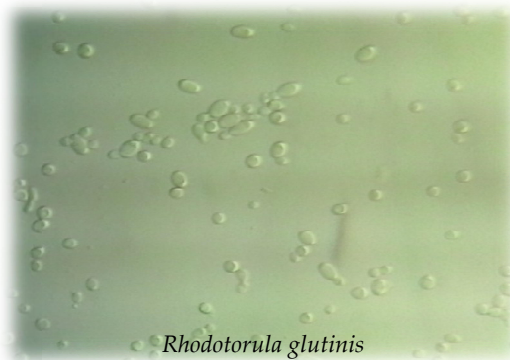


ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου
Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων

**Π.Μ.Σ.: Επιστήμη και Τεχνολογία Τροφίμων και Διατροφή
του Ανθρώπου**

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Επιλογή στελεχών ζυμών προς βιοτεχνολογική παραγωγή
δευτερογενών μεταβολιτών και λιπιδίων χρησιμοποιώντας
ως υπόστρωμα την ακάθαρτη βιομηχανική γλυκερόλη



Δημήτρης Κ. Αντωνίου

Επιβλέπων καθηγητής:
Σεραφείμ Παπανικολάου, Αναπληρωτής Καθηγητής Γ.Π.Α.

ΑΘΗΝΑ 2015

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Επιλογή στελεχών ζυμών προς βιοτεχνολογική παραγωγή δευτερογενών μεταβολιτών και λιπιδίων χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα την ακάθαρτη βιομηχανική γλυκερόλη

Εξεταστική Επιτροπή:

- ✓ Σεραφείμ Παπανικολάου, Αναπληρωτής Καθηγητής Γ.Π.Α. (Επιβλέπων καθηγητής)
- ✓ Απόστολος Κουτίνας, Επίκουρος Καθηγητής Γ.Π.Α.
- ✓ Γεώργιος-Ιωάννης Νυχάς, Καθηγητής Γ.Π.Α.

Δημήτρης Κ. Αντωνίου

ΑΘΗΝΑ 2015

Πρόλογος - Ευχαριστίες

Στα πλαίσια των μεταπτυχιακών μου σπουδών στο τμήμα της Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου – Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων – του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών εκπόνησα την παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή με θέμα τις «Επιλογή στελεχών ζυμών προς βιοτεχνολογική παραγωγή δευτερογενών μεταβολιτών και λιπιδίων χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα την ακάθαρτη βιομηχανική γλυκερόλη». Η μελέτη αυτή μου έδωσε την ευκαιρία να αποκτήσω εμπειρίες μιας πλήρους ερευνητικής εργασίας, στον ευρύτερο τομέα της επιστήμης της μικροβιολογίας και βιοτεχνολογίας τροφίμων, καθώς και να συνεργαστώ με άρτιους επιστήμονες και ανθρώπους.

Θα ήθελα να εκφράσω τις εγκάρδιες μου ευχαριστίες στον κ. Σεραφείμ Παπανικολάου¹, Αναπληρωτή Καθηγητή του Γ.Π.Α., για την ανάθεση και επίβλεψη της παρούσας εργασίας, που βρήκα εξαιρετικά ενδιαφέροντα και διδάχτηκα πολλά κατά τη διάρκεια της εκπόνησής της, για την πολύτιμη καθοδήγηση του, για τη διαρκή συμπαράσταση και βοήθεια που μου προσέφερε καθ 'όλη τη διάρκεια της παρούσας εργασίας και για την εμπιστοσύνη που δείχνει μέχρι του παρόντος στο πρόσωπό μου. Επίσης, θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες μου στα λοιπά μέλη της τριμελούς εξεταστικής επιτροπής, τον κ. Γεώργιο-Ιωάννη Νυχά¹, Καθηγητή του Γ.Π.Α. και τον κ. Απόστολο Κουτίνα², Επίκουρο Καθηγητή Γ.Π.Α., για τη συμμετοχή τους στην εξεταστική επιτροπή, καθώς και για την διαρκή τους διαθεσιμότητα και βοήθεια όποτε την χρειάστηκα.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλο το ανθρώπινο δυναμικό του εργαστηρίου Μικροβιολογίας & Βιοτεχνολογίας Τροφίμων και ιδιαίτερα την κα Ουρανία Καλατζή (ΕΔΙΠ), τους υποψήφιους διδάκτορες Ροζανίνα Φιλιπούση, Βαγγέλη Ξερόπουλο, Σοφία Μάινα και Κατερίνα Παπαδάκη, που χωρίς την καθοδήγηση, υποστήριξη και υπομονή τους δεν θα ήταν δυνατή η ολοκλήρωση της παρούσας μελέτης, καθώς και τον μεταδιδακτορικό ερευνητή Δρ. Δημήτριο Σαρρή, για την πολύτιμη και ανιδιοτελή του βοήθεια. Τέλος, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου και την ευγνωμοσύνη μου στην οικογένειά μου, σε συγγενής και φίλους για την συμπαράστασή τους και την ανιδιοτελή υποστήριξή τους.

Αντωνίου Δημήτρης

¹ Εργαστήριο Μικροβιολογίας & Βιοτεχνολογίας Τροφίμων – Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών – Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων & Διατροφής του Ανθρώπου

² Εργαστήριο Μηχανικής Τροφίμων, Επεξεργασίας & Συντήρησης Γεωργικών Προϊόντων – Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών – Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων & Διατροφής του Ανθρώπου

Περίληψη

Σκοπός της παρούσας μελέτη ήταν η διερεύνηση της ικανότητας ανάπτυξης διάφορων στελεχών ζυμών χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα ανανεώσιμες πρώτες ύλες, συγκεκριμένα ακάθαρτη βιομηχανική γλυκερόλη, η οποία είναι παραπροϊόν της βιομηχανικής παραγωγής βιοκαυσίμου (biodiesel). Ειδικότερα, μελετήθηκε η ικανότητα των ζυμών να μεταβολίζουν την ακάθαρτη βιομηχανική γλυκερόλη προς παραγωγή βιομάζας, δευτερογενών μεταβολιτών (μικροβιακού λίπους και ενδοπολυσακχαριτών) και διαφόρων μεταβολικών προϊόντων (π.χ. αραβιτόλη, μαννιτόλη) των στελεχών αυτών. Οι καλλιέργειες διενεργήθηκαν σε διαφορετικές συγκεντρώσεις υποστρώματος, σε σταθερές συνθήκες ανάδευσης και θερμοκρασίας. Τα στελέχη των ζυμών που χρησιμοποιήθηκαν ανήκουν στα γένη *Yarrowia*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Rhodotorula*, *Rhodospiridium* και τρία μη ταυτοποιημένα στελέχη του γένους *Metschnikowia*, που απομονώθηκαν από τα είδη *Prunus domestica* (κορομηλιά) και *Vitis vinifera* (άμπελος). Η γλυκερόλη που χρησιμοποιήθηκε ήταν διαχωρισμένη και καθαρότητας 95% κατά βάρος.

Η παρούσα μελέτη χωρίστηκε σε τέσσερα πειραματικά στάδια, στα τρία πρώτα οι καλλιέργειες διενεργήθηκαν σε κωνικές φιάλες των 250 mL και το τέταρτο σε βιοαντιδραστήρα κλειστού τύπου (batch bioreactor) των 3 L.

Στο πρώτο πείραμα μελετήθηκε το σύνολο των στελεχών σε υγρές καλλιέργειες με υπόστρωμα βιομηχανικής γλυκερόλης, συγκέντρωσης 40 g/L. Η συγκριτική τους αξιολόγηση βασίστηκε στην ικανότητά τους να αξιοποιούν την γλυκερόλη καταναλώνοντας και μετατρέποντάς την σε βιομάζα, λιπίδια, ενδοπολυσακχαρίτες και δευτερογενείς μεταβολίτες. Οι μετρήσεις έδειξαν ότι οι περισσότεροι μικροοργανισμοί προσαρμόστηκαν στο υπόστρωμα της γλυκερόλης παράγοντας ικανοποιητικές ποσότητες βιομάζας και ενδοπολυσακχαριτών, ενώ από στελέχη των γενών *Yarrowia lipolytica* LMBF Y-45, LMBF Y-46, LMBF Y-47 και *Debaryomyces hansenii* EMBT Y-41 παρατηρήθηκε παραγωγή πολυωλών και παραγωγή ενδοκυτταρικών λιπιδίων σε ικανοποιητικές ποσότητες για περαιτέρω διερεύνηση παρατηρήθηκε από τα στελέχη *Rhodotorula glutinis* NRRL YB-252 και *Cryptococcus curvatus* NRRL Y-1511.

Στο δεύτερο πείραμα μελετήθηκαν περαιτέρω πέντε επιλεγμένα στελέχη σε υγρές καλλιέργειες με υπόστρωμα βιομηχανικής γλυκερόλης, συγκέντρωσης 80 g/L. Παρατηρήθηκαν, υψηλή παραγωγή σε αραβιτόλη από το στέλεχος και *Debaryomyces hansenii* EMBT Y-41 με μέγιστη τιμή τα 27.5 g/L στις 240 h και σε ενδοκυτταρικά λιπίδια από το στέλεχος *Rhodotorula glutinis* NRRL YB-252 με μέγιστη τιμή τα 7.2 g/L στις 216 h.

Στο τρίτο πείραμα μελετήθηκε το στέλεχος *Debaryomyces hansenii* EMBT Y-41 σε υγρή καλλιέργεια με υπόστρωμα βιομηχανικής γλυκερόλης, συγκέντρωσης 125 g/L. Παρατηρήθηκε ακόμη μεγαλύτερη παραγωγή αραβιτόλης, 47.5 g/L στις 360 h με συντελεστή απόδοσης επί του καταναλωθέντος υποστρώματος $Y_{\text{arol/S}}=0.62$ g/g. Η

τιμή αυτή είναι, επί του παρόντος, η μεγαλύτερη τιμή που έχει αναφερθεί σε αντίστοιχες δημοσιευμένες έγκριτες μελέτες που αφορούν στην παραγωγή αραβιτόλης με υπόστρωμα ανάπτυξης μικροοργανισμού την γλυκερόλη.

Στο τέταρτο πείραμα μελετήθηκε, σε βιοαντιδραστήρα, το στέλεχος *Debaryomyces hansenii* EMBT Y-41 σε υγρή καλλιέργεια με υπόστρωμα βιομηχανικής γλυκερόλης, συγκέντρωσης 80 g/L. Παρατηρήθηκε μέγιστη παραγωγή αραβιτόλης, 27.8 g/L στις 72 h, καθώς και βιομάζας, 33.1 g/L στις 104 h, σε πιο σύντομο χρονικό διάστημα σε σύγκριση με τις καλλιέργειες στις κωνικές φιάλες.

Λέξεις κλειδιά: Ζύμες, γλυκερόλη, αραβιτόλη, μικροβιακό λίπος, πολυόλες, ενδοπολυσακχαρίτες

Abstract

The purpose of this study was to investigate the ability of various yeast strains to grow on renewable raw materials, particularly crude-industrial glycerol, which is the main byproduct of the industrial production of biodiesel. In particular, the ability of yeasts to metabolize industrial crude glycerol to produce biomass, secondary metabolites (single cell oil and intra-cellular polysaccharides) and various metabolic products (e.g., arabitol, mannitol) was studied. Fermentations were performed at different substrate concentrations at constant stirring and temperature. The yeast strains which were used belong to the genera *Yarrowia*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Rhodotorula*, *Rhodospiridium* and furthermore three unidentified strains, isolated from the species *Prunus domestica* (plum) and *Vitis vinifera* (grape vine). The glycerol used was separated and 95% purity w/w.

This study was divided into four experimental stages, the first three experiments were conducted in Erlenmeyer flasks 250 mL and fourth in a 3 L batch bioreactor.

In the first experiment all yeast strains were cultivated in liquid submerged culture with 40 g/L initial glycerol as substrate (shake-flasks). The comparative assessment (screening) was based on their ability to utilize glycerol consuming and turning it into biomass, lipids, intra-cellular polysaccharides and secondary metabolites. The results showed that most strains were adapted to the glycerol-composed media producing sufficient quantities of biomass and intra-cellular polysaccharides, while the yeast strains *Yarrowia lipolytica* LMBF Y-45, LMBF Y-46, LMBF Y-47 and *Debaryomyces hansenii* EMBT Y-41 produced polyols (sugar alcohols). Also, the yeast strains *Rhodotorula glutinis* NRRL YB-252 and *Cryptococcus curvatus* NRRL Y-1511 produced sufficient quantities of intracellular lipids, fact that deserves further investigation.

In the second experiment five selected yeast strains were studied further in liquid submerged shake-flask cultures with 80 g/L initial glycerol as substrate. High arabitol production was observed by the strain *Debaryomyces hansenii* EMBT Y-41 and a maximum quantity was achieved of 27.5 g/L (240 h). Also, high quantities of intracellular lipids were observed by the strain *Rhodotorula glutinis* NRRL YB-252 and a maximum quantity was achieved of 7.2 g/L (lipid in dry weight of biomass) at 216 h.

In a third experiment, a single liquid state culture was conducted with 125 g/L initial glycerol as substrate, for the strain *Debaryomyces hansenii* EMBT Y-41. Which resulted to a even greater production of arabitol, 47.5 g/L (360h) with a yield at 62% of the consumed glycerol-composed substrate. This value is, currently, the largest value that has been reported in relevant published reputable studies involving the production of arabitol from glycerol.

The fourth experiment was conducted in a batch bioreactor for the strain *Debaryomyces hansenii* EMBT Y-41 in a liquid state culture, with 80 g/L initial glycerol as substrate. Which resulted to a maximum production of arabitol, 27.8 g/L (72 h) and biomass, 33.1 g/L (72 h), in a shorter time period in comparison with the cultures in Erlenmeyer flasks.

Keywords: Yeast, glycerol, arabitol, single cell oil, polyols, intra-cellular polysaccharides

Περιεχόμενα

1.	ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
1.1	Η ΓΛΥΚΕΡΟΛΗ	2
1.2	Η ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΗ ΓΛΥΚΕΡΟΛΗ	3
1.3	ΖΥΜΕΣ - ΕΛΑΙΟΓΟΝΟΙ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ	4
1.3.1	Ζύμες	4
1.3.2	Ελαιογόνοι μικροοργανισμοί.....	5
1.4	ΠΑΡΑΓΟΜΕΝΑ ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΑ ΠΡΟΪΟΝΤΑ	6
1.4.1	Λιπίδια - Βιοσύνθεση κυτταρικών λιπιδίων.....	6
1.4.2	Ενδοπολυσακχαρίτες (Intracellular Polysaccharides, IPS).....	9
1.4.3	Κιτρικό οξύ.....	9
1.4.4	Πολυόλες.....	10
1.5	ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ	13
2.	ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	14
2.1	ΒΙΟΛΟΓΙΚΟ ΥΛΙΚΟ - ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ	15
2.2	ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ ΤΩΝ ΥΠΟ ΜΕΛΕΤΗ ΣΤΕΛΕΧΩΝ.....	15
2.2.1	Παρασκευή υγρού εμβολίου	15
2.2.2	Θρεπτικό μέσο καλλιέργειας.....	16
2.2.3	Συνθήκες καλλιέργειας.....	17
2.2.3.1	Συγκριτική αξιολόγηση (screening) των 16 στελεχών σε κωνικές φιάλες (S ₀ 40 g/L).....	18
2.2.3.2	Καλλιέργειες σε κωνικές φιάλες με τις ζύμες <i>Debaryomyces</i> , <i>Rhodotorula</i> & <i>Cryptococcus</i> (S ₀ 50 & 80 g/L)	18
2.2.3.3	Καλλιέργεια σε κωνικές φιάλες του <i>D. hansenii</i> EMBT Y-41 (S ₀ 125 g/L).....	19
2.2.3.4	Ασυνεχής καλλιέργεια σε βιοαντιδραστήρα του στελέχους <i>D. hansenii</i> EMBT Y-41 (S ₀ 80 g/L)	19
2.3	ΧΗΜΙΚΕΣ ΑΝΑΛΥΣΕΙΣ - ΜΕΤΡΗΣΕΙΣ	20
2.3.1	Προσδιορισμός του pH στο μέσο ανάπτυξης των μικροοργανισμών.....	20
2.3.2	Προσδιορισμός της παραγόμενης βιομάζας	20
2.3.3	Προσδιορισμός ενδοκυτταρικού λίπους	20
2.3.3.1	Ποσοτικός προσδιορισμός - εκχύλιση λίπους.....	20
2.3.3.2	Ποιοτικός προσδιορισμός.....	21
2.3.4	Προσδιορισμός ενδοπολυσακχαριτών (IPS).....	21
2.3.4.1	Ποσοτικός προσδιορισμός.....	22
2.3.4.2	Ποιοτικός προσδιορισμός.....	22
2.3.5	Προσδιορισμός γλυκερόλης και πολυολών (αραβιτόλη, μαννιτόλη, ερυθριτόλη)	22
2.3.6	Προσδιορισμός κιτρικού οξέος.....	22
3.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	23
3.1	ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΗ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ (SCREENING) ΤΩΝ 16 ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΣΕ ΚΩΝΙΚΕΣ ΦΙΑΛΕΣ (S ₀ 40 G/L)	24
3.2	ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ ΣΕ ΚΩΝΙΚΕΣ ΦΙΑΛΕΣ ΜΕ ΤΙΣ ΖΥΜΕΣ <i>DEBARYOMYCES</i> , <i>RHODOTORULA</i> & <i>CRYPTOCOCCUS</i> (S ₀ 50 & 80 G/L).....	30
3.3	ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΣΕ ΚΩΝΙΚΕΣ ΦΙΑΛΕΣ ΤΟΥ <i>D. HANSENI</i> EMBT Y-41 (S ₀ 125 G/L)	34
3.4	ΑΣΥΝΕΧΗΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΣΕ ΒΙΟΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΑ ΤΟΥ ΣΤΕΛΕΧΟΥΣ <i>D. HANSENI</i> EMBT Y-41 (S ₀ 80 G/L).....	36
3.5	ΑΝΑΛΥΣΗ ΠΑΡΑΓΟΜΕΝΟΥ ΕΝΔΟΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΛΙΠΟΥΣ.....	39
4.	ΣΥΖΗΤΗΣΗ	42
4.1	ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΗ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ (SCREENING) ΤΩΝ 16 ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΣΕ ΚΩΝΙΚΕΣ ΦΙΑΛΕΣ (S ₀ 40 G/L)	43
4.2	ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ ΣΕ ΚΩΝΙΚΕΣ ΦΙΑΛΕΣ ΜΕ ΤΙΣ ΖΥΜΕΣ <i>DEBARYOMYCES</i> , <i>RHODOTORULA</i> & <i>CRYPTOCOCCUS</i> (S ₀ 50 & 80 G/L).....	48

4.3	ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΣΕ ΚΩΝΙΚΕΣ ΦΙΑΛΕΣ ΤΟΥ <i>D. HANSENI</i> ΕΜΒΥ-41 (S_0 125 G/L)	54
4.4	ΑΣΥΝΕΧΗΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΣΕ ΒΙΟΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΑ ΤΟΥ ΣΤΕΛΕΧΟΥΣ <i>D. HANSENI</i> ΕΜΒΥ-41 (S_0 80 G/L)	56
5.	ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	58
6.	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	59

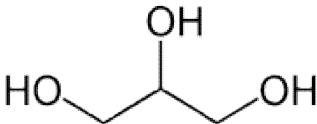
1. Εισαγωγή

1.1 Η γλυκερόλη

Η γλυκερόλη (*glycerol*- 1,2,3-προπανοτριόλη, πίν. 1.1-1) είναι ένα άχρωμο, άοσμο, παχύρρευστο υγρό με γλυκιά γεύση, το οποίο προέρχεται τόσο από φυσικές όσο και από πετροχημικές πρώτες ύλες. Η ονομασία γλυκερόλη προέρχεται από την ελληνική λέξη για το "γλυκό", *γλυκός*, καθώς και οι όροι γλυκερίνη (*glycerin* ή *glycerine*) και γλυκερόλη (*glycerol*) τείνουν να χρησιμοποιηθούν εναλλακτικώς στη βιβλιογραφία. Από την άλλη πλευρά, η ονομασία γλυκερίνη (*glycerin* ή *glycerine*), γενικά, αναφέρεται σε εμπορικό διάλυμα γλυκερόλης σε νερό, του οποίου το κύριο συστατικό είναι η γλυκερόλη. Η ακατέργαστη γλυκερόλη είναι 70-80% καθαρή και συχνά συμπυκνώνεται και καθαρίζεται πριν από την εμπορική της διάθεση σε καθαρότητα 95.5-99%.

Η γλυκερόλη είναι από τις περισσότερο πολλαπλά χρήσιμες και πολύτιμες χημικές ουσίες που είναι γνωστές στον άνθρωπο. Στη σύγχρονη εποχή, εντοπίστηκε το 1779 από τον Σουηδό χημικό Carl W. Scheele, ο οποίος ανακάλυψε ένα νέο διαφανές, παχύρρευστο υγρό θερμαίνοντας το ελαιόλαδο με λιθάργυρο (PbO-χρησιμοποιούνταν σε μολυβδούχα υαλώματα στην κεραμική). Η γλυκερόλη περιέχει τρεις υδρόφιλες αλκοολικές υδροξυλομάδες, οι οποίες είναι υπεύθυνες για τη διαλυτότητα της στο νερό και της υγροσκοπικής της φύση, επίσης, είναι ελαφρά διαλυτή σε πολλούς κοινούς διαλύτες (π.χ. αιθέρας), όμως είναι αδιάλυτη σε υδρογονάνθρακες.

Πίνακας 1.1-1: Φυσικοχημικές ιδιότητες και δομή γλυκερόλης.

Φυσικοχημικές ιδιότητες γλυκερόλης στους 20 °C		Συντακτικός Τύπος
Μοριακός τύπος:	C ₃ H ₅ (OH) ₃	
Μοριακή μάζα:	92.09 g/mol	
Πυκνότητα:	1.261 g/mL	
Ιξώδες:	1.5 Pa·s	
Σημείο τήξης:	18.2°C	
Σημείο βρασμού:	290°C	
Σημείο ανάφλεξης:	160 °C (κλειστό καπάκι)	
Δείκτης διάθλασης:	1.4746	
Διατροφική ενέργεια:	4.32 kcal/g	
Επιφανειακή τάση:	64.00 mN/m	

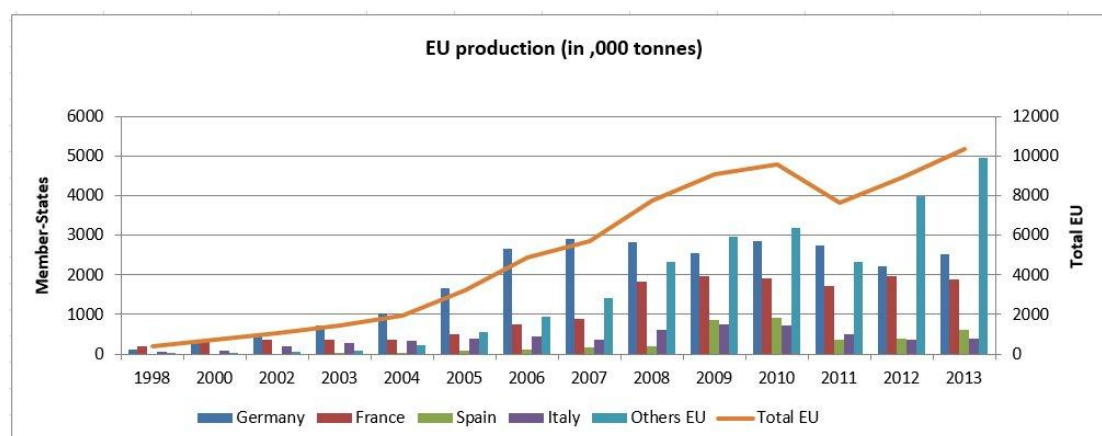
(Pagliaro *et al.*, 2010)

Στην καθαρή άνυδρη κατάσταση της, η γλυκερόλη έχει μια ειδική βαρύτητα 1.261 g/mL, σημείο τήξης 18.2°C και σημείο ζέσεως 290°C, η οποία συνοδεύεται από αποσύνθεση, υπό συνθήκες κανονικής ατμοσφαιρικής πίεσης. Σε χαμηλές θερμοκρασίες, η γλυκερόλη μπορεί να σχηματίσει κρυστάλλους οι οποίοι τήκονται σε 17.9°C. Συνολικά, διαθέτει ένα μοναδικό συνδυασμό φυσικών και χημικών ιδιοτήτων

(πίν. 1.1-1), οι οποίες χρησιμοποιούνται σε πολλές χιλιάδες εμπορικά προϊόντα. Πράγματι, έχει πάνω από 1500 γνωστές χρήσεις, συμπεριλαμβανομένων των εφαρμογών της ως συστατικό ή ενισχυτικό στη μεταποίηση σε καλλυντικά, σε είδη προσωπικής υγιεινής, σε προϊόντα προσωπικής φροντίδας, σε φαρμακευτικά σκευάσματα και σε τρόφιμα. Επιπλέον, είναι εξαιρετικά σταθερή υπό κανονικές συνθήκες αποθήκευσης, συμβατή με πολλές άλλες χημικές ουσίες, σχεδόν μη ερεθιστική σε διάφορες χρήσεις της και δεν έχει γνωστές αρνητικές περιβαλλοντικές επιπτώσεις (Pagliaro *et al.*, 2010).

1.2 Η βιομηχανική γλυκερόλη

Η γλυκερόλη είναι μια απλή πηγή άνθρακα που μπορεί να αφομοιωθεί εύκολα από πολυάριθμους ευκαρυωτικούς και προκαρυωτικούς μικροοργανισμούς. Ωστόσο, η ένωση αυτή είχε παραμεληθεί ως υπόστρωμα για μικροβιακές καλλιέργειες για πολλά χρόνια, κυρίως λόγω του υψηλού κόστους της. Παρ'όλα αυτά, οι πρόσφατες εξελίξεις στην αγορά καυσίμων, οδήγησαν στην παραγωγή του βιοντίζελ σε μεγάλη κλίμακα που προέρχεται από φυτικά έλαια, αντιστρέφοντας αυτήν την κατάσταση. Επί του παρόντος, η γλυκερόλη είναι διαθέσιμη σε μεγάλες ποσότητες στις μονάδες παραγωγής βιοντίζελ. Αυτή η βιομηχανία παράγει τεράστιες ποσότητες γλυκερόλης ως υποπροϊόν κατά τη διάρκεια της διαδικασίας μετεστεροποίησης του ελαίου με μεθανόλη ή αιθανόλη. Ως εκ τούτου, η γλυκερόλη μετατρέπεται σε μια ελκυστική πρώτη ύλη. Σε γενικές γραμμές, εκτιμάται για κάθε 100 kg βιοντίζελ που παράγονται, δημιουργούνται περίπου 10 kg ακατέργαστης γλυκερόλης.



Εικόνα 1.2-1: Η παραγωγή βιοντίζελ εντός της Ευρωπαϊκής Ένωσης από το 1998 έως το 2013 (πηγή: European Biodiesel Board).

Η ακατέργαστη γλυκερόλη αντιπροσωπεύει το μεγαλύτερο υποπροϊόν της βιομηχανίας βιοντίζελ. Επί του παρόντος, η παραγωγή βιοντίζελ στις Η.Π.Α. και στην Ευρώπη βιώνει μια ταχεία επέκταση (εικ. 1.2-1), π.χ. στην Ευρωπαϊκή Ένωση

παρήχθησαν περίπου 23 εκατομμύρια τόνοι βιοντίζελ για το 2014 (European Biodiesel Board) και στις Η.Π.Α. περίπου 1.8 δισεκατομμύρια γαλόνια για το 2013 (National Biodiesel Board). Ως εκ τούτου, είναι ευνόητο ότι η αγορά έχει κατακλυσθεί με πλεονάζουσα ποσότητα ακατέργαστης γλυκερόλης. Λόγω διαφόρων ακαθαρσιών που περιέχονται στην ακατέργαστη γλυκερόλη, δεν είναι οικονομικώς αποδοτικό να καθαριστεί αυτό το ρεύμα αποβλήτων προς χρήση που θα αφορά στις βιομηχανίες τροφίμων, φαρμακευτικών ή καλλυντικών. Διάφορες εναλλακτικές μέθοδοι για τη διάθεση και την αξιοποίηση αυτής της ακατέργαστης γλυκερόλης επιχειρήθηκαν, όπως η καύση, κομποστοποίηση, αναερόβια χώνευση, προς ζωοτροφές, θερμοχημικές και βιολογικές μετατροπές σε προϊόντα προστιθέμενης αξίας. Οπότε, αν αυτό το ρεύμα αποβλήτων μπορεί να χρησιμοποιηθεί με οικονομικά συμφέροντα τρόπο, η διαδικασία παραγωγής βιοντίζελ θα γίνει πιο επικερδής και περισσότερο επικρατούσα στην αγορά (Wen *et al.*, 2009).

1.3 Ζύμες - Ελαιόγνοιοι μικροοργανισμοί

1.3.1 Ζύμες

Οι ζύμες είναι ευκαρυωτικοί μονοκύτταροι μικροοργανισμοί (microfungi), οι οποίοι είναι ευρέως κατανεμημένοι στα διάφορα φυσικά περιβάλλοντα. Αν και οι ζύμες δεν βρίσκονται παντού, όπως τα βακτήρια στο φυσικό περιβάλλον, έχουν απομονωθεί από το χερσαίο, υδάτινο και ατμοσφαιρικό περιβάλλον. Οι κοινότητες των ζυμών έχει διαπιστωθεί ότι συναναστρέφονται με τα φυτά, τα ζώα και τα έντομα. Πολλά είδη ζυμών έχουν επίσης απομονωθεί από εξειδικευμένα ή ακραία περιβάλλοντα, όπως σε αυτά που επικρατούν συνθήκες χαμηλού υδατικού δυναμικού (π.χ. υψηλές συγκεντρώσεις σακχάρου ή άλατος), χαμηλών θερμοκρασιών (π.χ. οι ζύμες που απομονώθηκαν από το περιβάλλον της Ανταρκτικής), χαμηλής διαθεσιμότητας οξυγόνου (π.χ. εντερική οδό των ζώων). Περίπου 1.500 είδη ζυμών, που ανήκουν σε περισσότερες από 100 γένη, έχουν περιγραφεί επί του παρόντος. Εκτιμάται ότι μόνο το 1% των σωζόμενων ζυμών της γης έχουν περιγραφεί (Shivaji *et al.*, 2009).

Η χρήση των ζυμών χρονολογείται από τις αρχαίες ημέρες. Πριν από το 7000 π.Χ., μύρα παράγονταν στη Σουμερία, κρασί παράγονταν στην Ασσυρία από το 3500 π.Χ. και η αρχαία Ρώμη είχε πάνω από 250 αρτοποιεία που έκαναν ψωμί με προζύμι από το 100 π.Χ.. Το γάλα μετατρέπονταν σε kefir και σε koumiss (προϊόντα από ζύμωση γάλακτος) με τη χρήση ειδών *Kluyveromyces* στην Ασία για πολλούς αιώνες. Οι ζύμες είναι υπεύθυνες για την παραγωγή εκ των κορυφαίων προϊόντων ζύμωσης σε όλο τον κόσμο. Πρόκειται για την μύρα ($60 \cdot 10^6$ tn/yr), το κρασί ($30 \cdot 10^6$ tn/yr), τη μονοκυτταρική πρωτεΐνη και τις ζωοτροφές ($8 \cdot 10^5$ tn/yr), τη ζύμη αρτοποιίας ($6 \cdot 10^5$ tn/yr) και κιτρικό οξύ ($5 \cdot 10^5$ tn/yr) που παράγεται από ζύμες και μύκητες.

Οι ζύμες χρησιμοποιούνται σε πολλές βιομηχανικές διεργασίες, όπως στην παραγωγή αλκοολούχων ποτών, αρτοποιητικής βιομάζας, τροφίμων, ζωοτροφών και σε διάφορα μεταβολικά προϊόντα. Η τελευταία κατηγορία περιλαμβάνει ένζυμα, βιταμίνες, πολυσακχαρίτες, καροτενοειδή, πολυόλες, λιπίδια, γλυκολιπίδια, κιτρικό οξύ, αιθανόλη, διοξείδιο του άνθρακα και ενώσεις που συντίθενται με την εισαγωγή του ανασυνδυασμένου DNA σε ζυμομύκητες. Μερικά από αυτά τα προϊόντα παράγονται εμπορικά ενώ άλλα είναι δυνητικά πολύτιμα στον τομέα της βιοτεχνολογίας. Ορισμένες από τις παρούσες και πιθανές χρήσεις των ζυμών στις βιομηχανίες τροφίμων, ποτών και άλλων βιομηχανιών ζύμωσης παρατίθενται στον πίνακα 1.3-1 (Demain *et al.*, 1998).

Πίνακας 1.3-1: Ορισμένες παρούσες και πιθανές χρήσεις των ζυμών στις βιομηχανίες τροφίμων, ποτών και ζύμωσης.

Εφαρμογή	Στέλεχος ζύμης
Ζύμωση μπίρας τύπου "ale"	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Διόγκωση ψωμιών και ζυμών (προζύμι)	<i>S. cerevisiae</i> , <i>Saccharomyces exiguus</i> , " <i>Saccharomyces rosei</i> "
D-Αραβιτόλη (γλυκαντική ουσία)	<i>Candida diddensiae</i>
Γαλακτωματοποιητές	<i>Candida lipolytica</i>
Ζύμωση αιθανόλης	<i>S. cerevisiae</i>
Ιχθυοτροφές και πτηνοτροφές (ασταξανθίνη)	<i>Phaffia rhodozyma</i>
Ζωοτροφές και μονοκυτταρική πρωτεΐνη	<i>Candida utilis</i>
Ζύμωση λακτόζης και γάλακτος	<i>Candida pseudotropicalis</i> , " <i>Kluyveromyces fragilis</i> ", <i>Kluyveromyces lactis</i>
Ζύμωση μπίρας τύπου "lager"	" <i>Saccharomyces carlsbergensis</i> " (= <i>S. pastorianus</i>)
Μαννιτόλη (ενυδατική ουσία)	" <i>Torulopsis mannitofaciens</i> "
Σάλτσα (Shoyu) και πάστα (Miso) σόγιας	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>
Ζύμωση κρασιού	<i>S. cerevisiae</i>
Ξυλιτόλη (γλυκαντική ουσία)	" <i>Torulopsis candida</i> "
Ζύμωση D-Ξυλόζης	<i>Candida shehatae</i> , <i>Pachysolen tannophilus</i> , <i>Pichia stipitis</i> , <i>Pichia segobiensis</i>

[πηγή: (Demain *et al.*, 1998)]

1.3.2 Ελαιογόνοι μικροοργανισμοί

Οι ελαιογόνοι μικροοργανισμοί έχουν χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή λιπιδίων, τα οποία χαρακτηρίζονται ως μονοκυτταρικά έλαια (Single Cell Oils, SCOs) για να υποδηλωθεί η μικροβιακή τους προέλευση. Ο όρος "ελαιογόνος" χρησιμοποιήθηκε για να περιγράψει όλους τους μικροοργανισμούς που έχουν την ικανότητα να συσσωρεύουν περισσότερο από 20% κατά βάρος (w/w) λιπίδια στη βιομάζα τους. Αυτό το όριο συσσώρευσης, όμως είναι κάπως αυθαίρετο, ενώ ένας πιο ακριβής ορισμός θα ήταν ότι ένας μικροοργανισμός μπορεί να ονομαστεί ελαιογόνος εάν παράγει ένα ποσό SCOs, το οποίο να μπορεί να εξαχθεί με οικονομικά συμφέροντα τρόπο και να έχει εμπορική αξία (Fakas *et al.*, 2009).

Η αξιοποίηση των ελαιογόνων μικροοργανισμών ως πηγές ελαίων και λιπών σε επιχειρήσεις μεγάλης κλίμακας παρουσιάζει ένα μεγάλο βιομηχανικό ενδιαφέρον. Η τιμή παραγωγής των SCOs είναι υψηλότερη σε σύγκριση με την παραδοσιακή χρησιμοποίηση κοινών ελαίων και λιπών, λόγω της υποχρεωτικής διατήρηση ασηπτικών συνθηκών κατά την ανάπτυξη των μικροοργανισμών καθώς και του υψηλού κόστους της ζύμωσης (Koutinas *et al.*, 2014), όμως, διάφορες εναλλακτικές λύσεις για μεγάλης κλίμακας παραγωγή SCOs υπάρχουν, δεδομένου ότι οι τιμές των διαφόρων φυσικώς απαντώμενων λιπιδίων και λιπών στο φυτικό και ζωικό βασίλειο μπορεί να ποικίλουν. Ως εκ τούτου, η ταυτοποίηση μικροοργανισμών ικανών να παράγουν σε αυξημένες ποσότητες λιπίδια με δομή και σύνθεση παρόμοια με εκείνη των λιπών υψηλής αξίας και ακολούθως παραγωγή αυτών σε μεγάλη κλίμακα παρουσιάζει ένα τεράστιο οικονομικό ενδιαφέρον. Επιπλέον, διάφοροι ελαιογόνοι μικροοργανισμοί έχουν τη δυνατότητα να παρουσιάζουν αξιοσημείωτη ανάπτυξη και παραγωγή SCOs σε απόβλητα και υποπροϊόντα του κλάδου της αγρό-βιομηχανίας. Έτσι, η αξιοποίηση των υπολειμμάτων αυτών μαζί με την παραγωγή δυνητικά υψηλής προστιθέμενης αξίας λιπιδίων θα μπορούσε να αυξήσει τη βιωσιμότητα της διαδικασίας και να είναι ταυτόχρονα επωφελείς για το περιβάλλον (Papanikolaou & Aggelis, 2011).

1.4 Παραγόμενα μεταβολικά προϊόντα

1.4.1 Λιπίδια - Βιοσύνθεση κυτταρικών λιπιδίων

Όλοι οι μικροοργανισμοί είναι ικανοί να συνθέσουν λιπίδια με σκοπό να εφοδιάσουν τις δομές (π.χ. μεμβράνες) καθώς και για διάφορους λειτουργικούς σκοπούς. Όμως, μόνο τα χαρακτηριζόμενα ως ελαιογόνα στελέχη ενδέχεται να συσσωρεύσουν στο εσωτερικό των κυττάρων τους σημαντικές ποσότητες λιπιδίων. Έχει αποδειχθεί ότι οι ελαιογόνοι μικροοργανισμοί δεν διαθέτουν ένα υπερδραστήριο σύστημα της βιοσύνθεσης λιπαρών οξέων, αλλά είναι ικανοί να παράγουν σημαντικές ποσότητες ακετυλο-συνενζύμου Α (acetyl-CoA), τη βασική μονάδα βιοσύνθεσης λιπαρών οξέων.

Στην περίπτωση της βιοσύνθεσης λιπιδίων των μη-ελαιογόνων μικροοργανισμών συμβαίνει το εξής:

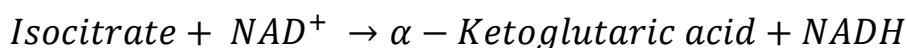
Το καθαρό προϊόν της γλυκόλυσης είναι το πυροσταφυλικό οξύ, το οποίο περνά μέσα από την μιτοχονδριακή μεμβράνη στη μήτρα του μιτοχονδρίου. Η πυροσταφυλική αφυδρογονάση καταλύει το σχηματισμό του ακετυλο-CoA από πυροσταφυλικό οξύ και το αυτό είτε εισέρχεται μέσα στον κύκλο του Krebs, ή μεταφέρεται και πάλι μέσα στο κυτταρόπλασμα, προκειμένου να ενισχυθεί η βιοσύνθεση των κυτταρικών λιπαρών οξέων. Δεδομένου ότι η μιτοχονδριακή μεμβράνη δεν είναι διαπερατή από το ακετυλο-CoA, η μετατροπή αυτής της ένωσης σε ακετυλο-καρνιτίνη (καταλύεται από καρνιτίνη-ακυλο-τρανσφεράση) θα πρέπει να

είναι αναγκαία για τη μεταφορά της μέσα στο κυτταρόπλασμα. Όμως, πρωτεύων ρόλος της καρνιτίνη-ακυλο-τρανσφεράσης είναι ακριβώς ο αντίθετος, δηλαδή η μεταφορά του ακετυλο-CoA στο εσωτερικό της μήτρας του μιτοχονδρίου. Ελάχιστες ποσότητες ακετυλο-καρνιτίνης μπορεί να περάσουν μέσω της μήτρας του μιτοχονδρίου προκειμένου να εισέλθουν στο κυτταρόπλασμα.

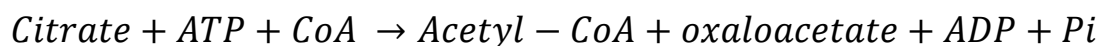
Στους ελαιογόνους μικροοργανισμούς το ακετυλο-CoA αποτελεί πρόδρομο μόριο της ενδοκυτταρικής βιοσύνθεσης των λιπαρών οξέων, προέρχεται από διάσπαση του κιτρικού οξέος - το οποίο υπό ορισμένες συνθήκες έχει προηγουμένως συσσωρευτεί μέσα στα μιτοχόνδρια - και στη συνέχεια μεταφέρεται στο κυτταρόπλασμα. Το καθοριστικό στάδιο για τη συσσώρευση λιπιδίων στους ελαιογόνους μικροοργανισμούς είναι η αλλαγή της ενδοκυτταρικής συγκέντρωσης των διαφόρων μεταβολιτών, η οποία συμβαίνει μετά την εξάντληση ορισμένων θρεπτικών συστατικών στο μέσο της καλλιέργειας. Στις περισσότερες από τις διεξαχθείσες μελέτες, η απαραίτητη θρεπτική ουσία, η εξάντληση της οποίας επάγεται τη συσσώρευση αποθεματικών λιπιδίων, είναι εκείνη του αζώτου. Επίσης, το εξωκυτταρικό άζωτο είναι ο περιοριστικός παράγοντας της μικροβιακής ανάπτυξης. Η εξάντληση του αζώτου προκαλεί μια ταχεία μείωση της συγκέντρωσης του ενδοκυτταρικής μονοφωσφορικής αδενοσίνης (AMP), δεδομένου ότι ο μικροοργανισμός διασπά την AMP σε μονοφωσφορική ινοσίνη (IMP) και σε ιόντα αμμωνίου (NH_4^+), με την δράση του ενζύμου AMP-απαμινάση.



Τα ιόντα NH_4^+ αποτελούν συμπληρωματική πηγή αζώτου, η οποία γίνεται απαραίτητη για τη βιοσύνθεση των κυττάρων μετά τον περιορισμό του εξωκυτταρικού αζώτου. Η ενδοκυτταρική AMP ενεργοποιεί αλλοστερικά την ισοκιτρική αφυδρογονάση, ένζυμο που είναι υπεύθυνο για τη μετατροπή του ισοκιτρικού οξέος σε α -κετογλουταρικό οξύ.



Οπότε, η υπερβολική μείωση της συγκέντρωσης της ενδοκυτταρικής AMP έχει ως συνέπεια την απώλεια της δραστηριότητας της ισοκιτρικής αφυδρογονάσης, με αποτέλεσμα να αλλάζει η λειτουργία του κύκλου του Krebs. Έτσι, το ισοκιτρικό οξύ συσσωρεύεται μέσα στο μιτοχόνδριο και βρίσκεται σε ισορροπία με το κιτρικό οξύ (αντίδραση που καταλύεται από ισοκιτρική ακονιτάση). Όταν η ενδομιτοχονδριακή συγκέντρωση κιτρικού οξέος φθάσει σε μια κρίσιμη τιμή, το κιτρικό οξύ εισέρχεται στο κυτταρόπλασμα σε ανταλλαγή με μηλικό οξύ. Τέλος, το κιτρικό οξύ διασπάται από την ATP-κιτρική λυάση (ATP-CL), το ένζυμο κλειδί της διαδικασίας συσσώρευσης λιπιδίων στους ελαιογόνους μικροοργανισμούς, σε ακετυλο-CoA και σε οξαλοξικό οξύ.



Το ακέτυλο-CoA, μέσω της ανεστραμμένης β-οξειδωσης, θα δημιουργήσει τα κυτταρικά λιπαρά οξέα (Fakas *et al.*, 2009; Papanikolaou & Aggelis, 2011; Ratledge, 2004).

Όμως, για τη βιοσύνθεση των λιπαρών οξέων είναι απαραίτητη η παρουσία συνενζύμων NADPH (απορροφώνται σε μεγάλες ποσότητες κατά τη διεργασία της σύνθεσης των λιπαρών οξέων), τα οποία παρέχονται από τον κύκλο του μηλικού οξέος, που λαμβάνει χώρα στα κύτταρα των ελαιογόνων μικροοργανισμών. Τελικά, τα παραγόμενα λιπαρά οξέα εστεροποιούνται στο μόριο της γλυκερόλης, σχηματίζοντας τριγλυκερίδια και μέσω του ενδοπλασματικού δικτύου διακινούνται για να σχηματίσουν λιποσωμάτια (Ratledge, 2004).

Συνοψίζοντας, η συσσώρευση των κυτταρικών λιπιδίων είναι μια αναβολική βιοχημική διαδικασία κατά την οποία το ακέτυλο-CoA, που εκρέει από το ενδιάμεσο κυτταρικό μεταβολισμό, δημιουργεί κυτταρικά λιπαρά οξέα. Τα λιπαρά οξέα στη συνέχεια εστεροποιούνται με τη γλυκερόλη δημιουργώντας δομικά (φωσφολιπίδια, σφιγγολιπίδια, κλπ) και εφεδρικά-αποθεματικά (κυρίως τριγλυκερίδια- TAGs) λιπίδια (Papanikolaou & Aggelis, 2011).

Αυτή η αλληλουχία αντιδράσεων εξασφαλίζει την αποτελεσματική διοχέτευση του άνθρακα προς σύνθεση SCOs. Τα SCOs είναι οι κύριες πηγές πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (PUFAs) που έχουν μεγάλο διατροφικό και φαρμακευτικό ενδιαφέρον. Η μικροβιακή παραγωγή PUFAs έχει καθιερωθεί λόγω της έλλειψης εναλλακτικών πηγών αυτών των λιπαρών οξέων. Πράγματι, ορισμένα PUFAs παράγονται σήμερα σε μεγάλη κλίμακα με τη χρήση ελαιογόνων μικροοργανισμών, όπως το αραχιδονικό οξύ. Επίσης, βιομηχανικές διαδικασίες για την παραγωγή PUFAs με υψηλή διατροφική και φαρμακευτική αξία, στα οποία υπάρχει έλλειψη άφθονων φυσικών πηγών, είναι υπό ανάπτυξη (Fakas *et al.*, 2009).

Τέλος, αξίζει να αναφερθεί το γεγονός ότι το καθαρό προϊόν της δράσης της ATP-CL, που όπως προαναφέρθηκε είναι το ακέτυλο-CoA, θα μετατραπεί περαιτέρω σε ενδο-κυτταρικά λιπαρά οξέα. Εάν, όμως, το ενζυματικό σύμπλοκο της ATP-CL δεν υπάρχει, η εξάντληση του αζώτου οδηγεί στη συσσώρευση του κιτρικού οξέος μέσα στο κυτταρόπλασμα. Στην περίπτωση αυτή, το κιτρικό οξύ είτε θα εκκρίνεται στο μέσο καλλιέργειας ή θα προκαλέσει την αναστολή της 6-φώσφορο-φρουκτοκινάσης, έχοντας σαν αποτέλεσμα ενδοκυτταρική συσσώρευση των πολυσακχαριτών. Λόγω της σημαντικής βιοχημικής ομοιότητας μεταξύ της ενδοκυτταρικής συσσώρευσης λιπιδίων και της εξωκυτταρικής έκκρισης και παραγωγής του κιτρικού οξέος, τα τελευταία χρόνια οι ζύμες έχουν χωριστεί και ταξινομούνται από διάφορους συγγραφείς είτε ως ζύμες που συσσωρεύουν λιπίδια είτε ως ζύμες που παράγουν κιτρικό οξύ (Papanikolaou & Aggelis, 2011).

1.4.2 Ενδοπολυσακχαρίτες (Intracellular Polysaccharides, IPS)

Οι πολυσακχαρίτες είναι πολυμερή αποτελούμενα από μονοσακχαρίτες και ο γενικός χημικός τους τύπος είναι $(C_6H_{10}O_5)_n$, συνήθως με $n > 100$. Όπως και οι ολιγοσακχαρίτες αποτελούνται από μονάδες γλυκοζυλίου σε γραμμική ή διακλαδισμένη διάταξη, αλλά οι περισσότεροι αποτελούνται από πολλούς περισσότερους 20 μονοσακχαρίτες, που είναι το όριο για τους ολιγοσακχαρίτες. Ο αριθμός των μονάδων μονοσακχαρίτη σε έναν πολυσακχαρίτη, που ονομάζεται βαθμός πολυμερισμού (ΒΠ), ποικίλλει. Μόνο λίγοι πολυσακχαρίτες έχουν ένα ΒΠ μικρότερο από 100, οι περισσότεροι έχουν ΒΠ εντός του εύρους 200-3000. Οι μεγαλύτεροι από αυτούς, όπως η κυτταρίνη, έχουν ένα ΒΠ από 7000-15000. Επίσης, χρησιμεύουν ως αποταμιευτικές και δομικές ύλες σε ζωικούς και φυτικούς οργανισμούς. Εκτιμάται ότι περισσότερο από το 90% της σημαντικής μάζας υδατάνθρακα στη φύση είναι στη μορφή των πολυσακχαριτών. Πολυσακχαρίτες μπορούν να είναι είτε γραμμικά ή διακλαδισμένα μόρια. Ο γενικός επιστημονικός όρος για τους πολυσακχαρίτες είναι ο όρος γλυκάνες (BeMiller *et al.*, 1996; Belitz *et al.*, 2009).

1.4.3 Κιτρικό οξύ

Η ονομασία του κιτρικού οξέως ($C_6H_8O_7$) προέρχεται από τη λατινική λέξη "*citrus*", το δέντρο κίτρο. Απομονώθηκε για πρώτη φορά από τον χυμό λεμονιού το 1784 από τον Carl Scheele (1742-1786), έναν Σουηδό χημικό, ο οποίος έκανε μια σειρά ανακαλύψεων σημαντικές για την πρόοδο της χημείας. Το κιτρικό οξύ ως εκ τούτου ήταν ένα από τα πολλά φυσικά οργανικά οξέα.

Φυσικά παραγόμενο κιτρικό οξύ (λεμόνια): Παράχθηκε εμπορικά από ιταλικά λεμόνια περίπου το 1826 στην Αγγλία, αλλά καθώς αποκτούσε αυξανόμενη σημασία του ως ένα στοιχείο του εμπορίου, η παραγωγή του σε μεγάλη κλίμακα ξεκίνησε στην Ιταλία από τους καλλιεργητές λεμονιών, οι οποίοι καθιέρωσαν ένα εικονικό μονοπώλιο κατά το υπόλοιπο του 19^{ου} αιώνα. Ο χυμός του λεμονιού παρέμεινε η εμπορική πηγή του κιτρικού οξέος μέχρι το 1919, όταν στο Βέλγιο ξεκίνησε η πρώτη βιομηχανική διαδικασία χρησιμοποιώντας τον μικροοργανισμό *Aspergillus niger*.

Συνθετικό κιτρικό οξύ: Το κιτρικό οξύ παράχθηκε συνθετικά το 1880 από γλυκερόλη από τους Grignoux και Adams. Αρκετοί διαφορετικοί τρόποι που χρησιμοποιούν διαφορετικά υλικά εκκίνησης έχουν έκτοτε δημοσιευθεί. Όλες, όμως, οι χημικές μέθοδοι έχουν μέχρι στιγμής αποδειχθεί προβληματικές, μη ανταγωνιστικές κυρίως για οικονομικούς λόγους με το αρχικό υλικό αξίζει περισσότερο από το τελικό προϊόν και με κακές αποδόσεις λόγω του αριθμού των σταδίων αντίδρασης στην σύνθεση ή ακατάλληλες λόγω των απαραίτητων προφυλάξεων κατά το χειρισμό των επικίνδυνων ενώσεων που εμπλέκονται.

Μικροβιακό κιτρικό οξύ: Η έννοια της μικροβιολογικής δράσης αποδίδοντας χρήσιμα προϊόντα, που ακολουθήθηκε από τις πρωτοποριακές μελέτες Pasteur σχετικά με τη μικροβιακή ζύμωση, είχε ως αποτέλεσμα τη συστηματική διερεύνηση των μυκήτων και βακτηρίων. Ο Wehmer, το 1893, έδειξε ότι ένα στέλεχος του "*Citromyces*" (τώρα *Penicillium*) συσσωρεύει κιτρικό οξύ σε ένα μέσο καλλιέργειας που περιέχει σάκχαρα και ανόργανα άλατα. Το έργο αυτό δεν οδήγησε άμεσα σε μια εμπορική διαδικασία, αλλά επέφερε ως επακόλουθο την αναζήτηση για άλλους οργανισμούς ικανούς να συνθέτουν κιτρικό οξύ. Η Cuggie, το 1917, βρήκε στελέχη του *Aspergillus niger* που παρήγαγαν κιτρικό οξύ όταν καλλιεργούνταν σε θρεπτικά μέσα με χαμηλές τιμές pH, με υψηλά επίπεδα σακχάρων και με ανόργανα άλατα.

Χρήσεις του κιτρικού οξέος: Το κιτρικό οξύ χρησιμοποιείται σε τρόφιμα, είδη ζαχαροπλαστικής, ποτά, σε φαρμακευτικά είδη και σε βιομηχανικούς τομείς. Οι χρήσεις του εξαρτώνται από τρεις ιδιότητες: την οξύτητα, το άρωμα και τη δυνατότητα σχηματισμού αλάτων, κάποιες από τις εφαρμογές του παρατίθενται στον πίνακα 1.4-1 (Mattey *et al.*, 1999).

Πίνακας 1.4-1: Εφαρμογές του κιτρικού οξέος.			
Βιομηχανικός τομέας	Ιδιότητα	Χρήση	Μερίδιο αγοράς
<i>Τρόφιμα</i>			Περίπου 75%
Ποτά	Οξίνιση	Αρτυματική	
Ζελέ, μαρμελάδες κ.α.	Αρτυματική	Οξίνιση	
Λίπη και έλαια	Αντιοξειδωτική	Συμπλοκοποίηση μετάλλων	
Κατεψυγμένα τρόφιμα	Αντιοξειδωτική		
<i>Φαρμακευτικά είδη</i>			Περίπου 10%
Αναβράζοντα	Οξέος	Γεύση	
Βιταμίνες	Αντιοξειδωτική		
Αντιπηκτικά	Διαχωριστική	Ρυθμιστική	
Σκευάσματα σιδήρου	Σχηματισμός αλάτων		
Καλλυντικά	Ρυθμιστική	Αντιοξειδωτική	
<i>Χημική βιομηχανία</i>			Περίπου 15%
Καθαριστικά μετάλλων	Διαχωριστική		
Απορρυπαντικά	Ρυθμιστική	Διαχωριστική	
Φωτογραφικά	Ρυθμιστική		
Πολυμερισμός	Διαχωριστική		

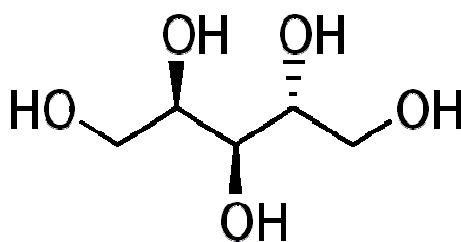
(Mattey *et al.*, 1999)

1.4.4 Πολυόλες

Οι πολυόλες είναι αλκοόλες που περιέχουν πολλαπλές υδροξυλομάδες, δηλαδή πολυαλκοόλες, όπως για παράδειγμα η αραβιτόλη ($C_5H_{12}O_5$), η μαννιτόλη ($C_6H_{14}O_6$) και η ερυθριτόλη ($C_4H_{10}O_4$). Ουσιαστικά είναι αλδόζες ή κετόζες, οι οποίες με αναγωγικά μέσα, ανάγονται στο σημείο της καρβονυλικής ομάδας πολυσθενείς αλκοόλες (ή πολυόλες ή πολυαλκοόλες), τις αλδιτόλες (Belitz *et al.*,

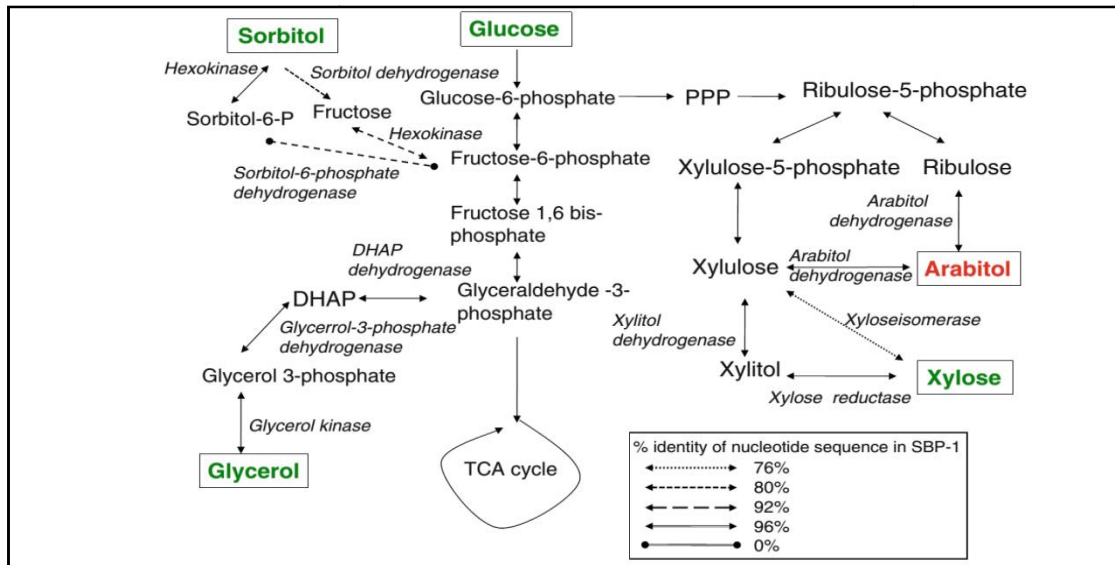
2009; BeMiller *et al.*, 1996). Προσφάτως, έχει σημειωθεί κάποια έρευνα που σχετίζεται με την παραγωγή πολυολών από στελέχη της ζύμης *Yarrowia lipolytica* που αναπτύχθηκαν κυρίως σε υποστρώματα αποτελούμενα από ακάθαρτη (κυρίως προερχόμενη από βιοντίζελ) ή καθαρή γλυκερόλη (André *et al.*, 2009; Rymowicz *et al.*, 2009; Tomaszewska *et al.*, 2012).

Η αραβιτόλη (εικ. 1.4-1), η οποία είναι εναντιομερές της ξυλιτόλης, έχει προσδιοριστεί ως μια από τις κορυφαίες δώδεκα χημικές δομικές ουσίες που προέρχονται από την βιομάζα. Η αραβιτόλη μπορεί να μετατραπεί σε διάφορες ομάδες χημικών ουσιών (π.χ. προπυλενογλυκόλη, αιθυλενογλυκόλη), έχει σημείο τήξης 103°C (ξυλιτόλη Σ.Τ.=93°C), είναι εξαιρετικά διαλυτή στο νερό και σχηματίζει λευκούς κρυστάλλους σε καθαρή μορφή. Ο καταβολισμός της αραβιτόλης από το βακτήριο *Escherichia coli* περιλαμβάνει το σχηματισμό φωσφορικής αραβιτόλης που επάγει την σύνθεση ενώσεων που αναστέλλουν βακτηριακό μεταβολισμό. Αυτή η ιδιότητα καθιστά δυνατή τη χρήση της αραβιτόλης ως γλυκαντικό που δεν συμβάλλει στην τερηδόνα. Επίσης, η θερμιδική αξία της αραβιτόλης είναι 0.2 kcal/g, ενώ της ξυλιτόλης είναι 2.4 kcal/g και της σακχαρόζης 4 kcal/g. Οπότε, είναι πολύ πιθανό ότι αραβιτόλη μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε πολλές από τις γνωστές εφαρμογές της ξυλιτόλης. (Koganti *et al.*, 2011; Le Tourneau, 1966; Werpy *et al.*, 2004; Scangos *et al.*, 1979; McCormick *et al.*, 1961; Huck *et al.*, 2004; Crick, 1961; Mitchell, 2006).



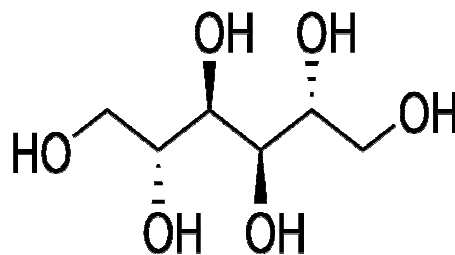
Εικόνα 1.4-1: Συντακτικός τύπος της αραβιτόλης.

Η αραβιτόλη συντίθεται μέσω της οδού των φωσφορικών πεντοζών (Saha *et al.*, 2007). Οι πιθανές οδοί σύνθεσής της συνοψίζονται στην *εικόνα 1.4-2*.



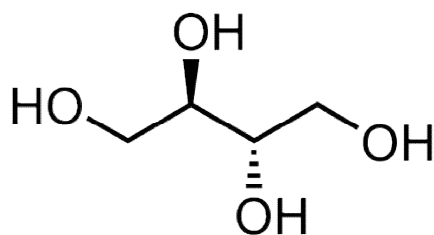
Εικόνα 1.4-2: Πιθανά μεταβολικά μονοπάτια για τη μετατροπή των διαφόρων υποστρωμάτων σε αραβιτόλη. [πηγή: αυτούσιο από (Koganti *et al.*, 2011)]

Η μαννιτόλη (εικ. 1.4-3) είναι μια πολυσθενής αλκοόλη με έξι άτομα άνθρακα, έχει πολλές εφαρμογές στις βιομηχανίες τροφίμων, φαρμάκων και στις ιατρικές επιστήμες. Υπάρχει ευρέως στη φύση, σε διάφορα φυτά, άλγη, σε διάφορους μύκητες και αποτελεί έναν από τους κύριους υδατάνθρακες των μανιταριών. Αυτή τη στιγμή παράγεται βιομηχανικώς με χημική σύνθεση χρησιμοποιώντας την τεχνική υδρογόνωσης της φρουκτόζης σε υψηλή θερμοκρασία και πίεση. Αυτή η διαδικασία δεν είναι πολύ αποτελεσματική και απαιτεί υψηλή καθαρότητα υποστρωμάτων. Ως εκ τούτου, η μικροβιολογική παραγωγή της μαννιτόλης θα ήταν μια ενδιαφέρουσα εναλλακτική λύση.



Εικόνα 1.4-3: Συντακτικός τύπος της μαννιτόλης.

Η ερυθριτόλη (εικ. 1.4-4) είναι μια πολυσθενής αλκοόλη τεσσάρων ατόμων άνθρακα που παράγεται σε μικροβιολογικές μεθόδους. Σε σύγκριση με άλλες πολυσθενείς αλκοόλες που χρησιμοποιούνται σήμερα ως υποκατάστατα της σακχαρόζης, η ερυθριτόλη έχει πολύ χαμηλή ενεργειακή αξία, περίπου 0.2 kcal/g σε σύγκριση με την σακχαρόζη, 4 kcal/g, καθώς και άλλες αλκοόλες της ζάχαρης (π.χ. ξυλιτόλη 2.4 kcal/g) (Tomaszewska *et al.*, 2012).



Εικόνα 1.4-4: Συντακτικός τύπος της ερυθριτόλης.

Επίσης, τα υποκατάστατα ζάχαρης είναι αυτές οι ενώσεις που χρησιμοποιούνται σαν τα σάκχαρα για γλύκανση, αλλά μεταβολίζονται χωρίς την επίδραση της ινσουλίνης. Σημαντικά υποκατάστατα ζάχαρης είναι οι αλκοόλες σακχάρων (πολυόλες) (Belitz *et al.*, 2009).

1.5 Σκοπός της μελέτης

Στην παρούσα μελέτη διερευνήθηκε η ικανότητα ανάπτυξης των στελεχών των ζυμών (πίν. 2.2-1) χρησιμοποιώντας ανανεώσιμες πρώτες ύλες, συγκεκριμένα ακάθαρτη βιομηχανική γλυκερόλη, η οποία είναι παραπροϊόν της βιομηχανικής παραγωγής βιοκαυσίμου (biodiesel). Ειδικότερα, μελετήθηκε η ικανότητα των ζυμών να μεταβολίζουν την ακάθαρτη βιομηχανική γλυκερόλη προς παραγωγή βιομάζας, δευτερογενών μεταβολιτών (μικροβιακού λίπους και ενδοπολυσακχαριτών) και διαφόρων μεταβολικών προϊόντων (π.χ. αραβιτόλη, μαννιτόλη) των στελεχών αυτών. Οι καλλιέργειες διενεργήθηκαν σε διαφορετικές συγκεντρώσεις υποστρώματος και σε σταθερές συνθήκες ανάδευσης και θερμοκρασίας. Η γλυκερόλη που χρησιμοποιήθηκε ήταν διαχωρισμένη και καθαρότητας 95% κατά βάρος.

2. Υλικά και μέθοδοι

2.1 Βιολογικό υλικό - Μικροοργανισμοί

Τα στελέχη των μικροοργανισμών, που χρησιμοποιήθηκαν ως βιολογικό υλικό στην παρούσα μελέτη παρατίθενται στον πίνακα 2.1-1. Από τα στελέχη αυτά όσα έχουν την ονομασία EMBT και LMBF, απομονώθηκαν, αναγνωρίστηκαν και ταυτοποιήθηκαν στο Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, ενώ όσα έχουν την ονομασία NRRL παρασχέθηκαν από την συλλογή καλλιέργειών της Υπηρεσίας Γεωργικής Έρευνας (Agricultural Research Service, ARS), που αποτελεί τον επικεφαλής επιστημονικό οργανισμό έρευνας του Υπουργείου Γεωργίας των Η.Π.Α. Οι μικροοργανισμοί διατηρούνταν σε PDA σε θερμοκρασία 4°C και η ανανέωσή τους γίνονταν ανά τακτά χρονικά διαστήματα (περίπου κάθε 30 ημέρες).

Πίνακας 2.1-1: Στελέχη ζυμών που χρησιμοποιήθηκαν για την παρούσα μελέτη.

Γένος	Είδος	Στέλεχος
<i>Yarrowia</i>	<i>lipolytica</i>	LMBF Y-45
		LMBF Y-46
		LMBF Y-47
<i>Rhodotorula</i>	sp.	LMBF Y-49
		EMBT Y-48
		EMBT Y-49
<i>Cryptococcus</i>	<i>glutinis</i>	NRRL YB-252
	<i>curvatus</i>	NRRL Y-1511
	<i>uzbekistanensis</i>	EMBT Y-44
<i>Metschnikowia</i>	sp.	P.D. - F1 ^a
		P.D. - D2 ^a
		V.V. - D4 ^b
<i>Rhodospiridium</i>	<i>kratochvilovae</i>	EMBT Y-42
		EMBT Y-43
<i>Debaryomyces</i>	<i>hansenii</i>	EMBT Y-36
		EMBT Y-41

^a στελέχη απομονωμένα από το είδος *Prunus domestica* (κορομηλιά), με κωδικές ονομασίες

^b στέλεχος απομονωμένο από το είδος *Vitis vinifera* (άμπελος), με κωδική ονομασία

2.2 Συνθήκες καλλιέργειας των υπό μελέτη στελεχών

2.2.1 Παρασκευή υγρού εμβολίου

Για την προετοιμασία του εμβολιαστικού υλικού, έγινε αύξηση του μικροοργανισμού σε προκαλλιέργεια. Η προκαλλιέργεια πραγματοποιήθηκε εντός κωνικών φιαλών Erlenmeyer των 250 mL, πληρωμένες κατά το 1/5 του όγκου τους (50±1 mL) με θρεπτικό μέσο YPD. Στη συνέχεια, η προκαλλιέργεια τοποθετούνταν σε ανακινούμενη τράπεζα προς επώαση σε σταθερές συνθήκες ανάδευσης, στις 180±5 rpm και θερμοκρασίας στους 28±1°C, για 24 ώρες. Η προκαλλιέργεια χρησιμοποιήθηκε για τον εμβολιασμό του θρεπτικού μέσου της καλλιέργειας. Η

συγκεκριμένη διαδικασία πραγματοποιήθηκε πριν από κάθε καλλιέργεια του εκάστοτε στελέχους.

2.2.2 Θρεπτικό μέσο καλλιέργειας

Οι καλλιέργειες πραγματοποιήθηκαν σε θρεπτικό μέσο που περιείχε ως μοναδική πηγή άνθρακα και ενέργειας ακάθαρτη βιομηχανική γλυκερόλη και ήταν περιοριστικό ως προς την πηγή αζώτου. Η βιομηχανική γλυκερόλη (περιείχε 2% μονογλυκερίδια, διγλυκερίδια και ελεύθερα λιπαρά οξέα, 3% NaCl, 0,1 % μεθανόλη και 3% νερό) και ήταν καθαρότητας 95% κατά βάρος (w/w).

Συγκεκριμένα, οι αρχικές συγκεντρώσεις που επιλέχθηκαν ήταν:

για την πηγή άνθρακα

1. 40.0 g/L γλυκερόλης
2. 50.0 g/L γλυκερόλης
3. 80.0 g/L γλυκερόλης
4. 125.0 g/L γλυκερόλης

για των πηγών αζώτου

1. 2.0 g/L πεπτόνης και 1.0 g/L yeast extract

για των αλάτων

1. 7.0 g/L KH_2PO_4 (άνυδρο φωσφορικό κάλιο)
2. 2.5 g/L Na_2HPO_4 (άνυδρο φωσφορικό δι-νάτριο)
3. 1.5 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (ένυδρο θειικό μαγνήσιο)
4. 0.15 g/L $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (ένυδρος 3-χλωριούχος σίδηρος ή μολυσίτης)
5. 0.15 g/L $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (ένυδρο 2-χλωριούχο ασβέστιο)
6. 0.02 g/L $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (ένυδρος θειικός ψευδάργυρος)
7. 0.06 g/L $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (ένυδρο θειικό μαγγάνιο)

Επίσης, ο λόγος άνθρακας προς άζωτο (C/N), στην αρχή της καλλιέργειας, ήταν:

1. 45 g/g ή 53 mol/mol για 40 g/L γλυκερόλης
2. 57 g/g ή 66 mol/mol για 50 g/L γλυκερόλης
3. 90 g/g ή 105 mol/mol για 80 g/L γλυκερόλης
4. 140 g/g ή 163 mol/mol για 125 g/L γλυκερόλης

2.2.3 Συνθήκες καλλιέργειας

Η παρούσα μελέτη χωρίστηκε σε τέσσερα πειραματικά στάδια (πειράματα). Οι καλλιέργειες που διενεργήθηκαν καθώς και η διάρκεια της κάθε ζύμωσης παρατίθενται στους πίνακες 2.2-1 & 2.2-2. Οι καλλιέργειες πραγματοποιήθηκαν σε κωνικές φιάλες Erlenmeyer των 250 mL και σε βιοαντιδραστήρα των 3 L.

Πίνακας 2.2-1: Οι καλλιέργειες που πραγματοποιήθηκαν κατά τη διάρκεια της παρούσας μελέτης, ανά στέλεχος, σε διαφορετικές συγκεντρώσεις γλυκερόλης.

Στέλεχος	Κωνικές Φιάλες (250 mL)			Βιοαντιδραστήρας (3 L)
	40 g/L	80 g/L	125 g/L	80 g/L
<i>Yarrowia lipolytica</i> LMBF Y-45	✓			
<i>Yarrowia lipolytica</i> LMBF Y-46	✓			
<i>Yarrowia lipolytica</i> LMBF Y-47 ¹	✓			
<i>Rhodotorula</i> sp. LMBF Y-49	✓			
<i>Rhodotorula</i> sp. EMBT Y-48	✓			
<i>Rhodotorula</i> sp. EMBT Y-49	✓			
<i>Rhodotorula glutinis</i> NRRL YB-252	✓	✓		
<i>Cryptococcus curvatus</i> NRRL Y-1511	✓	✓		
<i>Cryptococcus uzbekistanensis</i> EMBT Y-44 ¹	✓			
<i>Metschnikowia</i> sp. PD - F1	✓			
<i>Metschnikowia</i> sp. PD - D2	✓			
<i>Metschnikowia</i> sp. VV - D4	✓			
<i>Rhodospiridium kratochvilovae</i> EMBT Y-42	✓			
<i>Rhodospiridium kratochvilovae</i> EMBT Y-43	✓			
<i>Debaryomyces hansenii</i> EMBT Y-36	✓	✓		
<i>Debaryomyces hansenii</i> EMBT Y-41	✓	✓	✓	✓

¹ Πραγματοποιήθηκαν δύο καλλιέργειες στην ίδια συγκέντρωση, αλλά διαφορετικής διάρκειας.

Πίνακας 2.2-2: Η διάρκεια, σε ώρες (h), κάθε καλλιέργειας, στις αντίστοιχες συγκεντρώσεις γλυκερόλης.

Στέλεχος	Κωνικές Φιάλες (250 mL)			Βιοαντιδραστήρας (3 L)
	40 g/L	80 g/L	125 g/L	80 g/L
<i>Yarrowia lipolytica</i> LMBF Y-45	162h			
<i>Yarrowia lipolytica</i> LMBF Y-46	162h			
<i>Yarrowia lipolytica</i> LMBF Y-47	162h, 192h			
<i>Rhodotorula</i> sp. LMBF Y-49	162h			
<i>Rhodotorula</i> sp. EMBT Y-48	168h			
<i>Rhodotorula</i> sp. EMBT Y-49	162h			
<i>Rhodotorula glutinis</i> NRRL YB-252	168h	312h		
<i>Cryptococcus curvatus</i> NRRL Y-1511	168h	288h		
<i>Cryptococcus uzbekistanensis</i> EMBT Y-44	166h, 432h			
<i>Metschnikowia</i> sp. PD - F1	166h			
<i>Metschnikowia</i> sp. PD - D2	166h			
<i>Metschnikowia</i> sp. VV - D4	166h			
<i>Rhodospiridium kratochvilovae</i> EMBT Y-42	168h			
<i>Rhodospiridium kratochvilovae</i> EMBT Y-43	168h			
<i>Debaryomyces hansenii</i> EMBT Y-36	168h	240h		
<i>Debaryomyces hansenii</i> EMBT Y-41	168h	240h	360h	104h

2.2.3.1 Συγκριτική αξιολόγηση (screening) των 16 στελεχών σε κωνικές φιάλες (S₀ 40 g/L)

Στα στελέχη των μικροοργανισμών, που αναφέρονται στον πίνακα 2.1-1, διενεργήθηκε διερεύνηση και αξιολόγησή τους (screening), υπό τις ίδιες συνθήκες, για την καλύτερη παραγωγή μεταβολικών προϊόντων και την προσαρμογή τους στο υπόστρωμα της ακάθαρτης γλυκερόλης. Οι συνθήκες των ζυμώσεων ήταν οι εξής:

Το θρεπτικό μέσο τοποθετούνταν στις κωνικές φιάλες, οι οποίες γεμίζονταν κατά το 1/5 του όγκου τους (50±1 mL) με αυτό και αποστειρώνονταν σε αυτόκλειστο (121°C & 1.5 atm) για 20 min. Έπειτα, εμβολιάζονταν με 1000 µL εμβολίου (προκαλλιέργεια) υπό ασηπτικές συνθήκες. Οι κωνικές φιάλες της κύριας καλλιέργειας μεταφέρονταν σε ανακινούμενη τράπεζα στους 28±1°C και στις 180±5 rpm, ακολουθούσε κλειστή καλλιέργεια και το pH του θρεπτικού μέσου διορθώνονταν, όποτε κρίνονταν αναγκαίο. Η αρχική συγκέντρωση της γλυκερόλης στο θρεπτικό μέσο ήταν 40.0 g/L.

2.2.3.2 Καλλιέργειες σε κωνικές φιάλες με τις ζύμες *Debaryomyces*, *Rhodotorula* & *Cryptococcus* (S₀ 50 & 80 g/L)

Επιλέχθηκαν τα στελέχη *Debaryomyces hansenii* EMBT Y-36, *Debaryomyces hansenii* EMBT Y-41, *Rhodotorula glutinis* NRRL YB-252, *Cryptococcus curvatus* NRRL Y-1511 και *Cryptococcus uzbekistanensis* EMBT Y-44, βάσει των

αποτελεσμάτων τους, από το πρώτο πείραμα για να διερευνηθούν περαιτέρω σε υψηλότερες συγκεντρώσεις γλυκερόλης. Οι συνθήκες των ζυμώσεων ήταν οι εξής:

Το θρεπτικό μέσο τοποθετούνταν στις κωνικές φιάλες, οι οποίες γεμίζονταν κατά το 1/5 του όγκου τους (50±1 mL) με αυτό και αποστειρώνονταν σε αυτόκλειστο (121°C & 1.5 atm) για 20 min. Έπειτα, εμβολιάζονταν με 1000 µL εμβολίου (προκαλλιέργεια) υπό ασηπτικές συνθήκες. Οι κωνικές φιάλες της κύριας καλλιέργειας μεταφέρονταν σε ανακινούμενη τράπεζα στους 28±1°C και στις 180±5 rpm, ακολουθούσε κλειστή καλλιέργεια και το pH του θρεπτικού μέσου διορθώνονταν, όποτε κρίνονταν αναγκαίο. Η αρχική συγκέντρωση της γλυκερόλης στο θρεπτικό μέσο ήταν 80.0 g/L, εκτός από το στέλεχος *Cryptococcus uzbekistanensis* EMBT Y-44, για το οποίο η αρχική συγκέντρωση της γλυκερόλης ήταν 50.0 g/L.

2.2.3.3 Καλλιέργεια σε κωνικές φιάλες του *D. hansenii* EMBT Y-41 (S₀ 125 g/L)

Στο συγκεκριμένο στάδιο της πειραματικής διαδικασίας, επιλέχθηκε το στέλεχος *Debaryomyces hansenii* EMBT Y-41, για να διερευνηθεί περαιτέρω σε ακόμα υψηλότερη αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης, 125 g/L. Οι συνθήκες της καλλιέργειας ήταν οι εξής:

Το θρεπτικό μέσο τοποθετούνταν στις κωνικές φιάλες, οι οποίες γεμίζονταν κατά το 1/5 του όγκου τους (50±1 mL) με αυτό και αποστειρώνονταν σε αυτόκλειστο (121°C & 1.5 atm) για 20 min. Έπειτα, εμβολιάζονταν με 1000 µL εμβολίου (προκαλλιέργεια) υπό ασηπτικές συνθήκες. Οι κωνικές φιάλες της κύριας καλλιέργειας μεταφέρονταν σε ανακινούμενη τράπεζα στους 28±1°C και στις 180±5 rpm, ακολουθούσε κλειστή καλλιέργεια και το pH του θρεπτικού μέσου διορθώνονταν, όποτε κρίνονταν αναγκαίο.

2.2.3.4 Ασυνεχής καλλιέργεια σε βιοαντιδραστήρα του στελέχους *D. hansenii* EMBT Y-41 (S₀ 80 g/L)

Στο συγκεκριμένο στάδιο της πειραματικής διαδικασίας πραγματοποιήθηκε ασυνεχής υγρή καλλιέργεια σε βιοαντιδραστήρα με το στέλεχος *Debaryomyces hansenii* EMBT Y-41 και αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης 80 g/L ώστε να γίνει σύγκριση με το αντίστοιχο πείραμα που έγινε σε κωνικές φιάλες (πείραμα 2^ο).

Στην συγκεκριμένη περίπτωση διενεργήθηκε ασυνεχής καλλιέργεια (batch culture) σε βιοαντιδραστήρα 3 L, στον οποίο τοποθετούνταν το θρεπτικό μέσο, αποστειρωνόταν σε κλίβανο και εμβολιαζόταν με όγκο εμβολίου το 10% του τελικού ενεργού όγκου της καλλιέργειας, υπό ασηπτικές συνθήκες. Οι συνθήκες της καλλιέργειας ήταν η θερμοκρασία στους 28°C, η ανάδευση στις 150 rpm με ρύθμιση (cascade) να φτάνει

τις 400 rpm, ροή αέρα 1 vvm, το ποσοστό του διαλυμένου οξυγόνου (Dissolved Oxygen, DO) στο 20% και το pH να διατηρείται εντός του εύρους τιμών 5-6.

2.3 Χημικές αναλύσεις - Μετρήσεις

2.3.1 Προσδιορισμός του pH στο μέσο ανάπτυξης των μικροοργανισμών

Η μέτρηση της τιμής του pH της καλλιέργειας γίνονταν με πεχάμετρο (pH/mV meter HI 8014-Hanna Instruments). Εφόσον, η μετρηθείσα τιμή ήταν εντός του επιθυμητού εύρους τιμών ($\text{pH}=6.0\pm 0.5$) δεν γίνονταν καμία ενέργεια, ενώ σε αντίθετη περίπτωση διορθώνονταν η τιμή του pH, στις υπόλοιπες κωνικές φιάλες της καλλιέργειας, με προσθήκη κατάλληλης ποσότητας αποστειρωμένου διαλύματος καυστικού καλίου (KOH), συγκέντρωσης 5M.

2.3.2 Προσδιορισμός της παραγόμενης βιομάζας

Ο προσδιορισμός της βιομάζας γίνονταν με μέτρηση του ξηρού βάρους. Αρχικά οι καλλιέργειες φυγοκεντρώνταν σε φυγόκεντρο στις 9000 στροφές ανά λεπτό, για 10 λεπτά και σε θερμοκρασία 4°C. Ακολουθούσε έκπλυση με απιονισμένο νερό και τα κύτταρα φυγοκεντρώνταν για δεύτερη φορά, στις ίδιες συνθήκες. Έπειτα η βιομάζα μεταφερόταν σε προζυγισμένα φιαλίδια McCartney και στη συνέχεια σε φούρνο προς ξήρανση μέχρι σταθεροποίησης του βάρους, περίπου για 24 ώρες. Το ξηρό υπόλειμμα ζυγιζόταν σε ζυγό ακριβείας και εκφραζόταν σε g/L.

2.3.3 Προσδιορισμός ενδοκυτταρικού λίπους

Σε κάθε καλλιέργεια που πραγματοποιήθηκε, κατά την διάρκεια της παρούσας μελέτης, διενεργήθηκαν στο παραγόμενο ενδοκυτταρικό λίπος (SCO) ποσοτική ανάλυση (εκχύλιση λίπους) σε όλα τα δείγματα και ποιοτική ανάλυση (μεθυλεστεροποίηση & ανάλυση GC) στο ευρύτερο μέρος των δειγμάτων, που προέκυψαν από κάθε καλλιέργεια.

2.3.3.1 Ποσοτικός προσδιορισμός - εκχύλιση λίπους

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό του ενδοκυτταρικού λίπους, που παράχθηκε σε κάθε καλλιέργεια των χρησιμοποιούμενων στελεχών, ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία εκχύλισης του λίπους:

1. Παραλαβή της ξηρής βιομάζας σε φιαλίδιο τύπου McCartney, προσθήκη διαλύματος Folch σε ποσότητα τέτοια ώστε να καλύπτεται η ξηρή βιομάζα (Folch *et al.*, 1957; Paranikolaou *et al.*, 2001) και παραμονή του στο σκοτάδι, με σκοπό να αποφευχθεί η οξειδωση των λιπαρών οξέων του λίπους, για

τουλάχιστον 72 ώρες αεροστεγώς κλεισμένο. Το χρησιμοποιούμενο διάλυμα (Folch) είναι μίγμα των διαλυτών χλωροφορμίου (CHCl_3) και μεθανόλης (CH_3OH) σε αναλογία 2:1.

2. Διήθηση του υγρού βιομάζας και διαλυτών με διπλό διηθητικό χαρτί.
3. Εξάτμιση του διηθήματος, με τη βοήθεια περιστροφικού εξάτμιστήρα (flash evaporator).
4. Ζύγιση του μικροβιακού λίπους σε ζυγό ακριβείας και υπολογισμός του σε g/L ή σε g/g ξηράς ουσίας (ξηρής βιομάζας).

2.3.3.2 Ποιοτικός προσδιορισμός

Για τον ποιοτικό προσδιορισμό του μικροβιακού λίπους, που παράχθηκε στις καλλιέργειες των χρησιμοποιούμενων στελεχών, εφαρμόστηκε η μέθοδος της μεθυλεστεροποίησης λιπών σύμφωνα με τη μέθοδο A.F.NOR (Paranikolaou *et al.*, 2001), στο ευρύτερο μέρος των δειγμάτων και ακολούθησε ανάλυσή τους στον αέριο χρωματογράφο (GC).

2.3.4 Προσδιορισμός ενδοπολυσακχαριτών (IPS)

Σε κάθε καλλιέργεια που πραγματοποιήθηκε, κατά την διάρκεια της παρούσας μελέτης, διενεργήθηκε ποσοτικός προσδιορισμός των παραγόμενων ενδοπολυσακχαριτών (IPS, Intra-cellular polysaccharides) σε όλα τα δείγματα και ποιοτικός προσδιορισμός των ενδοπολυσακχαριτών σε αντιπροσωπευτικό μέρος των δειγμάτων, που προέκυψαν από κάθε καλλιέργεια.

Η ολική συγκέντρωση των ενδοπολυσακχαριτών μετρήθηκε με την διαδικασία η οποία είναι βασισμένη σε ένα τροποποιημένο πρωτόκολλο μεθόδου, το οποίο εκδόθηκε από τους Liang *et al.* (2009). Εν συντομία, η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν ότι σε 0.05 g ξηρής βιομάζας γίνονταν προσθήκη 10 mL υδροχλωρικού οξέος (HCl, 2M), το διάλυμα που προέκυπτε υδrolύονταν στους 100°C για 30 λεπτά, ακολουθούσε εξουδετέρωση του HCl με προσθήκη 10 mL καυστικού νατρίου (NaOH, 2M) και διήθησή με διπλό διηθητικό χαρτί, ώστε το διήθημα που προκύπτει να είναι διαυγές.

Για την ποσοτική ανάλυση των ενδοπολυσακχαριτών εφαρμόστηκε η μέθοδος για τον προσδιορισμό των αναγόντων σακχάρων σε ισοδύναμα γλυκόζης με χρήση του 3,5-δινιτροσαλικυλικού οξέος (Miller, 1959), ενώ για τον ποιοτικό προσδιορισμό των ενδοπολυσακχαριτών έγινε ανάλυση των δειγμάτων με την τεχνική της Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης (HPLC, High Performance Liquid Chromatography).

2.3.4.1 Ποσοτικός προσδιορισμός

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό των ενδοπολυσακχαριτών εφαρμόστηκε η μέθοδος για τον προσδιορισμό των αναγόντων σακχάρων σε ισοδύναμα γλυκόζης με χρήση του 3,5-δινιτροσαλικυλικού οξέος (αντιδραστήριο DNS), που εφαρμόστηκε από τον Miller (1959).

Η συγκέντρωση του εκάστοτε δείγματος σε ανάγοντα σάκχαρα υπολογίστηκε από την πρότυπη καμπύλη αναφοράς και εκφράστηκε σε ισοδύναμη συγκέντρωση γλυκόζης (g/L). Όλες οι απορροφήσεις μετρήθηκαν σε φασματοφωτόμετρο τύπου Hitachi U-2000 Spectrophotometer.

2.3.4.2 Ποιοτικός προσδιορισμός

Όπως προαναφέρθηκε ο ποιοτικός προσδιορισμός των ενδοπολυσακχαριτών έγινε με την χρήση της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC).

Η στήλη με την οποία έγινε ο διαχωρισμός των ουσιών είναι τύπου Aminex HPX-87H (Bio-Rad), όγκου 15mL και διαθέτει ένα συνδυασμό ανιχνευτών UV και RI. Ως κινητή φάση (mobile phase) χρησιμοποιήθηκε διάλυμα θειικού οξέος (H₂SO₄) συγκέντρωσης 5 mM (0.005M), με ρυθμό ροής (flow rate) 0.6 mL/min, σε θερμοκρασία 65°C και η διάρκεια της ανάλυσης ήταν 25 min.

2.3.5 Προσδιορισμός γλυκερόλης και πολυολών (αραβιτόλη, μαννιτόλη, ερυθριτόλη)

Ο προσδιορισμός των συγκεντρώσεων της γλυκερόλης και των πολυολών (αραβιτόλη, μαννιτόλη, ερυθριτόλη) έγινε με τη χρήση της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC) και η εύρεση των αγνώστων συγκεντρώσεων έγινε με τη χρήση των αντίστοιχων καμπυλών αναφοράς των πρότυπων ουσιών.

2.3.6 Προσδιορισμός κιτρικού οξέος

Το κιτρικό οξύ προσδιορίστηκε, επίσης, με τη χρήση της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC). Συγκεκριμένα το κιτρικό οξύ ανιχνεύθηκε στον UV και η εύρεση των αγνώστων συγκεντρώσεων έγινε με τη χρήση της αντίστοιχης καμπύλης αναφοράς της πρότυπης ουσίας.

3. Αποτελέσματα

Κατά τη διάρκεια της κινητικής των καλλιεργειών μελετήθηκαν τα δεδομένα της μικροβιακής αύξησης:

- Το pH της εκάστοτε καλλιέργειας.
- Η παραγωγή βιομάζας.
- Η καταναλισκόμενη πηγή άνθρακα (γλυκερόλη).
- Η παραγωγή μικροβιακού λίπους.
- Η παραγωγή ενδοπολυσακχαριτών (IPS).
- Η παραγωγή μεταβολικών προϊόντων (αραβιτόλη, μαννιτόλη, ερυθριτόλη & κιτρικό οξύ).

Οι παράμετροι που μετρήθηκαν, χρησιμοποιήθηκαν για τον υπολογισμό των εξής παραμέτρων της μικροβιακής αύξησης:

- Συντελεστής απόδοσης της παραχθείσας βιομάζας ($Y_{X/S}$) ως προς το καταναλωθέν υπόστρωμα.
- Το παραγόμενο μικροβιακό λίπος ($Y_{L/X}$) ως προς την παραχθείσα βιομάζα.
- Οι παραγόμενοι ενδοπολυσακχαρίτες ($Y_{IPS/X}$) ως προς την παραχθείσα βιομάζα.
- Συντελεστής απόδοσης των παραγόμενων μεταβολιτών ($Y_{arol/S}$, $Y_{erol/S}$, $Y_{maol/S}$, $Y_{citra/S}$) ως προς το καταναλωθέν υπόστρωμα.

3.1 Συγκριτική αξιολόγηση (screening) των 16 στελεχών σε κωνικές φιάλες (S_0 40 g/L)

Στο πρώτο στάδιο της πειραματικής διαδικασίας διενεργήθηκαν ισάριθμες υγρές καλλιέργειες αντίστοιχες με το πλήθος των στελεχών. Παρακάτω παρατίθενται αναλυτικά τα αποτελέσματα του screening των 16 στελεχών (πίν. 3.1-1):

Πίνακας 3.1-1: Αποτελέσματα των υγρών καλλιιεργειών σε συγκέντρωση γλυκερόλης 40 g/L. Όπου, $S_{rem.}$: υπολειπόμενη συγκέντρωση γλυκερόλης, $S_{cons.}$: καταναλωθέν υπόστρωμα γλυκερόλης, X: βιομάζα, L: ενδοκυτταρικό λίπος, IPS: ενδοπολυσακχαρίτες, $Y_{X/S}$: συντελεστής απόδοσης παραγόμενης βιομάζας προς $S_{cons.}$ (g/g).

Στέλεχος	Χρόνος (h)	pH	$S_{rem.}$ (g/L)	$S_{cons.}$ (g/L)	X (g/L)	L (g/L)	$Y_{X/S}$ (g/g)	IPS (g/L)	IPS(%)	L (%)
<i>Y. lipolytica</i>	48	5.7	19.6	23.4	9.2	0.2	0.39	2.5	27.0	1.7
LMBF Y-45	162	6.1	0.0	43.0	12.4	1.1	0.29	4.9	39.2	9.0
<i>Y. lipolytica</i>	48	5.7	14.0	29.0	9.5	0.5	0.33	3.8	40.3	5.4
LMBF Y-46	162	6.3	0.0	43.0	12.4	0.4	0.29	3.3	26.5	3.2
<i>Y. lipolytica</i>	48	5.6	20.7	22.3	9.6	0.8	0.43	4.3	44.3	8.0
LMBF Y-47	168	6.3	0.0	43.0	12.9	0.5	0.30	5.3	41.1	3.8
Rhodotorula sp.	48	6.3	28.2	14.8	5.0	0.8	0.34	1.1	22.1	16.1
LMBF Y-49	162	6.3	19.9	23.1	8.8	1.0	0.38	2.4	27.5	11.2
Rhodotorula sp.	72	6.3	22.5	15.3	7.2	1.2	0.47	3.1	42.9	16.2
EMBT Y-48	168	6.2	11.3	26.4	9.1	1.6	0.34	3.5	38.8	17.9
Rhodotorula sp.	48	6.1	31.6	11.4	7.4	1.1	0.65	2.5	34.0	15.5
EMBT Y-49	162	6.1	22.7	20.4	10.0	1.4	0.49	3.7	36.9	13.8
R. glutinis NRRL	72	6.2	14.4	23.3	10.9	2.1	0.47	3.9	36.2	19.2
YB-252	168	6.3	0.0	37.7	14.5	1.1	0.38	6.8	47.0	7.4
C. curvatus NRRL	72	6.4	12.7	25.0	13.5	0.6	0.54	8.4	61.9	4.2
Y-1511	168	6.2	1.6	36.2	15.4	1.3	0.42	6.8	44.4	8.4
C. uzbekistanensis	48	6.4	38.3	4.7	2.5	0.5	0.54	0.5	19.0	20.3
EMBT Y-44	166	6.3	35.4	7.6	3.2	1.1	0.42	1.0	32.7	36.1
R. kratochvilovae	72	6.3	20.7	18.9	8.6	1.7	0.45	3.4	39.5	19.3
EMBT Y-42	168	6.1	3.2	36.5	12.4	0.8	0.34	3.3	26.5	6.8
R. kratochvilovae	72	6.3	15.8	23.9	9.0	1.5	0.38	3.7	40.8	16.4
EMBT Y-43	168	6.1	0.0	39.6	13.7	1.4	0.35	3.6	26.6	9.9
D. hansenii	72	6.3	10.1	29.5	13.5	0.5	0.46	5.0	36.8	3.3
EMBT Y-36	168	6.2	0.0	39.6	16.5	0.2	0.42	5.7	34.3	1.2
D. hansenii	72	6.3	6.7	32.9	12.3	0.6	0.38	5.7	45.9	5.2
EMBT Y-41	168	6.2	0.0	39.6	13.6	0.6	0.34	5.6	41.5	4.1
Metschnikowia	48	6.2	26.1	17.0	9.8	0.9	0.58	3.1	32.0	9.1
sp. PD-F1	166	6.1	3.9	39.1	16.4	0.6	0.42	7.2	43.8	3.7
Metschnikowia	48	6.2	28.2	14.8	9.8	0.6	0.66	3.1	31.3	6.4
sp. PD-D2	166	6.1	9.0	34.0	15.2	0.4	0.45	7.1	46.5	2.9
Metschnikowia	48	6.1	27.8	15.2	9.0	0.3	0.59	3.5	39.5	3.0
sp. VV-D4	166	6.0	6.4	36.7	14.5	0.3	0.40	6.2	43.0	1.9

Επίσης, στον πίνακα 3.1-2 που ακολουθεί παραθέτονται οι συγκεντρώσεις των πολυολών και του κιτρικού οξέος, που παρατηρήθηκαν κατά το πρώτο πειραματικό στάδιο.

Πίνακας 3.1-2: Παραγόμενες πολυόλες (μαννιτόλη, αραβιτόλη, ερυθριτόλη) και κιτρικό οξύ από στελέχη κατά τη διάρκεια του πρώτου πειραματικού σταδίου (screening).

Στέλεχος	Χρόνος (h)	Mannitol (g/L)	Arabitol (g/L)	Erythritol (g/L)	Citric acid (g/L)
<i>Y. lipolytica</i> LMBF Y-45	0	0.0	0.0	0.0	0.5
	24	0.0	0.0	0.0	0.7
	48	3.8	1.3	0.0	0.0
	65	4.7	1.3	0.6	1.7
	162	8.1	1.6	0.0	1.2
<i>Y. lipolytica</i> LMBF Y-46	0	0.0	0.0	0.0	0.5
	24	0.0	0.0	0.0	0.6
	48	3.9	1.2	0.1	1.3
	65	4.8	1.3	0.6	2.0
	162	8.5	1.7	0.0	0.9
<i>Y. lipolytica</i> LMBF Y-47	0	0.0	0.0	0.0	0.6
	24	0.0	0.0	0.0	0.8
	48	2.7	1.0	0.2	0.0
	72	7.4	1.4	1.4	1.5
	96	11.2	1.4	0.9	0.0
	120	12.1	2.0	0.0	0.0
	144	10.9	1.5	0.0	0.0
	168	10.6	1.2	0.0	0.0
192	9.5	1.3	0.0	0.0	
<i>D. hansenii</i> EMBT Y-41	0	-	0.0	-	0.6
	24	-	0.0	-	0.0
	72	-	7.3	-	0.5
	120	-	10.3	-	0.0
	168	-	9.4	-	0.0

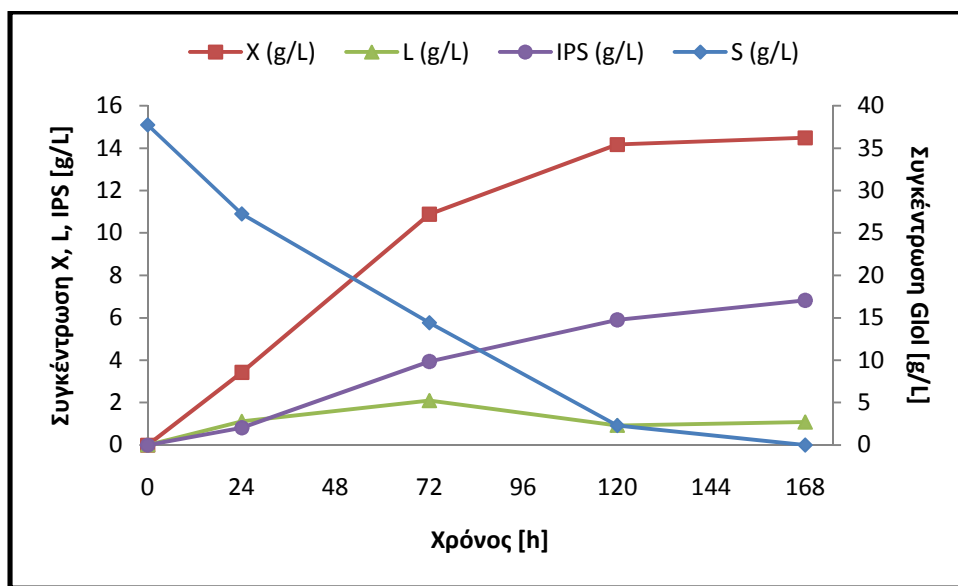
Έπειτα από το πρώτο πειραματικό στάδιο, επιλέχθηκαν τα εξής πέντε στελέχη για περαιτέρω μελέτη:

1. *Debaryomyces hansenii* EMBT Y-36, γιατί παρουσίασε υψηλή παραγωγή βιομάζας (16.8 g/L, 120 h), ενδοπολυσακχαριτών (6.8 g/L, 120 h) και υψηλό συντελεστή απόδοσης βιομάζας προς καταναλωθέν υπόστρωμα.
2. *Debaryomyces hansenii* EMBT Y-41, γιατί παρουσίασε υψηλή παραγωγή αραβιτόλης (10.3 g/L, 120 h), βιομάζας (13.6 g/L, 168 h), ενδοπολυσακχαριτών (6.2 g/L, 120 h) και υψηλό συντελεστή απόδοσης βιομάζας προς καταναλωθέν υπόστρωμα ($Y_{X/S}=0.76$ g/g, 24 h).
3. *Rhodotorula glutinis* NRRL YB-252, γιατί παρουσίασε υψηλή παραγωγή λιπιδίων (2.1 g/L, 72 h), βιομάζας (14.5 g/L, 168 h), ενδοπολυσακχαριτών

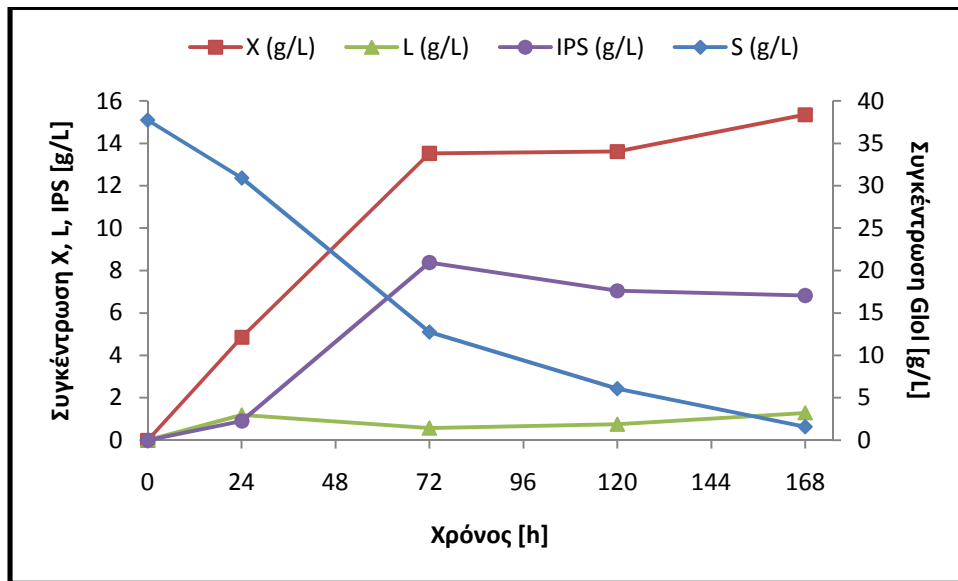
(6.8 g/L, 168 h) και υψηλή τιμή παραγόμενων λιπιδίων προς παραγόμενης βιομάζας ($Y_{L/X}=0.33$ g/g, 24h).

4. *Cryptococcus curvatus* NRRL Y-1511, γιατί παρουσίασε υψηλή παραγωγή βιομάζας (15.4 g/L, 168h), ενδοπολυσακχαριτών (8.4 g/L, 72h) και υψηλό $Y_{X/S}$ και $Y_{L/X}$.
5. *Cryptococcus uzbekistanensis* EMBT Y-44, για περαιτέρω μελέτη λόγω ικανοποιητικών αποδόσεων παραγωγής λιπιδίων ($Y_{L/X}=0.36$ g/g, 168 h), αλλά χωρίς προσαρμογή στην γλυκερόλη με αποτέλεσμα μικρές ποσότητες βιομάζας (3.2 g/L, 168 h).

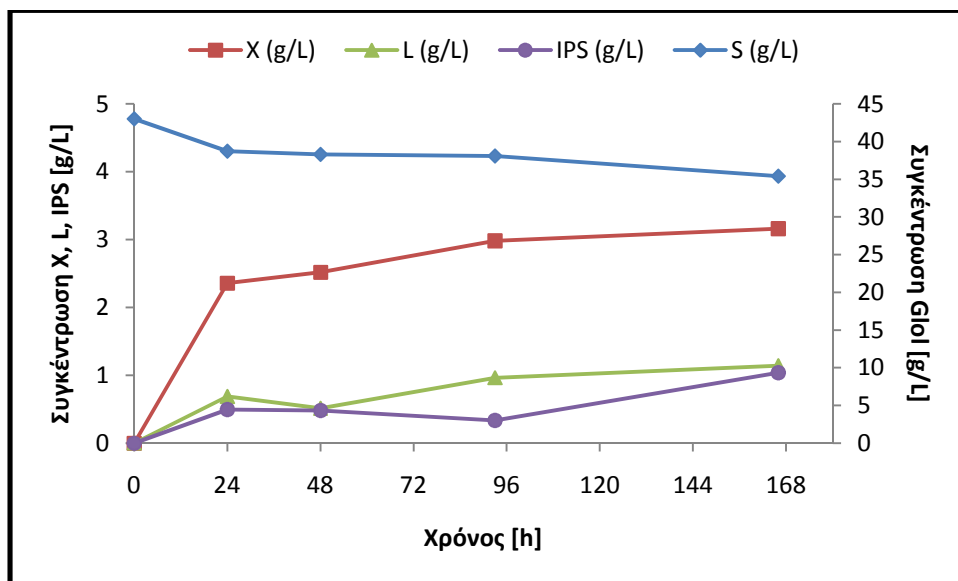
Οι κινητικές των πέντε αυτών στελεχών παραθέτονται στα επόμενα διαγράμματα.



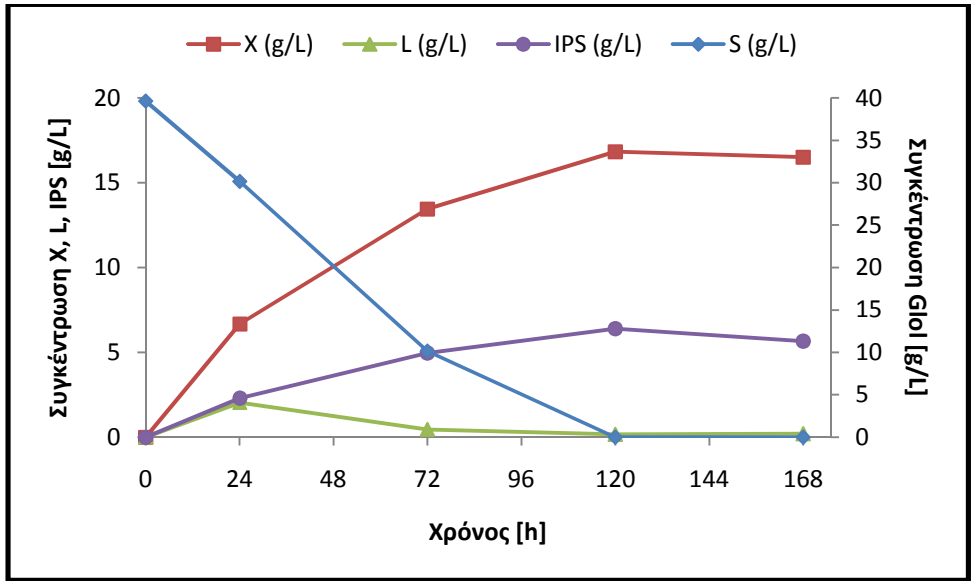
Διάγραμμα 3.1-1: Κινητική βιομάζας, κατανάλωσης υποστρώματος βιομηχανικής γλυκερόλης (40 g/L), μικροβιακού λίπους (SCO) και ενδοπολυσακχαριτών (IPS) του στελέχους *R. glutinis* NRRL YB-252.



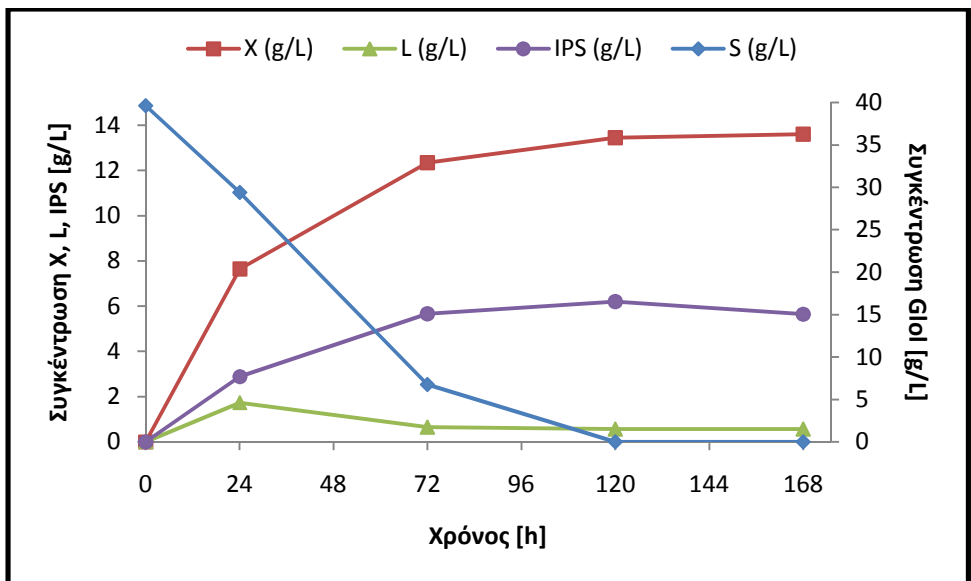
Διάγραμμα 3.1-2: Κινητική βιομάζας, κατανάλωσης υποστρώματος βιομηχανικής γλυκερόλης (40 g/L), μικροβιακού λίπους (SCO) και ενδοπολυσακχαριτών (IPS) του στελέχους *C. curvatus* NRRL Y-1511.



Διάγραμμα 3.1-3: Κινητική βιομάζας, κατανάλωσης υποστρώματος βιομηχανικής γλυκερόλης (40 g/L), μικροβιακού λίπους (SCO) και ενδοπολυσακχαριτών (IPS) του στελέχους *C. uzbekistanensis* EMBT Y-44.



Διάγραμμα 3.1-4: Κινητική βιομάζας, κατανάλωσης υποστρώματος βιομηχανικής γλυκερόλης (40 g/L), μικροβιακού λίπους (SCO) και ενδοπολυσακχαριτών (IPS) του στελέχους *D.hansenii* EMBT Y-36.



Διάγραμμα 3.1-5: Κινητική βιομάζας, κατανάλωσης υποστρώματος βιομηχανικής γλυκερόλης (40 g/L), μικροβιακού λίπους (SCO) και ενδοπολυσακχαριτών (IPS) του στελέχους *D. hansenii* EMBT Y-41.

3.2 Καλλιέργειες σε κωνικές φιάλες με τις ζύμες *Debaryomyces*, *Rhodotorula* & *Cryptococcus* (S₀ 50 & 80 g/L)

Στο δεύτερο στάδιο της πειραματικής διαδικασίας διενεργήθηκαν υγρές καλλιέργειες για τα στελέχη *Rhodotorula glutinis* NRRL YB-252, *Cryptococcus curvatus* NRRL Y-1511, *Cryptococcus uzbekistanensis* EMBT Y-44, *Debaryomyces hansenii* EMBT Y-36 και *Debaryomyces hansenii* EMBT Y-41. Τα αποτελέσματα των καλλιιεργειών αυτών παραθέτονται παρακάτω (πίν. 3.2-1).

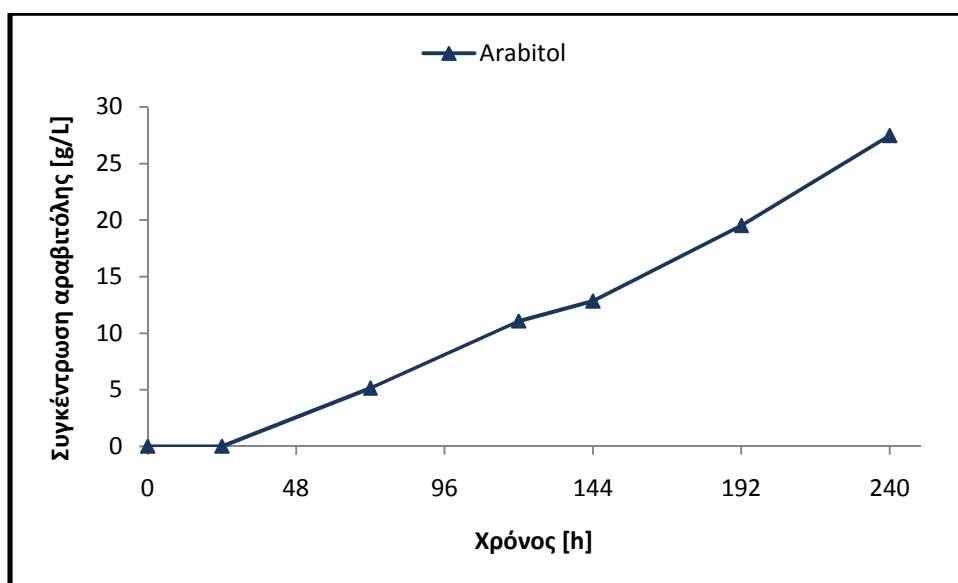
Πίνακας 3.2-1: Αποτελέσματα των υγρών καλλιιεργειών σε συγκέντρωση γλυκερόλης 50 g/L και 80 g/L. Όπου, S_{rem}: υπολειπόμενη συγκέντρωση γλυκερόλης, S_{cons}: καταναλωθέν υπόστρωμα γλυκερόλης, X: βιομάζα, L: ενδοκυτταρικό λίπος, IPS: ενδοπολυσακχαρίτες, Y_{X/S}: συντελεστής απόδοσης παραγόμενης βιομάζα προς S_{cons} (g/g).

Στέλεχος	Χρόνος (h)	pH	S _{rem.} (g/L)	S _{cons.} (g/L)	X (g/L)	Y _{X/S} (g/g)	L (g/L)	L (%)	IPS (g/L)	IPS (%)
<i>D. hansenii</i> EMBT Y-36	72	6.1	58.4	19.3	12.4	0.64	2.1	17.0	3.6	29.1
	240	5.9	18.6	59.1	21.5	0.37	0.6	2.8	7.1	32.9
<i>D. hansenii</i> EMBT Y-41	72	6.1	56.0	21.7	10.6	0.49	1.5	14.6	4.0	37.7
	240	6.0	8.8	68.9	18.0	0.26	1.0	5.4	7.5	41.8
<i>R. glutinis</i> NRRL YB-252	72	5.8	71.3	11.3	8.4	0.74	3.2	38.8	2.5	29.3
	216	5.5	33.7	48.9	18.9	0.39	7.2	38.2	6.6	34.9
<i>C. curvatus</i> NRRL Y-1511	72	6.1	65.8	13.3	10.7	0.80	3.7	34.7	3.5	32.3
	216	6.0	45.7	33.5	18.1	0.54	3.5	19.6	7.2	39.9
<i>C. uzbekistanensis</i> EMBT Y-44	168	6.1	41.0	6.1	4.8	0.79	1.3	27.8	1.2	24.4
	432	6.1	20.8	26.2	10.6	0.40	1.2	10.9	3.3	31.1

Η παραγωγή αραβιτόλης από το στέλεχος *Debaryomyces hansenii* EMBT Y-41, παρουσιάζεται παρακάτω:

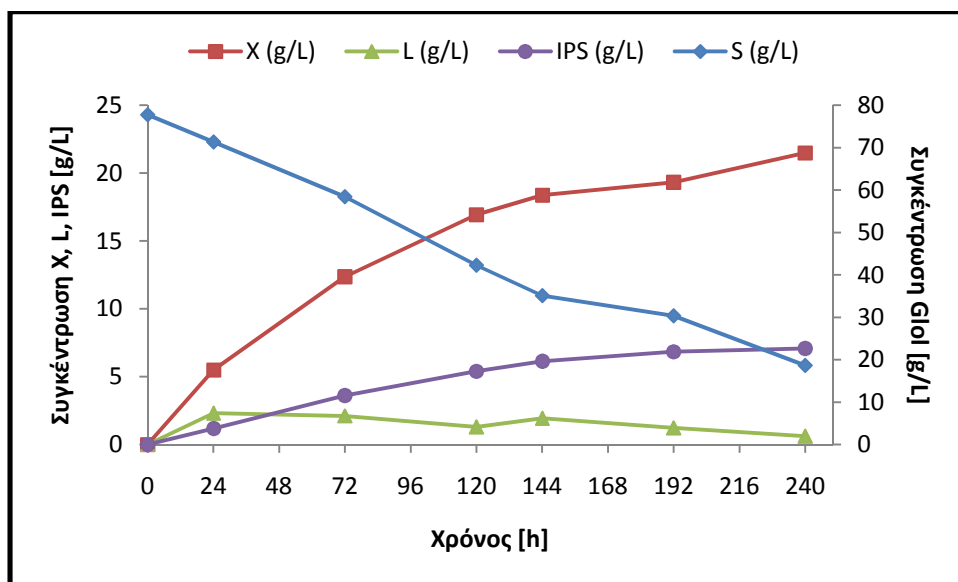
Πίνακας 3.2-2: Παραγόμενα μεταβολικά προϊόντα της υγής καλλιιεργειας του στελέχους *D. hansenii* EMBT Y-41, σε συγκέντρωση υποστρώματος 80 g/L. Οι συγκεντρώσεις αραβιτόλης, κιτρικού οξέος σε g/L και οι αντίστοιχοι συντελεστές απόδοσης Y_{arol/S}, Y_{citra/S} παραγόμενων μεταβολιτών προς S_{cons} σε g/g.

Χρόνος (h)	Arabitol (g/L)	Citric acid (g/L)	Y _{arol/S} (g/g)	Y _{citra/S} (g/g)
0	0.0	0.7	0.00	0.00
24	0.0	0.7	0.00	0.09
72	5.1	0.0	0.24	0.00
120	11.1	0.0	0.29	0.00
144	12.8	1.0	0.27	0.02
192	19.5	0.5	0.34	0.01
240	27.5	0.6	0.40	0.01

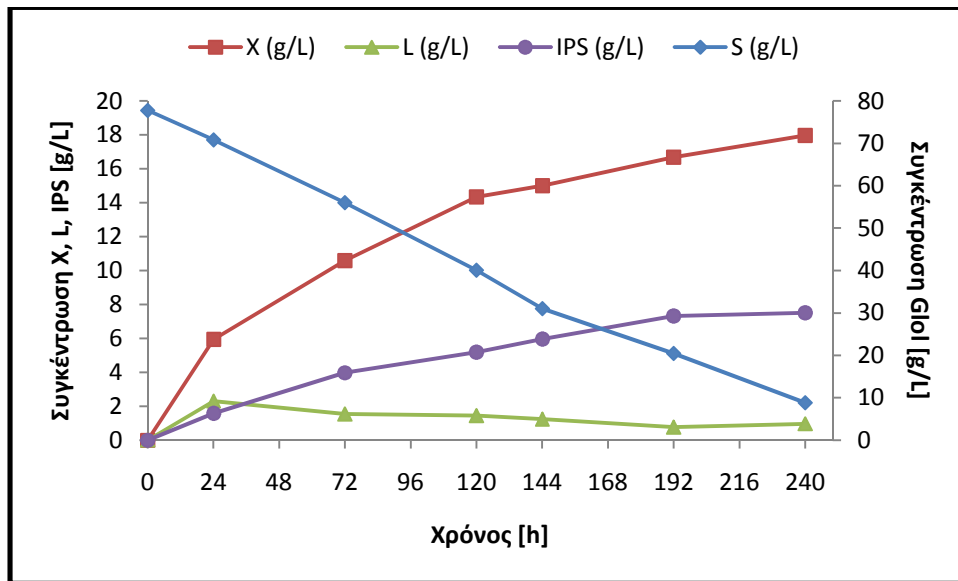


Διάγραμμα 3.2-1: Παραγωγή αραβιτόλης του στελέχους *D.hansenii* EMBT Y-41, σε αρχική συγκέντρωση υποστρώματος γλυκερόλης 80 g/L.

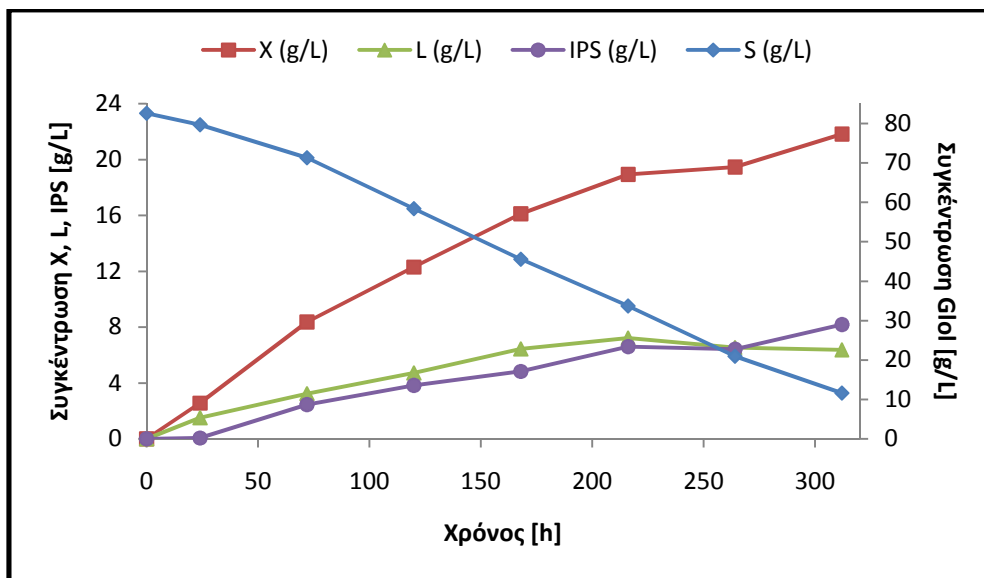
Οι κινητικές των στελεχών, που διενεργήθηκαν σε αυτό το στάδιο, παραθέτονται στα επόμενα διαγράμματα.



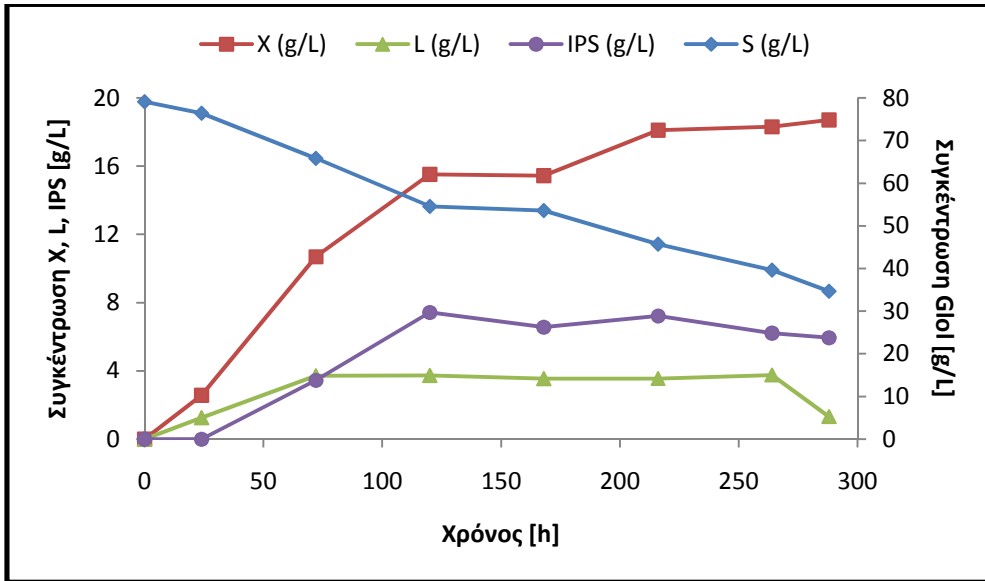
Διάγραμμα 3.2-2: Κινητική βιομάζας, κατανάλωσης υποστρώματος βιομηχανικής γλυκερόλης (80 g/L), μικροβιακού λίπους (SCO) και ενδοπολυσακχαριτών (IPS) του στελέχους *D. hansenii* EMBT Y-36.



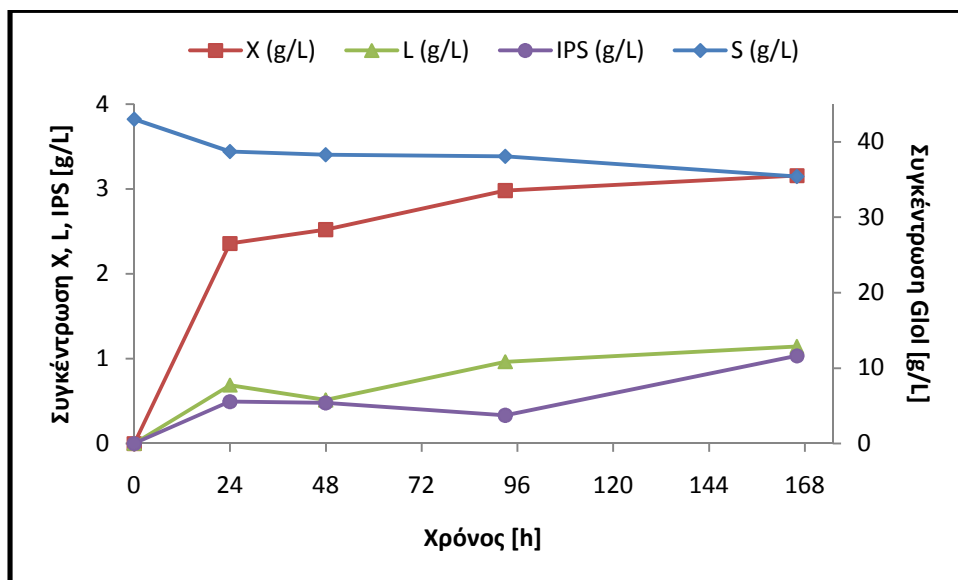
Διάγραμμα 3.2-3: Κινητική βιομάζας, κατανάλωσης υποστρώματος βιομηχανικής γλυκερόλης (80 g/L), μικροβιακού λίπους (SCO) και ενδοπολυσακχαριτών (IPS) του στελέχους *D. hansenii* EMBT Y-41.



Διάγραμμα 3.2-4: Κινητική βιομάζας, κατανάλωσης υποστρώματος βιομηχανικής γλυκερόλης (80 g/L), μικροβιακού λίπους (SCO) και ενδοπολυσακχαριτών (IPS) του στελέχους *R. glutinis* NRRL YB-252.



Διάγραμμα 3.2-5: Κινητική βιομάζας, κατανάλωσης υποστρώματος βιομηχανικής γλυκερόλης (80 g/L), μικροβιακού λίπους (SCO) και ενδοπολυσακχαριτών (IPS) του στελέχους *C.curvatus* NRRL Y-1511.



Διάγραμμα 3.2-6: Κινητική βιομάζας, κατανάλωσης υποστρώματος βιομηχανικής γλυκερόλης (50 g/L), μικροβιακού λίπους (SCO) και ενδοπολυσακχαριτών (IPS) του στελέχους *C.uzbekistanensis* EMBT Y-44.

3.3 Καλλιέργεια σε κωνικές φιάλες του *D. hansenii* EMBT Y-41 (S₀ 125 g/L)

Στο τρίτο στάδιο της πειραματικής διαδικασίας διενεργήθηκε υγρή καλλιέργεια με το στελέχος *Debaryomyces hansenii* EMBT Y-41. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον επόμενο πίνακα.

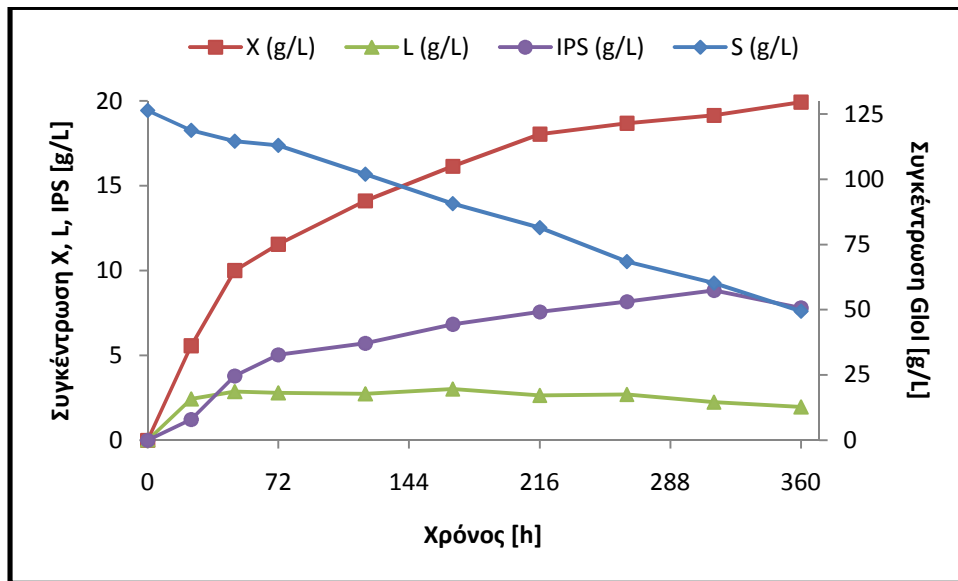
Πίνακας 3.3-1: Αποτελέσματα της υγρής καλλιέργειας του στελέχους *D.hansenii* EMBT Y-41, σε συγκέντρωση υποστρώματος 125 g/L. Όπου, S_{rem.}: υπολειπόμενη συγκέντρωση γλυκερόλης (g/L), S_{cons.}: καταναλωθέν υπόστρωμα (g/L), X: βιομάζα (g/L), L: ενδοκυτταρικό λίπος (g/L), IPS: ενδοπολυσακχαρίτες (g/L), Y_{X/S}: συντελεστής απόδοσης παραγόμενης βιομάζας προς S_{cons.} (g/g) Y_{L/X}: συντελεστής απόδοσης παραγόμενου L προς παραγόμενη X (g/g), Y_{IPS/X}: συντελεστής απόδοσης παραγόμενων IPS προς παραγόμενη X (g/g).

Χρόνος (h)	pH	S _{rem.} (g/L)	S _{cons.} (g/L)	X (g/L)	L (g/L)	Y _{X/S} (g/g)	IPS (g/L)	IPS (%)	L (%)	Y _{IPS/X} (g/g)
0	6.0	126.3	0.0	0.0	0.0	0.00	0.0	0.0	0.0	0.00
24	6.1	118.8	7.6	5.6	2.4	0.74	1.2	22.1	43.7	0.22
48	6.0	114.6	11.7	10.0	2.9	0.85	3.8	37.9	28.6	0.38
72	6.0	113.0	13.3	11.5	2.8	0.87	5.0	43.7	24.1	0.44
120	6.1	101.9	24.4	14.1	2.7	0.58	5.7	40.5	19.3	0.40
168	6.0	90.6	35.7	16.2	3.0	0.45	6.8	42.2	18.6	0.42
216	6.0	81.5	44.9	18.0	2.6	0.40	7.6	42.0	14.6	0.42
264	5.9	68.5	57.8	18.7	2.7	0.32	8.2	43.8	14.4	0.44
312	5.7	60.2	66.1	19.2	2.2	0.29	8.8	46.0	11.7	0.46
360	5.6	49.4	76.9	19.9	2.0	0.26	7.8	39.1	9.8	0.39

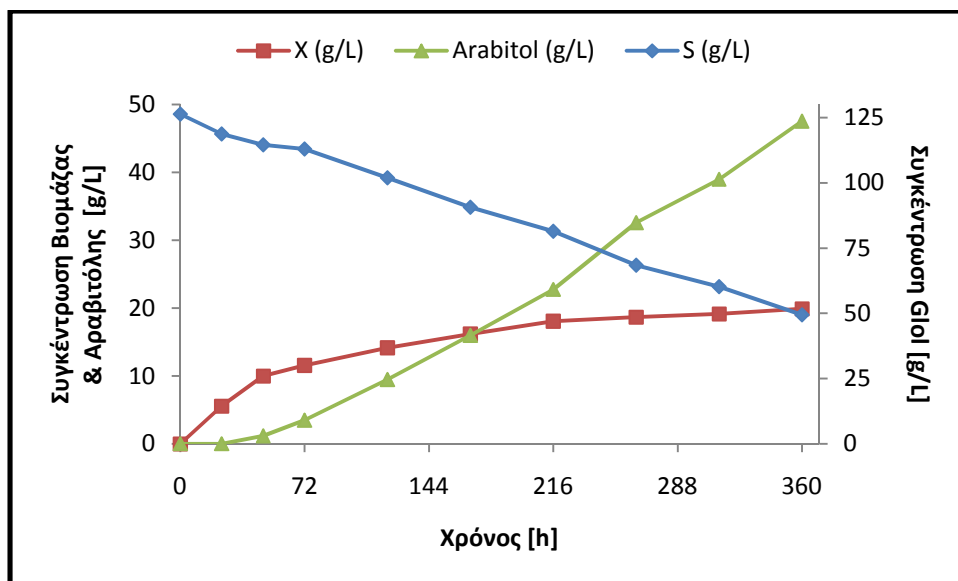
Επίσης, παραγωγή αραβιτόλης και η κινητική της μικροβιακής αύξησης του στελέχους *Debaryomyces hansenii* EMBT Y-41, παρουσιάζονται στον πίνακα και στα διαγράμματα που ακολουθούν.

Πίνακας 3.3-2: Παραγόμενη αραβιτόλη της υγρής καλλιέργειας του στελέχους *D.hansenii* EMBT Y-41, σε συγκέντρωση υποστρώματος 125 g/L. Η συγκέντρωση της αραβιτόλης σε g/L και ο αντίστοιχος συντελεστής απόδοσης Y_{arol/S} της παραγόμενης αραβιτόλης προς το καταναλωθέν υπόστρωμα σε g/g.

Χρόνος (h)	Arabitol (g/L)	Y _{arol/S} (g/g)	Χρόνος (h)	Arabitol (g/L)	Y _{arol/S} (g/g)
0	0.0	0.00	168	16.0	0.45
24	0.0	0.00	216	22.7	0.51
48	1.1	0.10	264	32.6	0.56
72	3.5	0.26	312	39.0	0.59
120	9.4	0.38	360	47.5	0.62



Διάγραμμα 3.3-1: Κινητική βιομάζας, κατανάλωσης υποστρώματος βιομηχανικής γλυκερόλης (125 g/L), μικροβιακού λίπους (SCO) και ενδοπολυσακχαριτών (IPS) του στελέχους *D.hansenii* EMBT Y-41.



Διάγραμμα 3.3-2: Κινητική κατανάλωσης υποστρώματος βιομηχανικής γλυκερόλης (125 g/L) και παραγωγή εξοκυτταρικών μεταβολικών προϊόντων, συγκεκριμένα αραβιτόλης του στελέχους *D.hansenii* EMBT Y-41.

3.4 Ασυνεχής καλλιέργεια σε βιοαντιδραστήρα του στελέχους *D. hansenii* EMBT Y-41 (S_0 80 g/L)

Στο τέταρτο στάδιο της πειραματικής διαδικασίας διενεργήθηκε ασυνεχής υγρή καλλιέργεια με το στέλεχος *Debaryomyces hansenii* EMBT Y-41. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον επόμενο πίνακα.

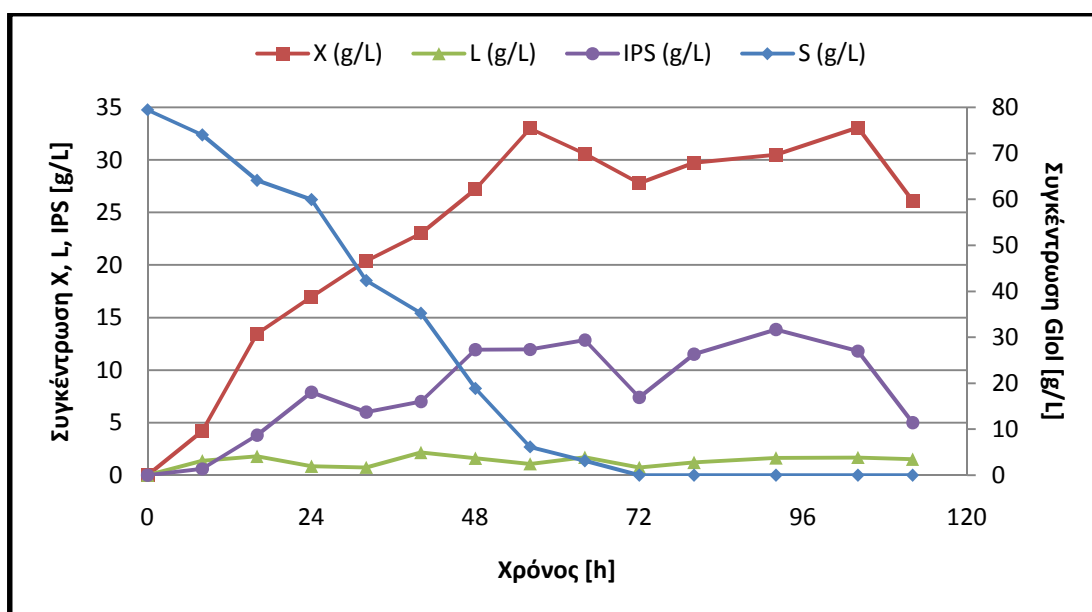
Πίνακας 3.4-1: Αποτελέσματα της υγρής καλλιέργειας σε βιοαντιδραστήρα του στελέχους *D.hansenii* EMBT Y-41, σε συγκέντρωση υποστρώματος 80 g/L. Όπου, $S_{rem.}$: υπολειπόμενη συγκέντρωση γλυκερόλης (g/L), $S_{cons.}$: καταναλωθέν υπόστρωμα (g/L), X: βιομάζα (g/L), L: ενδοκυτταρικό λίπος (g/L), IPS: ενδοπολυσακχαρίτες (g/L), $Y_{X/S}$: συντελεστής απόδοσης παραγόμενης βιομάζας προς $S_{cons.}$ (g/g) $Y_{L/X}$: συντελεστής απόδοσης παραγόμενου L προς παραγόμενη X (g/g), $Y_{IPS/X}$: συντελεστής απόδοσης παραγόμενων IPS προς παραγόμενη X (g/g).

Χρόνος (h)	pH	$S_{rem.}$ (g/L)	$S_{cons.}$ (g/L)	X (g/L)	L (g/L)	$Y_{X/S}$ (g/g)	IPS (g/L)	IPS (%)	L (%)	$Y_{IPS/X}$ (g/g)
0	6.1	79.5	0.0	0.0	0.0	0.00	0.0	0.0	0.0	0.00
8	6.1	74.0	5.5	4.2	1.4	0.77	0.6	15.1	32.6	0.15
16	6.1	64.1	15.4	13.5	1.8	0.88	3.8	28.3	13.4	0.28
24	6.1	59.9	19.5	17.0	0.9	0.87	7.9	46.5	5.1	0.46
32	6.1	42.3	37.1	20.4	0.8	0.55	6.0	29.5	3.7	0.29
40	6.1	35.3	44.2	23.0	2.2	0.52	7.0	30.4	9.4	0.30
48	6.1	18.9	60.6	27.2	1.6	0.45	11.9	43.9	6.0	0.44
56	6.1	6.2	73.3	33.0	1.1	0.45	12.0	36.3	3.3	0.36
64	6.1	3.2	76.3	30.6	1.7	0.40	12.9	42.0	5.6	0.42
72	6.1	0.0	79.5	27.8	0.8	0.35	7.4	26.6	2.7	0.27
80	6.1	0.0	79.5	29.7	1.2	0.37	11.5	38.8	4.1	0.39
92	6.1	0.0	79.5	30.5	1.7	0.38	13.9	45.5	5.4	0.45
104	6.1	0.0	79.5	33.1	1.7	0.42	11.8	35.8	5.1	0.36
112	6.1	0.0	79.5	26.1	1.5	0.33	5.0	19.1	5.8	0.19

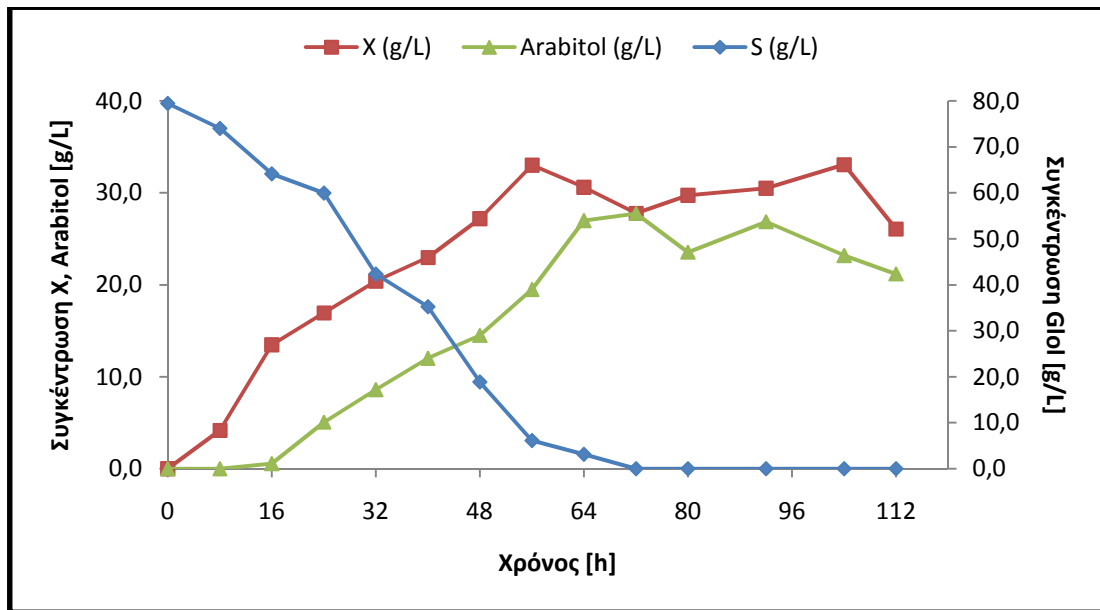
Επίσης, παραγωγή αραβιτόλης και η κινητική της μικροβιακής αύξησης του στελέχους *Debaryomyces hansenii* EMBT Y-41, παρουσιάζονται στον πίνακα και στα διαγράμματα που ακολουθούν.

Πίνακας 3.4-2: Παραγόμενη αραβιτόλη της υγρής καλλιέργειας σε βιοαντιδραστήρα του στελέχους *D.hansenii* EMBT Y-41, σε συγκέντρωση υποστρώματος 80g/L. Η συγκέντρωση της αραβιτόλης σε g/L και ο αντίστοιχος συντελεστής απόδοσης $Y_{\text{arol/S}}$ της παραγόμενης αραβιτόλης προς το καταναλωθέν υπόστρωμα σε g/g.

Χρόνος (h)	Arabitol	$Y_{\text{arol/S}}$	Χρόνος (h)	Arabitol	$Y_{\text{arol/S}}$
0	0.0	0.00	56	19.5	0.27
8	0.0	0.00	64	27.0	0.35
16	0.6	0.04	72	27.8	0.35
24	1.1	0.06	80	23.6	0.30
32	8.6	0.23	92	26.9	0.34
40	12.0	0.27	104	23.2	0.29
48	14.5	0.24	112	21.2	0.27



Διάγραμμα 3.4-1: Κινητική βιομάζας, κατανάλωσης υποστρώματος βιομηχανικής γλυκερόλης (80g/L), μικροβιακού λίπους (SCO) και ενδοπολυσακχαριτών (IPS) του στελέχους *D.hansenii* EMBT Y-41, σε βιοαντιδραστήρα.



Διάγραμμα 3.4-2: Κινητική κατανάλωσης υποστρώματος βιομηχανικής γλυκερόλης (80g/L) και παραγωγή εξωκυτταρικών μεταβολικών προϊόντων, συγκεκριμένα αραβιτόλης του στελέχους *D.hansenii* EMBT Υ-41, σε βιοαντιδραστήρα.

3.5 Ανάλυση παραγόμενου ενδοκυτταρικού λίπους

Από τα στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν, επιλέχθηκαν κάποια για να αναλυθούν ποιοτικά ως προς το παραγόμενο ενδοκυτταρικό τους λίπος. Η κατατομή των παραγόμενων ενδοκυτταρικών λιπιδίων σε λιπαρά οξέα παρατίθεται στους πίνακες 3.4-1, 3.4-2 & 3.4-3. Επίσης, για το μοναδικό στέλεχος (*Rhodotorula glutinis* NRRL YB-252), που είχε την μεγαλύτερη ποσοτικά παραγωγή ενδοκυτταρικού λίπους, έγινε ποιοτικός προσδιορισμός αυτού σε τέσσερα σημεία της κινητικής της μικροβιακής του αύξησης (24h, 120h, 216h & 312h), ώστε να υπάρξει όσο γίνεται πιο ολοκληρωμένη κατατομή του λίπους (πίν. 3.4-4). Τα αποτελέσματα από την ανάλυση του ενδοκυτταρικού λίπους παρουσιάζονται παρακάτω.

Στα εξεταζόμενα στελέχη τα επικρατέστερα λιπαρά οξέα ήταν το ελαϊκό οξύ (*Rhodotorula sp.* EMBT Y-48, *C.curvatus* NRRL Y-1511, *R.kratochvilovae* EMBT Y-42, *D.hansenii* EMBT Y-36, *D.hansenii* EMBT Y-41, P.D. - D2, *R.glutinis* NRRL YB-252), το λινελαϊκό οξύ (*Rhodotorula sp.* EMBT Y-49, *R.kratochvilovae* EMBT Y-43, V.V. - D4) και το μυριστικό οξύ (P.D. - F1). Επίσης, α-λινολενικό οξύ (ALA) και γ-λινολενικό οξύ (GLA), λιπαρά οξέα με δυνητικά υψηλή οικονομική αξία καθώς διατροφική και φαρμακευτική, είτε δεν ανιχνεύθηκαν καθόλου είτε ανιχνεύθηκαν σε μικρά ποσοστά στα προς εξέταση δείγματα.

Πίνακας 3.5-1: Ποιοτική ανάλυση παραγόμενων ενδοκυτταρικών λιπιδίων στα αντίστοιχα τους λιπαρά οξέα, εκφρασμένα σε ποσοστό επί τοις εκατό (%) που κατέχουν στο σύνολο του ενδοκυτταρικού λίπους. Ο χρόνος που λήφθηκαν τα δείγματα κυμαίνεται από τις 162 έως τις 168 ώρες.

Λιπαρά οξέα	Στέλεχος		
	<i>Rhodotorula sp.</i> EMBT Y-48	<i>Rhodotorula sp.</i> EMBT Y-49	<i>C.curvatus</i> NRRL Y-1511
C6:0	0.0	0.0	0.7
C11:0	1.3	0.0	1.3
C12:0	0.5	0.0	0.6
C14:0	1.0	2.9	1.0
C15:1	0.4	0.0	0.3
C16:0	21.6	0.0	14.5
C16:1	1.2	18.2	1.7
C17:1	0.0	0.0	1.4
C18:0	8.3	0.0	5.1
C18:1	51.3	8.3	60.1
C18:2	12.0	68.1	4.1
C18:3 (n-3)	1.6	0.0	2.1
C20:0	0.7	0.0	2.4

Πίνακας 3.5-2: Ποιοτική ανάλυση παραγόμενων ενδοκυτταρικών λιπιδίων στα αντίστοιχά τους λιπαρά οξέα, εκφρασμένα σε ποσοστό επί τοις εκατό (%) που κατέχουν στο σύνολο του ενδοκυτταρικού λίπους. Ο χρόνος που λήφθηκαν τα δείγματα κυμαίνεται από τις 162 έως τις 168 ώρες.

Λιπαρά οξέα	Στέλεχος		
	<i>R.kratochvilovae</i> EMBT Y-42	<i>R.kratochvilovae</i> EMBT Y-43	<i>D.hansenii</i> EMBT Y-36
C6:0	0.0	5.0	1.2
C10:0	0.0	0.0	0.0
C11:0	2.7	2.0	0.0
C12:0	1.0	0.0	1.4
C13:0	0.7	0.0	0.0
C14:0	2.0	0.0	1.9
C14:1	0.0	0.0	0.0
C15:0	0.0	0.0	0.0
C15:1	0.4	2.0	0.0
C16:0	25.8	10.7	23.9
C16:1	1.8	0.0	3.3
C17:0	0.0	2.4	1.6
C17:1	0.0	0.0	1.8
C18:0	6.2	2.0	8.4
C18:1	38.3	13.4	46.5
C18:2	14.5	49.1	7.4
C18:3 (n-3)	6.2	6.3	1.0
C20:0	0.0	2.8	0.0

Πίνακας 3.5-3: Ποιοτική ανάλυση παραγόμενων ενδοκυτταρικών λιπιδίων στα αντίστοιχά τους λιπαρά οξέα, εκφρασμένα σε ποσοστό επί τοις εκατό (%) που κατέχουν στο σύνολο του ενδοκυτταρικού λίπους. Ο χρόνος που λήφθηκαν τα δείγματα κυμαίνεται από τις 162 έως τις 168 ώρες.

Λιπαρά οξέα	Στελέχος			
	<i>D.hansenii</i> EMBT Y-41	P.D. - F1	P.D. - D2	V.V. - D4
C10:0	0.0	1.7	0.0	0.0
C11:0	8.3	0.0	0.0	0.0
C12:0	0.0	0.0	3.4	3.4
C14:0	4.1	0.9	5.7	6.0
C14:1	0.0	1.9	0.0	0.0
C15:0	0.0	20.0	0.0	0.0
C15:1	4.4	9.3	0.0	0.0
C16:0	12.8	0.0	11.4	9.4
C16:1	0.0	1.6	5.5	5.6
C17:0	0.0	4.3	0.0	0.0
C17:1	0.0	48.5	0.0	0.0
C18:0	3.2	5.0	3.4	0.0
C18:1	44.6	3.6	39.2	33.9
C18:2	22.6	3.2	31.3	41.8

Πίνακας 3.5-4: Ποιοτική ανάλυση παραγόμενων ενδοκυτταρικών λιπιδίων, του στελέχους *Rhodotorula glutinis* NRRL YB-252 σε συγκεκριμένα σημεία της κινητικής (24h, 120h, 216h, 320h), στα αντίστοιχά τους λιπαρά οξέα, εκφρασμένα σε ποσοστό επί τοις εκατό (%) που κατέχουν στο σύνολο του ενδοκυτταρικού λίπους.

Λιπαρά οξέα	24h	120h	216h	320h
C11:0	0.0	3.4	0.4*	0.0
C12:0	0.0	0.1*	0.1*	0.1*
C13:0	0.5*	0.0	0.0	0.0
C14:0	1.4	1.6	0.8*	0.6*
C16:0	28.2	23.8	18.6	16.6
C16:1	1.0*	2.4	2.1	1.8
C18:0	8.5	2.5	0.4*	0.4*
C18:1	42.4	58.5	72.3	73.9
C18:2	11.8	1.9	1.9	2.2
C18:3 (n-3)	1.4	0.2*	0.2*	0.1*
Λοιπά Λ.Ο.	6.3	9.4	5.1	5.6

* τα ποσοστά αυτά έχουν συμπεριληφθεί στο ποσοστό των λοιπών λιπαρών οξέων

4. Συζήτηση

Το κόστος και η απόδοση των παραγόμενων προϊόντων σε μικροβιακές καλλιέργειες επηρεάζονται σε σημαντικό βαθμό από το κόστος της πηγής άνθρακα που χρησιμοποιείται. Οπότε, απαιτείται να εντοπιστούν πηγές διαθέσιμων πηγών άνθρακα μηδενικής ή ελάχιστης αξίας, όπως μια από αυτές είναι η ακάθαρτη γλυκερόλη που προέρχεται από την παραγωγή βιοντίζελ, ως παραπροϊόν της διαδικασίας αυτής.

Γενικά, η σύνθεση της γλυκερόλης, που προέρχεται από την παραγωγή βιοντίζελ, εξαρτάται από την προέλευση των πρώτων υλών, τη μέθοδο της μετεστεροποίησης και τις συνθήκες διαχωρισμού κατά τη διάρκεια της παραγωγής βιοντίζελ. Επομένως, η σύνθεση της γλυκερόλης σε ακαθαρσίες και προσμίξεις μπορεί να διαφέρει αρκετά και αυτές να έχουν είτε θετικές είτε αρνητικές συνέπειες στην μικροβιακή αύξηση και στον σχηματισμό προϊόντων (Chatzifragkou *et al.*, 2012).

Σε αυτό το κεφάλαιο εξετάζονται οι παραγόμενες ποσότητες σε βιομάζα, μεταβολικά προϊόντα, ενδοκυτταρικά λιπίδια και ενδοπολυσακχαρίτες, καθώς και οι αποδόσεις είτε ως προς το καταναλωθέν υπόστρωμα είτε ως προς την παραγόμενη βιομάζα.

4.1 Συγκριτική αξιολόγηση (screening) των 16 στελεχών σε κωνικές φιάλες (S_0 40 g/L)

Τα ευρήματα του πρώτου σταδίου της πειραματικής διαδικασίας, που προκύπτουν από τους υπολογισμούς των παραμέτρων της μικροβιακής αύξησης και αποτέλεσαν τα κριτήρια για την επιλογή των στελεχών που χρησιμοποιήθηκαν στο δεύτερο πείραμα είναι η μέγιστη παραγόμενη βιομάζα, η μέγιστη συγκέντρωση μικροβιακού λίπους, μέγιστη συγκέντρωση ενδοπολυσακχαριτών και η μέγιστη απόδοση λιπιδίων προς παραγόμενης βιομάζας, όπως παραθέτονται παρακάτω.

Η μέγιστη συγκέντρωση βιομάζας, στις υγρές καλλιέργειες με αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης 40 g/L, παρατηρήθηκε από το στέλεχος *Debaryomyces hansenii* EMBT Y-36 στις 120 ώρες καλλιέργειας. Σχεδόν σε όλα τα στελέχη ο συντελεστής απόδοσης βιομάζας, στο σημείο της μέγιστης παραγωγής της, είχε τιμές $Y_{X/S} > 0.3$. Ερμηνεία που μπορεί να δοθεί στο γεγονός αυτό είναι ότι ο λόγος C/N ευνόησε την παραγωγή βιομάζας.

Πίνακας 4.1-1: Μέγιστη παραγωγή βιομάζας σε υπόστρωμα βιομηχανικής γλυκερόλης, συγκέντρωσης 40 g/L, ανά στέλεχος. S_{cons} : καταναλωθέν υπόστρωμα (g/L), X: βιομάζα (g/L), $Y_{X/S}$: συντελεστής απόδοσης βιομάζας προς καταναλωθέν υπόστρωμα (g/g).

Στέλεχος μικροοργανισμού	Χρόνος (h)	S_{cons} (g/L)	X (g/L)	$Y_{X/S}$ (g/g)
<i>Yarrowia lipolytica</i> LMBF Y-45	162	43.0	12.4	0.29
<i>Yarrowia lipolytica</i> LMBF Y-46	162	43.0	12.4	0.29
<i>Yarrowia lipolytica</i> LMBF Y-47	120	43.0	13.1	0.30
<i>Rhodotorula</i> sp. LMBF Y-49	162	23.1	8.8	0.38
<i>Rhodotorula</i> sp. EMBT Y-48	168	26.4	9.1	0.34
<i>Rhodotorula</i> sp. EMBT Y-49	162	20.4	10.0	0.49
<i>Rhodotorula glutinis</i> NRRL YB-252	168	37.7	14.5	0.38
<i>Cryptococcus curvatus</i> NRRL Y-1511	168	36.2	15.4	0.42
<i>Cryptococcus uzbekistanensis</i> EMBT Y-44	166	7.6	3.2	0.42
<i>Rhodosporidium kratochvilovae</i> EMBT Y-42	168	36.5	12.4	0.34
<i>Rhodosporidium kratochvilovae</i> EMBT Y-43	168	39.6	13.7	0.35
<i>Debaryomyces hansenii</i> EMBT Y-36	120	39.6	16.8	0.42
<i>Debaryomyces hansenii</i> EMBT Y-41	168	39.6	13.6	0.34
<i>Metschnikowia</i> sp. PD - F1	166	39.1	16.4	0.42
<i>Metschnikowia</i> sp. PD - D2	166	34.0	15.2	0.45
<i>Metschnikowia</i> sp. VV - D4	166	36.7	14.5	0.40

Η μέγιστη συγκέντρωση μικροβιακού λίπους, στις υγρές καλλιέργειες με αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης 40 g/L, παρατηρήθηκε από το στέλεχος *Rhodotorula glutinis* NRRL YB-252 στις 72 ώρες καλλιέργειας. Στην περίπτωση που αφορά την παραγωγή ενδοκυτταρικού λίπους, ο λόγος C/N δείχνει να μην ευνοεί την παραγωγή λιπιδίων, για το λόγο ότι δεν επιτεύχθηκαν υψηλές συγκεντρώσεις λιπιδίων και ο συντελεστής απόδοσης παραγόμενου μικροβιακού λίπους προς παραγόμενη βιομάζα ξεπέρασε σε λίγες περιπτώσεις το 20%, ενώ όποτε έγινε αυτό δεν συνδυάστηκε με υψηλές συγκεντρώσεις

Πίνακας 4.1-2: Μέγιστη παραγωγή μικροβιακών λιπιδίων σε υπόστρωμα βιομηχανικής γλυκερόλης συγκέντρωσης 40 g/L, ανά στέλεχος. L: παραγόμενο μικροβιακό λίπος (g/L), X: παραγόμενη βιομάζα (g/L), L (%) : Το ποσοστό του παραγόμενου μικροβιακού λίπους προς την παραγόμενη βιομάζα (% w/w).

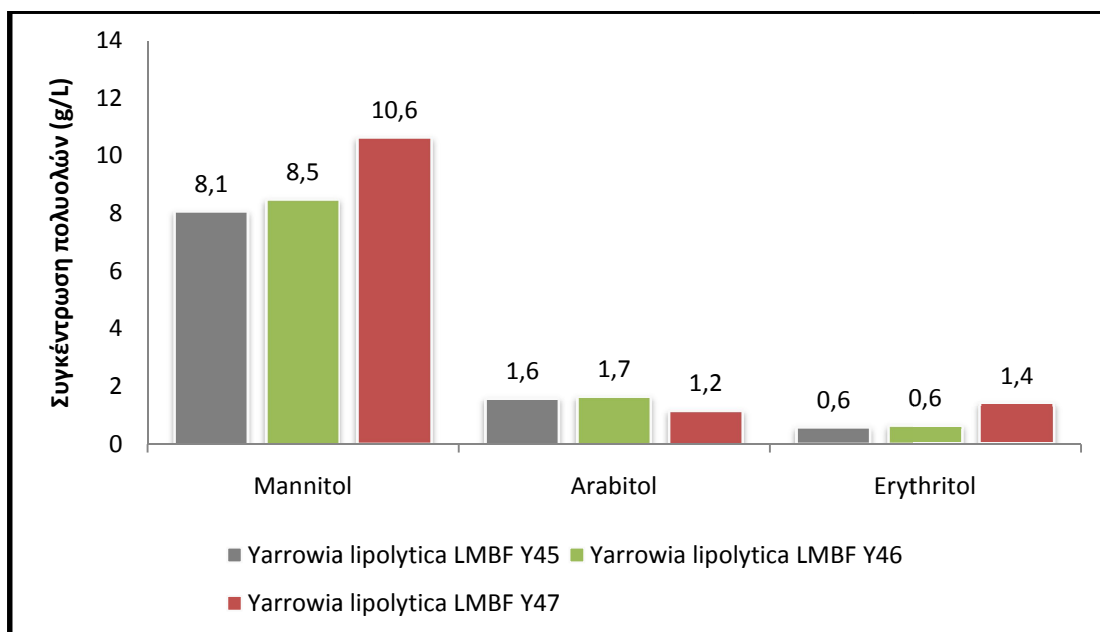
Στέλεχος μικροοργανισμού	Χρόνος (h)	L (g/L)	L (% w/w)
<i>Yarrowia lipolytica</i> LMBF Y-45	162	1.1	9.0
<i>Yarrowia lipolytica</i> LMBF Y-46	24	0.8	10.1
<i>Yarrowia lipolytica</i> LMBF Y-47	24	1.3	19.5
<i>Rhodotorula</i> sp. LMBF Y-49	162	1.0	11.2
<i>Rhodotorula</i> sp. EMBT Y-48	168	1.6	17.9
<i>Rhodotorula</i> sp. EMBT Y-49	162	1.4	13.8
<i>Rhodotorula glutinis</i> NRRL YB-252	72	2.1	19.2
<i>Cryptococcus curvatus</i> NRRL Y-1511	168	1.3	8.4
<i>Cryptococcus uzbekistanensis</i> EMBT Y-44	166	1.1	36.1
<i>Rhodosporidium kratochvilovae</i> EMBT Y-42	72	1.7	19.3
<i>Rhodosporidium kratochvilovae</i> EMBT Y-43	72	1.5	16.4
<i>Debaryomyces hansenii</i> EMBT Y-36	24	2.0	30.5
<i>Debaryomyces hansenii</i> EMBT Y-41	24	1.7	22.6
<i>Metschnikowia</i> sp. PD - F1	24	1.2	17.9
<i>Metschnikowia</i> sp. PD - D2	24	0.9	14.6
<i>Metschnikowia</i> sp. VV - D4	24	0.8	12.3

Η μέγιστη συγκέντρωση ενδοπολυσακχαριτών, στις υγρές καλλιέργειες με αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης 40 g/L, παρατηρήθηκε από το στέλεχος *Cryptococcus curvatus* NRRL Y-1511 στις 72 ώρες καλλιέργειας. Αντιθέτως με την περίπτωση των μικροβιακών λιπιδίων, στην περίπτωση των ενδοπολυσακχαριτών επιτεύχθηκαν υψηλές συγκεντρώσεις και αποδόσεις, εκτός από την περίπτωση του στελέχους *Cryptococcus uzbekistanensis* EMBT Y-44.

Πίνακας 4.1-3: Μέγιστη παραγωγή ενδοπολυσακχαριτών σε υπόστρωμα βιομηχανικής γλυκερόλης συγκέντρωσης 40 g/L, ανά στέλεχος. IPS: παραγόμενοι ενδοπολυσακχαρίτες (g/L), X: παραγόμενη βιομάζα (g/L), IPS (%): Το ποσοστό των παραγόμενων ενδοπολυσακχαριτών προς την παραγόμενη βιομάζα (% w/w).

Στέλεχος μικροοργανισμού	Χρόνος (h)	IPS (g/L)	IPS (% w/w)	X (g/L)
<i>Yarrowia lipolytica</i> LMBF Y-45	162	4.9	39.2	12.4
<i>Yarrowia lipolytica</i> LMBF Y-46	48	3.8	40.3	9.5
<i>Yarrowia lipolytica</i> LMBF Y-47	120	6.6	50.3	13.1
<i>Rhodotorula</i> sp. LMBF Y-49	162	2.4	27.5	8.8
<i>Rhodotorula</i> sp. EMBT Y-48	120	3.5	42.0	8.4
<i>Rhodotorula</i> sp. EMBT Y-49	162	3.7	36.9	10.0
<i>Rhodotorula glutinis</i> NRRL YB-252	168	6.8	47.0	14.5
<i>Cryptococcus curvatus</i> NRRL Y-1511	72	8.4	61.9	13.5
<i>Cryptococcus uzbekistanensis</i> EMBT Y-44	166	1.0	32.7	3.2
<i>Rhodosporidium kratochvilovae</i> EMBT Y-42	120	3.9	34.7	11.1
<i>Rhodosporidium kratochvilovae</i> EMBT Y-43	120	3.9	33.0	11.8
<i>Debaryomyces hansenii</i> EMBT Y-36	168	5.7	34.3	16.5
<i>Debaryomyces hansenii</i> EMBT Y-41	120	6.2	46.1	13.4
<i>Metschnikowia</i> sp. PD - F1	166	7.2	43.8	16.4
<i>Metschnikowia</i> sp. PD - D2	166	7.1	46.5	15.2
<i>Metschnikowia</i> sp. VV - D4	166	6.2	43.0	14.5

Επίσης, από τα στελέχη του γένους *Yarrowia* παρατηρήθηκε αξιοσημείωτη παραγωγή μαννιτόλης με καλύτερο το στέλεχος *Y.lipolytica* LMBF Y-47, παρουσιάζεται στο επόμενο διάγραμμα.



Διάγραμμα 4.1-1: Μέγιστες συγκεντρώσεις των παραγόμενων πολυολών (μαννιτόλη, αραβιτόλη, ερυθριτόλη) στις 168 ώρες καλλιέργειας για τα στελέχη *Y.lipolytica* LMBF Y-45, Y-46 & Y-47, σε υγρή καλλιέργεια αρχικής συγκεντρώσης γλυκερόλης 40 g/L.

Οπότε, τα συμπεράσματα του πρώτου πειράματος είναι τα εξής:

- Τα δύο στελέχη *Rhodospiridium kratichrilovae* EMBT Y-42 και EMBT Y-43 παρουσίασαν ικανότητα στην κατανάλωση της γλυκερόλης, όμως δεν παρήγαγαν λιπίδια σε μεγάλες ποσότητες (0.4-1.7 g/L), ενώ οι ποσότητες για τους ενδοπολυσακχαρίτες ήταν μεγαλύτερες (1.0-3.9 g/L).
- Τέσσερα στελέχη (*Rhodotorula sp.* LMBF Y-49, *Rhodotorula sp.* EMBT Y-48, EMBT Y-49 και *Cryptococcus uzbekistanensis* EMBT Y-44) παρουσίασαν μικρή ικανότητα να καταναλώσουν την γλυκερόλη και δεν αναπτύχθηκαν επαρκώς.
- Τα τρία μη ταυτοποιημένα στελέχη P.D. - F1, P.D. - D2 και V.V. - D4 παρουσίασαν ικανότητα στην κατανάλωση της γλυκερόλης, αφήνοντας μικρό μέρος ακατανάλωτο και παρήγαγαν ικανοποιητική ποσότητα βιομάζας (max 14.5-16.4 g/L, 166 h) και ενδοπολυσακχαριτών (max 6.2-7.2 g/L, 166 h), όμως οι ποσότητες λιπιδίων ήταν σχεδόν πάντα μικρότερες από 1.0 g/L.
- Τα τρία στελέχη *Yarrowia lipolytica* LMBF Y-45, LMBF Y-46 και LMBF Y-47 κατανάλωσαν πλήρως το υπόστρωμα της γλυκερόλης παράγοντας μικρές ποσότητες λιπιδίων (max 0.8-1.4 g/L) και ενδοπολυσακχαριτών, παρόλα αυτά παρουσίασαν ικανότητα να παράγουν κιτρικό οξύ (max 1.5-2.0 g/L) και πολυόλες, συγκεκριμένα μαννιτόλη (max 8.1-12.1 g/L), αραβιτόλη (max 1.6-2.0 g/L) και ερυθριτόλη (max 0.6-1.4 g/L).

Επίσης επιλέχθηκαν τα παρακάτω στελέχη για περαιτέρω διερεύνηση:

- Το στέλεχος *Debaryomyces hansenii* EMBT Y-36, γιατί παρουσίασε την μεγαλύτερη παραγωγή βιομάζας (16.8 g/L, 120 h), είχε υψηλές συγκεντρώσεις ενδοπολυσακχαριτών σε όλα τα σημεία της κινητικής του, παρουσίασε την δεύτερη μεγαλύτερη συγκέντρωση λιπιδίων (2.0 g/L, 24 h) και έδειξε να αναπτύσσεται στη γλυκερόλη καταναλώνοντάς την πλήρως.
- Το στέλεχος *Debaryomyces hansenii* EMBT Y-41, γιατί παρουσίασε υψηλές συγκεντρώσεις αραβιτόλης εξωκυτταρικά (max C_{arol} =10.3 g/L, 120 h), ενώ είχε αξιόλογη παραγωγή βιομάζας, υψηλές συγκεντρώσεις ενδοπολυσακχαριτών σε όλα τα σημεία της κινητικής του και έδειξε να αναπτύσσεται στη γλυκερόλη καταναλώνοντάς την πλήρως.
- Το στέλεχος *Rhodotorula glutinis* NRRL YB-252, γιατί παρουσίασε την υψηλότερη συγκέντρωση λιπιδίων (max C_{SCO} =2.1 g/L, 72 h) στο πρώτο στάδιο, ενώ είχε αξιόλογη παραγωγή βιομάζας, υψηλές συγκεντρώσεις ενδοπολυσακχαριτών σε όλα τα σημεία της κινητικής του και έδειξε να αναπτύσσεται στη γλυκερόλη καταναλώνοντάς την πλήρως.
- Το στέλεχος *Cryptococcus curvatus* NRRL Y-1511, γιατί παρουσίασε την υψηλότερη συγκέντρωση ενδοπολυσακχαριτών (max C_{IPS} =8.4 g/L, 72 h) στο πρώτο στάδιο, ενώ είχε αξιόλογη παραγωγή βιομάζας και έδειξε να αναπτύσσεται στη γλυκερόλη καταναλώνοντάς το 96% της αρχικής της συγκέντρωσης.
- Το στέλεχος *Cryptococcus uzbekistanensis* EMBT Y-44, γιατί παρόλο που δεν παρουσίασε υψηλές συγκεντρώσεις βιομάζας (max C_X =3.2 g/L, 166 h), λιπιδίων και ενδοπολυσακχαριτών, τα οποία κυμάνθηκαν σε συγκεντρώσεις που δεν ξεπέρασαν τα 1.0 g/L, καθώς και μικρή κατανάλωση γλυκερόλης - καταναλώθηκε μόλις το 18% της αρχικής της συγκέντρωσης στις 166 h - παρουσίασε όμως υψηλές αποδόσεις λιπιδίων προς βιομάζας, σταθερά μεγαλύτερες του 20% w/w σε όλη την διάρκεια της ζύμωσης.

4.2 Καλλιέργειες σε κωνικές φιάλες με τις ζύμες *Debaryomyces*, *Rhodotorula* & *Cryptococcus* (S_0 50 & 80 g/L)

Η επιλογή των στελεχών, σε αυτό το στάδιο (2^ο πείραμα) της πειραματικής διαδικασίας, έγινε βάσει των παραμέτρων της μικροβιακής αύξησης, που προαναφέρθηκαν και αποτέλεσαν τα κριτήρια για την επιλογή των στελεχών που χρησιμοποιήθηκαν.

Η μέγιστη συγκέντρωση μικροβιακού (διαγρ.4.2-1) λίπους επιτεύχθηκε από το στέλεχος *Rhodotorula glutinis* NRRL YB-252 στις 216 ώρες καλλιέργειας, με καταναλωθέν υπόστρωμα 48.9 g/L, με $L(\%) = 38.2\%$, με συγκέντρωση βιομάζας 18.9 g/L και η συγκέντρωσή του μικροβιακού λίπους ήταν 7.2 g/L. Γεγονός, που υποδηλώνει ότι η αναλογία που C/N που χρησιμοποιήθηκε στην συγκεκριμένη

καλλιέργεια ευνόησε την παραγωγή μικροβιακού λίπους και αυτή η υπόθεση δείχνει να επιβεβαιώνεται, επίσης, στην περίπτωση των στελεχών *R.glutinis* NRRL YB-252, *C.curvatus* NRRL Y-1511, *D.hansenii* EMBT Y-36 και EMBT Y-41 στα διαγράμματα 4.2-1 & 4.2-2 στην σύγκριση διαφορετικών συγκεντρώσεων αρχικής γλυκερόλης, 40 g/L με 80 g/L, μετά από 72 ώρες καλλιέργειας.

Επίσης, για το στέλεχος *Rhodotorula glutinis* NRRL YB-252 έγινε σύγκριση του παραγόμενου μικροβιακού λίπους του με δημοσιευμένα αποτελέσματα από διαφορετικές μελέτες με διαφορετικά στελέχη ζυμών (πίν.4.2-1)

Πίνακας 4.2-1: Πειραματικά αποτελέσματα μικροβιακών στελεχών ζυμών καλλιεργημένα σε υποστρώματα βασισμένα στην γλυκερόλη και παραγωγή μικροβιακών λιπιδίων κατά την αύξησή τους σε διαφορετικούς συνδυασμούς καλλιέργειών και σύγκρισή τους με την παρούσα μελέτη.

Στέλεχος	Είδος καλλιέργειας	DCW (g/L)	Y _L /DCW (% w/w)	Αναφορά
<i>Cryptococcus albidus</i> CBS 4517 ^a	Shake flasks	1.4	43.8	Hansson & Dostalek (1986)
<i>Rhodospiridium toruloides</i> CBS 14 ^a	Shake flasks	5.8	34.6	Moreton (1988)
<i>Cryptococcus curvatus</i> ATCC 20509 ^a	Fed batch bioreactor	118.0	25.0	Meesters <i>et al.</i> (1996)
<i>Yarrowia lipolytica</i> ACA-DC 50109 ^b	Single stage continuous	8.1	43.0	Papanikolaou & Aggelis (2009)
<i>Yarrowia lipolytica</i> ACA-DC 50109 ^{b, c}	Shake flasks	11.4	29.8	Papanikolaou <i>et al.</i> (2003)
<i>Yarrowia lipolytica</i> ACA -DC 50109 ^a	Fed Batch bioreactor	4.7	23.1	Makri <i>et al.</i> (2010)
<i>Cryptococcus curvatus</i> ATCC 20509 ^b	Fed Batch bioreactor	32.9	52.9	Liang <i>et al.</i> (2010)
<i>Rhodotorula glutinis</i> TISTR 5159	Shake flasks	5.5	35.2	Saenge <i>et al.</i> (2011)
<i>Cryptococcus curvatus</i> ATCC 20509 ^b	Fed Batch bioreactor	22.0	49.0	Cui <i>et al.</i> (2012)
<i>Yarrowia lipolytica</i> MUCL 28849 ^{a, d}	Fed Batch bioreactor	42.2	38.2	Fontanille <i>et al.</i> (2012)
<i>Rhodospiridium toruloides</i> AS2.1389 ^b	Shake flasks	19.2	47.7	Xu <i>et al.</i> (2012)
<i>Rhodospiridium toruloides</i> AS2.1389 ^b	Batch bioreactor	19.2	47.7	Xu <i>et al.</i> (2012)
<i>Yarrowia lipolytica</i> A10 ^a	Fed Batch bioreactor	23.0	12.9	Celinska & Grajek (2013)
<i>Yarrowia lipolytica</i> NCYC 3825 ^{a, e}	Fed Batch bioreactor	42.0	30.9	Celinska & Grajek (2013)
<i>Candida</i> sp. LEB-M3 ^b	Shake flasks	19.7	50.2	Duarte <i>et al.</i> (2013)

Πίνακας 4.2-1 (συνέχεια)

<i>Kodamaea ohmeri</i> BY4-523 ^b	Shake flasks	10.3	53.3	Kitcha & Cheirslip (2013)
<i>Trichosporanoides spathulata</i> JU4-57 ^b	Shake flasks	17.1	43.4	Kitcha & Cheirslip (2013)
<i>Trichosporanoides spathulata</i> JU4-57 ^b	Fed Batch bioreactor	13.8	56.4	Kitcha & Cheirslip (2013)
<i>Yarrowia lipolytica</i> TISTR 5151 ^{b, f}	Batch bioreactor	5.5	50.8	Louhasakul & Cheirslip (2013)
<i>Yarrowia lipolytica</i> JMY1203 ^{b, e}	Shake flasks	3.2	30.7	Papanikolaou <i>et al.</i> (2013)
<i>Cryptococcus curvatus</i> ATCC 20509 ^{a, g}	Shake flasks	50.4	37.7	Ryu <i>et al.</i> (2013)
<i>Rhodospiridium toruloides</i> Y4 ^a	Batch bioreactor	35.3	46.0	Uckun Kiran <i>et al.</i> (2013)
<i>Yarrowia lipolytica</i> Q21 ^b	Shake flasks	3.9	22.1	Poli <i>et al.</i> (2014)
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	Shake flasks	7.4	40.0	Santamauro <i>et al.</i> (2014)
<i>Yarrowia lipolytica</i> ATCC 20460 ^b	Shake flasks	11.6	31.0	Sestric <i>et al.</i> (2014)
<i>Rhodospiridium toruloides</i> Y4 ^b	Shake flasks	24.9	48.9	Yang <i>et al.</i> (2014)
<i>Rhodotorula glutinis</i> NRRL YB-252	Shake flasks	18.9	38.2	Παρούσα μελέτη

^a Χρήση καθαρής γλυκερόλης.

^b Χρήση ακάθαρτης γλυκερόλης.

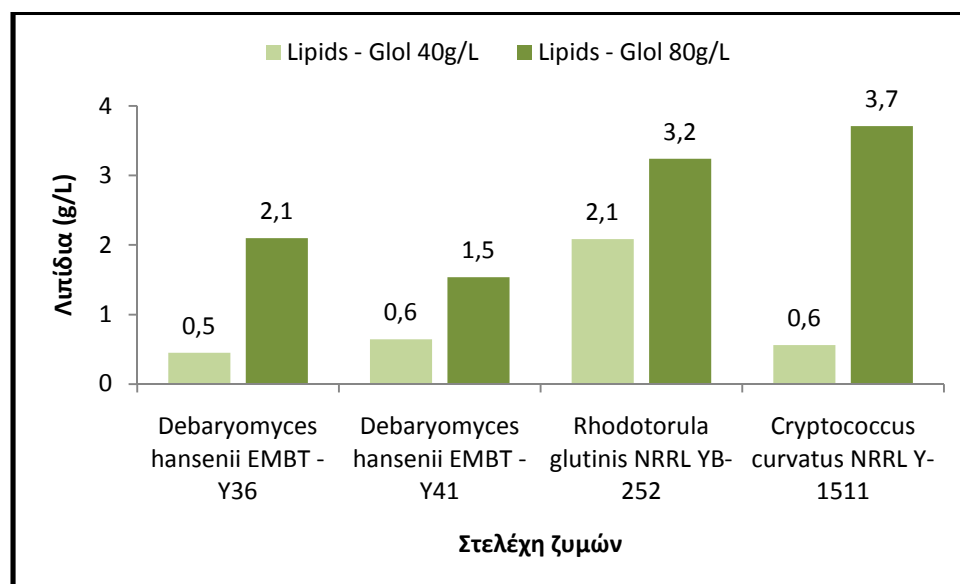
^c Χρήση μίγματος γλυκερόλης με κορεσμένα ελεύθερα λιπαρά οξέα.

^d Χρήση μίγματος γλυκερόλης με πτητικά λιπαρά οξέα.

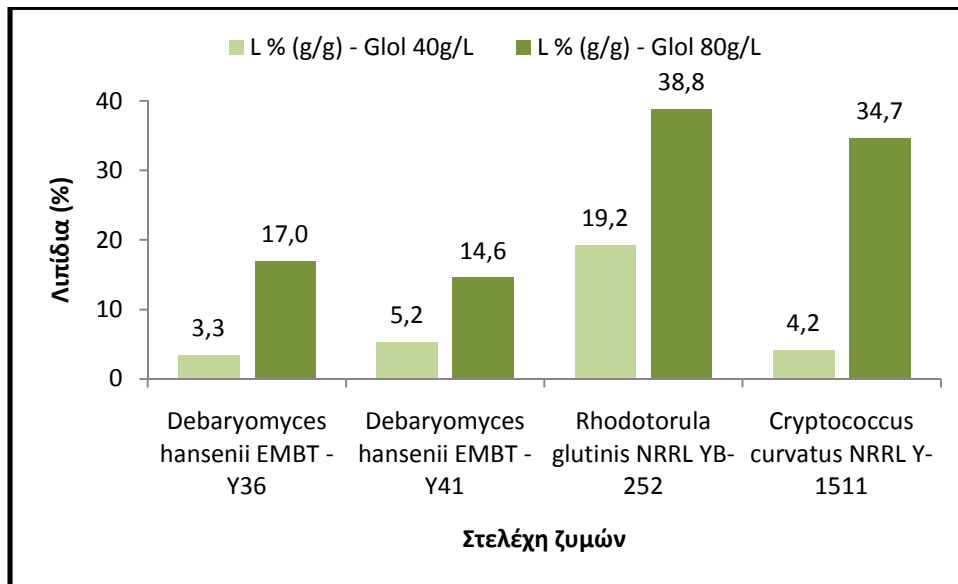
^e Χρήση γενετικά τροποποιημένου στελέχους.

^f Χρήση μίγματος γλυκερόλης με λύματα από φοινικέλαιο.

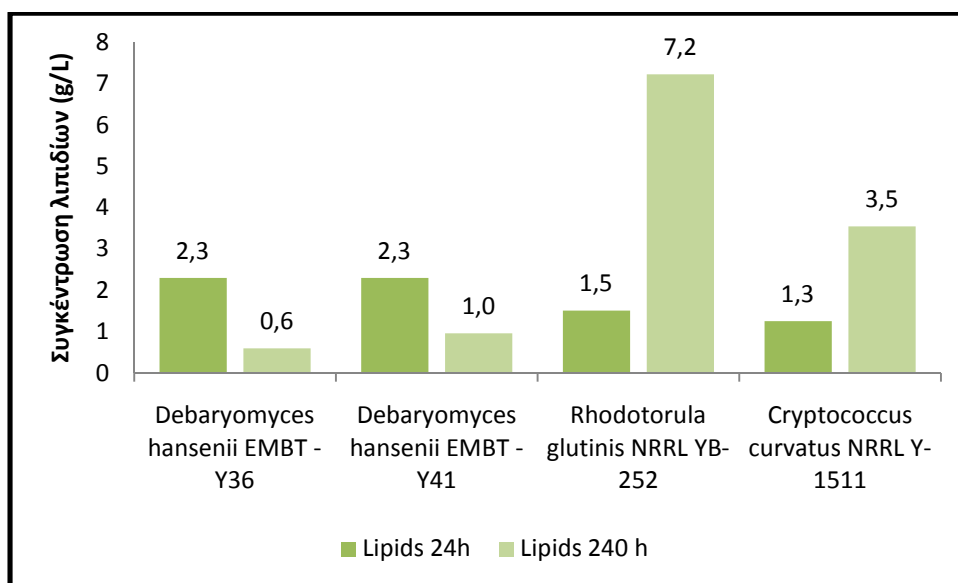
^g Χρήση μίγματος γλυκερόλης με spent yeast lysate.



Διάγραμμα 4.2-1: Σύγκριση παραγόμενων λιπιδίων στις 72 ώρες καλλιέργειας μεταξύ αρχικής συγκέντρωσης γλυκερόλης 40 g/L και 80 g/L, από επιλεγμένα στελέχη για το 2^ο πείραμα.

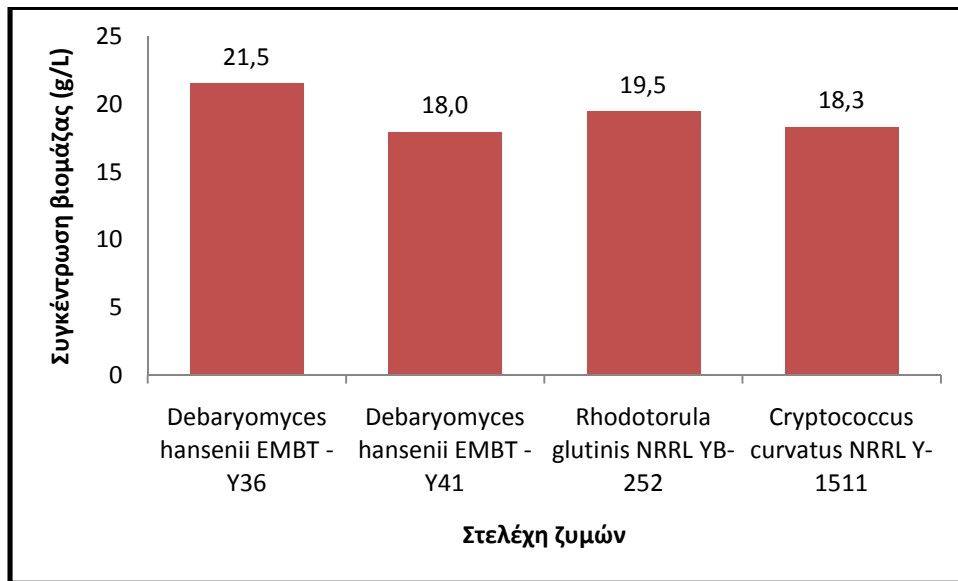


Διάγραμμα 4.2-2: Σύγκριση ποσοστών λιπιδίων επί της παραγόμενης βιομάζας στις 72 ώρες καλλιέργειας μεταξύ αρχικής συγκέντρωσης γλυκερόλης 40 g/L και 80 g/L, από επιλεγμένα στελέχη για το 2^ο πείραμα.



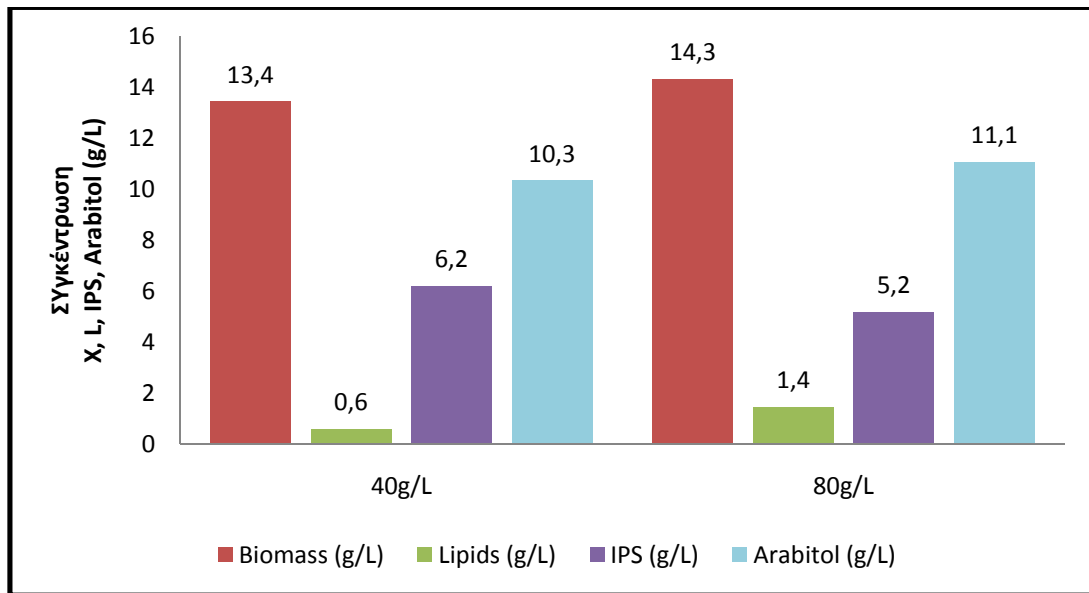
Διάγραμμα 4.2-3: Σύγκριση παραγόμενων λιπιδίων στις 24 και 240 ώρες καλλιέργειας από επιλεγμένα στελέχη για το 2^ο πείραμα, σε υγρή καλλιέργεια αρχικής συγκέντρωσης γλυκερόλης 80 g/L.

Η μέγιστη παραγόμενη βιομάζα επιτεύχθηκε από δύο στελέχη, το *R. glutinis* NRRL YB-252 στις 312 ώρες καλλιέργειας παρουσίασε συγκέντρωσή 21.8 g/L και το *D. hansenii* EMBT Y-36 στις 240 ώρες καλλιέργειας παρουσίασε συγκέντρωσή 21.5 g/L.



Διάγραμμα 4.2-4: Σύγκριση παραγόμενης βιομάζας στις 240 ώρες καλλιέργειας από επιλεγμένα στελέχη για το 2^ο πείραμα, σε υγρή καλλιέργεια αρχικής συγκέντρωσης γλυκερόλης 80 g/L.

Η μέγιστη συγκέντρωση παραγωγής πολυολών και συγκεκριμένα αραβιτόλης επιτεύχθηκε από το στέλεχος *D.hansenii* EMBT Y-41 στις 240 ώρες καλλιέργειας, με καταναλωθέν υπόστρωμα 68.9 g/L, με $Y_{arol/S}=0.40$ g/g, με συγκέντρωση βιομάζας 18.0 g/L και η συγκέντρωσή της αραβιτόλης ήταν 27.5 g/L. Συγκρίνοντας αυτές τις τιμές των παραμέτρων με αυτές των *Koganti et al. (2013)*, παρατηρείται ότι με μικρότερη αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης το συγκεκριμένο στέλεχος (*D.hansenii* EMBT Y-41) στο αντίστοιχο χρονικό σημείο η συγκέντρωση της αραβιτόλης καθώς και ο συντελεστής απόδοσης κινήθηκαν σε παρόμοια επίπεδα, ενώ στο τέλος της καλλιέργειας παρήγαγε μεγαλύτερες ποσότητες αραβιτόλης με μικρότερη παραγωγή βιομάζας. Επίσης, ο λόγος C/N επηρεάζει και σε αυτήν την περίπτωση την παραγωγή λιπιδίων και ενδοπολυσακχαριτών, διότι στην περίπτωση του 1^{ου} πειράματος ο λόγος C/N είναι μικρότερος συγκρινόμενος με τον λόγο του 2^{ου} πειράματος και στην πρώτη περίπτωση ενοείται η παραγωγή ενδοπολυσακχαριτών και όχι των λιπιδίων, ενώ στην δεύτερη το αντίστροφο (διάγμ. 4-6).. Σε κάθε περίπτωση, όμως, η εξωκυτταρική παραγωγή αραβιτόλης δεν επηρεάζεται σημαντικά (διάγμ. 4-6).



Διάγραμμα 4.2-5: Σύγκριση παραγόμενης βιομάζας, λιπιδίων, ενδοπολυσακχαριτών και εξωκυτταρικής παραγωγής αραβιτόλης στις 120 ώρες καλλιέργειας του στελέχους *D.hansenii* EMBT - Y41, σε υγρή καλλιέργεια αρχικής συγκέντρωσης γλυκερόλης 40 g/L και 80 g/L.

Η μέγιστη συγκέντρωση ενδοπολυσακχαριτών επιτεύχθηκε από το στέλεχος *Rhodotorula glutinis* NRRL YB-252 στις 312 ώρες καλλιέργειας, με καταναλωθέν υπόστρωμα 70.9 g/L, με $IPS(\%) = 37.5\%$, με συγκέντρωση βιομάζας 21.8 g/L και συγκέντρωσή των ενδοπολυσακχαριτών ήταν 8.2 g/L.

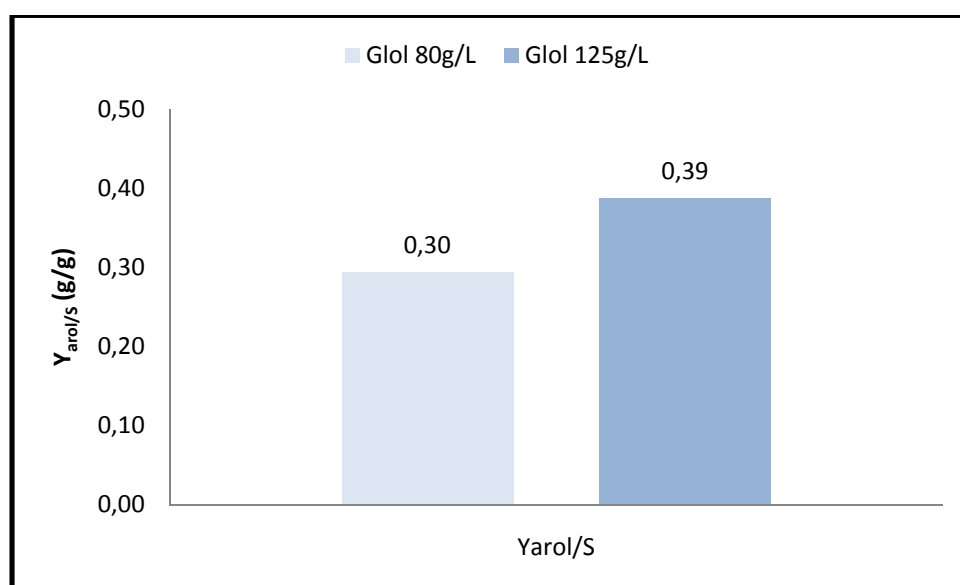
Οπότε, τα συμπεράσματα του πρώτου πειράματος είναι τα εξής:

- Το στέλεχος *Cryptococcus curvatus* NRRL Y-1511, παρουσίασε μέγιστη παραγωγή βιομάζας 18.7 g/L, με συγκέντρωση λιπιδίων 1.3 g/L και ενδοπολυσακχαριτών 6.0 g/L, έπειτα από 288 ώρες καλλιέργειας.
- Το στέλεχος *Rhodotorula glutinis* NRRL YB-252 παρουσίασε τη μέγιστη συγκέντρωση λιπιδίων 7.2 g/L έπειτα από 216 ώρες καλλιέργειας, με συγκέντρωση βιομάζας 18.9 g/L και ενδοπολυσακχαριτών 6.6 g/L.
- Το στέλεχος *Debaryomyces hansenii* EMBT Y-36, παρουσίασε τη μέγιστη παραγωγή βιομάζας 21.5 g/L, με συγκέντρωση ενδοπολυσακχαριτών 7.1 g/L, αλλά με μικρή παραγωγή λιπιδίων 0.6 g/L, έπειτα από 240 ώρες καλλιέργειας.
- Το στέλεχος *Debaryomyces hansenii* EMBT Y-41 ήταν το μόνο που παράγγαγε 27.5 g/L αραβιτόλης μετά από 240 ώρες καλλιέργειας και παράλληλα παρουσίασε 7.5 g/L ενδοπολυσακχαρίτες.

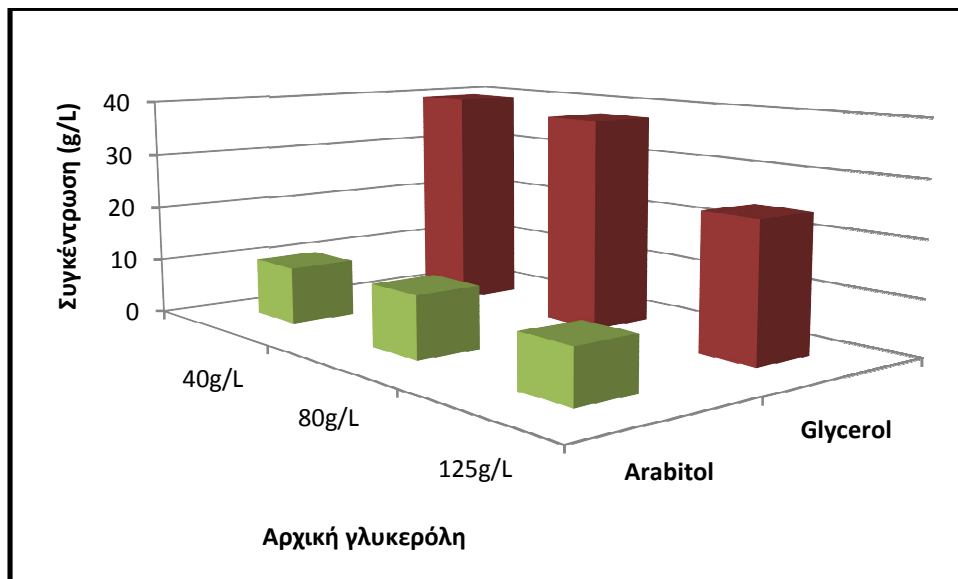
4.3 Καλλιέργεια σε κωνικές φιάλες του *D. hansenii* EMBT Y-41 (S_0 125 g/L)

Στο τρίτο στάδιο της πειραματικής διαδικασίας, η μέγιστη παραγωγή βιομάζας επιτεύχθηκε στις 360 ώρες καλλιέργειας, με καταναλωθέν υπόστρωμα 76.9 g/L, με $Y_{X/S}=0.26$ g/g και με συγκέντρωση βιομάζας 19.9 g/L. Η μέγιστη συγκέντρωση μικροβιακού λίπους επιτεύχθηκε στις 168 ώρες καλλιέργειας, με καταναλωθέν υπόστρωμα 35.7 g/L, με $L(\%) = 18.5\%$, με συγκέντρωση βιομάζας 16.2 g/L και η συγκέντρωσή του μικροβιακού λίπους ήταν 3.0 g/L, γεγονός που δικαιολογείται από την κατεύθυνση του μεταβολισμού προς παραγωγή ενδοπολυσακχαριτών και αραβιτόλης. Η μέγιστη συγκέντρωση ενδοπολυσακχαριτών επιτεύχθηκε στις 312 ώρες καλλιέργειας, με καταναλωθέν υπόστρωμα 66.1 g/L, με $IPS(\%) = 46.0\%$, με συγκέντρωση βιομάζας 19.2 g/L και η συγκέντρωσή των ενδοπολυσακχαριτών ήταν 8.8 g/L. Η μέγιστη συγκέντρωση παραγωγής αραβιτόλης επιτεύχθηκε στις 360 ώρες καλλιέργειας, με καταναλωθέν υπόστρωμα 76.9 g/L, με $Y_{arol/S}=0.62$ g/g, συγκέντρωση βιομάζας 19.9 g/L και η συγκέντρωσή της αραβιτόλης ήταν 47.5 g/L. Συγκρίνοντας αυτές τις τιμές των παραμέτρων με αυτές των *Koganti et al. (2013)*, παρατηρείται ότι, το συγκεκριμένο στέλεχος *D.hansenii* EMBT Y-41, στις 360 ώρες καλλιέργειας παρουσίασε παρόμοια συγκέντρωση αραβιτόλης, αλλά ο συντελεστής απόδοσης στην παρούσα περίπτωση ($Y_{arol/S}=0.62$ g/g) ξεπέρασε την τιμή ($Y_{arol/S}=0.55$ g/g) των *Koganti et al. (2013)*.

Συγκρίνοντας την απόδοση αραβιτόλης επί του καταναλωθέντος υποστρώματος γλυκερόλης σε δυο διαφορετικές συγκεντρώσεις (διάγρ. 4.3-1 & 4.3-2), παρατηρείται ότι στην περίπτωση μεγαλύτερης αρχικής συγκέντρωσης έχουμε και μεγαλύτερο συντελεστή απόδοσης, έπειτα από 120 ώρες καλλιέργειας.



Διάγραμμα 4.3-1: Σύγκριση συντελεστή απόδοσης παραγωγής αραβιτόλης επί του καταναλωθέντος υποστρώματος μεταξύ 80 g/L και 125 g/L αρχικής συγκέντρωσης γλυκερόλης, έπειτα από 120 ώρες καλλιέργειας, του στελέχους *D.hansenii* EMBT - Y41.



Διάγραμμα 4.3-2: Παραγόμενη αραβιτόλη από το στέλεχος *D. hansenii* EMBT -Y41, σε διαφορετικές αρχικές συγκεντρώσεις γλυκερόλης (40 g/L, 80 g/L, 1265 g/L), έπειτα από 120 ώρες καλλιέργειας.

Στον πίνακα που ακολουθεί γίνεται σύγκριση των συντελεστών απόδοσης αραβιτόλης επί του καταναλωθέντος υποστρώματος γλυκερόλης, από στελέχη του γένους *Debaryomyces*, για τα οποία υπάρχουν δημοσιευμένα αποτελέσματα.

Πίνακας 4.3-1: Σύγκριση απόδοσης αραβιτόλης επί του καταναλωθέντος υποστρώματος γλυκερόλης, με αποδόσεις από άλλες μελέτες, με την χρήση στελέχους ζύμης του γένους *Debaryomyces*.

Στέλεχος	Πηγή άνθρακα	Αραβιτόλη (g/L)	$Y_{arol/S}$ (g/g)	Αναφορά
<i>Candida quercitrusa</i> 17-2A	Glo1 250 g/L	85.1	0.40	Yoshikawa <i>et al.</i> (2014)
<i>Debaryomyces hansenii</i> NRRL Y-7483	Glo1 100 g/L	40.0	0.55	Koganti <i>et al.</i> (2013)
<i>Debaryomyces hansenii</i> NRRL Y-7483	Glo1 150 g/L	≈15 g/L	0.50	Koganti <i>et al.</i> (2011)
<i>Metschnikowia reukaufii</i> AJ14787	Glc 400 g/L	206	0.52	Nozaki <i>et al.</i> (2003)
<i>Debaryomyces hansenii</i> EMBT Y-41	Glo1 125 g/L	47.5	0.62	Παρούσα μελέτη

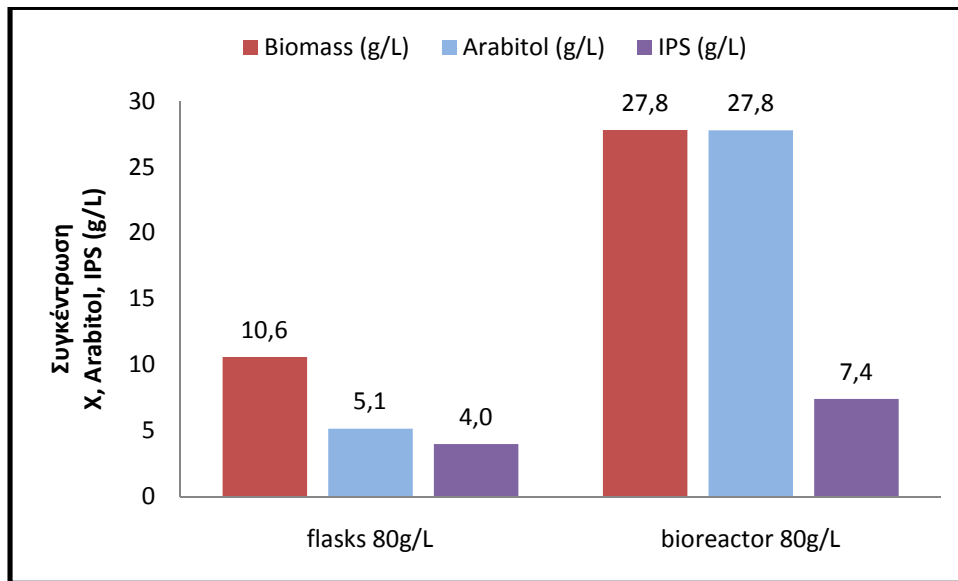
Η αραβιτόλη σε εμπορικό επίπεδο διατίθεται σε κρυσταλική μορφή και υψηλή καθαρότητα ($\geq 99\%$), με τιμές να κυμαίνονται από 122 € έως 1205 € (Sig; San; Car).

Συμπερασματικά, από το συγκεκριμένο πειραματικό στάδιο, το στέλεχος *D.hansenii* EMBT - Y41 παρουσιάζει πολύ υψηλές συγκεντρώσεις αραβιτόλης (47.5 g/L, 360h), επίσης με υψηλό συντελεστή απόδοσης επί της καταναλωθείσας γλυκερόλης (61.8%) γεγονός για το οποίο δεν υφίστανται βιβλιογραφικές αναφορές.

4.4 Ασυνεχής καλλιέργεια σε βιοαντιδραστήρα του στελέχους *D. hansenii* EMBT Y-41 (S_0 80 g/L)

Όσον αφορά την υγρή καλλιέργεια στον βιοαντιδραστήρα για το στέλεχος *Debaryomyces hansenii* EMBT Y-41 το σύνολο της πηγής άνθρακα του μέσου ανάπτυξης καταναλώθηκε πλήρως στις 72 ώρες καλλιέργειας και η μικροβιακή του ανάπτυξη παρατηρήθηκε έως τις 112 ώρες. Η μέγιστη παραγωγή βιομάζας επιτεύχθηκε στις 56 ώρες καλλιέργειας, με καταναλωθέν υπόστρωμα 73.3 g/L, με $Y_{X/S}=0.45$ g/g και με συγκέντρωση βιομάζας 33.0 g/L. Η μέγιστη συγκέντρωση μικροβιακού λίπους επιτεύχθηκε στις 40 ώρες καλλιέργειας, με καταναλωθέν υπόστρωμα 44.2 g/L, με $L(\%) < 10\%$, με συγκέντρωση βιομάζας 23.0 g/L και η συγκέντρωσή του μικροβιακού λίπους ήταν 2.2 g/L, γεγονός που δικαιολογείται από την κατεύθυνση του μεταβολισμού προς παραγωγή ενδοπολυσακχαριτών και αραβιτόλης. Η μέγιστη συγκέντρωση ενδοπολυσακχαριτών επιτεύχθηκε στις 92 ώρες καλλιέργειας, με καταναλωθέν υπόστρωμα 79.5 g/L, με $IPS(\%) = 45.5\%$, με συγκέντρωση βιομάζας 30.5 g/L και η συγκέντρωσή των ενδοπολυσακχαριτών ήταν 13.9 g/L. Η μέγιστη συγκέντρωση παραγωγής αραβιτόλης επιτεύχθηκε στις 72 ώρες καλλιέργειας, με καταναλωθέν υπόστρωμα 79.5 g/L, με $Y_{arol/S}=0.35$ g/g, με συγκέντρωση βιομάζας 27.8 g/L και η συγκέντρωσή της αραβιτόλης ήταν 27.8 g/L. Συγκρίνοντας αυτές τις τιμές των παραμέτρων με αυτές των *Koganti et al. (2013)*, παρατηρείται ότι, όπως και στην περίπτωση των κωνικών φιαλών, το συγκεκριμένο στέλεχος (*D.hansenii* EMBT Y-41) στο αντίστοιχο χρονικό σημείο η συγκέντρωση της αραβιτόλης καθώς και ο συντελεστής απόδοσης κινήθηκαν σε παρόμοια επίπεδα.

Επίσης, η παραγωγικότητα αραβιτόλης στον βιοαντιδραστήρα (0.39 g/L/h) ήταν πολύ μεγαλύτερη από την αντίστοιχη στις κωνικές φιάλες (0.07 g/L/h), όπως φαίνεται στο διάγραμμα 4.4-1.



Διάγραμμα 4.4-1: Σύγκριση παραγόμενης βιομάζας, παραγωγής αραβιτόλης και ενδοπολυσακχαριτών στις 72 ώρες καλλιέργειας του στελέχους *D.hansenii* EMBT - Y41, σε υγρή καλλιέργεια αρχικής συγκέντρωσης γλυκερόλης 80g/L σε κωνικές φιάλες και βιοαντιδραστήρα.

Συμπερασματικά, από το συγκεκριμένο πειραματικό στάδιο, το στέλεχος *D.hansenii* EMBT - Y41 παρουσιάζει συγκέντρωση αραβιτόλης 27.8 g/L στις 72 ώρες καλλιέργειας, ενώ στην καλλιέργεια σε κωνικές φιάλες παρόμοια συγκέντρωση (27.5 g/L) επιτυγχάνεται στις 240 ώρες καλλιέργειας, η παραγόμενη βιομάζα στις 104 ώρες καλλιέργειας παρουσιάζει συγκέντρωση 33.3 g/L, με χαμηλή συγκέντρωση λιπιδίων (1.3 g/L) και αφότου καταναλωθεί το σύνολο της γλυκερόλης αρχίζει και καταναλώνεται η αραβιτόλη.

5. Παράρτημα

Δημοσίευση μέρους των αποτελεσμάτων της παρούσας μελέτης (poster) στο 6^ο Πανελλήνιο Επιστημονικό συνέδριο «ΣΥΓΧΡΟΝΕΣ ΤΑΣΕΙΣ ΣΤΟΝ ΤΟΜΕΑ ΤΩΝ ΛΙΠΙΔΙΩΝ» (Αθήνα 11-12 Ιουνίου 2015 - Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών)

Μετατροπή της βιομηχανικής γλυκερόλης σε γλυκαντικές αλκοόλες και κιτρικό οξύ από στελέχη *Yarrowia lipolytica* και *Debaryomyces hansenii*

Αντωνίου Δ.¹, Φιλιππούση Ρ.¹, Κουτίνιας Α.², Τρυφινόπουλου Π.¹, Νυχάς Γ.Ι.¹, Παναγιωτοπούλου Σ.¹

¹ Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Εργαστήριο Μικροβιολογίας & Βιοτεχνολογίας Τροφίμων

² Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Εργαστήριο Μηχανικής Τροφίμων, Επεξεργασίας & Συντήρησης Γ. Προϊόντων

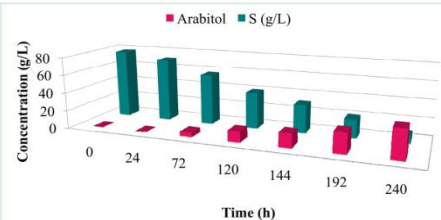
Εισαγωγή

Στην παρούσα μελέτη διερευνήθηκαν εναλλακτικοί τρόποι αξιοποίησης της ακατέργαστης γλυκερόλης από τα στελέχη των ζυμομυκήτων *Yarrowia lipolytica* LMBF-Y45, LMBF-Y46, LMBF-Y47 και *Debaryomyces hansenii* EMBT-Y36, EMBT-Y41 μέσω της βιομετατροπής της σε βιομάζα, πολυόλες (μαννιτόλη, αραβιτόλη, ερυθριτόλη), ενδοκυτταρικό λίπος (SCO), ενδοπολυσακχαρίτες (IPS), και κιτρικό οξύ. Οι καλλιέργειες πραγματοποιήθηκαν σε κωνικές φιάλες των 250mL υπό ανάδευση για 10 ημέρες και το υπόστρωμα ανάπτυξης των στελεχών των ζυμομυκήτων περιείχε ακατέργαστη διαχωρισμένη γλυκερόλη, καθαρότητας 95%, σε συγκεντρώσεις 40g/L για τα στελέχη του ζυμομύκητα *Yarrowia lipolytica*, 80g/L για τα στελέχη του ζυμομύκητα *Debaryomyces hansenii*, ενώ το στέλεχος EMBT-Y41 επιλέχθηκε για περαιτέρω έρευνα σε πείραμα με αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης 120g/L. Καθ' όλη την διάρκεια των ζυμώσεων οι συνθήκες καλλιέργειας διατηρήθηκαν σταθερές, με την θερμοκρασία στους 28±1 °C και την ανάδευση στις 180±5 rpm.

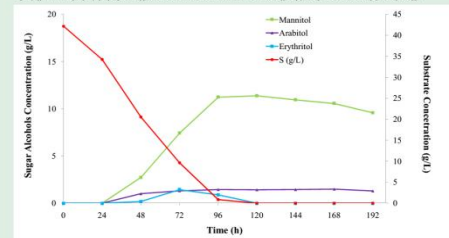
Πίνακας 1: Παραγωγή βιομάζας, IPS, SCO και γλυκαντικών αλκοολών από τα στελέχη των ζυμομυκήτων που χρησιμοποιήθηκαν.

Yeast strains	Time (h)	X (g/L)	Y _{IPS/X} (% w/w)	L (g/L)	Mannitol (g/L)	Arabitol (g/L)	Erythritol (g/L)	Citric acid (g/L)
<i>Yarrowia lipolytica</i> LMBF-Y45	72	9.2	27.0	0.2	6.6	1.3	1.1	1.7
	168	12.4	39.2	1.1	8.1	1.6	ND	1.2
<i>Yarrowia lipolytica</i> LMBF-Y46	72	9.5	22.7	0.1	6.1	1.0	0.9	1.9
	168	12.4	26.5	0.4	8.6	1.7	ND	0.9
<i>Yarrowia lipolytica</i> LMBF-Y47	72	9.3	25.6	1.4	7.4	1.0	1.4	2.0
	168	12.0	30.1	0.6	10.6	1.3	ND	1.2
<i>Debaryomyces hansenii</i> EMBT-Y36	192	19.3	35.4	1.2	ND	1.1	ND	1.4
	240	21.5	32.9	0.6	ND	2.4	ND	1.6
<i>Debaryomyces hansenii</i> EMBT-Y41	192	16.7	43.8	0.8	ND	22.4	ND	1.0
	240	18.0	41.8	1.0	ND	32.3	ND	0.7
	312	19.2	46.0	2.2	ND	39.0	ND	ND
	360	19.9	39.1	2.0	ND	47.5	ND	ND

ND: not detectable



Επίγραμμα 1: Παραγωγή αραβιτόλης από το *D. hansenii* EMBT-Y41 σε σχέση με την κατανάλωση γλυκερόλης.



Επίγραμμα 2: Παραγωγή γλυκαντικών αλκοολών από το *Y. lipolytica* LMBF-Y47 σε σχέση με την κατανάλωση γλυκερόλης.

Αποτελέσματα – Συμπεράσματα

Τα πειράματα έδειξαν ότι όλα τα στελέχη των ζυμομυκήτων *Yarrowia lipolytica* και *Debaryomyces hansenii* κατανάλωσαν την γλυκερόλη, μετατρέποντάς την σε βιομάζα, IPS, SCO, κιτρικό οξύ και γλυκαντικές αλκοόλες, όπως η αραβιτόλη (*D. hansenii*, *Y. lipolytica*), η μαννιτόλη και η ερυθριτόλη (*Y. lipolytica*). Ανάμεσα στα στελέχη του *D. hansenii* εξαιρετικά αποτελέσματα παρουσίασε το στέλεχος EMBT-Y41 με την ποσότητα της παραγόμενης αραβιτόλης να φτάνει τα **47.5g/L** στις 360h με αρχική ποσότητα υποστρώματος 120g/L και απόδοση επί του καταναλωθέντος υποστρώματος 63.5% w/w, αξιολογία ήταν επίσης η παραγωγή βιομάζας 19.9g/L (360h) και IPS 7.8g/L (360h). Αντίθετα η παραγωγή SCO 2.0g/L (360h) και κιτρικού οξέως δεν ήταν σημαντική. Τα στελέχη του *Y. lipolytica* παρουσίασαν αξιολογία παραγωγή της μαννιτόλης αγγίζοντας τα 11.3g/L (120h). Η τιμή της βιομάζας έφτασε τα 13.1g/L (120h), ενώ οι τιμές της αραβιτόλης, της ερυθριτόλης και του κιτρικού οξέως κυμάνθηκαν σε σχετικά χαμηλές συγκεντρώσεις 1.0-1.7g/L, 0.9-1.4g/L και 0.9-2.0g/L, αντίστοιχα, καθ' όλη την διάρκεια της ζύμωσης. Η παραγωγή SCO δεν ήταν ικανοποιητική, ενώ οι τιμές των IPS διακυμάνθηκαν στην διάρκεια της ζύμωσης μεταξύ 2.2-2.5g/L (72h) και 3.3-4.9g/L (168h).

Τα συγκεκριμένα αποτελέσματα είναι ιδιαίτερα ενθαρρυντικά για περαιτέρω έρευνα καθώς υποδεικνύουν έναν οικονομικό τρόπο παραγωγής γλυκαντικών αλκοολών χαμηλής θερμοδικής αξίας, οι οποίες μπορούν να αξιοποιηθούν από την βιομηχανία τροφίμων, μέσω της βιομετατροπής της απόβλητης βιομηχανικής γλυκερόλης.

Βιβλιογραφία:

- Papanikolaou, S., Aggelis, G., Lipid production by *Yarrowia lipolytica* growing on industrial glycerol in asingle-state continuous culture. *Bioresource Technology* (2002) **82** : 43-49.
- Koganti, S., Kuo, T. M., Kurtzman, C. P., Smith, N., Ju, L.K., Production of arabitol from glycerol: strain screening and study of factors affecting production yield. *Appl Microbiol Biotechnol* (2011) **90**: 257-267.
- Koganti, S., Ju, L.K., *Debaryomyces hansenii* fermentation for arabitol production. *Biochemical Engineering Journal* (2013) **79**: 112-119.

Ευχαριστίες:

Η επιχορήγηση της μελέτης έγινε στα πλαίσια του προγράμματος "BIO4OIL" με θέμα: «Νέες βιοεργασίες παραγωγής μικροβιακών λιπιδίων χρησιμοποιώντας την ακάθαρτη γλυκερόλη και κυτταρινούχα σάκχαρα».

6. Βιβλιογραφία

- Andre, 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. *Engineering in Life Sciences*, 9(6), 468–478.
- Belitz, H. D., Grosch, W., & Schieberle, P. (2009). *Food chemistry. Food Chemistry* (Vol. 101).
- Chatzifragkou, A., & Papanikolaou, S. (2012). Effect of impurities in biodiesel-derived waste glycerol on the performance and feasibility of biotechnological processes. *Applied Microbiology and Biotechnology*.
- Crick, R. (1961). Improvements in or relating to sweetening agents for food. vol. *US patent*, 884.
- Demain, A. L., Phaff, H. J., & Kurtzman, C. P. (1998). The industrial and agricultural significance of yeasts. *The yeasts, a taxonomic study, 4th edn. Elsevier, Amsterdam*, 13-20.
- Fakas, S., Bellou, S., Makri, A., & Aggelis, G. (2009). Single cell oil and gamma-linolenic acid production by *Thamnidium elegans* grown on raw glycerol. *Microbial Conversions of Raw Glycerol*, 85-99.
- Fennema, O. R., & Tannenbaum, S. R. (1996). Introduction to food chemistry. *FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY-NEW YORK-MARCEL DEKKER-*, 103–104.
- Folch, J., Lees, M., & Stanley, G. H. S. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem*, 226(1), 497–509.
- Huck, J. H. J., Roos, B., Jakobs, C., van der Knaap, M. S., & Verhoeven, N. M. (2004). Evaluation of pentitol metabolism in mammalian tissues provides new insight into disorders of human sugar metabolism. *Molecular Genetics and Metabolism*, 82(3), 231–7.
- Koganti, S., & Ju, L. K. (2013). *Debaryomyces hansenii* fermentation for arabitol production. *Biochemical Engineering Journal*, 79, 112–119.
- Koganti, S., Kuo, T. M., Kurtzman, C. P., Smith, N., & Ju, L. K. (2011). Production of arabitol from glycerol: Strain screening and study of factors affecting production yield. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 90(1), 257–267.
- Koutinas, A. A., Chatzifragkou, A., Kopsahelis, N., Papanikolaou, S., & Kookos, I. K. (2014). Design and techno-economic evaluation of microbial oil production as a renewable resource for biodiesel and oleochemical production. *Fuel*, 116, 566-577.

- Le Tourneau, D. (1966). Trehalose and acyclic polyols in sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Mycologia*, 934-942.
- Liang, Y., Sarkany, N., & Cui, Y. (2009). Biomass and lipid productivities of *Chlorella vulgaris* under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic growth conditions. *Biotechnology Letters*, 31(7), 1043–1049.
- Mattey, M., & Kristiansen, B. J. Ø. R. N. (1999). A brief introduction to citric acid biotechnology. In *Citric Acid Biotechnology* (pp. 1-9). Taylor & Francis London.
- McCormick, D. B., & Touster, O. (1961). Conversion of d-[1-14 C] arabitol, l-[1-14 C] arabitol, and d-[1-14 C] ribitol to liver glycogen in the rat and guinea-pig. *Biochimica et Biophysica Acta*, 54(3), 598-600.
- Meier, H., Reid, J. S. G., Loewus, F. A., & Tanner, W. (1982). Encyclopedia of plant physiology. *Encyclopedia of Plant Physiology*, 13.
- Miller, G. L. (1959). Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*, 31(3), 426–428.
- Mitchell, H. (Ed.). (2008). *Sweeteners and sugar alternatives in food technology*. John Wiley & Sons.
- Pagliari, M., & Rossi, M. (2010). Glycerol: properties and production. *The future of glycerol*, 20-21.
- 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. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 80(3-4), 215–224.
- Papanikolaou, S., & Aggelis, G. (2011). Lipids of oleaginous yeasts. Part I: Biochemistry of single cell oil production. *European Journal of Lipid Science and Technology*.
- Ratledge, C. (2004). Fatty acid biosynthesis in microorganisms being used for Single Cell Oil production. *Biochimie*.
- Rymowicz, W., Rywińska, A., & Marcinkiewicz, M. (2009). High-yield production of erythritol from raw glycerol in fed-batch cultures of *Yarrowia lipolytica*. *Biotechnology Letters*, 31(3), 377–380.
- Saha, B. C., Sakakibara, Y., & Cotta, M. A. (2007). Production of D-arabitol by a newly isolated *Zygosaccharomyces rouxii*. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 34(7), 519-523.

- Scangos, G. A., & Reiner, A. M. (1979). A unique pattern of toxic synthesis in pentitol catabolism: implications for evolution. *Journal of Molecular Evolution*, 12(3), 189–195.
- Shivaji, S., & Prasad, G. S. (2009). Antarctic yeasts: biodiversity and potential applications. In *Yeast biotechnology: Diversity and applications* (pp. 3-18). Springer Netherlands.
- Tchakouteu, S. S., Kalantzi, O., Gardeli, C., Koutinas, A. a., Aggelis, G., & Papanikolaou, S. (2015). Lipid production by yeasts growing on biodiesel-derived crude glycerol: strain selection and impact of substrate concentration on the fermentation efficiency. *Journal of Applied Microbiology*, 118(4), 911–927.
- Tomaszewska, L., Rywińska, A., & Gladkowski, W. (2012). Production of erythritol and mannitol by *Yarrowia lipolytica* yeast in media containing glycerol. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 39(9), 1333–1343.
- Wen Zhiyou, Pyle Denver J. and Athalye Sneha K. (2009). Glycerol Waste from Biodiesel. Manufacturing. Microbial Conversions of Raw Glycerol, 1-7.
- Werpy, T., & Petersen, G. (2004). *Top Value Added Chemicals from Biomass: Volume I -- Results of Screening for Potential Candidates from Sugars and Synthesis Gas*. Office of Scientific and Technical Information (OSTI). Office of Scientific and Technical Information.
- [Online] //SigmaAldrich. <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/a3381?lang=en®ion=GR>.
- [Online] // Santa Cruz Biotechnology, Inc. - <http://www.scbt.com/datasheet-221460-d-arabitol.html>.
- [Online] // Carbosynth. - <http://www.carbosynth.com/carbosynth/website.nsf/%28w-productdisplay%29/D3A4D1EAB4302ADB80256A6B003594D6>.