοχλωρίδιο σε 250 mL μεθανόλης), κανονικό (ν- εξάνιο και άνυδρο θειϊκό νάτριο (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>).

## 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 (CH<sub>3</sub>OH - 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 εξανίου. 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 εξανίου (Εικόνα 2.7). Η τυχόν εναπομένουσα ποσότητα νερού απομακρύνθηκε με προσθήκη άνυδρου θειικού νατρίου.

### 2.4.5 Ανάλυση στον αέριο χρωματογράφο

Για τις αναλύσεις στον αέριο χρωματογράφο (8000 series FISONs) πραγματοποιούνταν έκχυση 1 μL από το διάλυμα των μεθυλεστερών, 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 0C
- Θερμοκρασία ανιχνευτή
- Φέρον αέριο He (ροή 1.38 mL/min) , H<sub>2</sub> (60 kPa) O<sub>2</sub> (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 0C για 20 min. Η ταυτοποίηση των λιπαρών οξέων πραγματοποιήθηκε με βάση το χρόνο κατακράτησης των αντίστοιχων μεθυλεστερών τους. Από το εμβαδόν της κάθε κορυφής προέκυπτε το ποσοστό του κάθε λιπαρού οξέος επί συνόλου λιπαρών οξέων.

#### **2.4.6 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 οC 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, 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) του στελέχους *Cryptococcus curvatus* ATCC NRLL Y 1511 κατά την ανάπτυξή του σε υπόστρωμα με βάση την ξυλόζη. Ο τεχνολογικός και, εν δυνάμει, βιομηχανικός στόχος της εργασίας ήταν η μελέτη των διεργασιών ζύμωσης για παραγωγή λιπιδίων, κυτταρικής μάζας αξιοποιώντας τα σε βιομηχανική κλίμακα. Ως πηγή άνθρακα χρησιμοποιήθηκε η ξυλόζη σε συγκεντρώση 25,75 και 110 g/L. Οι καλλιέργειες πραγματοποιήθηκαν σε ζυμώσεις βυθού και έλαβαν χώρα κάτω από αερόβιες συνθήκες (αναδεδυόμενες κωνικές φιάλες). Οι καλλιέργειες πραγματοποιήθηκαν σε περιοριστικές σε άζωτο συνθήκες (nitrogen-limited). Οι κωνικές με το θρεπτικό υπόστρωμα αποστειρώνονταν σε αυτόκλειστο (115 oC, για 30 min). Για το στέλεχος που χρησιμοποιήθηκε επιλέχθηκε εκείνο που έδωσε τα καλύτερα αποτελέσματα, όσον αφορά την παραγωγή λίπους, βιομάζας και ενδοπολυσακχαριτών στο 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 (YX/S), η παραγωγή ενδοκυτταρικού λίπους (L), ο συντελεστής παραχθέντος λίπους σε σχέση με την παραγόμενη βιομάζα (YL/X), και η παραγωγή ενδοπολυσακχαριτών (IPS) καθώς και η % περιεκτικότητας τους στην παραγόμενη βιομάζα. Περαιτέρω μελετήθηκε η σύσταση σε λιπαρά οξέα του μικροβιακού λίπους.

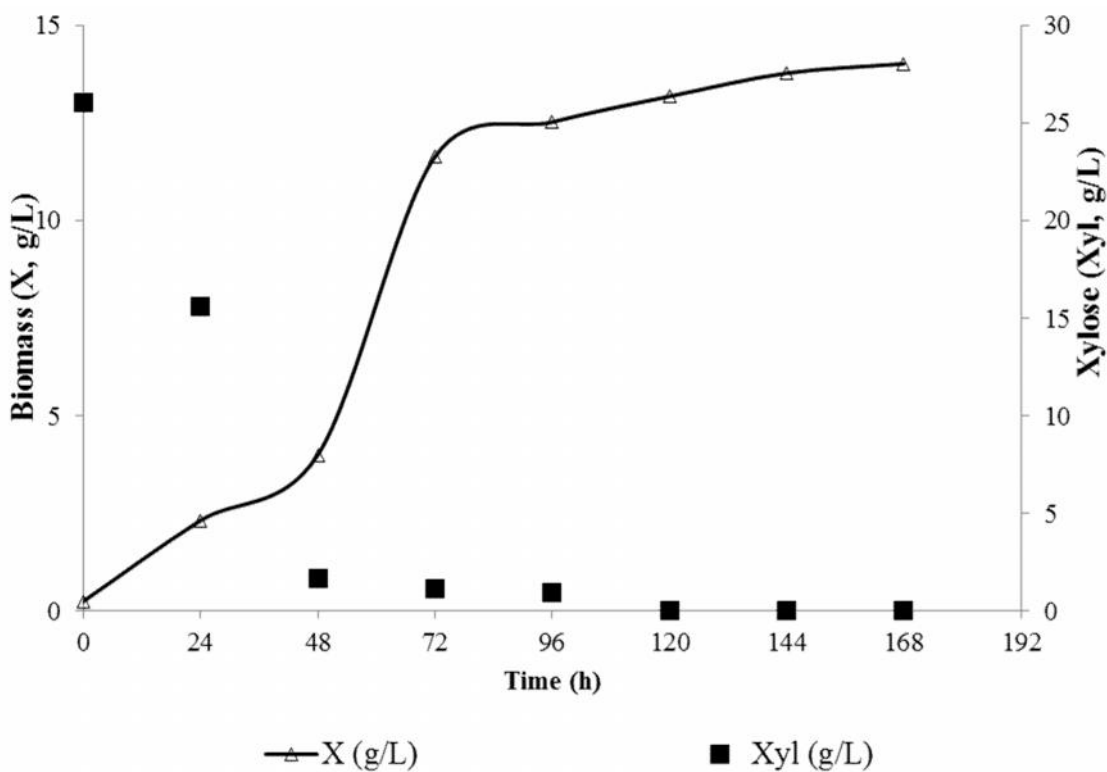
Αρχικά μελετήθηκαν τα παραπάνω σε θρεπτικό υπόστρωμα που είχε ως πηγή άνθρακα την ξυλόζη σε αρχική συγκέντρωση 25 g/L.

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

	Xylose <sub>0</sub> (g/L)	Fermentation time (h)	X (g/L)	L (g/L)	IPS (g/L)	Xylose <sub>cons</sub> (g/L)	Y <sub>X/xylose</sub> (g/L)	Y <sub>L/X</sub> (g/L)	IPS (g/g)
Φιάλες	~25	168 <sup>a</sup>	14,02	1,44	5,17	26,84	0,522	0,103	0,369
		96 <sup>b</sup>	12,53	1,64	4,78	26,84	0,467	0,131	0,382
		144 <sup>c</sup>	13,78	1,48	5,27	26,84	0,513	0,107	0,382
	~75	312 <sup>a</sup>	19,42	3,44	5,77	75,30	0,258	0,177	0,297
		216 <sup>bc</sup>	18,52	3,78	7,10	58,51	0,317	0,204	0,384
	~110	168 <sup>ab</sup>	26,44	3,24	6,11	66,02	0,400	0,123	0,231
144 <sup>c</sup>		24,63	2,86	7,06	67,70	0,364	0,116	0,287	
Βιοαντιδραστήρας	~80	189 <sup>ab</sup>	21,64	3,12	*	62,98	0,34	0,144	*

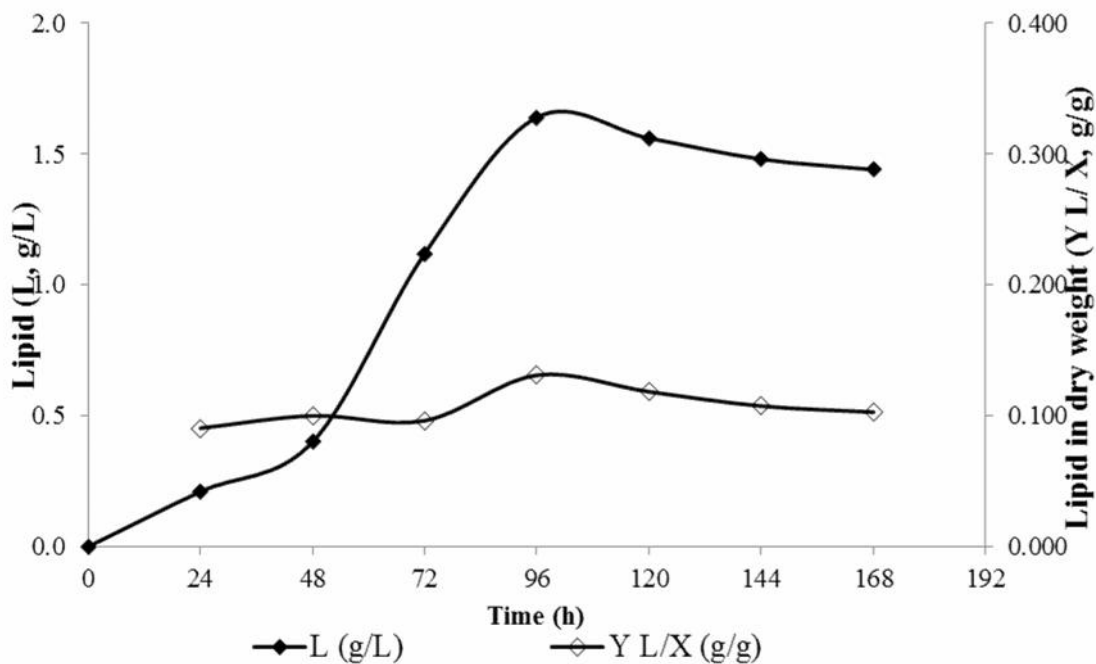
Πίνακας 1. Παρουσίαση αποτελεσμάτων ζυμώσεων σε φιάλες και βιοαντιδραστήρα.

Στον ανωτέρω πίνακα παρατηρείται ότι στην ζύμωση που πραγματοποιήθηκε με βάση το υπόστρωμα ξυλόζης των 25 g/L, τα αντίστοιχα αποτελέσματα όσον αφορά τις τιμές της βιομάζας που παράχθηκε ήταν η μέγιστη τιμή της συγκεντρώσεως της που ανέρχεται σε 14.02 g/L, στις 168 h της ζυμώσεως. Αυτό φαίνεται στο παρακάτω σχήμα.



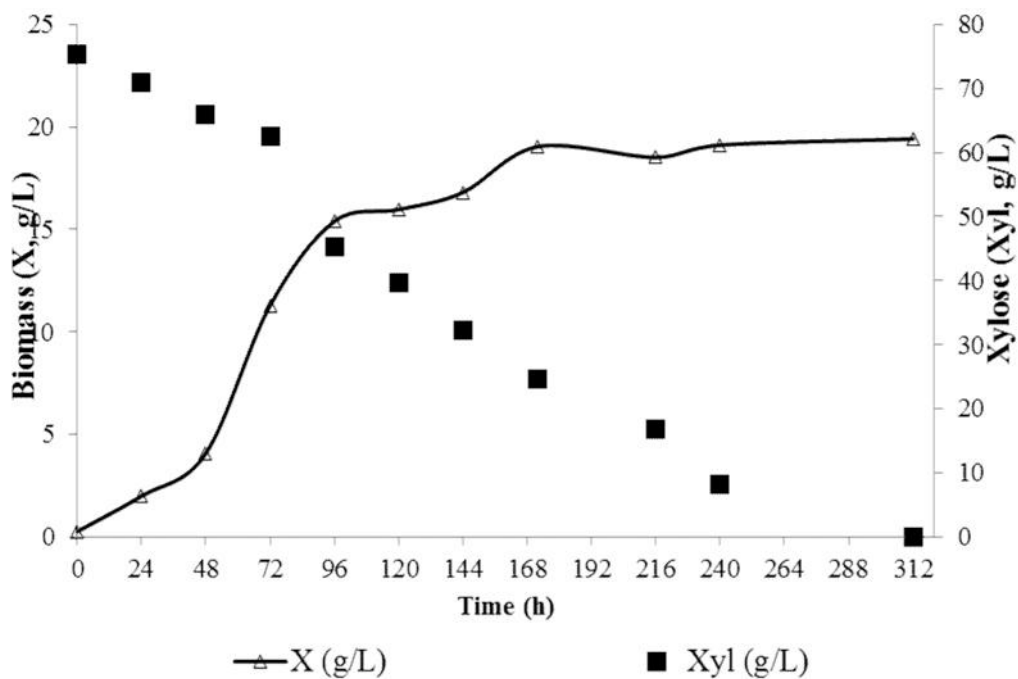
Γράφημα 1. Παρουσίαση της πορείας της βιομάζας στη ζύμωση των 25g/L συναρτήσει του χρόνου και της κατανάλωσης της ξυλόζης.

Αντίστοιχα, όσον αφορά τις τιμές συγκεντρώσεως του λίπους, όπως αυτές καταγράφονται στον ανωτέρω πίνακα και παρουσιάζονται στο παρακάτω σχήμα, καταλήγει η μέγιστη συγκέντρωση του λίπους να παρατηρείται στην τιμή των 12.53 g/L, η οποία εμφανίζεται στις 96 h στον χρόνο της ζυμώσεως. Επίσης, ο ρυθμός παραγωγής λίπους ως προς το υπόστρωμα ανέρχεται στην τιμή της συγκεντρώσεως των 0.131 g/L, που εμφανίζεται στο χρόνο της ζυμώσεως των 96 h.



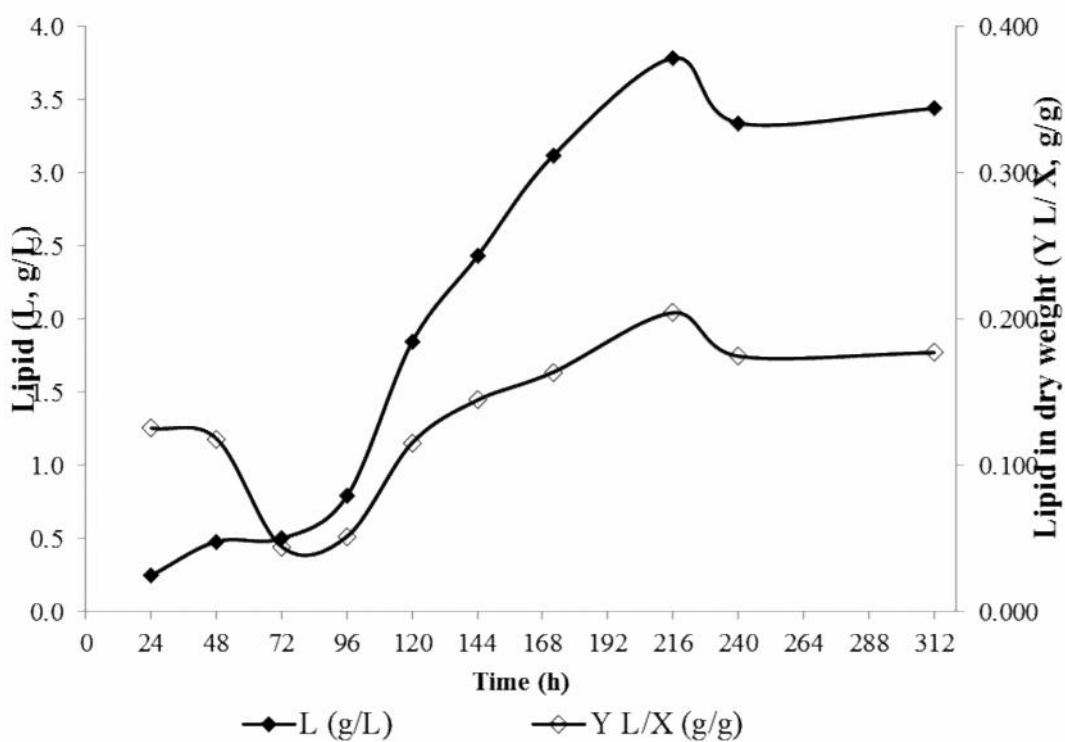
Γράφημα 2. Παρουσίαση της συγκεντρώσεως του λίπους και του ρυθμού παραγωγής λίπους συναρτήσει του χρόνου της ζυμώσεως των 25g/L.

Συνεχίζοντας, στην ζύμωση των 75 g/L με βάση το υπόστρωμα της ξυλόζης, παρατηρείται η διακύμανση των τιμών της βιομάζας, που καταλήγει στην μέγιστη συγκέντρωση της σε 19.42 g/L, σε χρόνο ζυμώσεως σε χρόνο ζυμώσεως που αντιστοιχεί σε 312 h.



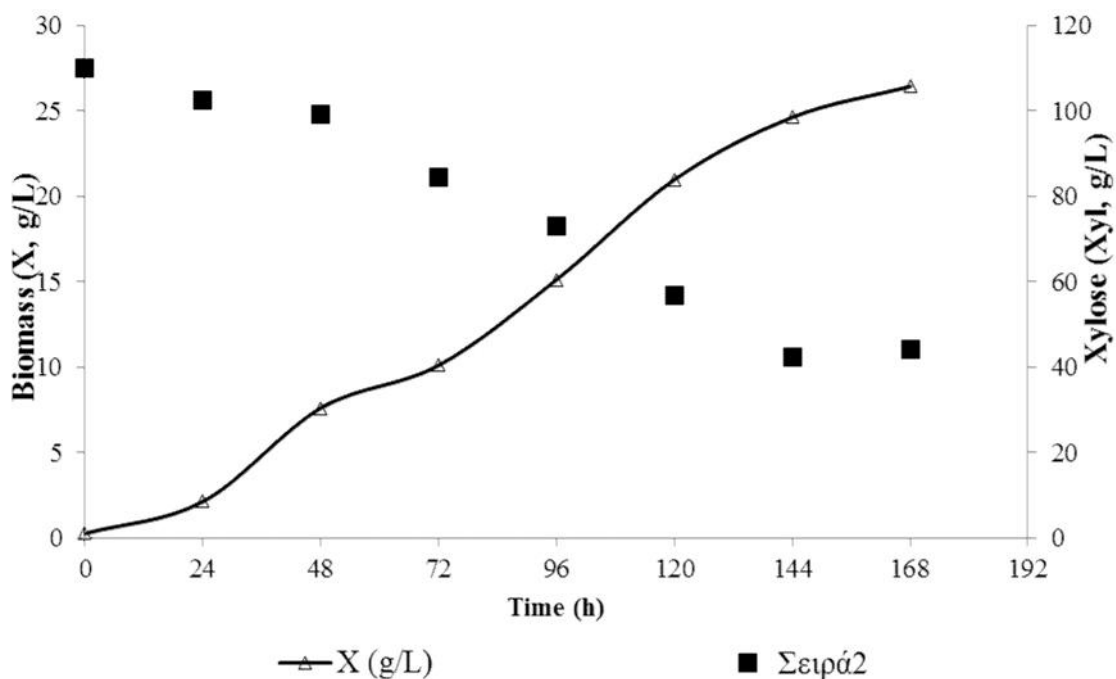
Γράφημα 3. Παρουσίαση της πορείας της βιομάζας συναρτήσει του χρόνου και της κατανάλωσης του υποστρώματος της ξυλόζης στη ζύμωση των 75g/L.

Για τις μετρήσεις του λίπους, αναφέρεται η μέγιστη τιμή συγκεντρώσεως σε 3.78 g/L, σε χρόνο ζυμώσεως 216 h, ενώ ο ρυθμός παραγωγής λίπους ως προς το υπόστρωμα αναφέρεται σε 0.204 g/L και σε χρόνο ζυμώσεως που αντιστοιχεί σε 216 h.



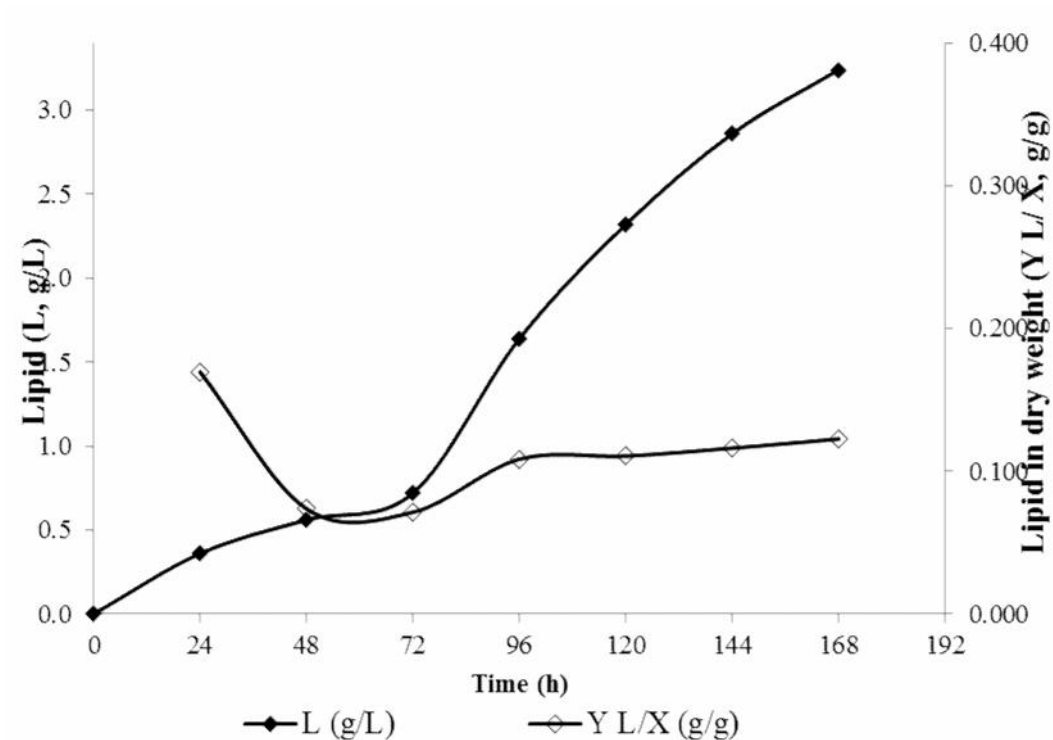
Γράφημα 4. Παρουσίαση της συγκεντρώσεως του λίπους και του ρυθμού παραγωγής του συναρτήσει του χρόνου της ζυμώσεως των 75g/L.

Τελευταία σειρά πειραμάτων σε φιάλες , πραγματοποιήθηκε σε ζύμωση με συγκέντρωση 110 g/L με υπόστρωμα ξυλόζη. Η καταμέτρηση της βιομάζας απεικονίζεται στο κατωτέρο διάγραμμα, όπου αναγράφονται οι τιμές συγκεντρώσεως της βιομάζας, με κορύφωση της σε συγκέντρωση 26.44 g/L και σε χρόνο ζυμώσεως 168 h.



Γράφημα 5. Παρουσίαση της πορείας της συγκεντρώσεως της βιομάζας συναρτήσει της κατανάλωσης του υποστρώματος ξυλόζης και του χρόνου της ζυμώσεως των 110g/L.

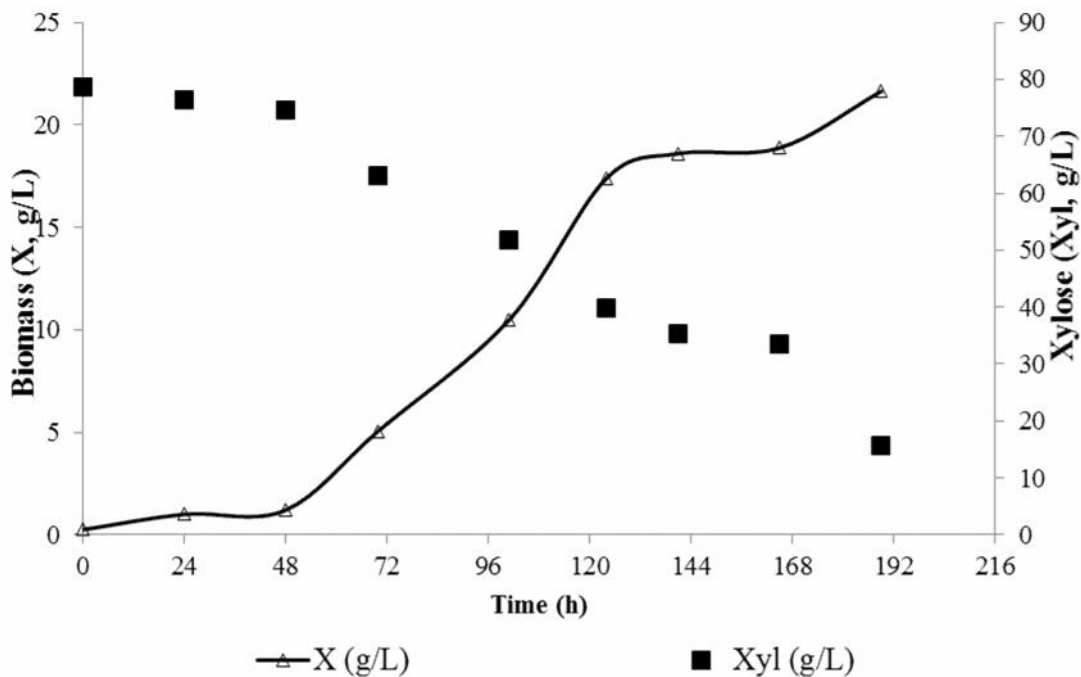
Για τις μετρήσεις του λίπους της ίδιας ζυμώσεως, αναγράφεται η μέγιστη τιμή της συγκεντρώσεως του λίπους που ανέρχεται σε συγκέντρωση 3.24 g/L και σε χρόνο ζυμώσεως 168h. επίσης, ο ρυθμός παραγωγής του λίπους σε σχέση με το υπόστρωμα καταγράφει την υψηλότερη τιμή του σε 0.123 g/g σε χρόνο ζυμώσεως που φτάνει τις 168h.



Γράφημα 6. Παρουσίαση της συγκεντρώσεως του λίπους και του ρυθμού παραγωγής του συναρτήσει του χρόνου της ζυμώσεως των 110g/L.

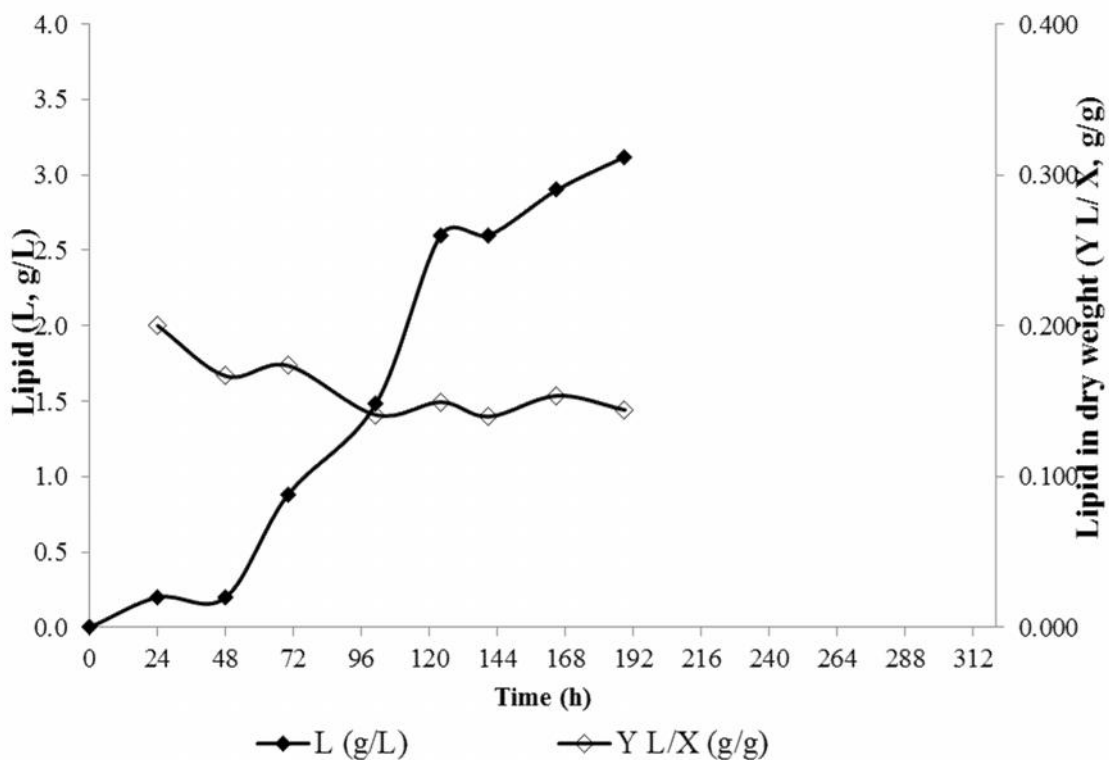


Επιπλέον, σειρά πειραμάτων πραγματοποιήθηκαν και σε βιοαντιδραστήρα, τα αποτελέσματα των οποίων φαίνονται στο παρακάτω διάγραμμα για την βιομάζα και το λίπος. Ξεκινώντας από την βιομάζα παρατηρείται ότι η μέγιστη τιμή συγκεντρώσεως της καταγράφεται σε 21.64 g/L και σε χρόνο ζυμώσεως που αντιστοιχεί σε 189 h.



Γράφημα 7. Παρουσίαση των αποτελεσμάτων της συγκεντρώσεως της βιομάζας συναρτήσει της κατανάλωσης του υποστρώματος της ξυλόζης και του χρόνου της ζυμώσεως των 80g/L στον βιοαντιδραστήρα.

Τέλος, όσον αφορά την παραγωγή λίπους η μέγιστη συγκέντρωση που παρατηρήθηκε αντιστοιχεί σε 3.12 g/L, σε χρόνο ζυμώσεως 189 h, ενώ στον ίδιο χρόνο ζυμώσεως παρατηρείται ο μέγιστος ρυθμός παραγωγής λίπους ως προς το υπόστρωμα που είναι 0.144 g/g.



Γράφημα 8. Παρουσίαση της συγκεντρώσεως του λίπους και του ρυθμού παραγωγής του συναρτήσει του χρόνου της ζυμώσεως των 80g/L στο βιοαντιδραστήρα.

### 3.1.2 Μελέτη της σύστασης του μικροβιακού λίπους (FAMES)

	Xylose <sub>0</sub> (g/L)	Time (h)	C16:0	<sup>Δ9</sup> C16:1	C18:0	C18:1	<sup>Δ9,12</sup> C18:2	C18:3
Φιάλες	~25	96	17,86	0,00	12,69	51,90	12,92	4,64
		120	21,80	0,95	11,62	50,51	13,47	1,64
		144	17,18	0,25	14,01	56,51	10,47	1,59
	~75	216	17,2	0,0	11,6	57,5	11,5	2,1
		240	8,3	0,0	12,7	63,1	13,5	2,5
		96	10,00	0,53	14,32	61,16	12,25	1,73
	~110	120	7,79	0,34	15,99	62,95	11,23	1,71
		168	17,59	0,24	13,86	55,92	10,67	1,73
		70	8,26	0,00	12,70	63,10	13,46	2,49
Βιοαντιδραστήρας	~80	101	20,12	0,00	16,05	49,61	14,22	0,00
		124	19,00	0,00	14,67	54,00	12,33	0,00
		141	18,07	0,00	14,29	57,08	10,56	0,00

Πίνακας 2. Παρουσίαση των αποτελεσμάτων της συστάσεως σε λιπαρά οξέα του μικροβιακού λίπους που παράχθηκε στις ζυμώσεις των φιαλών και του βιοαντιδραστήρα.

Στον ανωτέρω πίνακα, καταγράφονται τα αποτελέσματα της μελέτης της σύστασης σε λιπαρά οξέα του μικροβιακού λίπους. Γενικότερα, τα λιπαρά οξέα που ανιχνεύθηκαν ήταν με την σειρά τα εξής:

- 1) το παλμιτικό (C16:0),
- 2) το παλμιτελαϊκό (C16:1),
- 3) το στεατικό (C18:0),
- 4) το ελαϊκό (C18:1) ,
- 5) το λινελαϊκό (C 18:2) και
- 6) το α-λινολενικό (C 18:3).

Στην πρώτη ζύμωση που λαμβάνει χώρα σε φιάλες σε συγκέντρωση υποστρώματος ξυλόζης 25 g/L, το κυρίαρχο σε ποσοστό της τάξεως του 56.51% στις 144 h, είναι το ελαϊκό οξύ. Το δεύτερο μεγαλύτερο σε ποσοστό λιπαρό οξύ αποτελεί το παλμιτικό οξύ με την μέγιστη τιμή του να σημειώνεται 21.80% σε 120 h. Το τρίτο κατά σειρά μεγαλύτερο ποσοστό αναφέρεται στο στεατικό οξύ με την μέγιστη τιμή του να καταγράφεται σε 14.01% στις 144 h. Το τέταρτο κατά σειρά είναι το λινελαϊκό οξύ με μέγιστη τιμή σε 13.47% στις 120 h. Το χαμηλότερο ποσοστό αντιστοιχεί στο α-λινολενικό και είναι της τάξεως του 4.64% στις 96 h.

Στην δεύτερη ζύμωση των 75 g/L, το μεγαλύτερο ποσοστό καταγράφεται στο ελαϊκό οξύ και αντιστοιχεί σε ποσοστό της τάξεως του 63.1% στις 240 h. Στη δεύτερη θέση βρίσκεται το παλμιτικό οξύ με ποσοστό 17.2% στις 216 h. Στην Τρίτη θέση είναι το λινελαϊκό σε ποσοστό 13.5% στις 240 h. Στην τέταρτη κατά σειρά θέση βρίσκεται το στεατικό οξύ με ποσοστό 12.7% στις 240 h. Τελευταίο ακολουθεί το α-λινολενικό με ποσοστό 2.5% στις 240 h.

Στην τρίτη ζύμωση που λαμβάνει χώρα σε υπόστρωμα με βάση την ξυλόζη και σε συγκέντρωση 110 g/L ανιχνεύθηκαν τα κάτωθι λιπαρά οξέα στο μικροβιακό λίπος που παράχθηκε κατά σειρά από το μεγαλύτερο στο μικρότερο ποσοστιαία. Έτσι, το πρώτο είναι το ελαϊκό οξύ με ποσοστό 62.95% στις 120 h. Το δεύτερο είναι το παλμιτικό οξύ με ποσοστό 17.59% στις 168 h. Το τρίτο κατά σειρά μεγαλύτερο ποσοστό αντιστοιχεί στο στεατικό οξύ και είναι 15.99% στις 120 h. Το προτελευταίο αποτελεί το λινελαϊκό με ποσοστό 12.25% στις 96 h και τελευταίο σε σειρά έρχεται το α-λινολενικό οξύ με ποσοστό 1.73% στις 96 h. Ομοίως, το ίδιο ποσοστό ανιχνεύεται και στις 168 h.

Στη ζύμωση που πραγματοποιήθηκε στον βιοαντιδραστήρα, σε υπόστρωμα με βάση την ξυλόζη και συγκεντρώσεως 80 g/L, τα λιπαρά οξέα που εντοπίστηκαν κατά σειρά από το μεγαλύτερο προς το μικρότερο σε ποσοστιαία βάση παρουσιάζονται παρακάτω. Το πρώτο είναι το ελαϊκό οξύ με ποσοστό 63.10% στις 70 h. Το δεύτερο αποτελούσε το παλμιτικό οξύ με ποσοστό 20.12% στις 101 h. Το τρίτο είναι το στεατικό οξύ σε ποσοστό 16.05% στις 101 h. Το τέταρτο κατά σειρά είναι το λινελαϊκό οξύ σε ποσοστό 14.22% στις 101 h. Το τελευταίο αποτελεί το α-λινολενικό που αντιστοιχεί σε ποσοστό 2.49% στις 70 h.

## Κεφάλαιο 4

### 4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η εξαγωγή των συμπερασμάτων και η συζήτηση τους θα επιχειρηθεί να γίνει σε δύο φάσεις. Κατά την πρώτη θα συζητηθεί η εξαγωγή των συμπερασμάτων κατά την σύγκριση μεταξύ των ζυμώσεων που πραγματοποιήθηκαν στις φιάλες, ενώ στη δεύτερη φάση θα παρουσιαστεί η σύγκριση μεταξύ των αποτελεσμάτων του βιοαντιδραστήρα και της αντίστοιχης ζύμωσης που πραγματοποιήθηκε στις φιάλες των 75 g/L, η οποία προσεγγίζει περισσότερο στη συγκέντρωση της ζυμώσεως που έλαβε χώρα στον βιοαντιδραστήρα, άρα τα αποτελέσματα τους είναι πιο συγκρίσιμα σε σχέση με των υπολοίπων φιαλών που έλαβαν χώρα σε διαφορετικές συγκεντρώσεις.

Όσον αφορά τις ζυμώσεις που πραγματοποιήθηκαν στις φιάλες σε συγκεντρώσεις 25, 75 και 110 g/L παρατηρήθηκε με βάση πάντοτε τα αποτελέσματα που καταγράφηκαν ότι αυξανόμενη της συγκεντρώσεως των ζυμώσεων, αυξάνονται η συγκέντρωση της βιομάζας και του μικροβιακού λίπους που μετρήθηκε. Όμως, στην περίπτωση του λίπους, η αύξηση της συγκεντρώσεως σταματά μετά την ζύμωση των 75 g/L. Έτσι, η τιμή της συγκεντρώσεως του λίπους αυξάνει απότομα στην ζύμωση των 75 g/L αλλά στην ζύμωση των 110 g/L υπάρχει μία μικρή πτώση. Στους ενδοπολυσακχαρίτες, η τιμή της συγκεντρώσεως τους αυξάνει από την ζύμωση των 25 g/L και στην ζύμωση των 75 g/L, όμως παρατηρήθηκε μία οριακή πτώση στην μέγιστη τιμή στην ζύμωση των 110 g/L.

Στον βιοαντιδραστήρα, όπως προαναφέρθηκε, η σύγκριση μεταξύ των φιαλών με την ζύμωση των 75 g/L και του βιοαντιδραστήρα, έδωσε τα ακόλουθα συμπεράσματα. Η βιομάζα που παράχθηκε στον βιοαντιδραστήρα είναι μεγαλύτερη σε σχέση με αυτήν που παράχθηκε στις φιάλες της αντίστοιχης ζυμώσεως. Για το μικροβιακό λίπος θεωρείται ότι η τιμή της συγκεντρώσεως του είναι σαφώς μικρότερη, με βάση τα αποτελέσματα, από εκείνη που καταγράφηκε στην ζύμωση των φιαλών.

Συνεχίζοντας, θα γίνει μία σύγκριση μεταξύ των ζυμώσεων που έλαβαν χώρα στις φιάλες. Το ποσοστό του παλμιτικού οξέος, παρουσίασε μέγιστη τιμή 21.8 % στην ζύμωση των 25 g/L το οποίο μειώθηκε σε 17.2% στην ζύμωση των 75 g/L και σημείωσε μικρή άνοδο με ποσοστό που ανερχόταν σε 17.59%. Το στεατικό οξύ εμφάνισε μέγιστη τιμή 14.01% στην ζύμωση των 25 g/L στη συνέχεια πτώση με μέγιστη τιμή 12.7% στη ζύμωση των 75 g/L και άνοδο της τάξεως του 15.99% στη ζύμωση των 110 g/L. Το ελαϊκό οξύ καταγράφει μέγιστη τιμή 56.51% στη ζύμωση των 25 g/L, ενώ παρουσιάζει άνοδο της τάξεως του 63.1% στη ζύμωση των 75 g/L κι έπειτα μικρή πτώση με ποσοστό που ανέρχεται σε 62.95%. Για το λινελαϊκό οξύ στη ζύμωση των 25 g/L υπήρξε

μέγιστη τιμή 13.47%, έπειτα μικρή άνοδος στη ζύμωση των 75 g/L και τέλος πτώση με ποσοστό 12.25%. Το α-λινολενικό οξύ καταγράφει μέγιστη τιμή 4.64% στη ζύμωση των 25 g/L, ενώ στη ζύμωση των 75 g/L καταγράφει πτώση με ποσοστό 2.5% και ακόμα μεγαλύτερη πτώση στη ζύμωση των 110 g/L που εκφράζεται σε ποσοστό 1.73%.

Για τον βιοαντιδραστήρα η σύσταση του μικροβιακού λίπους που καταγραφήκε σε σχέση με την ζύμωση των 75 g/L οδηγεί στην εξαγωγή των παρακάτω συμπερασμάτων. Το ποσοστό του ελαϊκού οξέος είναι ακριβώς ίδιο και στις δύο ζυμώσεις, 63.1%. Το παλμιτικό οξύ βρίσκεται σε ποσοστό υψηλότερο έναντι του αντίστοιχου της ζυμώσεως των φιαλών. Το στεατικό οξύ υπερτερεί στην ζύμωση του βιοαντιδραστήρα έναντι εκείνου στη ζύμωση των φιαλών. Το λινελαϊκό οξύ ανιχνεύεται σε ποσοστό μεγαλύτερο στη ζύμωση του βιοαντιδραστήρα. Τέλος, το α-λινολενικό οξύ, είναι περίπου ίδιο σε ποσοστό και στις δύο ζυμώσεις.

Για τον βιοαντιδραστήρα η σύσταση του μικροβιακού λίπους που καταγραφήκε σε σχέση με την ζύμωση των 75 g/L οδηγεί στην εξαγωγή των παρακάτω συμπερασμάτων. Το ποσοστό του ελαϊκού οξέος είναι ακριβώς ίδιο και στις δύο ζυμώσεις, 63.1%. Το παλμιτικό οξύ βρίσκεται σε ποσοστό υψηλότερο έναντι του αντίστοιχου της ζυμώσεως των φιαλών. Το στεατικό οξύ υπερτερεί στην ζύμωση του βιοαντιδραστήρα έναντι εκείνου στη ζύμωση των φιαλών. Το λινελαϊκό οξύ ανιχνεύεται σε ποσοστό μεγαλύτερο στη ζύμωση του βιοαντιδραστήρα. Τέλος, το α-λινολενικό οξύ, είναι περίπου ίδιο σε ποσοστό και στις δύο ζυμώσεις.

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη της μικροβιακής αύξησης, της παραγωγής βιομάζας, της κατανάλωσης υποστρώματος, της παραγωγής λίπους του στελέχους του μικροοργανισμού καθώς και η σύσταση των μεθυλεστέρων του λίπους των μικροοργανισμών που κατά την ανάπτυξή τους σε λιγνοκυτταρινούχα σάκχαρα (ξυλόζη). Ο τεχνολογικός και, εν δυνάμει, βιομηχανικός στόχος της εργασίας ήταν η μελέτη της συμπεριφοράς της ζύμης σε υπόστρωμα με βάση την ξυλόζη, σε διεργασίες ζύμωσης για παραγωγή λιπιδίων, κυτταρικής μάζας και ενδοπολυσακχαριτών. Ως πηγή άνθρακα χρησιμοποιήθηκε σε συγκεντρώσεις 25,75 και 110 g/l η ξυλόζη. Οι καλλιέργειες πραγματοποιήθηκαν σε ζυμώσεις βυθού και έλαβαν χώρα κάτω από αερόβιες συνθήκες (αναδεδυόμενες κωνικές φιάλες). Στο τέλος αξιολογήθηκαν τα αποτελέσματα των ζυμών εκτενέστερα.

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 (YX/S), η παραγωγή ενδοκυτταρικού λίπους (L), ο συντελεστής παραχθέντος λίπους σε σχέση με την παραχθείσα βιομάζα (YL/X) και η παραγωγή ενδοπολυσακχαριτών (IPS). Περαιτέρω μελετήθηκε η σύσταση σε λιπαρά οξέα του μικροβιακού λίπους.

Η μέγιστη ποσότητα του μικροβιακού λίπους σημειώθηκε στην ζύμωση των 75 g/L, και ήταν 3.78 g/L, η μέγιστη

Η παραγωγή λιπιδίων από τους ελαιογόνους μικροοργανισμούς και η χρησιμοποίηση αυτών για την παραγωγή εναλλακτικών μορφών ενέργειας, όπως το βιοντήζελ είναι ένας τομέας που θα γνωρίσει σημαντική άνθηση στα αμέσως επόμενα χρόνια. Αυτό οφείλεται στην παρόμοια σύσταση τους σε λιπαρά οξέα με τα φυτικά έλαια (Huang *et al*, 2009). Τα μικροβιακά λιπίδια είναι πλούσια σε συγκεκριμένα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα, και συχνά χρησιμοποιούνται σε συμπληρώματα διατροφής (Ratlidge, 2002; Spolaore, 2006). Οι μικροοργανισμοί πλεονεκτούν σε σχέση με τα φυτά ως προς την παραγωγή λιπιδίων, εξαιτίας του σύντομου κύκλου ζωής, των μικρότερων απαιτήσεων σε εργασία, τόπο, χώρο, κλίμα.

Η παρούσα μελέτη αποτελεί μία σημαντική ακόμα προσπάθεια, μεταξύ ενός πλήθους ερευνών στην διεθνή βιβλιογραφία, ώστε να πραγματοποιηθεί μία ορθολογική αειφορική διαχείριση των παραγόμενων αποβλήτων και παραπροϊόντων του αγροτικού και βιομηχανικού τομέα, με στόχο την αξιοποίηση τους ως υποστρώματα στην παραγωγή τροφίμων και φαρμακευτικών σκευασμάτων, αλλά και ανανεώσιμων πηγών ενέργειας. Αυτό αποτελεί ιδανική λύση για την εκμετάλλευση των ολοένα διογκούμενων αποβλήτων του αγροτικού κλάδου και της βιομηχανίας, αφού μέχρι σήμερα είναι ένα τεράστιο πρόβλημα η διαχείριση τους (Peters, 2007).

Για τον παραπάνω λόγο, το ερευνητικό ενδιαφέρον έχει στραφεί στη διαδικασία της βιομετατροπής των αγροτικών και βιομηχανικών αποβλήτων και παρά το πλήθος των ερευνών που έχουν δημοσιευτεί, συνεχίζεται διαρκώς η προσπάθεια (Peters, 2007). Θεωρείται από την επιστημονική κοινότητα η πιθανή μελλοντική λύση στο ενεργειακό πρόβλημα που οξύνεται, καθώς και μία δεξαμενή παραγωγής προϊόντων προστιθέμενης αξίας, για την φαρμακευτική βιομηχανία και την βιομηχανία τροφίμων.

Σε μελλοντικές έρευνες δύναται να μελετηθεί η καλλιέργεια του μικροοργανισμού σε διαφορετικές αρχικές συγκεντρώσεις, αλλά και σε συνυποστρώματα λιγνοκυτταρινούχων υλικών και άλλων αποβλήτων. Επίσης είναι δυνατή η μελέτη για την χρήση άλλων πηγών άνθρακα. Τέλος, θα ήταν καλό να γίνει έρευνα, με σκοπό την μελέτη της βιοχημικής συμπεριφοράς και άλλων μικροοργανισμών στο συγκεκριμένο υπόστρωμα, ώστε να προκύψουν συγκρίσιμα αποτελέσματα.

Για τον βιοαντιδραστήρα η σύσταση του μικροβιακού λίπους που καταγραφηκε σε σχέση με την ζύμωση των 75 g/L οδηγεί στην εξαγωγή των παρακάτω συμπερασμάτων. Το ποσοστό του ελαϊκού οξέος είναι ακριβώς ίδιο και στις δύο ζυμώσεις, 63.1%. Το παλμιτικό οξύ βρίσκεται σε ποσοστό υψηλότερο έναντι του αντίστοιχου της ζυμώσεως των φιαλών. Το στεατικό οξύ υπερτερεί στην ζύμωση του βιοαντιδραστήρα έναντι εκείνου στη ζύμωση των φιαλών. Το λινελαϊκό οξύ

ανιχνεύεται σε ποσοστό μεγαλύτερο στη ζύμωση του βιοαντιδραστήρα. Τέλος, το α-λινολενικό οξύ, είναι περίπου ίδιο σε ποσοστό και στις δύο ζυμώσεις.



## 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. 98

- 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., Neuvégilise, 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. 99

- 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. 100

- 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. 101

- 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). 102

- 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. 103

- 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