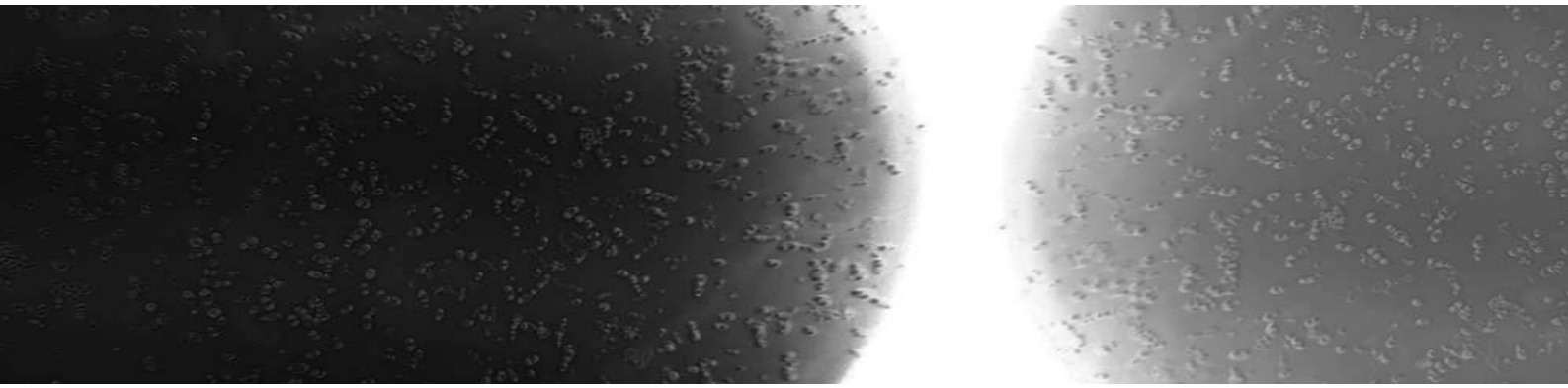
ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ
ΠΜΣ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ -
ΒΙΟΔΙΕΡΓΑΣΙΕΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΒΙΟΔΙΥΛΙΣΤΗΡΙΑ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Αύξηση της ζύμης *Rhodotorula glutinis* σε χαμηλού κόστους υδρόφιλα υποστρώματα προς παραγωγή λιπιδίων και δευτερογενών μεταβολιτών



Rhodotorula glutinis NRRL YB-252

Ιωάννης Σ. Γιαννικάκης

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

Αθήνα, 2016

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Αύξηση της ζύμης *Rhodotorula glutinis* σε χαμηλού κόστους υδρόφιλα υποστρώματα προς παραγωγή λιπιδίων και δευτερογενών μεταβολιτών

Εξεταστική Επιτροπή:

Σεραφείμ Παπανικολάου, Αναπληρωτής Καθηγητής Γ.Π.Α.
(Επιβλέπων καθηγητής)

Απόστολος Κουτίνας, Επίκουρος Καθηγητής Γ.Π.Α.
Νικόλαος Στοφόρος, Καθηγητής Γ.Π.Α.

Ιωάννης Σ. Γιαννικάκης

Αθήνα, 2016

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα ερευνητική μελέτη εκπονήθηκε στο εργαστήριο Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, στα πλαίσια του Π.Μ.Σ. «Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου». Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον αναπληρωτή καθηγητή και επιβλέποντα κο. Παπανικολάου για την εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπο μου καθώς και για την καθοδήγηση και τη συνεργασία μας τόσο κατά τη διάρκεια της μελέτης αυτής όσο και των προηγούμενων χρόνων. Επιπλέον, θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες στην υποψήφια διδάκτορα κα. Ροζανίνα Φιλιππούση για την πολύτιμη βοήθεια της, τη συνεχή καθοδήγηση και τις χρήσιμες συμβουλές της κατά τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας και τη συγγραφή της μελέτης. Επίσης, θα ήθελα να εκφράσω ένα μεγάλο ευχαριστώ στον υποψήφιο διδάκτορα κο. Βαγγέλη Ξενόπουλο για την πολύτιμη βοήθεια του και τις συμβουλές τους στο χώρο του εργαστηρίου καθώς και για τη συνεχή στήριξη και ενθάρρυνση τα τελευταία χρόνια παρουσίας μου στο ΓΠΑ. Επιπλέον, ευχαριστώ τις υποψήφιες διδάκτορες κα. Νατάσα Παλαιογιώργου, κα. Κατερίνα Παπαδάκη και την κα. Ερμίντα Τσούκο καθώς και τον υποψήφιο διδάκτορα κο. Δημήτρη Λαδάκη, τους συμφοιτητές μου και τις συμφοιτήτριες μου για την άριστη συνεργασία μας και το ευχάριστο κλίμα που επικράτησε στο χώρο του εργαστηρίου. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την οικογένεια μου για την αμέριστη συμπαράσταση και τη στήριξη τους καθ' όλη τη διάρκεια διεξαγωγής της μελέτης αυτής.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η διερεύνηση της ικανότητας αύξησης του ζυμομύκητα *Rhodotorula glutinis* NRRL YB-252 χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα ανανεώσιμες πρώτες ύλες, συγκεκριμένα ακάθαρτη βιομηχανική γλυκερόλη, η οποία είναι το κύριο παραπροϊόν της βιομηχανικής παραγωγής βιοκαυσίμου (biodiesel) και δευτερευόντως διάφορα σακχαρούχα προϊόντα (γλυκόζη, φρουκτόζη, ξυλόζη). Ειδικότερα, μελετήθηκε η ικανότητα του ζυμομύκητα να μεταβολίζει την ακάθαρτη βιομηχανική γλυκερόλη, την εμπορική γλυκόζη, την εμπορική φρουκτόζη και την εμπορική ξυλόζη προς παραγωγή βιομάζας, δευτερογενών μεταβολιτών (μικροβιακού λίπους και ενδοπολυσακχαριτών) και διαφόρων μεταβολικών προϊόντων (π.χ. αραβιτόλη, μαννιτόλη). Οι καλλιέργειες διενεργήθηκαν σε σταθερές αρχικές συγκεντρώσεις υποστρώματος, σε σταθερές συνθήκες ανάδευσης και θερμοκρασίας. Όλες οι ζυμώσεις πραγματοποιήθηκαν σε καλλιέργειες κλειστού τύπου και σε κάθε περίπτωση ο λόγος C/N ήταν υψηλός (115 mol/mol), προκειμένου να ευνοηθεί η συσσώρευση ενδοκυτταρικού λίπους. Επιπλέον, μετά την αριστοποίηση των παραμέτρων της καλλιέργειας, έγινε εφαρμογή της διεργασίας σε βιοαντιδραστήρα και για το σκοπό αυτό επιλέχθηκε η ζύμωση που έδωσε τα πιο ικανοποιητικά αποτελέσματα, ήτοι 90 g/L γλυκερόλη. Κατά τη διεξαγωγή της πειραματικής διαδικασίας, ο ζυμομύκητας παρουσίασε σημαντική κυτταρική αύξηση σε όλα τα υποστρώματα (εκτός από τη ξυλόζη), καθώς και ικανοποιητική παραγωγή μικροβιακού λίπους. Συγκεκριμένα, στο μέσο με 90 g/L γλυκερόλη, ο ζυμομύκητας παρήγαγε 26.6 g/L βιομάζας και 7.1 g/L ενδοκυτταρικού λίπους με ποσοστό λιποσυσσώρευσης 34%. Αντίθετα, στη γλυκόζη (90 g/L), ο ζυμομύκητας εμφάνισε μικρότερη κυτταρική αύξηση (17.8 g/L) σε σχέση με τη γλυκερόλη και παρήγαγε 4.7 g/L λίπος με ποσοστό λιποσυσσώρευσης 26% καθώς και μικρή ποσότητα αραβιτόλης (4 g/L). Την ίδια συμπεριφορά παρουσίασε ο ζυμομύκητας και στο μέσο με φρουκτόζη (90 g/L) ως μοναδική πηγή άνθρακα, καθώς εμφάνισε παρόμοια κυτταρική αύξηση (18.2 g/L) σε σχέση με την γλυκόζη αλλά παρήγαγε λιγότερο λίπος (2.0 g/L) με ποσοστό λιποσυσσώρευσης 13%, που οφείλεται στην μεγάλη παραγωγή πολυολών [αραβιτόλη (4.6 g/L), μαννιτόλη (9.8 g/L)]. Αντίθετα με τα παραπάνω υποστρώματα, ο ζυμομύκητας δεν μπόρεσε να

μεταβολίσει πλήρως την ξυλόζη, καταναλώνοντας μόνο την μίση αρχική ποσότητα του μέσου (90 g/L) και εμφανίζοντας μικρή κυτταρική αύξηση (9.5 g/L) και παραγωγή λίπους (1.3 g/L). Ωστόσο, στα μίγματα γλυκόζης-γλυκερόλης, ο μύκητας αναπτύχθηκε ικανοποιητικά και παρήγαγε παρόμοιες ποσότητες ενδοκυτταρικού λίπους. Στο μίγμα γλυκόζης-γλυκερόλης 45:45 (g/L), ο ζυμομύκητας παρήγαγε 20.4 g/L βιομάζα, 4.6 g/L ενδοκυτταρικό λίπος με ποσοστό λιποσυσσώρευσης 23%. Παρόμοια αποτελέσματα σημειώθηκαν κατά την καλλιέργεια του ζυμομύκητα στο μίγμα γλυκόζης-γλυκερόλης 67.5:22.5 (g/L), με παραγωγή βιομάζας 20.4 g/L, ενδοκυτταρικό λίπος 4.4 g/L και ποσοστό λιποσυσσώρευσης 22%. Επιπλέον, στο μίγμα γλυκόζης-γλυκερόλης 22.5:67.5 (g/L), ο ζυμομύκητας παρήγαγε 21.4 g/L βιομάζα και 4.1 g/L ενδοκυτταρικό λίπος με ποσοστό λιποσυσσώρευσης 19%. Η ζύμωση στο βιοαντιδραστήρα με 90 g/L γλυκερόλη έδωσε ικανοποιητικά αποτελέσματα με παραγωγή βιομάζας 29.3 g/L και παραγωγή ενδοκυτταρικού λίπους 9.0 g/L με ποσοστό λιποσυσσώρευσης 36%. Η εξέλιξη της κατανάλωσης της πηγής άνθρακα καταγράφηκε σε όλα τα θρεπτικά μέσα ανάπτυξης και σχεδόν σε όλες τις περιπτώσεις (εκτός ξυλόζης) παρατηρήθηκε πλήρης εξάντλησή της. Αξίζει να σημειωθεί, ότι στα θρεπτικά υποστρώματα που περιείχαν τη γλυκόζη, είτε ως μοναδική πηγή άνθρακα είτε ως μίγμα, παρατηρήθηκε μικρή παραγωγή αραβιτόλης, η συγκέντρωση της οποίας φτάνει σε μια μέγιστη τιμή και στη συνέχεια φαίνεται να ανακαταναλώνεται κατά την εξέλιξη των ζυμώσεων. Τέλος, πραγματοποιήθηκε ανάλυση της σύστασης του ενδοκυτταρικού λίπους σε λιπαρά οξέα και των κλάσεων αυτών σε επιλεγμένο δείγμα (ουδέτερα λιπίδια, σφιγγο-και γλυκολιπίδια και φωσφολιπίδια). Από την ανάλυση του ενδοκυτταρικού λίπους των παραπάνω δειγμάτων προκύπτει ότι το μεγαλύτερο ποσοστό του λίπους (70-80%) αποτελούνταν από ελαϊκό και παλμιτικό οξύ. Ενώ, κατά την κλασμάτωση των λιπιδίων παρατηρήθηκε ότι τα ουδέτερα λιπίδια (NL) αποτελούν το μεγαλύτερο ποσοστό των ολικών λιπιδίων (TL) και ακολουθούν τα σφιγγο-και γλυκολιπίδια (S+G) και τα φωσφολιπίδια (P) με χαμηλότερα ποσοστά. Μάλιστα, το κλάσμα των ουδέτερων λιπιδίων ομοιάζει σε σύσταση με αυτό των ολικών λιπιδίων (TL).

Λέξεις κλειδιά: *Rhodotorula glutinis*, Γλυκερόλη, Σακχαρούχα υποπροϊόντα, Μικροβιακό λίπος, Ενδοπολυσακχαρίτες

ABSTRACT

Aim of the present study was to investigate the biochemical behavior and ability of a yeast strain, namely *Rhodotorula glutinis* NRRL YB-252, to produce biomass and metabolic compounds such as single cell oil (SCO), during growth on media containing several types of hydrophilic low-cost carbon sources. The aforementioned microorganism was cultivated mainly on raw glycerol and secondary on sugar-based renewable carbon sources, such us glucose, fructose and xylose. Experiments were conducted in shake-flasks as well as in a bioreactor, while in any case, nitrogen limited media were employed in order to direct the microbial metabolism towards the synthesis of intra-cellular lipid (initial molar C/N ratio 115 moles/moles). The microorganism grew well in all substrates, (except of xylose) while lipid accumulation was overall satisfactory. Specifically, in the case of raw glycerol initial (90 g/L), *Rh. glutinis* produced 26.6 g/L biomass and 7.1 g/L lipid with lipid in dry cell weight ($Y_{L/X}$) = 34%. On the contrary, commercial glucose (90 g/L) resulted in lower final concentrations as far as DCW (17.8 g/L) and lipid accumulation (4.7 g/L) were concerned. Additionally, similar results were gained from the cultivation of the microorganism in media containing fructose (90 g/L) as sole carbon source. *Rh. glutinis* produced 18.2 g/L biomass accumulating 2.0 g/L lipid because of the high production of polyols (arabitol (4.6 g) and mannitol (9.8 g/L)). However, *Rh. glutinis* could not consume satisfactory the media that contained as sole carbon source commercial xylose (90 g/L), producing low values of biomass (9.5 g/L) and lipids (1.3 g/L). Moreover, the microorganism grew satisfactorily and produced noticeable amounts of lipids, in all glucose-glycerol mixtures. Especially, *Rh. glutinis* grew well on glucose-glycerol mixture 45:45 (g/L) and produced 20.4 g/L biomass with a lipid content of 4.6 g/L. Similar results arose from the cultivation of the microorganism on the glucose-glycerol mixture 22.5:67.5 (g/L), where the produced biomass was 21.4 g/L, containing 4.1 g/L lipid. Likewise, similar results derived from the cultivation of the microorganism on the glucose-glycerol mixture 67.5:22.5 (g/L), producing fair amounts of biomass (20.4 g/L) with lipid content (4.4 g/L). Finally, cultivation in bioreactor (raw glycerol initial ≈ (90 g/L)) gave satisfactory results concerning the produced biomass (29.3 g/L) and the accumulated lipid (9.0 g/L).

Moreover, in substrates containing glucose, either as sole carbon source or as a mixture, production of arabitol took place. Analysis of intra-cellular lipid showed, that the major cellular FAs (70-80%) were oleate and palmitate. Furthermore, fraction analysis of total lipids revealed that mycelia contained higher amounts of neutral lipids (NL) than polar lipids (S+G, P). Finally, the composition of fatty acids of the neutral fraction resembled with that of total lipids.

Keywords: *Rhodotorula glutinis*, Glycerol, Sugar-based byproducts, Microbial lipid, Intracellular polysaccharides

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Ι. ΕΙΣΑΓΩΓΗ 1

Ι.1) Υποπροϊόντα σε ζυμώσεις για παραγωγή μικροβιακού λίπους 2

1.1 Η γλυκερόλη 2

1.2 Βιομηχανική γλυκερόλη 3

1.3 Σακχαρούχα υποπροϊόντα 7

Ι.2) Ελαιογόνοι μικροοργανισμοί - Ελαιογόνες ζύμες 11

2.1 Ελαιογόνοι μικροοργανισμοί 11

2.2 Ελαιογόνες ζύμες - (*Rhodotorula glutinis*) 14

Ι.3) Παραγώμενα μεταβολικά προϊόντα 16

3.1 Βιοχημεία σύνθεσης ενδοκυτταρικών λιπιδίων 16

3.2 Ενδοπολυσακχαρίτες (IPs) 21

Ι.4) Σκοπός μελέτης 25

ΙΙ. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ 26

ΙΙ.1) ΒΙΟΛΟΓΙΚΟ ΥΛΙΚΟ 27

ΙΙ.2) ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ 27

2.1 Παρασκευή υγρού εμβολίου 27

2.2 Θρεπτικό μέσο καλλιέργειας 28

2.3 Συνθήκες καλλιέργειας 29

2.3.1 Στάδιο 1°: Καλλιέργειες σε κωνικές φιάλες στα προαναφερθέντα υποστρώματα 29

2.3.2 Στάδιο 2°: Ασυνεχής καλλιέργεια σε βιοαντιδραστήρα (S_o 90 g/L) 30

ΙΙ.3 ΜΕΘΟΔΟΙ 30

3.1 Προσδιορισμός pH: 30

3.2 Προσδιορισμός βιομάζας (X) : 31

3.3 Μελέτη ενδοκυτταρικού λίπους 31

3.3.1 Εκχύλιση λίπους 31

3.3.2 Παρασκευή μεθυλεστέρων λιπαρών οξέων 32

3.3.3 Εφαρμογή της μεθόδου 32

3.3.4 Ανάλυση στον αέριο χρωματογράφο (GC) 33

3.3.5 Κλασμάτωση λιπιδίων 33

3.4 Προσδιορισμός Ενδοπολυσακχαριτών (IPs) 35

3.5 Προσδιορισμός γλυκερόλης, σακχάρων και πολυολών (αραβιτόλη, μαννιτόλη) .. 36

3.6 Προσδιορισμός Αζώτου των Ελεύθερων Αμινομάδων (FAN analysis) 39

III. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ 41

III.1 ΓΕΝΙΚΗ ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ 42

III.2 Καλλιέργεια της ζύμης *Rhodotorula glutinis* σε εμπορική γλυκόζη ($S_{0\ Glu}$ = 90 g/L) 45

III.2.1 Κινητική της αύξησης, της κατανάλωσης υποστρώματος και της παραγωγής μεταβολικών προϊόντων. 45

III.3 Καλλιέργεια της ζύμης *Rhodotorula glutinis* σε εμπορική φρουκτόζη ($S_{0\ Fru}$ = 90 g/L) 48

III.3.1 Κινητική της αύξησης, της κατανάλωσης υποστρώματος και της παραγωγής μεταβολικών προϊόντων. 48

III.4 Καλλιέργεια της ζύμης *Rhodotorula glutinis* σε εμπορική ξυλόζη ($S_{0\ Xyl}$ = 90 g/L) .. 51

III.4.1 Κινητική της αύξησης, της κατανάλωσης υποστρώματος και της παραγωγής μεταβολικών προϊόντων. 51

III.5 Καλλιέργεια της ζύμης *Rhodotorula glutinis* σε ακάθαρτη γλυκερόλη ($S_{0\ Glol}$ = 90 g/L) 53

III.5.1 Κινητική της αύξησης, της κατανάλωσης υποστρώματος και της παραγωγής μεταβολικών προϊόντων. 53

III.6 Καλλιέργεια της ζύμης *Rhodotorula glutinis* σε μίγμα γλυκερόλης και γλυκόζης με αναλογία 1:1 ($S_{0\ Glol}$ = 45 g/L & $S_{0\ Glu}$ = 45 g/L)..... 57

III.6.1 Κινητική της αύξησης, της κατανάλωσης υποστρώματος και της παραγωγής μεταβολικών προϊόντων. 57

III.7 Καλλιέργεια της ζύμης *Rhodotorula glutinis* σε μίγμα γλυκερόλης και γλυκόζης με αναλογία 1:3 ($S_{0\ Glol}$ = 22.5 g/L & $S_{0\ Glu}$ = 67.5 g/L)..... 60

III.7.1 Κινητική της αύξησης, της κατανάλωσης υποστρώματος και της παραγωγής μεταβολικών προϊόντων. 60

III.8 Καλλιέργεια της ζύμης *Rhodotorula glutinis* σε μίγμα γλυκερόλης και γλυκόζης με αναλογία 3:1 ($S_{0\ Glol}$ = 67.5 g/L & $S_{0\ Glu}$ = 22.5 g/L)..... 63

III.8.1 Κινητική της αύξησης, της κατανάλωσης υποστρώματος και της παραγωγής μεταβολικών προϊόντων. 63

III.9 Καλλιέργεια της ζύμης *Rhodotorula glutinis* σε βιοαντιδραστήρα με υπόστρωμα ακάθαρτη γλυκερόλη ($S_{0\ Glol}$ = 90 g/L) 66

III.9.1 Κινητική της αύξησης, της κατανάλωσης υποστρώματος και της παραγωγής μεταβολικών προϊόντων. 66

IV. ΣΥΖΗΤΗΣΗ 71

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ 82

Ι. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

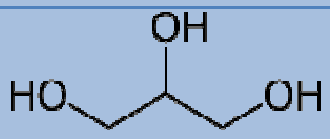
Ι.1) Υποπροϊόντα σε ζυμώσεις για παραγωγή μικροβιακού λίπους

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", *γλυκύς*, 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, παχύρευστο 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.

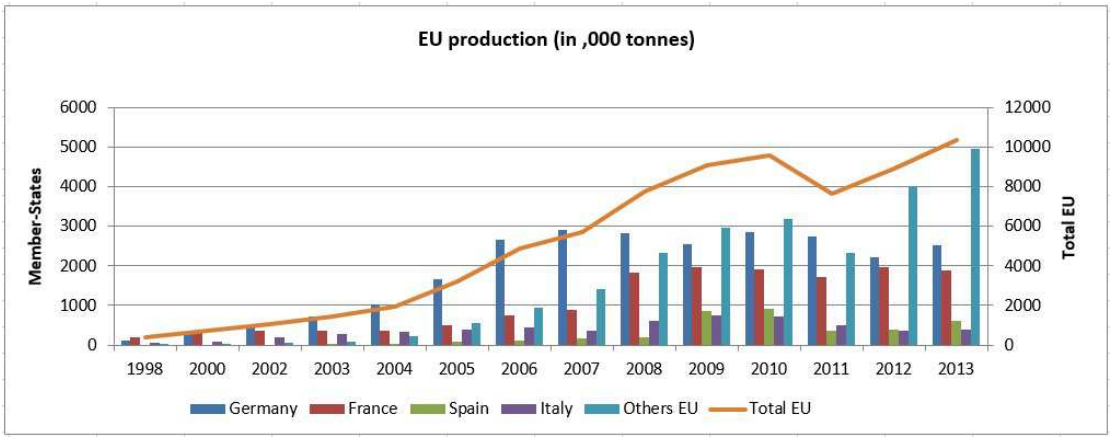
Πίνακας 1.1.1: Φυσικοχημικές ιδιότητες και δομή γλυκερόλης.

Φυσικοχημικές ιδιότητες γλυκερόλης στους 20°C		Συντακτικός Τύπος
Μοριακός τύπος:	$C_3H_5(OH)_3$	
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	

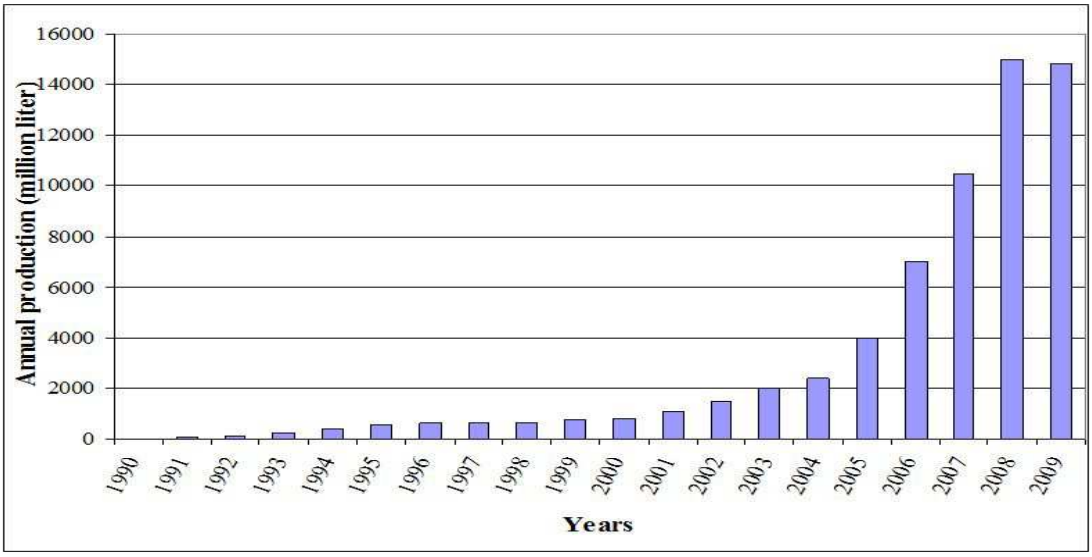
Στην καθαρή άνυδρη κατάστασή της, η γλυκερόλη έχει ειδικό βάρος 1.261g/mL, σημείο τήξης 18.2°C και σημείο ζέσεως 290°C, η οποία συνοδεύεται από αποσύνθεση, υπό συνθήκες κανονικής ατμοσφαιρικής πίεσης. Σε χαμηλές θερμοκρασίες, η γλυκερόλη μπορεί να σχηματίσει κρυστάλλους οι οποίοι τήκονται σε T=17.9°C. Συνολικά, διαθέτει ένα μοναδικό συνδυασμό φυσικών και χημικών ιδιοτήτων (**Πίνακας 1.1.2**), 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 Βιομηχανική γλυκερόλη

Η αυξανόμενη μείωση των αποθεμάτων πετρελαίου καθώς και η αυξανόμενη ζήτηση του, έχουν οδηγήσει την παγκόσμια επιστημονική κοινότητα στην ανάγκη παραγωγής ενέργειας από νέες εναλλακτικές μορφές καυσίμων (βιοντίζελ, βιουδρογόνο, βιοαιθανόλη), με το βιοντίζελ να θεωρείται μία απο τις πιό σημαντικές πηγές εναλλακτικής ενέργειας εξαιτίας των οικονομικών και περιβαλλοντικών πλεονεκτημάτων που έχει (Alper and Stephanopoulos, 2009). Η παραγωγή βιοντίζελ από το 2004 έως το 2008 σχεδόν τετραπλασιάστηκε εντός Ευρωπαϊκής Ένωσης, η οποία είναι η μεγαλύτερη παραγωγός βιοντίζελ, αυξανόμενη απο 1.9 εκατομμύρια τόνους το 2004 σε 7.7 εκατομμύρια τόνους μέσα στο 2008 (**Διάγραμμα 1.2.1**) (European Biodiesel Board). Για το λόγο αυτό, αναμένεται εκθετική ανάπτυξη της παγκόσμιας αγοράς βιοντίζελ τις ερχόμενες δεκαετίες. Οι προβλέψεις για τα επόμενα χρόνια προδικάζουν μεγάλη αύξηση του παγκόσμιου παραγόμενου βιοντίζελ, από 11.1 εκατομμύρια τόνους το 2008 σε 121 εκατομμύρια τόνους μέσα στο 2016 (Εικόνα) (Licht, 2009). Έτσι η αναγκαιότητα για την εύρεση μη συμβατικών πηγών ελαίων, για την μετατροπή τους σε βιοντίζελ είναι μεγάλης σημασίας, με τους ελαιογόνους μικροοργανισμούς να θεωρούνται κατάλληλοι υποψήφιοι για παραγωγή "δεύτερης γενιάς βιοντίζελ" (Li et al., 2007).



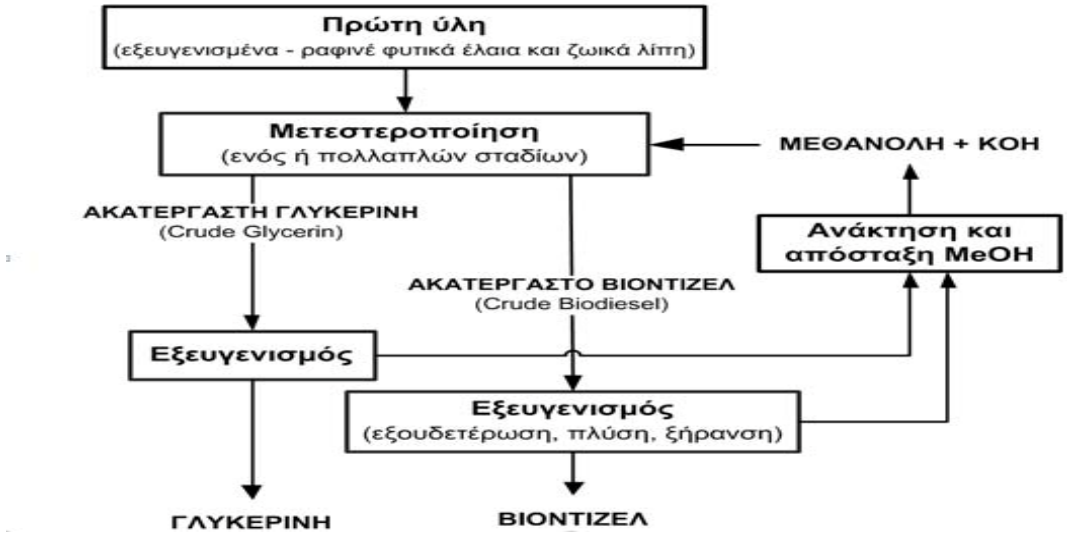
Διάγραμμα 1.2.1: Η παραγωγή βιοντίζελ εντός της Ευρωπαϊκής Ένωσης από το 1998 έως το 2013 (Διαδίκτυο 1).



Διάγραμμα 1.2.2: Η παγκόσμια παραγωγή βιοντίζελ μεταξύ 1991 και 2009 (Licht, 2009).

Το βιοντίζελ είναι ένα εναλλακτικό καύσιμο για τις μηχανές εσωτερικής καύσης. Είναι ένα μίγμα μονοαλκυλεστέρων λιπαρών οξέων που προέρχονται από την αντίδραση ανανεώσιμων λιπιδίων όπως, φυτικά έλαια και ζωικά λίπη, με μία χαμηλού μοριακού βάρους αλκοόλη. Η αντίδραση αυτή είναι μια αντίδραση μετεστεροποίησης. Οι αλκοόλες και πιο συγκεκριμένα η μεθανόλη, είναι οι πιο συνηθισμένοι δέκτες ακυλο-ομάδων. Σε μικρότερο βαθμό ισχύουν τα παραπάνω για την αιθανόλη και την βουτανολή (Papanikolaou and Aggelis, 2009; 2011a). Η διάσπαση των λιπαρών υλών για τον σχηματισμό βιοντίζελ, έχει ως αποτέλεσμα τον σχηματισμό συμπυκνωμένης γλυκερόλης, η οποία περιέχει νερό, ως το κύριο παραπροϊόν της διεργασίας. Για κάθε 10 kg παραγόμενου βιοντίζελ μέσω της

μετεστεροποίησης διαφόρων λιπαρών υλών, σχηματίζεται 1 kg (καθαρής) γλυκερόλης (Rivaldi et al., 2009; Wen et al., 2009a). Η επερχόμενη αύξηση στην παραγωγή βιοντίζελ και η υπερ-συσσώρευση της παραγώμενης γλυκερόλης μπορεί να οδηγήσει σε σημαντικά περιβαλλοντικά προβλήματα. Επίσης σημαντικές ποσότητες απόνερου (αποβλήτου) περιέχοντος υψηλή συγκέντρωση γλυκερόλης σχηματίζονται μέσω των διεργασιών παραγωγής βιοαιθανόλης ή αλκοολούχων ποτών. Για παράδειγμα, κατά τη διάρκεια μιας τυπικής διεργασίας παραγωγής βιοαιθανόλης, η αιθανόλη απομονώνεται μέσω εξάτμισης ενώ η υγρή φάση που παραμένει περιέχει 2% w/v γλυκερόλη (Yazdani and Gonzalez, 2007). Επιπλέον υγρά απόβλητα που περιέχουν μεγάλες ποσότητες γλυκερόλης (5590% w/v) παράγονται σε διάφορες βιομηχανίες σαπώνων, οδηγόντας έτσι σε αναπόφευκτη πτώση της τιμής της γλυκερόλης (Yazdani and Gonzalez, 2007; Papanikolaou and Aggelis, 2009). Για τους παραπάνω λόγους η μετατροπή της γλυκερόλης (υποπροϊόν μικρής αξίας) σε προϊόν προστιθέμενης αξίας, μέσω χημικών ή βιολογικών τεχνολογιών κρίνεται πολύ ενδιαφέρουσα.



Εικόνα 1.2.1: Μεθοδολογικό διάγραμμα ροής διεργασίας παραγωγής βιοντίζελ από εξευγενισμένα έλαια (Διαδίκτυο 2).

Διάφορες εναλλακτικές μέθοδοι για τη διάθεση και την αξιοποίηση αυτής της ακατέργαστης γλυκερόλης επιχειρήθηκαν, όπως η καύση, κομποστοποίηση, αναερόβια χώνευση, η χρήση προς ζωοτροφές, καθώς και 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). Σήμερα η γλυκερόλη χρησιμοποιείται σε πολλές εφαρμογές όπως καλλυντικά, τις βαφές, την αυτοκινητοβιομηχανία, τα τρόφιμα, τη φαρμακοβιομηχανία, ωστόσο μια πολλά υποσχόμενη εφαρμογή είναι η βιομετατροπή της σε προϊόντα υψηλής προστιθέμενης αξίας μέσω μικροβιακών ζυμώσεων. Άν και η γλυκερόλη ως υπόστρωμα παρουσίαζει ελάχιστα μικρότερη θεωρητική απόδοση μετατροπής σε σχέση με τη γλυκόζη, η συνεχόμενη αύξηση στην παραγωγή της ως υποπροϊόν του βιοντίζελ, την καθιστά ως μια σημαντική πηγή άνθρακα για μικροβιακές ζυμώσεις. Γενικότερα η χρήση της γλυκερόλης ως μικροβιακό υπόστρωμα, έχει μελετηθεί στην παραγωγή 1,3-προπανοδιόλης από βακτήρια (Papanikolaou, 2009), ενώ βιβλιογραφικές αναφορές με χρήση της γλυκερόλης ως υπόστρωμα από μικροοργανισμούς, για τη παραγωγή μικροβιακού λίπους (Single Cell Oil -SCO), έχουν παρατηρηθεί τα τελευταία χρόνια να αυξάνονται (Meesters et al., 1996; Papanikolaou and Aggelis, 2002b; Papanikolaou et al., 2003; Chi et al., 2007; Pyle et al., 2008; André et al., 2009, 2010; Liang et al., 2010a,b; Makri et al., 2010; Chatzifragkou et al., 2011a; Ethier et al., 2011; Saenge et al., 2011; Dedyukhina et al., 2012; 2014; Fontanille et al., 2012; Chang et al., 2013; Duarte et al., 2013a;b; Louhasakul and Cheirslip, 2013; Wensel et al., 2014).

Οι ελαιογόνες ζύμες, λόγω της μορφολογίας τους και του υψηλότερου ειδικού ρυθμού αύξησης τους σε σχέση με τους μύκητες και τα φύκη, θεωρούνται καταλληλότεροι μικροοργανισμοί για την παραγωγή δεύτερης γενιάς βιοντίζελ (Papanikolaou and Aggelis, 2010). Για αυτό το λόγο έχουν εμφανιστεί πολλές βιβλιογραφικές αναφορές για χρήση ευκαριωτικών μικροοργανισμών για παραγωγή πληθώρων μεταβολικών προϊόντων προστιθέμενης αξίας όπως μικροβιακά λιπίδια, κιτρικό οξύ, βιομάζα, ένζυμα και πολυόλες (Rivaldi et al., 2009; Papanikolaou and Aggelis, 2009; 2011b; Wen et al., 2009a; 2009b; Rywińska et al., 2013a; Abghari and Chen, 2014). Τα μικροβιακά λιπίδια που παράγονται από τους ελαιογόνους μικροοργανισμούς, παρουσιάζουν μεγάλο ενδιαφέρον για την βιοτεχνολογική

βιομηχανία, καθώς μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως υποκατάστατα φυτικών ή ζωικών λιπών είτε ως πρόδρομες ουσίες για τον σχηματισμό δεύτερης ή τρίτης γενιάς (Papanikolaou and Aggelis 2009; 2011a; 2011b; Abghari and Chen, 2014). Επίσης έχουν παραχθεί από γλυκερόλη διάφορα οργανικά οξέα από ποικίλα στελέχη (Rymowicz et al. 2008). Ένα άλλο ενδιαφέρον στοιχείο είναι, οτι ενώ το κιτρικό οξύ είναι ένα από τους σημαντικότερους μεταβολίτες που παράγεται μέσω βιοτεχνολογικών μεθόδων σε βιομηχανική κλίμακα, έχει παραχθεί κυρίως τα τελευταία χρόνια με τη χρήση γλυκερόλης ως υπόστρωμα (Papanikolaou et al. 2002, 2008). Τέλος η γλυκερόλη έχει χρησιμοποιηθεί σε μερικές μελέτες για την παραγωγή καροτενοειδών (Martelli et al. 1992; Razavi et al. 2007; Mantzouridou et al. 2008). Τα καροτενοειδή είναι γραμμικά μόρια που περιέχουν συζυγιακά συστήματα διπλών δεσμών, στα οποία οφείλεται και το χρώμα τους. Είναι φυσικές χρωστικές, λιποδιαλυτές ουσίες και τα περισσότερα να αποτελούνται από C40 τερπενοειδή. Τα κυριότερα καροτενοειδή που παράγονται από ζύμες είναι η ασταξανθίνη, το β-καροτένιο, το λυκοπένιο και το τορουλένιο (Sandmann, 2001). Διάφορα στελέχη ζυμών (κυρίως του γένους *Rhodotorula*) μπορούν να μετατρέψουν την γλυκερόλη σε διάφορους μεταβολίτες (Aksu and Tugba Eren 2005; Saenge et al. 2011; Galafassi et al. 2012; Kitcha and Cheirsilp 2011). Οι Saenge et al. (2011) μελέτησαν την πιθανή χρήση της ακάθαρτης γλυκερόλης, ως μόνη πηγή άνθρακα για την παραγωγή λιπιδίων και καροτενοειδών, με τη χρήση της κόκκινης ζύμης *Rhodotorula glutinis* TISTR 5159. Παραγωγή καροτενοειδών έχουν μελετηθεί και με τη χρήση του στελέχους *Sporobolomyces ruberrinus* H110 (Razavi and Marc 2006; Razavi et al. 2007).

1.3 Σακχαρούχα υποπροϊόντα

Τα θρεπτικά υποστρώματα στην πλειοψηφία τους περιλαμβάνουν πηγές άνθρακα, νιτρικών, ανόργανων συστατικών και άλλων θρεπτικών στοιχείων. Ωστόσο, η πηγή άνθρακα αποτελεί το κύριο συστατικό των θρεπτικών μέσων και απαντάται σε μεγαλύτερη συγκέντρωση σε αυτά. Ένας σημαντικός αριθμός πρώτων υλών που λειτουργούν ως θρεπτικά μέσα, καθώς και πρωτογενή υλικά που χρησιμοποιούνται ως πηγές άνθρακα, βρίσκουν εφαρμογή στις βιομηχανικές ζυμώσεις με σκοπό την παραγωγή βιοκαυσίμων και άλλων προϊόντων βιολογικής προέλευσης. Για

παράδειγμα, οι υδατάνθρακες που προέρχονται από καλλιέργειες πλούσιες σε σάκχαρα ή άμυλο αποτελούν τις κύριες πηγές άνθρακα στις βιομηχανικές ζυμώσεις. Επιπλέον, τα λίπη και τα έλαια χρησιμοποιούνται ως μόνη πηγή άνθρακα ή σε συνδυασμό με τους υδατανθράκες, καθώς επίσης οι αλκοόλες και άλλα οργανικά συστατικά (Peters, 2007).

Όπως αναφέραμε παραπάνω η συσσώρευση των λιπιδίων στους ελαιογόνους μικροοργανισμούς μπορεί να πραγματοποιηθεί, όταν χρησιμοποιηθούν ως πηγές άνθρακα υδρόφιλα ή υδρόφοβα υποστρώματα. Στην πρώτη κατηγορία ανήκουν τα σάκχαρα, οι πολυσακχαρίτες, η γλυκερόλη, η αιθανόλη, κλπ. Αντίθετα στην δεύτερη ανήκουν τα φυτικά έλαια και τα βιομηχανικά λίπη. Η διαφορά τους έγκειται στο ότι στη μεν πρώτη κατηγορία, η λιποσσυσώρευση ακολουθεί την de novo διεργασία ενώ στην άλλη περίπτωση την ex novo διεργασία.

Τα σακχαρούχα υποπροϊόντα που χρησιμοποιούνται για ζυμώσεις και παραγωγή μικροβιακών λιπιδίων ποικίλουν. Αυτά αποτελούνται από απλά σάκχαρα όπως, γλυκόζη, φρουκτόζη, λακτόζη και σουκρόζη. Επίσης σακχαρούχα υποπροϊόντα τα οποία είναι κατάλληλα για παραγωγή μικροβιακού λίπους είναι το τυρόγαλα, απόβλητα εμπλουτισμένα με γλυκόζη καθώς και η μελάσσα, τα οποία προέρχονται απο βιομηχανίες τροφίμων (Papanikolaou et al., 2004; Fakas et al., 2007; Fakas et al., 2008; Angerbauer et al., 2008; Chatzifragkou et al., 2010; Papanikolaou et al., 2010; Wu et al., 2011; Tsakona et al., 2014, 2016). Τέλος ζυμώσεις με χρήση της ξυλόζης ως υπόστρωμα έχουν γίνει αντικείμενο μελέτης λόγω της αφθονίας της ξυλόζης στο περιβάλλον, καθώς απομονώνεται μετά από χημική υδρόλυση ποικίλων λιγνοκυτταρινούχων πρώτων υλών (Zhao et al., 2008; Fakas et al., 2009a,b; Huang et al., 2009; Pan et al., 2009; Zikou et al., 2013).

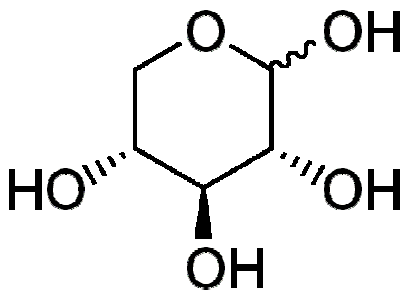
Αν παρατηρήσουμε την στοιχειομετρία του μεταβολισμού της γλυκόζης (παρόμοια σάκχαρα λακτόζη και φρουκτόζη) μπορούμε να συμπεράνουμε ότι 1,1 moles acetyl-Coa παράγονται από την αποικοδόμηση 100 g γλυκόζης (Ratledge, 1988; Fakas et al., 2009a,b). Ενώ αντίθετα για την ξυλόζη μπορούμε να συμπεράνουμε ότι μέσω της οδού των κετολασών, παράγονται 1,2 moles acetyl-Coa ανά 100 g αποικοδομήσιμης ξυλόζης είτε περίπου 1,0 mole acetyl-Coa ανά 100 g αποικοδομήσιμης ξυλόζης μέσω της οδούς των φωσφορικών πεντοζών (Ratledge, 1988; Fakas et al., 2009a). Για το λόγο αυτό, αν υποθέσουμε ότι όλο το παραγώμενο

acetyl-Coa ακολουθεί το μονοπάτι για σύνθεση λιπιδίων, η μέγιστη θεωρητική απόδοση του παραγώμενου μικροβιακού λίπους ανά g γλυκόζης που καταναλώνεται είναι ~ 0,32 g/g (Ratledge, 1988).

Τα τελευταία χρόνια, οι λιγνοκυτταρινούχες πρώτες ύλες έχουν γίνει αντικείμενο μελέτης και έχουν χρησιμοποιηθεί ως θρεπτικά μέσα σε βιομηχανικές ζυμώσεις (Peters, 2007). Το ξύλο, το γρασίδι, τα διάφορα γεωργικά και δασικά υπολείμματα, καθώς και τα θειούχα υδατικά διαλύματα χαρτοποιίας, που είναι άφθονα στη φύση και υλικών από τα υπολείμματα των γεωργικών καλλιεργειών, ο όγκος των οποίων αυξάνει συνεχώς και οδηγεί στην υποβάθμιση του περιβάλλοντος και στην απώλεια ωφέλιμων υλικών, τα οποία μπορούν να χρησιμοποιηθούν για παραγωγή βιο-καυσίμων, για δημιουργία προϊόντων κομποστοποίησης (compost) καθώς και για τη διατροφή του ανθρώπου και των ζώων.

Τα λιγνοκυτταρινούχα υλικά αποτελούνται από κυτταρίνη σε μεγαλύτερο ποσοστό (30–60%), ημικυτταρίνες (20–40%) και λιγνίνη (10–30%). Η κυτταρίνη και οι ημικυταρρίνες είναι μακρομόρια που αποτελούνται από διάφορα σάκχαρα, ενώ η λιγνίνη είναι ένα φαινολικό πολυμερές (Peters, 2007).

Μετά τον μηχανικό διαχωρισμό και τον τεμαχισμό, η βιομάζα των λιγνοκυτταρινούχων υπολειμμάτων πρέπει να υδρολυθεί έτσι ώστε να γίνει μετατροπή της κυτταρίνης και των ημικυτταρινών σε απλούς υδατάνθρακες με 6 και 5 άτομα άνθρακα. Το μίγμα των σακχάρων που προκύπτει μετά την υδρόλυση περιέχει κυρίως γλυκόζη και ξυλόζη, και σε μικρότερες ποσότητες αραβινόζη, γαλακτόζη και μανόζη.



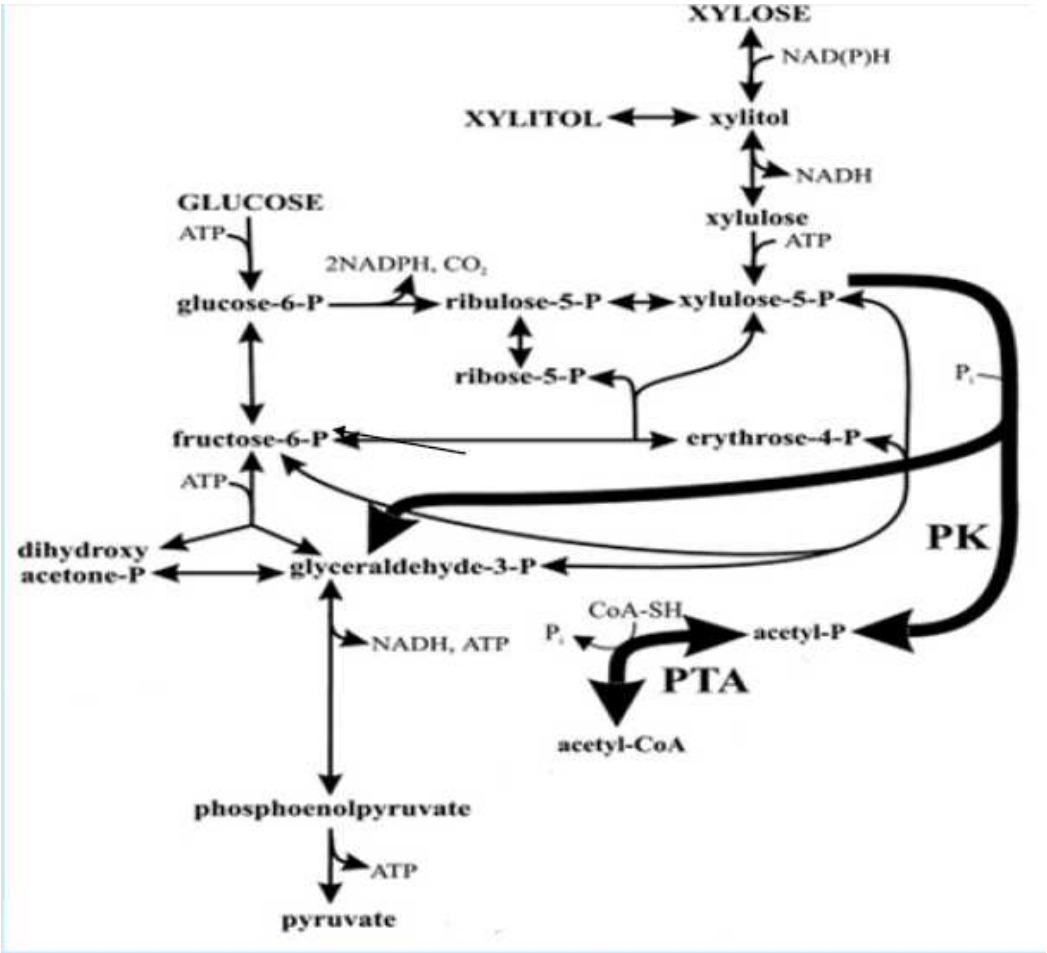
Εικόνα 1.3.2: Δομή ξυλόζης (Διαδύκτιο, 5)

Οι μικροοργανισμοί που είναι κυρίως υπεύθυνοι για την αποικοδόμηση των λιγνοκυτταρινούχων υπολειμμάτων είναι οι μύκητες. Η ικανότητα τους να αποικοδομούν αποτελεσματικά τα λιγνοκυτταρινούχα υλικά σχετίζεται με την ανάπτυξη του μυκηλίου τους κατά τη διάρκεια της οποίας μεταφέρουν ανεπιθύμητα συστατικά, όπως νιτρικά και σίδηρο, στο φτωχό σε θρεπτικά στοιχεία υπόστρωμα των λιγνοκυτταρινούχων υλικών, που αποτελεί τη δική τους πηγή άνθρακα.

Οι μύκητες διαθέτουν δυο τύπους εξωκυτταρικού ενζυμικού συστήματος: το υδρολυτικό σύστημα, κατά το οποίο παράγουν υδρολάσες που αποικοδομούν τους πολυσακχαρίτες και το εξωκυτταρικό και οξειδωτικό λιγνολυτικό σύστημα, όπου αποικοδομούν τη λιγνίνη και λύουν τους φαινολικούς δακτυλίους. Μύκητες όπως οι *Phanerochaete chrysosporium, Trichoderma reesei, Ceriporiopsis subvermispora,* θεωρούνται ιδιαίτερα αποτελεσματικοί στην αποικοδόμηση των λιγνοκυτταρινούχων υλικών (Sánchez, 2009; Philippoussis, 2009).

Το μονοπάτι των φωσφορικών πεντοζών (pentose phosphate pathway-PPP), το οποίο είναι το βασικό βιοχημικό μονοπάτι για τον μεταβολισμό της ξυλόζης, έχει βρεθεί σε όλους τους ευκαρυωτικούς μικροοργανισμούς όπου προσφέρει D-ριβόζη για σύνθεση νουκλειοτιδίων, 4 φωσφορο-D-ερυθρόζη για σύνθεση αρωματικών αμινοξέων και NADPH για αναβολικές διεργασίες. Το PPP θεωρείται ότι χωρίζεται σε δύο φάσεις. Στην οξειδωτική φάση η εξόζη 6-P-γλυκόζη μετατρέπεται στην πεντόζη 5-P-ριβουλόζη σε CO2 και σε NADPH. Στην μη-οξειδωτική φάση από την 5-P-ριβουλόζη παράγονται μόρια με 3-7 άτομα C, όπως 5-P-ριβόζη, 5-P-ξυλουλόζη, 7-P-σεδοεπτουλόζη, 6-P-φρουκτόζη, 4-P-ερυθρόζη και P-γλυκεριναλδεϋδη. Η είσοδος της D-ξυλόζης και της L-αραβινόζης στο PPP μονοπάτι πραγματοποιείται μέσω της D-ξυλουλόζης. Στις ζύμες, σε ορισμένους μύκητες και σε άλλους ευκαρυωτικούς μικροοργανισμούς η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται σε δύο στάδια οξείδωσης, με τη μεσολάβηση των ενζύμων ρεδουκτάση της ξυλόζης και αφυδρογονάση της ξυλιτόλης (Jeffries, 2006).

Στο παρακάτω σχήμα παρουσιάζεται η αποικοδόμηση της ξυλόζης μέσω της οδού των κετολασών και ή της οδού των φωσφορικών πεντοζών (υιοθετημένο από Sarris and Papanikolaou, 2016)



Εικόνα 1.3.3: Αποικοδόμηση της ξυλόζης μέσω της οδού των κετολασών και ή της οδού των φωσφορικών πεντοζών. Σε πρώτο στάδιο μέσω αντίδρασης καταλυόμενης απο την NADH- ή NADPH-εξαρτώμενη αφυδρογονάση η ξυλόζη θα αναχθεί σε ξυλιτόλη και στη συνέχεια η ξυλιτόλη θα οξειδωθεί μέσω αντίδρασης καταλυόμενης από την NADH- ή NADPH-εξαρτώμενη αφυδρογονάση, σε ξυλουλόζη (υιοθετημένο από Sarris and Papanikolaou, 2016).

I.2) Ελαιογόνοι μικροοργανισμοί - Ελαιογόνες ζύμες

2.1 Ελαιογόνοι μικροοργανισμοί

Ο άνθρωπος από τα αρχαία χρόνια χρησιμοποίησε τους μικροοργανισμούς ως πηγή θρεπτικών συστατικών και τροφής, όπως τα ζυμούμενα τρόφιμα (γιαούρτι, τυρί, αλλαντικά) και τα αλκοολούχα ποτά τα οποία έχουν υποστεί ζυμώσεις (μπύρα, κρασί). Με το ίδιο σκεπτικό της παραγωγής μικροβιακής βιομάζας ως πηγή πρωτεϊνών για τα τρόφιμα, γίνεται προσπάθεια παραγωγής λίπους και ελαίων αξιοποιώντας τους μικροοργανισμούς. Το μικροβιακό λίπος, γνωστό ως Single Cell

Oil (SCO), αφορά στο λίπος που παραλαμβάνεται από ένα μικροοργανισμό, ενώ παρουσιάζει συνηθέστερα σύσταση ομοιάζουσα με εκείνης των ελαίων φυτικής ή/ και ζωϊκής προέλευσης. Ωστόσο, υπάρχουν κάποιες βασικές αρχές που θα πρέπει να ληφθούν υπ' όψιν (Ratledge and Wynn, 2006; Papanikolaou and Aggelis, 2011):

- Η συσσώρευση λίπους δεν επιτελείται από όλους τους μικροοργανισμούς.
- Οι μικροοργανισμοί που παράγουν λίπος πάνω από το 20% της ξηρής βιομάζας τους ονομάζονται ελαιογόνοι.
- Οι κύριοι οργανισμοί παραγωγοί λίπους είναι οι μύκητες και οι ζύμες.
- Κάποιοι μικροοργανισμοί συσσωρεύουν μεγαλύτερες ποσότητες λίπους από κάποιους άλλους.
- Κάποιοι μικροοργανισμοί μπορούν να παράγουν λίπος έως και 70% (w/w) επί της ξηρής βιομάζας τους.
- Η συσσώρευση λίπους σε ένα μικροοργανισμό ενεργοποιείται από την εξάντληση κάποιου θρεπτικού συστατικού (συνήθως αζώτου) στο θρεπτικό μέσο και η υπάρχουσα πηγή άνθρακα (συνήθως γλυκόζη ή παρόμοιο μεταβολικό συστατικό) συνεχίζει να αφομοιώνεται από το μικροοργανισμό και αποθηκεύεται αποθησαυριστικά σε λίπος.
- Τα έλαια που συσσωρεύονται από τους μικροοργανισμούς έχουν την ίδια σύσταση με αυτά που απαντώνται στους σπόρους των ελαιογόνων φυτών (τριγλυκερίδια και εστεροποιημένα λιπαρά οξέα).

Ελαιογόνοι μικροοργανισμοί, εξ ορισμού είναι οι μικροοργανισμοί που δύνανται να συσσωρεύουν λίπος σε ποσότητα μεγαλύτερη από το 20% (w/w) της ξηρής βιομάζας τους, είχαν αρχικά μελετηθεί από το τέλος του δεύτερου παγκοσμίου πολέμου (Ratledge and Wynn, 1997). 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 ελαιογένεση είναι αρκετά σπάνιο χαρακτηριστικό στο κόσμο των μικροβίων. Λιγότερα από 100 είδη ζυμών, μυκήτων και φυκών θεωρούνται σήμερα ελαιογόνοι (Ratledge, 1988; 1997; 2006; Ratledge and Evans, 1989). Αυτοί οι μικροοργανσιμοί, από τους απλούστερους (βακτήρια) έως τους πιο σύνθετους (μύκητες) έχουν ένα αυξανόμενο οικονομικό και τεχνολογικό ενδιαφέρον (Davies and Holdsworth, 1992).

Αν και 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, (Ratledge and Cohen, 2008) 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 (Ratledge and Wynn, 2002). 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 (Ratledge and Wynn, 2002; Papanikolaou and Aggelis, 2011a). Επιπλέον, διάφοροι ελαιογόνοι μικροοργανισμοί έχουν τη δυνατότητα να παρουσιάζουν αξιοσημείωτη ανάπτυξη και παραγωγή SCOs σε ένα μεγάλο εύρος υποστρωμάτων όπως, εμπορικά σάκχαρα, πολυσακχαρίτες, απόβλητα και υποπροϊόντα του κλάδου της αγρό-βιομηχανίας, φυτικά λίπη, ελεύθερα λιπαρά οξέα, αιθανόλη και οργανικά οξέα (Ratledge, 1997; Ratledge, 1998; Angerbauer et al., 2008; Papanikolaou and Aggelis, 2009; Papanikolaou and Aggelis, 2010; Subramaniam et al., 2010; Wu et al., 2010). 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 επωφελής για το περιβάλλον (Papanikolaou et al., 2011).

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν τα λιπίδια των μυκήτων, καθώς αυτά θεωρούνται άριστη πηγή πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (PUFA) όπως π.χ. γ-λινολενικού το οποίο συμβάλλει στην καταπολέμηση πολλών ασθενειών, όπως η ρευματοειδής αρθρίτιδα, (Ahmed et al., 2009), δερματικά προβλήματα, καρδιοαγγειακά προβλήματα και στην αντιμετώπιση κάποιων μορφών καρκίνου, (Horrobin, 1992; Alakhras et al., 2015; Sayegh et al., 2016) διόμο-γ-λινολενικού, αραχιδονικού, εικοσιπενταενοϊκού κ.ά. Αυτά τα λιπαρά οξέα χρησιμοποιούνται στην κλινική διατροφή και ως πρώτες ύλες για παρασκευή ειδικών τροφών και καλλυντικών. Επίσης, τα ω-3 πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (π.χ. εικοσιδυοεξανοϊκό οξύ, C22:6, DHA,) εμφανίζουν θετικά αποτελέσματα σε νοητικές ασθένειες, στη ψωρίαση, στη ρευματοειδής αρθρίτιδα και γενικότερα συμβάλλουν στην ανάπτυξη του εγκεφάλου (Rubio-Rodríguez et al., 2010; Bellou et al., 2016). Το ενδιαφέρον αυξάνεται καθώς ο άνθρωπος δεν μπορεί να λάβει επαρκείς ποσότητες

πολυακόρεστων λιπαρών οξέων με τη τροφή του, ενώ αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι το μητρικό γάλα είναι πλούσιο σε GLA το οποίο είναι υπεύθυνο για την ανάπτυξη του εγκεφάλου των βρεφών. 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; Bellou et al., 2014, 2016).

Από την άλλη πλευρά, μερικοί μικροοργανισμοί, κάτω από ορισμένες συνθήκες αύξησης, συσσωρεύουν λιπιδιακά αποθέματα των οποίων η δομή παρουσιάζει εξαιρετικό ενδιαφέρον, επειδή μοιάζει με τη δομή διαφόρων «εξωτικών» λιπών, όπως π.χ. του λίπους του κακάο, της φάλαινας κλπ. (Papanikolaou et al., 2001;2008; Papanikolaou and Aggelis, 2009; 2010).

2.2 Ελαιογόνες ζύμες - (Η ζύμη *Rhodotorula glutinis*)

Οι ελαιογόνες ζύμες συσσωρεύουν τριγλυκερίδια πλούσια στα λιπαρά οξέα ελαϊκό (18:1), λινελαϊκό (18:2), παλμιτικό (16:0), παλμιτελαϊκό (16:1) και στεατικό (18:0). Οι ζύμες βρίσκονται παντού τόσο στο έδαφος όσο και στο υδάτινο περιβάλλον. Μπορούν και δημιουργούν αποικίες ακόμα και σε ακραίες περιβαλλοντικές συνθήκες όπως σε χαμηλές θερμοκρασίες και σε χαμηλή διαθεσιμότητα οξυγόνου (Vicente and Bautista, 2009).

Υπάρχουν περίπου 1500 είδη ζυμών που έχουν καταγραφεί μέχρι στιγμής. Τα περισσότερα από αυτά είναι ωφέλιμα για τον άνθρωπο ενώ ένας μικρός αριθμός είναι παθογόνος. Από όλα αυτά τα είδη ζυμών μόνο 30 είναι αυτά τα οποία μπορούν και συσσωρεύουν πάνω από 25% του ξηρού βάρους σε λιπίδια. Οι ελαιούχες ζύμες δύναται να συσσωρεύσουν λίπος έως και 72% της ξηρής βιομάζας τους. *Yarrowia, Candida, Rhodotorula, Rhodosporidium, Cryptococcus Trichosporon και Lipomyces* θεωρούνται οι πιο γνωστοί και αποδοτικοί ελαιογόνοι μικροοργανισμοί (Ratledge and Tan, 1990; Vicente and Bautista, 2009).

Γενικά οι ζύμες του γένους *Rhodotorula* είναι αυστηρώς αερόβιες με ιδιαίτερα μεταβολικά χαρακτηριστικά, όπως την ικανότητα να παράγουν γλυκογόνο κατά την εκθετική φάση ανάπτυξής τους και επιπλεόν την συσσώρευση μεγάλων ποσοτήτων

λιπιδίων και καροτενοειδών στη στατική φάση (Dworecka-Kaszak and Kizerwetter-Swida, 2011).

Ο ζυμομύκητας *Rhodotorula glutinis* θεωρείται σημείο ελέγχου ασφάλειας στις βιομηχανίες τροφίμων καθώς θεωρείται παθογόνος μικροοργανισμός. Ανήκει στο φύλο των βασιδιομυκήτων στην τάξη Sporidiales και στην οικογένεια Sporidiobolaceae (Fell et al., 2005). Το ολοκληρωμένο σύστημα πληροφοριών ταξινόμησης παρέχει τρία συνώνυμα του λατινικού ονόματος *Rhodotorula glutinis*: *R. rufula*, *R. glutinis* var. *rubescens* και *R. gracilis* (ITIS Standard, 2016). Οι αποικίες που δημιουργεί έχουν χαρακτηριστικό ρόζ χρώμα είναι λείες και έχουν άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης τους 30 ^{o}C. Τα κύτταρα της ζύμης έχουν διάμετρο 3-5μm, έχουν ελλειψοειδές σχήμα, παράγουν ψευδοϋφές και αναπαράγονται με mycelial clamp connections and teliospores. Ο ζυμομύκητας *Rhodotorula glutinis* απαιτεί μικρό ποσό θρεπτικών συστατικών, συσσωρεύει ενδοκυτταρικά λιπίδα πάνω από το 70% του κυτταρικού ξηρού βάρους (Meng et al., 2009) καθώς και κάποια καροτενοειδή κατά τη διάρκεια της ζύμωσης (Buzzini et al., 2007). Επίσης μπορέι να αφομοιώσει μεγάλη ποικιλά πηγών άνθρακα χαμηλής αξίας (Buzzini and Martini, 2000; Malisorn and Suntornsuk, 2008; Frengova et al. 1994). Το γένος *Rhodotorula* έχει βρεθεί στον αέρα, στο χώμα, σε επιφάνειες φύλλων όπως επίσης και στο γάλα και τυροκομικά προϊόντα (Dworecka-Kaszak and Kizerwetter-Swida, 2011; Reiss, Jean, and Marshall-Lyon, 2012).

Οι ζύμες του γένους *Rhodotorula* παράγουν το ένζυμο ουρεάση και έχουν την ικανότητα να αφομοιώνουν ινοτισόλη και να καταναλώνουν διάφορα σάκχαρα. Μερικά είδη αποτελούν τους κύριους παραγωγούς καροτενοειδών συνθέτοντας β-καροτένιο και τορουλένιο (Marova et al., 2012). Επιπλέον, είναι ευρέως γνωστά και ως καλή πηγή πρωτεινών, λιπιδίων και βιταμινών (Roadjnakamolson and Suntornsuk, 2010).

Στον παρακάτω **Πίνακα 2.2.1** παρουσιάζονται τα παραγώμενα προϊόντα από τον ζυμομύκητα *Rhodotorula glutinis* που έχουν μεγάλο οικονομικό και επιστημονικό ενδιαφέρον.

Πίνακας 2.2.1: Παραγώμενα προϊόντα από τον ζυμομύκητα *Rhodotorula glutinis* (Hernandez-Almanza et al., 2014).

Συστατικά	Αναφορές
Lipids - Fatty acid - Oil	Alvarez et al., (1992); Cheirslip, Kitcha, and Torpee, (2012); Saenge et al., (2011); Davoli et al., (2004); Easterling et al., (2009); Lopes da Silva et al., (2011)
Lipase	Papaparaskevas et al., (1992); Taskin, (2012)
Thymine hidroxylase	Thornburg et al., (1993); Neidigh et al,. (2009)
Tannase	Taskin, (2012)
Pectinase	Taskin, (2012)
Invertase	Canli, Erdal, Taskin, and Kurbanoglu, (2011)
Carotenoids	Bhosale and Gadre, (2001a); Bhosale, Jogdand, and Gadre, (2003); Davoli et al., (2004); Roadjnakamolson and Suntornsuk, (2010); Taskin et al., (2011)

I.3) Παραγώμενα μεταβολικά προϊόντα

3.1 Βιοχημεία σύνθεσης ενδοκυτταρικών λιπιδίων

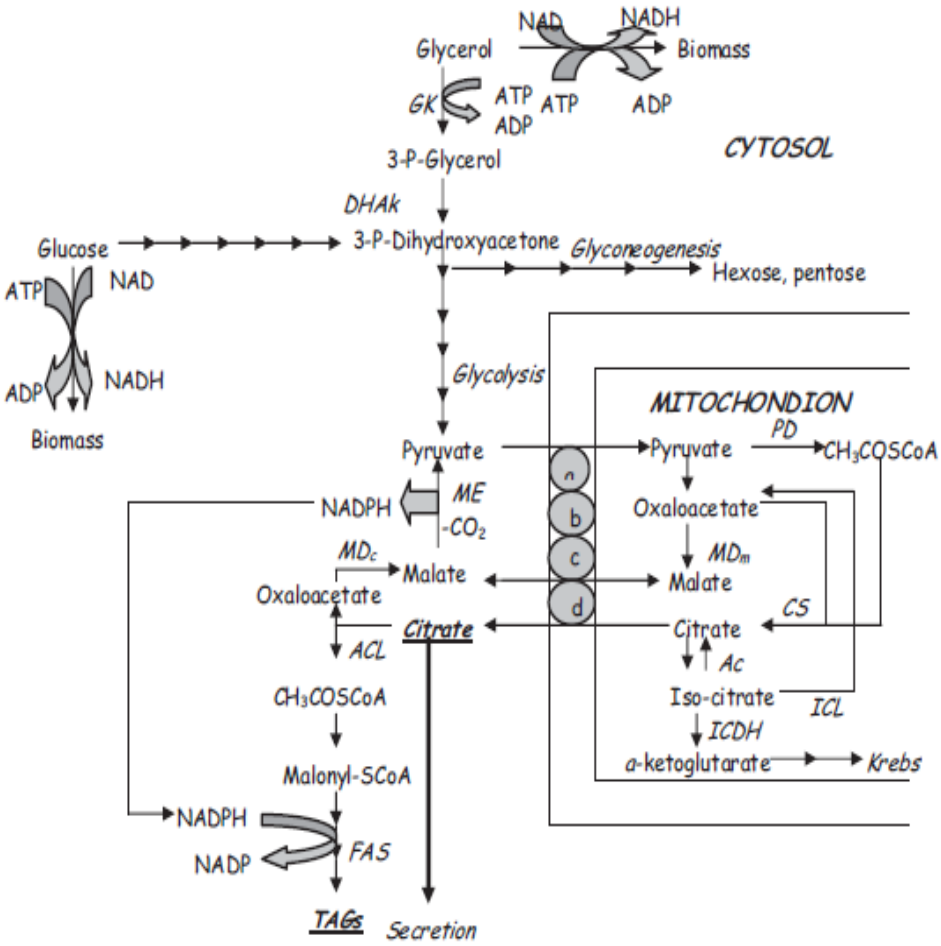
Η “de novo” βιοσύνθεση λιπιδίων και η συσσώρευση τους στους ελαιογόνους μικροοργανισμούς είναι δευτερογενής μεταβολική διεργασία, καθώς λαμβάνει χώρα μετά την εξάντληση του αζώτου και σε θρεπτικό μέσο όπου ο άνθρακας βρίσκεται σε περίσσεια. Όταν το άζωτο της καλλιέργειας εξαντληθεί, οι ελαιογόνοι μικροοργανισμοί συνεχίζουν να αφομοιώνουν την πηγή άνθρακα μετατρέποντας την σε τριγλυκερίδια TAG’s, τα οποία συσσωρεύονται εντός των κυττάρων. Τα TAG’s αποτελούνται από ένα μόριο γλυκερόλης και τρία λιπαρά οξέα όπως φαίνονται στο παρακάτω σχήμα. Η βιοχημεία της “de novo” σύνθεσης λιπιδίων μπορεί να διακριθεί σε δύο μέρη : τον ενδιάμεσο κυτταρικό μεταβολισμό και την βιοσύνθεση των TAG’s (Papanikolaou and Aggelis, 2011).

Στους ελαιογόνους μικροοργανισμούς το ακέτυλο-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 (Ratledge, 1994;1998; Ratledge and Wynn, 2002; Fakas et al., 2009a; Papanikolaou and Aggelis 2009; 2011a). 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 (Ratledge, 1994; Ratledge and Wynn, 2002; Papanikolaou and Aggelis, 2009, 2011a). 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 (Davies, 1992, Ratledge, 1997; Papanikolaou and Aggelis, 2009; Fakas et al., 2009b; Papanikolaou and Aggelis, 2010; 2011a; 2011b).

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 (Evans and Ratledge, 1985). 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 δραστικότητας της ισοκιτρικής αφυδρογονάσης, με αποτέλεσμα να αλλάζει η λειτουργία του κύκλου του Krebs (Boulton and Ratledge, 1981; Chen and Chang, 1996). Έτσι, το ισοκιτρικό οξύ συσσωρεύεται μέσα στο μιτοχόνδριο και βρίσκεται σε ισορροπία με το κιτρικό οξύ (αντίδραση που καταλύεται από ισοκιτρική ακονιτάση).

Παρακάτω παρουσιάζεται ένα γενικευμένο σχήμα παραγωγής μικροβιακών λιπιδίων και κιτρικού οξέος από γλυκερόλη και γλυκόζη ως πηγές άνθρακα και περιοριστικό παράγοντα αύξησης το άζωτο



Εικόνα 1.3.1: Ενδιάμεσος μεταβολισμός στους ελαιογόνους μικροοργανισμούς. (a-c) Συστήματα μεταφοράς του πυροσταφυλικού από το κυτόπλασμα στο μιτοχόνδριο και αντίθετα για το μηλικό οξύ. (d) Σύστημα μεταφοράς κιτρικού και μηλικού μεταξύ κυτοπλάσματος και μητοχονδρίου. Ένζυμα: Ac, ACC (acetyl-Coa καρβοξυλάση), ACL (ATP-κιτρική λυάση), FAS (συνθετάση των λιπαρών οξέων), ICDH (ισο-κιτρική αφυδρογονάση), MDc (αφυδρογονάση του μηλικού), MDm (αφυδρογονάση του μηλικού), PD (πυροσταφυλική αφυδρογονάση), PFK (φωσφοροφρουκτοκινάση), PK (πυροσταφυλική κινάση) (Ratledge, 1988; υιοθετημένο από Papanikolaou and Aggelis, 2009).

Όταν η ενδομιτοχονδριακή συγκέντρωση κιτρικού οξέος φθάσει σε μια κρίσιμη τιμή, το κιτρικό οξύ εισέρχεται στο κυτταρόπλασμα σε ανταλλαγή με μηλικό οξύ (Evans et al., 1983). Τέλος, το κιτρικό οξύ διασπάται από την ATP-κιτρική λυάση (ATP-CL), το ένζυμο κλειδί της διαδικασίας συσσώρευσης λιπιδίων στους ελαιογόνους μικροοργανισμούς, σε ακέτυλο-CoA και σε οξαλοξικό οξύ. Το ακέτυλο-

CoA, μέσω της ανεστραμμένης β-οξείδωσης, θα δημιουργήσει τα κυτταρικά λιπαρά οξέα (Fakas et al., 2009b).

Κιτρικό οξύ + CoA + ATP $\longrightarrow$ $CH_3COSCoA$+οξαλοξικό οξύ +ADP + Pi

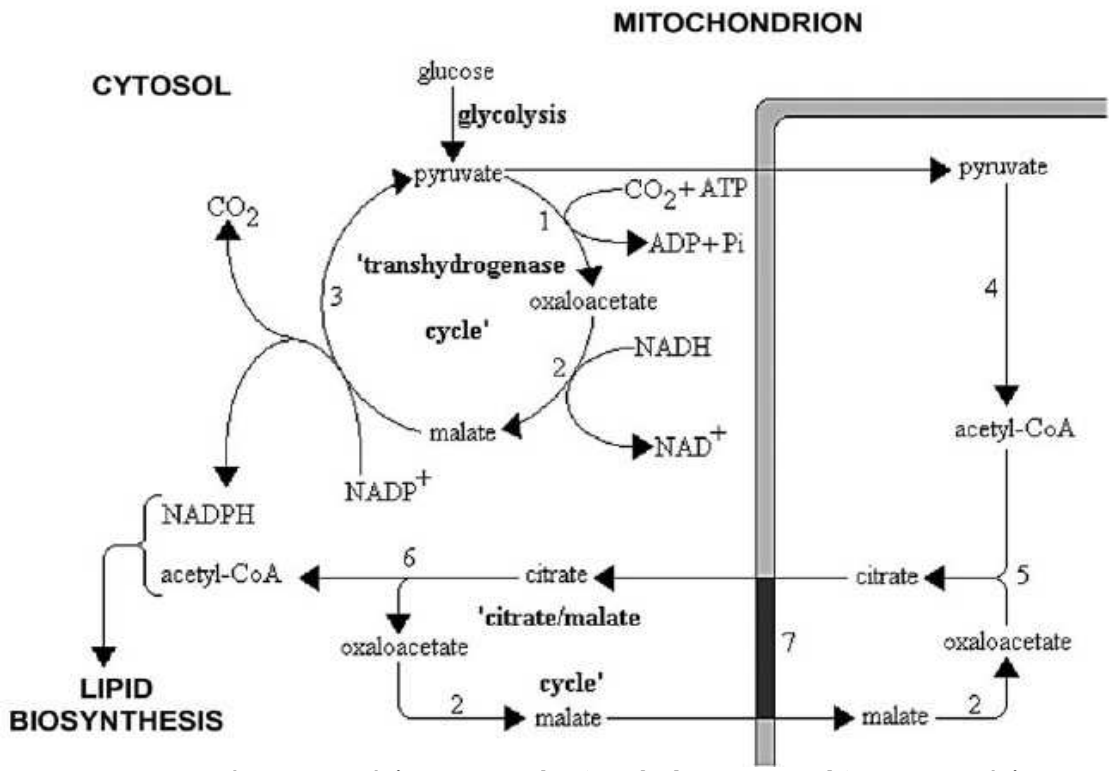
Για την βιοσύνθεση των λιπαρών οξέων, εκτός από την παραγωγή του Acetyl-CoA, είναι απαραίτητη η παροχή επαρκούς ποσότητας NADPH. Το μηλικό ένζυμο λειτουργεί ως προμηθευτής NADPH κατά την ακόλουθη εξίσωση :

Μηλικό οξύ + $NADP^+$ $\longrightarrow$ πυροσταφυλικό + CO_2 + NADPH

Στο παρακάτω **Σχήμα 3.3.1** απεικονιζεται ο κύκλος του Krebs (transhydrogenase cycle) και ο κύκλος του κιτρικού/μηλικού οξέος (citrate/malate cycle) ως προάγγελοι στην παραγωγή του ακετυλοσυνένζυμου Α και NADPH, για τη λιπογένεση στους ελαιογόνους μικροοργανισμούς.

Η δραστικότητα του μηλικού ενζύμου απαντάται στην πλειοψηφία των ελαιογόνων μικροοργανισμών και αποτελεί ένα μεταβολικό σύμπλοκο, το οποίο δρα συνεργιστικά με την ATP: κιτρική λυάση και τη συνθάση των λιπαρών οξέων, έτσι ώστε να εξασφαλίζεται άμεση επικοινωνία κατά τη μετατροπή του Acetyl-CoA σε λιπαρά οξέα. Τα λιπαρά οξέα που βιοσυντίθονται, εστεροποιούνται με γλυκερόλη σε τριγλυκερίδια και ενσωματώνονται μέσω του ενδοπλασματικού δικτύου σε σταγονίδια λιπαρών οξέων (Ratledge, 2004).

Όσον αφορά το μηλικό ένζυμο, έρευνες έχουν δείξει ότι υπάρχουν κάποιες ελαιογόνες ζύμες (*Lipomyces sp*. και *Candida sp.*) οι οποίες δεν διαθέτουν το εν λόγω ένζυμο και παρόλα αυτά έχουν την ικανότητα να βιοσυνθέτουν λίπος. Πιθανώς οι ζύμες αυτές να έχουν κάποιο εναλλακτικό ένζυμο το οποίο είναι εξειδικευμένο στην παραγωγή NADPH για τη βιοσύνθεση ενδοκυτταρικού λίπους (Ratledge, 2004).



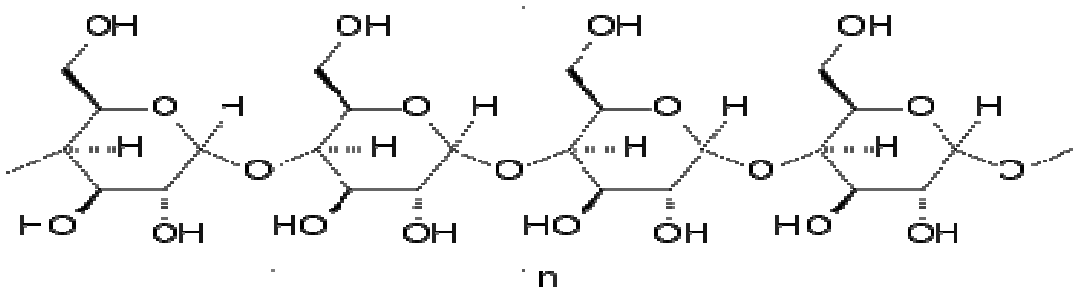
Σχήμα 3.3.1: Απεικόνιση του κύκλου του Krebs (transhydrogenase cycle) και του κύκλου του κιτρικού/μηλικού οξέος (citrate/malate cycle) ως προάγγελοι στην παραγωγή του ακετυλοσυνένζυμου Α και NADPH, για τη λιπογένεση στους ελαιογόνους μικροοργανισμούς. Ένζυμα: 1. αποκαρβοξυλάση του πυροσταφυλικού οξέος, 2. αφυδρογονάση του μηλικού οξέος, 3. μηλικό ένζυμο, 4. αφυδρογονάση του πυροσταφυλικού οξέος, 5. κιτρική συνθάση, 6. ATP:κιτρική λυάση, 7. ένζυμο υπεύθυνο για τη λειτουργία του συστήματος μεταφοράς κιτρικού/μηλικού οξέος μεταξύ μιτοχονδρίου και κυτταροπλάσματος (Ratledge, 2004).

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 et al., 2008a; 2008b).

3.2 Ενδοπολυσακχαρίτες (IPs)

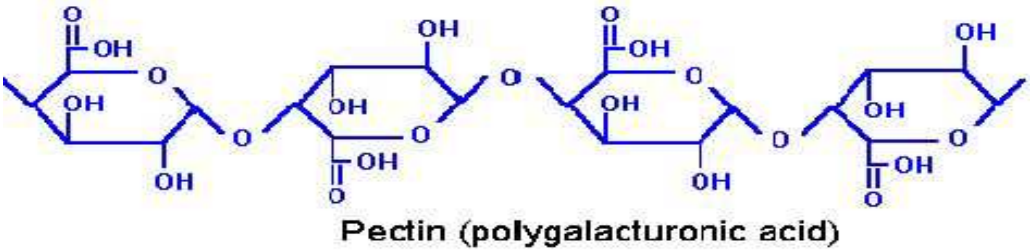
Οι πολυσακχαρίτες είναι πολυμερή αποτελούμενα από μονοσακχαρίτες και ο γενικός χημικός τους τύπος είναι $(C_6H_{10}O_5)_n$, συνήθως με n>100. Προκύπτουν από την ένωση περισσότερων από 10 μονοσακχαριτών με γλυκοσιδικό δεσμό, ο οποίος αναπτύσσεται μεταξύ του υδροξυλίου του C-1 του πρώτου σακχάρου και το υδροξύλιο ενός εκ των C-2, C-3, C-4 ή C-6 του επόμενου. Πολυσακχαρίτες όπως το άμυλο, το γλυκογόνο και η δεξτράνη αποτελούνται από αρκετά χιλιάδες μόρια D-γλυκόζης. 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).

Πολυμερή που έχουν μικρό μοριακό βάρος και αποτελούνται απο δύο έως εννιά μονοσακχαρίτες καλούνται ολιγοσακχαρίτες. Οι πολυσακχαρίτες ανάλογα με το είδος των σακχάρων που τους αποτελούν διακρίνονται σε διάφορες κατηγορίες. Έτσι πολυσακχαρίτες, όπως το άμυλο ή η κυτταρίνη, όπου μετά απο ενζυματική ή χημική υδρόλυση σχηματίζεται μόνο ένα είδος μονοσακχαρίτη (D-γλυκόζη) καλούνται "ομοπολυσακχαρίτες".



Εικόνα 3.2.1: Δομή αμυλόζης αποτελούμενη από 250-2000 μορίων γλυκόζης με μοριακό βάρος (MW=50.000-200.000) (Διαδίκτυο, 6).

Αντίθετα, πολυσακχαρίτες όπως οι πηκτίνες, όπου μετά από ενζυματική ή χημική υδρόλυση σχηματίζεται παραπάνω από ένα είδος μονοσακχαρίτη (το D-γαλακτουρονικό οξύ διακόπτεται από μόρια ραμνόζης) καλούνται ετεροπολυσακχαρίτες **(Εικόνα 3.2.2)**.



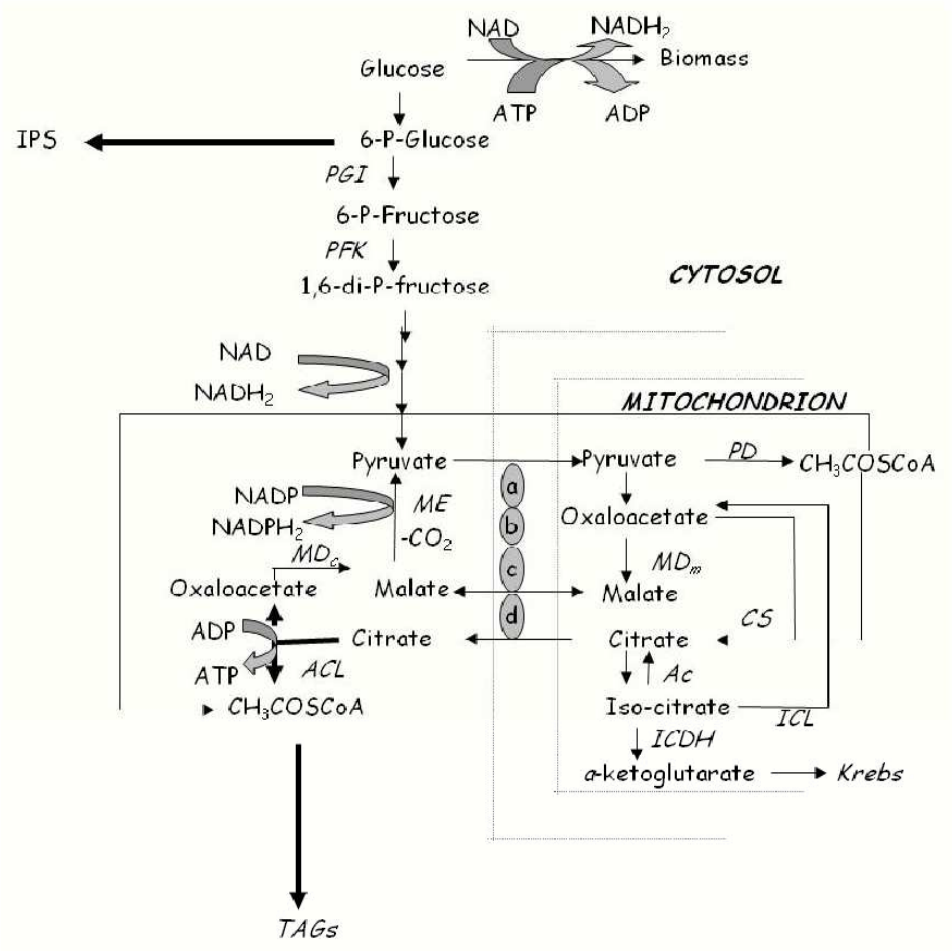
Εικόνα 3.2.2: Δομή πηκτίνης, αποτελούμενη απο 200-1000 μονάδες α-D-γαλακτουρονικού οξέος ενωμένες με δεσμό α(1,4) ενώ ταυτόχρονα υπάρχουν διακλαδώσεις ραμνόζης, υποκαταστάτες (μεθανόλη) και πλευρικές αλυσίδες (σάκχαρα) (Διαδίκτυο, 7).

Πολλοί πολυσακχαρίτες, συμπεριλαμβανομένων του αμύλου, της κυτταρίνης και των πηκτινών, χρησιμοποιούνται ευρέως στις φαρμακευτικές βιομηχανίες αλλά και στις βιομηχανίες τροφίμων, καθώς και σε διάφορες ιατρικές εφαρμογές (Stacey, 1967). Οι μύκητες έχουν ευρέως μελετηθεί για την παραγωγή πολυσακχαριτών (έξω και ένδο πολυσακχαριτών) και σε πολλές περιπτώσεις παρουσιάζουν φαρμακευτικές και θεραπευτικές δράσεις με αντικαρκινικές και ανοσολογικές ιδιότητες. Οι πολυσακχαρίτες που έχουν τις παραπάνω ιδιότητες ανήκουν στις ετερο-β-γλυκάνες (π.χ. λεντινάνη) (Tang and Zhong, 2002). Αυτές οι β γλυκάνες αποτελούνται από μόρια γλυκόζης ενωμένα με β-(1,3) γλυκοσιδικούς δεσμούς στα οποία συνδέονται με διακλαδώσεις μόρια γλυκόζης με γλυκοζιδικό δεσμό β-(1,6) (Seviour et al., 1992; Fazenda et al., 2008). Παρόλαυτά η έκταση της διακλάδωσης διαφέρει σε πολλά είδη μυκήτων (e.g. *Botryosphaeria rhodina, Pleurotus eryngii, Pleurotus ostreatoroseus, Lentinula edodes*), με τη συχνότητα διακλάδωσης (ένα μόριο γλυκόζης) να εμφανίζεται κάθε τρία μόρια γλυκόζης της βασικής αλυσίδας, ενώ σε άλλα, όπως στο *Pestalotia spp* εμφανίζεται μεγαλύτερη συχνότητα διακλαδώσεων με τρία μόρια γλυκόζης ενωμένα με β-(1,6) γλυκοσιδικό δεσμό κάθε πέντε μόρια γλυκόζης της βασικής αλυσίδας (Fazenda et al., 2008).

Οι πολυσακχαρίτες που παράγουν οι μύκητες πρόερχονται είτε από υγρές καλλιέργειες βυθού είτε από ζυμώσεις στερεής κατάστασης. Η σύσταση των παραγώμενων πολυσακχαριτών επηρεάζεται σημαντικά από τις συνθήκες που τελείται η ζύμωση, ακόμα περισσότερο επηρεάζει η σύσταση του μέσου καλλιέργειας (Wu et al., 2006). Η γνώση αυτών είναι απαραίτητη, έτσι ώστε να οδηγηθεί ο μεταβολισμός των μυκήτων προς την παραγωγή των επιθυμητών μεταβολιτών. Διάφορες μελέτες έχουν δείξει ότι η παραγωγή των πολυσακχαριτών επηρεάζεται θετικά από πηγές άθρακα όπως η γλυκόζη, αλλά και από διάφορες οργανικές πηγές αζώτου (π.χ. yeast extract, peptone, corn steep liquor) (Gern et al., 2008; Fang and Zhong, 2002). Επιπλέον παράγοντες όπως το pH, η θερμοκρασία της ζύμωσης αλλά και ο αερισμός παίζουν σημαντικό ρόλο στη βιοσύνθεση των πολυσακχαριτών. Παρόλαυτα, οι συνθήκες που ευνοούν την παραγωγή βιομάζας μπορεί να μην ευνοούν την συσσώρευση των πολυσακχαριτών (κυρίως των εξωπολυσακχαριτών) και αντιστρόφως (Tang and Zhong, 2002; Diamantopoulou et al., 2012a; 2012b; 2014).

Οι ενδοπολυσακχαρίτες που παράγονται από τους ανώτερους μύκητες περιλαμβάνουν μονοσακχαρίτες (π.χ. φρουκτόζη), δισακχαρίτες (π.χ. τρεχαλόζη), πολυόλες (π.χ. μαννιτόλη) αλλά κυρίως πολυσακχαρίτες όπως γλυκογόνο, πολλουλάνες, β-γλυκάνες και άλλα (Seviour et al., 1992; Galiotou-Panayotou et al., 1998; Fang and Zhong, 2002; Tang and Zhong, 2002; Fazenda et al., 2008; Tang et al., 2008; 2011; Diamantopoulou et al., 2014, 2016).

Από βιοχημική πλευρά, σε πολλές βιβλιογραφικές μελέτες έχει βρεθεί και τονιστεί ότι ο περιορισμός σε άζωτο στην καλλιέργεια επιδρά θετικά στην συσσώρευση αυτών των συστατικών (ο μηχανισμός είναι παρόμοιος σε σχέση με αυτόν κατά την συσσώρευση λιπιδίων) εξαιτίας του θετικού αλλοστερικού ελέγχου του AMP, όπου απενεργοποιεί το ένζυμο 6-φωσφοροφρουκτοκινάση (6-PFK) έτσι ώστε να εξασφαλιστούν οι απαιτήσεις των κυττάρων σε άζωτο (Galiotou-Panayotou et al., 1998; Ratledge and Wynn, 2002; Papanikolaou and Aggelis, 2011a). Η παραπάνω κατάσταση μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα την συσσώρευση ενδοπολυσακχαριτών. Το υποθετικό σενάριο της συσσώρευσης των ενδοπολυσακχαριτών παρουσιάζεται στο διάγραμμα.



Εικόνα 3.2.3: Υποθετικό σενάριο συσσώρευσης ενδοπολυσακχαριτών (IPS) και λιπιδίων από μικροοργανισμούς (προσαρμοσμένο από: Papanikolaou and Aggelis, 2009; Diamantopoulou, 2012).

Ι.4) Σκοπός μελέτης

Στην παρούσα μελέτη διερευνήθηκε η ικανότητα ανάπτυξης του ζυμομύκητα *Rhodotorula glutinis* NRRL YB-252 χρησιμοποιώντας ανανεώσιμες πρώτες ύλες, συγκεκριμένα ακάθαρτη βιομηχανική γλυκερόλη, η οποία είναι παραπροϊόν της βιομηχανικής παραγωγής βιοκαυσίμου (biodiesel). Ένα παραπροϊόν χαμηλού-μηδενικού κόστους, λόγω του ότι βρίσκεται πλέον σε αφθονία λόγω της μεγάλης παραγωγής βιοντίζελ. Ειδικότερα, μελετήθηκε η ικανότητα του ζυμομύκητα να μεταβολίζει την ακάθαρτη βιομηχανική γλυκερόλη προς παραγωγή βιομάζας, δευτερογενών μεταβολιτών (μικροβιακού λίπους και ενδοπολυσακχαριτών) και διαφόρων μεταβολικών προϊόντων (π.χ. αραβιτόλη, μαννιτόλη). Οι καλλιέργειες διενεργήθηκαν σε σταθερές αρχικές συγκεντρώσεις υποστρώματος και σε σταθερές συνθήκες ανάδευσης και θερμοκρασίας. Η γλυκερόλη που χρησιμοποιήθηκε ήταν διαχωρισμένη και καθαρότητας 88% κατά βάρος.

ΙΙ. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

ΙΙ.1) ΒΙΟΛΟΓΙΚΟ ΥΛΙΚΟ

Στην παρούσα πτυχιακή μελέτη χρησιμοποιήθηκε ένα στέλεχος ζυμομύκητα του γένους *Rhodotorula*, το *Rhodotorula glutinis* NRRL YB-252, το οποίο ανήκει στους Βασιδιομύκητες και παρουσιάζει κόκκινο χρώμα (Red yeast). Το εν λόγω στέλεχος παρασχέθηκε από την συλλογή καλλιεργειών της Υπηρεσίας Γεωργικής Έρευνας (Agricultural Research Service, ARS), που αποτελεί τον επικεφαλής επιστημονικό οργανισμό έρευνας του Υπουργείου Γεωργίας των Η.Π.Α.. Ο μικροοργανισμός ανανεωνόταν σε δοκιμαστικούς σωλήνες (slants) με στερεό θρεπτικό μέσο Glucose Peptone Yeast Malt Agar (MYPDA) που περιείχε Yeast extract (10 g/L), D-glucose (10 g/L), Malt extract (10 g/L), Peptone (5 g/L) και Agar (25 g/L) και επωαζόταν σε θερμοκρασία T= 28 ± 1°C για 5 μέρες. Η συντήρηση των καλλιεργειών γινόταν σε θερμοκρασία T= 4°C. Προκειμένου να διατηρηθεί η ζωτικότητα του στελέχους πραγματοποιούνταν ανανεώσεις σε τακτά χρονικά διαστήματα, ενώ πριν από κάθε εμβολιασμό του θρεπτικού μέσου το στέλεχος ανανεωνόταν προκειμένου να βρίσκεται κάθε φορά στην ίδια φάση ανάπτυξης (εκθετική φάση).

ΙΙ.2) ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ

2.1 Παρασκευή υγρού εμβολίου

Οι προκαλλιέργειες πραγματοποιήθηκαν με σκοπό την παραγωγή εμβολίου περιέχοντας κύτταρα του ίδιου φυσιολογικού σταδίου. Πραγματοποιήθηκαν σε κωνικές φιάλες Erlenmeyer των 250 mL, πληρωμένες κατά το 1/5 του όγκου τους, οι οποίες περιείχαν 50 mL YPD (Yeast Peptone D-glucose). Μετά την αποστείρωση σε θερμοκρασία T= 121°C για 20 min οι φιάλες εμβολιάστηκαν, υπό ασηπτικές συνθήκες με κύτταρα ζυμών προερχόμενα από καλλιέργειες ηλικίας 5 ημερών. Οι προκαλλιέργειες επωάστηκαν σε θερμοκρασία T= 30 ± 1°C σε ανακινούμενο επωαστικό θάλαμο (New Brunswick Sc, Usa), υπό συνεχή ανάδευση 180 r.p.m για 72 ώρες.

2.2 Θρεπτικό μέσο καλλιέργειας

Οι ζυμώσεις που πραγματοποιήθηκαν κατά τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας ήταν ζυμώσεις βυθού κλειστού τύπου σε κωνικές φιάλες Erlenmeyer όγκου 250 mL, πληρωμένες κατά το 1/5 τους (50±1 mL) με το αντίστοιχο θρεπτικό μέσο κάθε φορά. Η σύσταση των αλάτων κάθε καλλιέργειας δίνεται στον παρακάτω πίνακα (**Πίνακας 2.2.1**). Οι πηγές άνθρακα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν βιομηχανική γλυκερόλη (περιείχε 1-2% μονογλυκερίδια, διγλυκερίδια και ελεύθερα λιπαρά οξέα, 2-4% NaCl, 0.1 % μεθανόλη και 2-4% νερό και ήταν καθαρότητας 88% κατά βάρος (w/w), (Kachrimanidou et al., 2013) προερχόμενη από την εταιρία Πέττας ΑΕ, Πάτρα-Ελλάδα και εμπορική γλυκόζη (προερχόμενη από την Ελληνική Βιομηχανία Ζάχαρης), φρουκτόζη και ξυλόζη (Sigma-Aldrich, 99%). Η τιμή του pH του μέσου καλλιέργειας ρυθμιζόταν στο 5.5-6 με προσθήκη, υπό ασηπτικές συνθήκες, με τη χρήση διαλύματος KOH 5 M.

Πίνακας 2.2.1: Σύσταση αλάτων (Papanikolaou et al, 2001; Sarris et al., 2011; 2013)

ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ (g/L)
KH_2PO_4	7.00
Na_2HPO_4	2.50
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	1.50
Yeast extract	1.00
Peptone	2.00
$FeCl_3$	0.15
$CaCl_2$	0.15
$ZnSO_4$	0.02
$MnSO_4$	0.06

Οι αρχικές συγκεντρώσεις άνθρακα που επιλέχθηκαν για την διεξαγωγή των πειραμάτων ήταν βιομηχανική γλυκερόλη (90 g/L), εμπορική γλυκόζη (90 g/L), και μείγματα αυτών σε αναλογίες 1:1, 1:3, 3:1 με συνολική αρχική συγκέντρωση 90 g/L, εμπορική φρουκτόζη (90 g/L) και εμπορική ξυλόζη (90 g/L). Όλες οι ζυμώσεις πραγματοποιήθηκαν σε περιοριστικές σε άζωτο συνθήκες. Οι πηγές αζώτου που χρησιμοποιήθηκαν ήταν η Peptone (2 g/L) και το εκχύλισμα ζύμης (Yeast extract) (1 g/L) σε αναλογία 2:1. Επίσης ο λόγος άνθρακας προς άζωτο (C/N), στην αρχή της καλλιέργειας ήταν 115 g/g.

Μετά την παρασκευή του εκάστοτε υποστρώματος ακολουθούσε η μεταφορά του σε κωνικές φιάλες των 250 mL, κάθε μια εκ των οποίων περιείχε 50±1 mL θρεπτικού μέσου και στη συνέχεια τοποθετούνταν στο αυτόκλειστο για αποστείρωση (121 ^{o}C, 20 min). Μετά την αποστείρωση των φιαλών, πραγματοποιούνταν ο εμβολιασμός του θρεπτικού μέσου στις φιάλες. Οι φιάλες εμβολιάζονταν με 1 mL προκαλλιέργειας και μεταφέρονταν σε ανακινούμενο επωαστικό θάλαμο (New Brunswick Sc, Usa) στις 180 r.p.m και θερμοκρασία T= 30 ^{o}C.

2.3 Συνθήκες καλλιέργειας

Η παρούσα μελέτη χωρίστηκε σε δύο πειραματικά στάδια. Οι καλλιέργειες πραγματοποιήθηκαν σε κωνικές φιάλες Erlenmeyer των 250 mL και σε βιοαντιδραστήρα των 3L. Οι καλλιέργειες που διενεργήθηκαν παρατίθενται στο παρακάτω **Πίνακα 2.3.1**.

Πίνακας 2.3.1: Συγκεντρωτικός πίνακας των καλλιεργείων που πραγματοποιήθηκαν κατά τη διάρκεια της παρούσας μελέτης, σε διάφορα υποστρώματα με αρχική συγκέντρωση 90 g/L.

Στέλεχος	Πηγή άνθρακα	Κωνικές φιάλες (250ml) - 90 g/L	Βιοαντιδραστήρας (3L) - 90 g/L
***Rhodotorula glutinis* NRRL YB-252**	Glycerol	❖	❖
	Glucose	❖	-
	Glol-Glu 1:1	❖	-
	Glol-Glu 1:3	❖	-
	Glol-Glu 3:1	❖	-
	Fructose	❖	-
	Xylose	❖	-

Συνθήκες καλλιέργειας : ανάπτυξη σε ανακινούμενες φιάλες όγκου 250 mL (180±5 rpm), θερμοκρασία 30 ^{o}C, pH=6.0± 0.1.

2.3.1 Στάδιο 1°: Καλλιέργειες σε κωνικές φιάλες στα προαναφερθέντα υποστρώματα

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 30±1 °C και στις 180±5 rpm, ακολουθούσε κλειστή καλλιέργεια και το pH του θρεπτικού μέσου διορθώνονταν, όποτε κρίνονταν αναγκαίο. Η αρχική συγκέντρωση της πηγής άνθρακα στο θρεπτικό μέσο ήταν 90 g/L.

2.3.2 Στάδιο 2^{ο}: Ασυνεχής καλλιέργεια σε βιοαντιδραστήρα (S_o 90 g/L)

Στο δεύτερο στάδιο πραγματοποιήθηκε ασυνεχής υγρή καλλιέργεια σε βιοαντιδραστήρα με το στέλεχος *Rhodotorula glutinis* NRRL YB-252 και αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης 90 g/L ώστε να γίνει σύγκριση με το αντίστοιχο πείραμα που έγινε σε κωνικές φιάλες.

Στην συγκεκριμένη περίπτωση διενεργήθηκε ασυνεχής καλλιέργεια (batch culture) σε βιοαντιδραστήρα 3L, στον οποίο τοποθετούνταν το θρεπτικό μέσο, αποστειρωνόταν σε κλίβανο και εμβολιαζόταν με όγκο εμβολίου το 20% του τελικού ενεργού όγκου της καλλιέργειας, υπό ασηπτικές συνθήκες. Οι συνθήκες της καλλιέργειας ήταν η θερμοκρασία στους 30°C, η ανάδευση στις 150 rpm με ρύθμιση (cascade) να φτάνει τις 400 rpm ώστε το διαλυτό οξυγόνο να κυμαίνεται πάνω από 20%, ροή αέρα 1 vvm και το pH να διατηρείται εντός του εύρους τιμών 5-6.

ΙΙ.3 ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 Προσδιορισμός pH:

Το pH της εκάστοτε καλλιέργειας μετρήθηκε με pH-μετρο τύπου Hanna instruments HI 2211 pH meter. Μετά την μέτρηση του εκάστοτε σημείου της κινητικής, πραγματοποιείτο διόρθωση του pH στο θρεπτικό μέσο της καλλιέργειας, όπου ήταν αναγκαίο, έτσι ώστε η τιμή του pH να επιστρέψει στην επιθυμητή τιμή του (5-6). Η διόρθωση του pH γινόταν με προσθήκη διαλύματος καυστικού καλίου (KOH) 5M υπό ασηπτικές συνθήκες.

3.2 Προσδιορισμός βιομάζας (X)

Ο προσδιορισμός της βιομάζας στις φιάλες πραγματοποιούνταν με μέτρηση του ξηρού βάρους. Η συλλογή της βιομάζας πραγματοποιήθηκε μετά από φυγοκέντρηση του δείγματος σε 9000 rpm για 10 min σε θερμοκρασία 4°C και έκπλυση των κυττάρων με απιονισμένο νερό, διαδικασία που επαναλήφθηκε μία φορά. Η βιομάζα, απαλλαγμένη υπολειμμάτων θρεπτικού μέσου, μεταφέρθηκε σε προζυγισμένο φιαλίδιο McCartney και τοποθετήθηκε σε κλίβανο θερμοκρασίας (95±5°C), όπου αφέθηκε προς ξήρανση μέχρι σταθερού βάρους. Μετά την απομάκρυνση του νερού προσδιορίστηκε το βάρος της ολικής ξηρής βιομάζας (X), σε ζυγό ακριβείας τύπου Kern τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων.

3.3 Μελέτη ενδοκυτταρικού λίπους

Σε κάθε ζύμωση που έλαβε χώρα πραγματοποιήθηκε ποσοτική και ποιοτική ανάλυση του παραγόμενου ενδοκυτταρικού λίπους στην πλειοψηφία των δειγμάτων που προέκυψαν από κάθε καλλιέργεια.

3.3.1 Εκχύλιση λίπους

Η ξηρή βιομάζα λειοτριβήθηκε εντός φιαλιδίου McCartney, και το λίπος εκχειλίστηκε με διαλύτη Folch που αποτελείται από μίγμα διαλυτών χλωροφορμίου ($CHCl_3$)-μεθανόλης σε αναλογία 2:1 (Folch et al., 1957; τροποποιημένο από Aggelis et al., 1995). Το χρησιμοποιούμενο διάλυμα έχει την δυνατότητα να εκχυλίζει το συνολικό μικροβιακό λίπος. Η εκχύλιση πραγματοποιήθηκε στο σκοτάδι και σε θερμοκρασία δωματίου για τουλάχιστον 72 h. Ακολούθησε απομάκρυνση της βιομάζας με διήθηση μέσω ηθμού και στη συνέχεια το εκχύλισμα συλλέχθηκε σε προζυγισμένη σε ζυγό ακριβείας σφαιρική φιάλη. Έπειτα, ακολουθούσε εξάτμιση του διηθήματος από την φιάλη εξάτμισης με τη βοήθεια περιστροφικού εξατμιστήρα (Flash Evaporator - Rotavapor R-114) υπό κενό, σε θερμοκρασία 50-55 ^{o}C έτσι ώστε να απομακρυνθούν οι διαλύτες και να παραμείνει μόνο το μικροβιακό λίπος, το οποίο υπολογιζόταν σε g λιπδίων ανά g ξηρής ουσίας και συνακολούθως σε g λιπιδίων / L καλλιέργειας μετά το ζύγισμα του σε ζυγό ακριβείας.

3.3.2 Παρασκευή μεθυλεστέρων λιπαρών οξέων

Ο προσδιορισμός της σύστασης των λιπιδίων σε λιπαρά οξέα μέσω αέριας χρωματογραφίας προϋποθέτει μεθανόλυση των λιπιδίων και μετατροπή των λιπαρών οξέων στους αντίστοιχους μεθυλεστέρες, που είναι μόρια περισσότερο πτητικά και λιγότερο πολικά των λιπαρών οξέων. Το κυτταρικό λίπος μετατρέπεται με μεθυλίωση στους αντίστοιχους μεθυλικούς εστέρες, με τη γενικευμένη μέθοδο AFNOR (1984) (Papanikolaou et al., 2001). Η εστεροποίηση είναι μια διαδικασία που τελείται σε δυο στάδια, το πρώτο σε αλκαλικό περιβάλλον και το δεύτερο σε όξινο. Κατά το πρώτο στάδιο, τελείται η πυρηνόφιλη υποκατάσταση στο μόριο των τριγλυκεριδίων και των φωσφολιπιδίων, με τελικό προϊόν τους αντίστοιχους μεθυλεστέρες των λιπαρών οξέων.

Παράλληλα, τα ήδη υπάρχοντα ελεύθερα λιπαρά οξέα αντιδρούν με το διάλυμα του μεθόξυ νατρίου και παραλαμβάνονται οι αντίστοιχοι σάπωνες. Στο δεύτερο στάδιο, πραγματοποιείται η μετατροπή των σαπώνων των λιπαρών οξέων προς τους αντίστοιχους μεθυλεστέρες.

3.3.3 Εφαρμογή της μεθόδου

Στις φιάλες εξάτμισης που έχουν εξατμιστεί οι διαλύτες και έχει παραμείνει το ζυγισθέν κυτταρικό λίπος, προσθέτουμε 1-2 πέτρες βρασμού και 10 mL μεθανολικού νατρίου (MeO-Na+). Στη συνέχεια, το δείγμα τοποθετείται προς βρασμό για 15 min σε κάθετο ψυκτήρα. Μετά το πέρας του χρόνου, προστίθεται στο δείγμα ποσότητα υδροχλωρικής μεθανόλης έτσι ώστε το δείγμα να αποχρωματιστεί και αφήνεται προς βρασμό για άλλα 15 min. Έπειτα, προστίθεται νερό στο δείγμα έτσι ώστε η αντίδραση να λάβει τέλος και το δείγμα μεταφέρεται σε χοάνη διαχωρισμού. Προστίθενται 6 mL εξανίου και το δείγμα αναδεύεται έντονα και στη συνέχεια αφήνεται σε ηρεμία έως ότου διαχωριστούν οι δυο φάσεις (η οργανική με το εξάνιο και η υδατική). Η πάνω φάση, που αποτελείται από τους εστέρες των λιπαρών οξέων και το εξάνιο, παραλαμβάνεται σε φιαλίδιο και προστίθεται μικρή ποσότητα άνυδρου Na_2SO4 για απορρόφηση της υγρασίας, ενώ η κάτω φάση απορρίπτεται. Τέλος, το δείγμα που συλλέγεται οδηγείται στον αέριο χρωματογράφο (GC) για ανάλυση.

3.3.4 Ανάλυση στον αέριο χρωματογράφο (GC)

Τα δείγματα που προκύπτουν από τη μεθυλεστεροποίηση, οδηγούνται στον αέριο χρωματογράφο για την ανάλυση της σύστασης των λιπιδίων στα επιμέρους λιπαρά οξέα. Πραγματοποιείται έγχυση 1-2 μL δείγματος με ειδική σύριγγα στην υποδοχή του αέριου χρωματογράφου 8000 series FISONS.

Συνθήκες αέριου χρωματογράφου:

1. Θερμοκρασία εισαγωγέα 250 ^{o}C
2. Θερμοκρασία ανιχνευτή (FID) 250 ^{o}C
3. Φέρον αέριο He (ροή 1.38 mL/ min), H_2 (60 kPa), O_2 (110 kPa)
4. Τύπος στήλης Fused silica WCOT: CP-Sill 88 (0.2 μL)
   4.1. Μήκος 50 m
   4.2. Διάμετρος 0.32 m
   4.3. Πάχος επικάλυψης εσωτερικά που έρχεται σε επαφή με το δείγμα DF=0.32 μm.

Η θερμοκρασία της στήλης παρέμενε σταθερή στους 200°C για 20 min. (Fakas et al., 2006). Με τη χρήση πρότυπων μεθυλεστέρων των κυριότερων λιπαρών οξέων, ταυτοποιήθηκαν οι αντίστοιχοι χρόνοι κατακράτησης για τους μεθυλεστέρες κάθε λιπαρού οξέος. Η συγκέντρωση του κάθε λιπαρού οξέος στο δείγμα των λιπιδίων υπολογίστηκε με βάση το εμβαδόν της κάθε κορυφής του αντίστοιχου χρωματογραφήματος.

3.3.5 Κλασμάτωση λιπιδίων

Αρχικά έχουμε εκχύλιση λιπιδίων από την βιομάζα με Folch και στη συνέχεια έκπλυση των λιπιδίων με 0.88% (w/w) KCl : (σε 25 ml λιπιδίων προστίθενται 5 ml KCl και παραλαμβάνεται η κάτω φάση). Τα λιπίδια ξηραίνονται παρουσία Na_2SO_4 (προσθήκη Na_2SO_4 στο ποτήρι ζέσεως με την κάτω φαση του προηγούμενου βήματος τόση ώστε να δημιουργηθεί ενα στρώμα Na_2SO_4 και διαχωρισμός της υγρής φάσης με διήθηση) και συμπυκνώνονται μέχρι ξηρού

βάρους (evaporator) και ζυγίζονται. Για την κλασμάτωση ζυγίζεται 10πλάσια ποσότητα silicic acid από αυτή των παραληφθέντων λιπιδίων και τοποθετείται στο φούρνο (110° C).

Προετοιμασία στήλης: Το silicic acid διαλύεται σε Dichloromethane (ποτήρι ζέσης) και προστίθεται στη στήλη ως εξής: το εναιώρημα προστίθεται (ανακινώντας το) στο κέντρο της στήλης, έτσι ώστε να πέσει όσο λιγότερο γίνεται στα τοιχώματα της στήλης. Στη συνέχεια προστίθεται στο ποτήρι Dichloromethane και η διαδικασία επαναλαμβάνεται μέχρι να παραληφθεί το σύνολο σχεδόν του silicic acid.

Πακετάρισμα στήλης: Σε καθαρό ποτήρι ζέσεως μεταφέρονται περίπου 100 ml Dichloromethane και προστίθενται στα τοιχώματα της στήλης ώστε να απομακρυνθεί το silicic acid που είχε επικαθίσει στο εσωτερικό της στήλης (στρόφιγγα κλειστή). Ανοίγεται η στρόφιγγα ώστε να περάσει με πίεση ο διαλύτης απ' το silicic acid. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται 5-6 φορές ρίχνοντας το διαλύτη στα τοιχώματα της στήλης όχι απ' ευθείας πάνω στο silicic acid προσέχοντας να μην το αναταράξουμε. Προσέχουμε ώστε η επιφάνεια του silicic acid να είναι όσο το δυνατόν επίπεδη.

Κλασμάτωση: αφού τελειώσει το πακετάρισμα αδειάζουμε τη στήλη απ' το διαλύτη και αφήνουμε τόσο ώστε η στάθμη του να είναι λίγο πάνω απ' την επιφάνεια του silicic acid. Τα λιπίδια διαλύονται σε μια μικρή ποσότητα χλωροφόρμιου (1-2 ml). Με μια γυάλινη πιπέτα προσθέτουμε τα λιπίδια στη στήλη, ρίχνοντάς τα γύρω-γύρω στα τοιχώματα της στήλης με κυκλική κίνηση, προσέχοντας να μην αναταράξουμε το silicic acid. Με την ίδια πιπέτα ρίχνουμε στα τοιχώματα της στήλης χλωροφόρμιο (περίπου 5-10 mL) ώστε να παραληφθεί το σύνολο των λιπιδίων. Ανοίγουμε πολύ λίγο τη στρόφιγγα μέχρι να δούμε τα λιπίδια να εισέρχονται στο silicic acid (το silicic acid γίνεται καφετί) και στη συνέχεια κλείνουμε τη στρόφιγγα. Προσθέτουμε με την πιπέτα χλωροφόρμιο μέχρις ότου η στάθμη του να ανέβει αρκετά πάνω απ' το επίπεδο του το silicic acid, τόσο ώστε προσθέτοντας το διαλύτη με το ποτήρι ζέσης να μην αναταράσσεται το silicic acid. Ανοίγουμε τη στρόφιγγα και παραλαμβάνουμε το κλάσμα σε προ-ζυγισμένη σφαιρική φιάλη προσθέτοντας συνεχώς διαλύτη μέχρι την απαιτούμενη ποσότητα (100 ml ανά 100 mg λιπιδίων). Στη συνέχεια, απομακρύνεται ο διαλύτης και ζυγίζεται η σφαιρική φιάλη. Με τον ίδιο τρόπο προσθέτω στη στήλη ακετόνη και μεθανόλη για τον διαχωρισμό και την

παραλαβη των σφιγγο-γλυκολιπιδίων και φωσφολιπιδίων αντίστοιχα. Τέλος ακολουθεί η μέθοδος της μεθυλεστεροποίησης για τον ποιοτικό προσδιορισμό των λιπιδίων.

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.

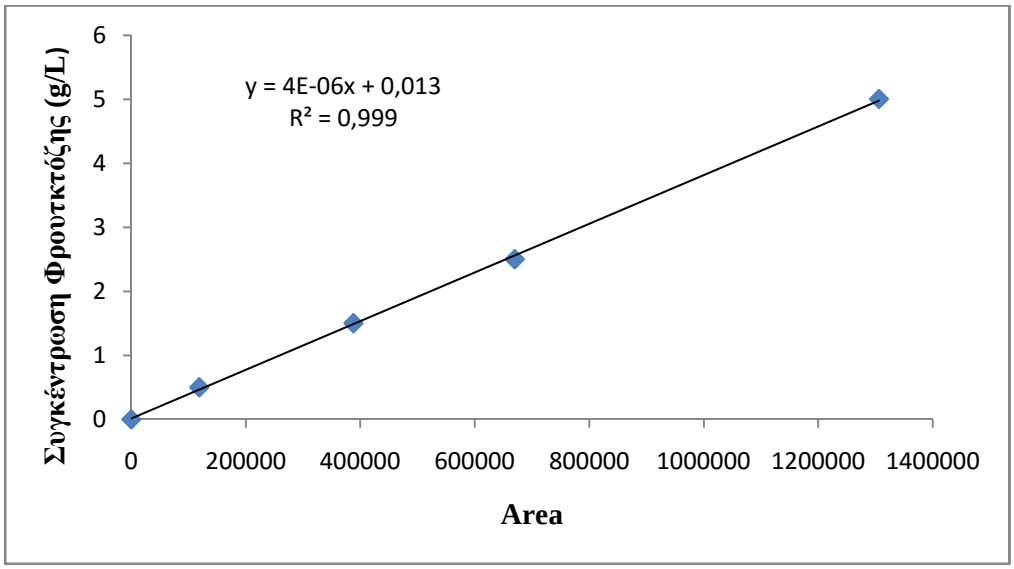
Η ολική συγκέντρωση των ενδοπολυσακχαριτών μετρήθηκε με την διαδικασία η οποία είναι βασισμένη σε ένα τροποποιημένο πρωτόκολλο μεθόδου, το οποίο εκδόθηκε από τους Liang et al., (2009). Εν συντομία, η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν ότι σε 0.05g ξηρής βιομάζας γίνονταν προσθήκη 10 mL υδροχλωρικού οξέος (HCl, 2M), το διάλυμα που προέκυπτε υδρολύονταν στους 80°C για 30 λεπτά, ακολουθούσε εξουδετέρωση του HCl σε pH 7 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 με την φωτομετρική μέθοδο του δινιτροσαλικυλικού οξέος (DNS) (Miller, 1959). Η μέθοδος στηρίζεται στην αναγωγή του 3,5-δινιτροσαλικυλικού οξέος προς 3-αμινο-5-νιτροσαλικυλικό οξύ παρουσία NaOH και την ταυτόχρονη οξείδωση της γλυκόζης προς γλυκονικό οξύ.

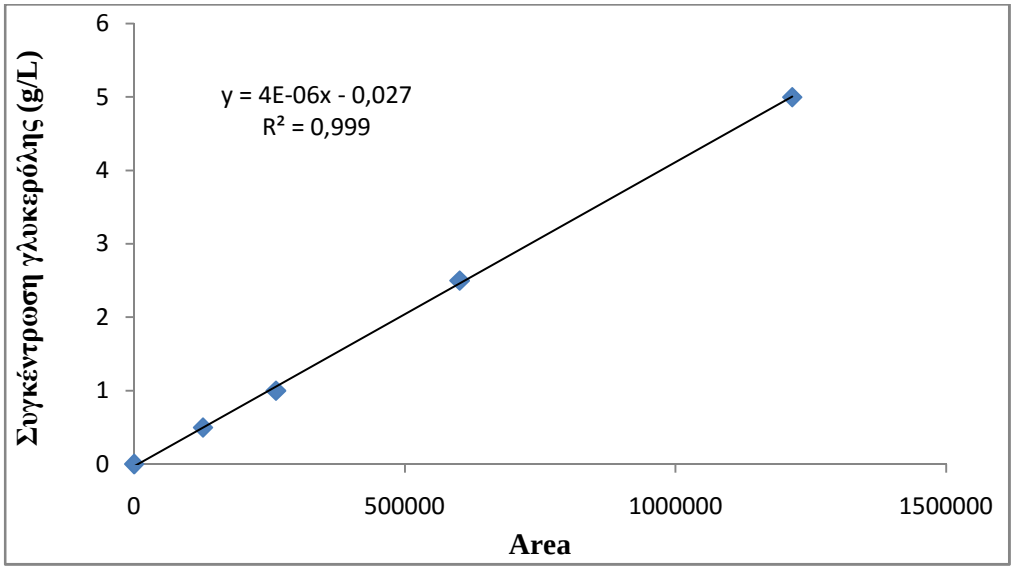
Σε 0.5 mL δείγματος προστίθενται 0.5 mL αντιδραστηρίου DNS και αναδεύονται. Στην συνέχεια μεταφέρονται τα δείγματα σε υδατόλουτρο (100°C) για 5 min ακριβώς και ψύχονται αμέσως με H_2O (25°C) για άλλα 5 min. Έπειτα προστίθενται 5 mL απιονισμένο H_2O, ακολουθεί ανάδευση και μέτρηση της απορρόφησης στα 540nm. Η συγκέντρωση του δείγματος σε ανάγοντα σάκχαρα υπολογίστηκε με βάση τη καμπύλη αναφοράς της γλυκόζης, εκφρασμένες σε g/L. Όλες οι απορροφήσεις μετρήθηκαν με φασματοφωτόμετρο τύπου Hitachi U-2000 Spectrophotometer.

3.5 Προσδιορισμός γλυκερόλης, σακχάρων και πολυολών (αραβιτόλη, μαννιτόλη)

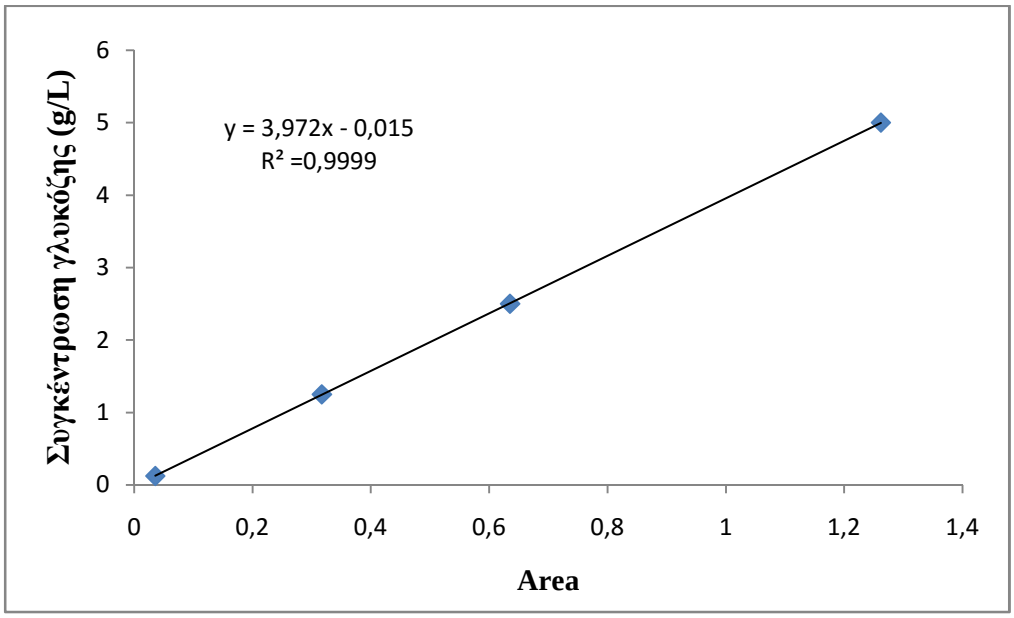
Ο προσδιορισμός των συγκεντρώσεων της γλυκερόλης και των σακχάρων (γλυκόζη, φρουκτόζη & ξυλόζη) και των πολυολών (αραβιτόλη, μαννιτόλη) έγινε με τη χρήση της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC) σε σύστημα Waters 600E και η εύρεση των αγνώστων συγκεντρώσεων έγινε με τη χρήση των αντίστοιχων καμπυλών αναφοράς των πρότυπων ουσιών. Ως κινητή φάση χρησιμοποιήθηκε αραιό διάλυμα H_2SO_4 (0.005 M) με ροή 0.6 mL/min. Η στήλη με την οποία έγινε ο διαχωρισμός του μίγματος ήταν τύπου Aminex HPX-87H (Bio-Rad, Richmond, USA) (30cmx7,8 mL) και θερμοκρασίας T= 60°C. Από τη στήλη περνούσαν 20 μl δείγματος και η διάρκεια της ανάλυσης ήταν 25 min. Οι καμπύλες αναφοράς με βάση τις οποίες υπολογίστηκαν οι συγκεντρώσεις της γλυκόζης, της ξυλόζης, της γλυκερόλης, της φρουκτόζης, της αραβιτόλης και της μαννιτόλης παρουσιάζονται στα διαγράμματα που ακολουθούν.



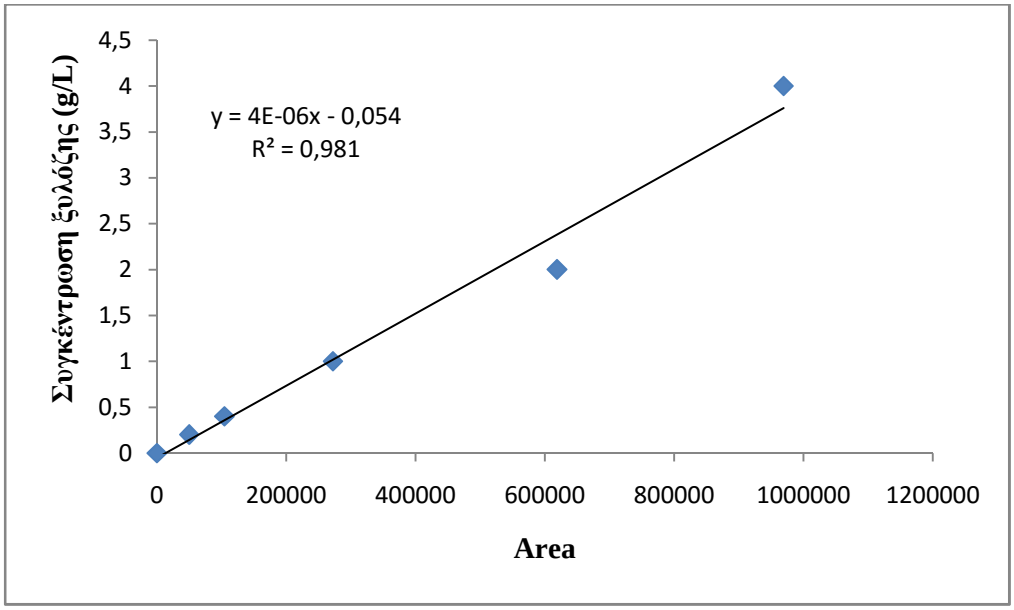
Διάγραμμα 3.5.1: Πρότυπη καμπύλη αναφοράς φρουκτόζης.



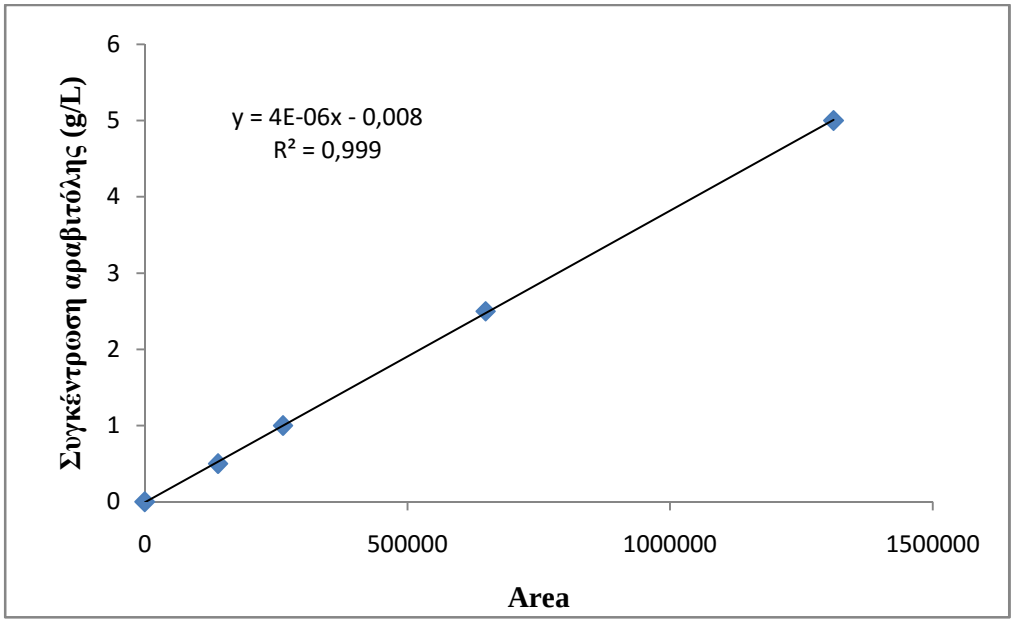
Διάγραμμα 3.5.2: Πρότυπη καμπύλη αναφοράς γλυκερόλης.



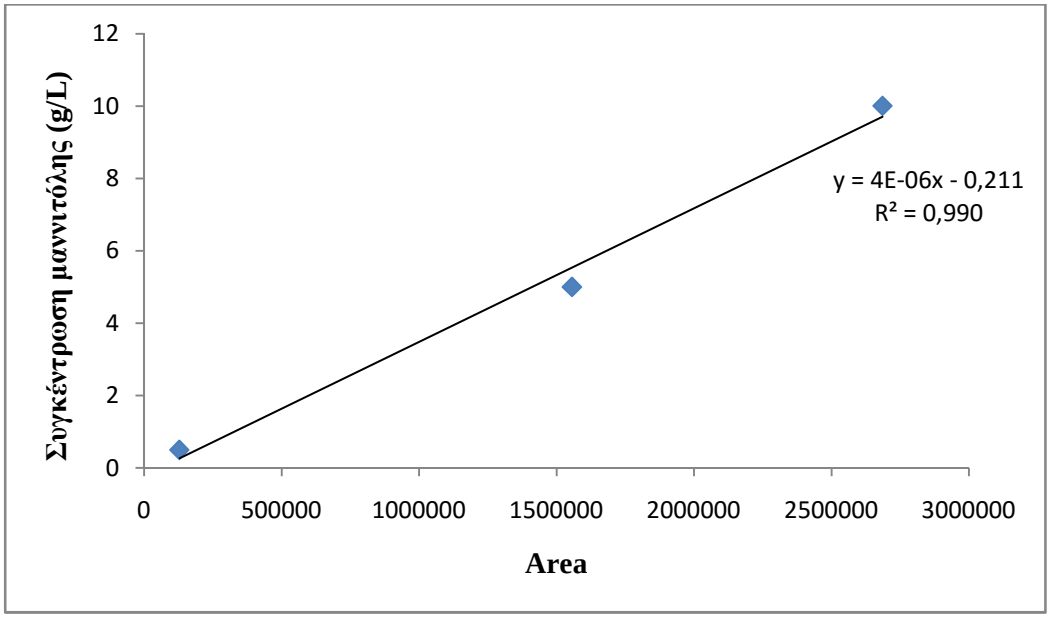
Διάγραμμα 3.5.3: Πρότυπη καμπύλη αναφοράς γλυκόζης.



Διάγραμμα 3.5.4: Πρότυπη καμπύλη αναφοράς ξυλόζης.



Διάγραμμα 3.5.5: Πρότυπη καμπύλη αναφοράς αραβιτόλης.



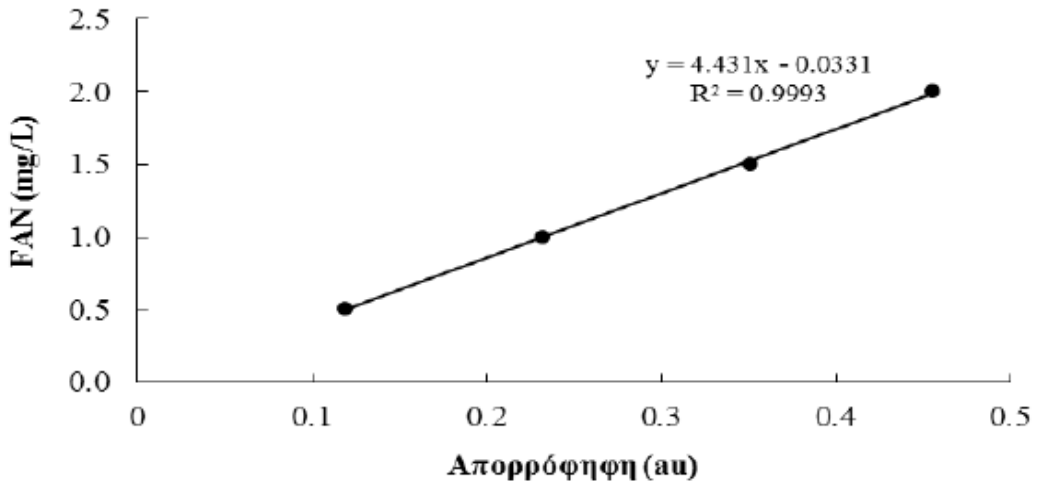
Διάγραμμα 3.5.6: Πρότυπη καμπύλη αναφοράς μαννιτόλης.

3.6 Προσδιορισμός Αζώτου των Ελεύθερων Αμινομάδων (FAN analysis)

Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό του αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων (FAN, Free Amino Nitrogen) είναι η φωτομετρική μέθοδος της νινυδρίνης (Lie, 1973). Σε δοκιμαστικό σωλήνα προστέθηκε 1 mL κατάλληλα αραιωμένου δείγματος και 0.5 mL αντιδραστηρίου χρώσης (colour reagent). Οι δοκιμαστικοί σωλήνες πωματίστηκαν και μεταφέρθηκαν για βρασμό στους 100°C για 16 min. Ακολούθησε ψύξη των δειγμάτων σε πάγο για 20 min. Έπειτα, προστέθηκαν 2.5 mL αντιδραστηρίου αραίωσης (dilution reagent) και αναδεύτηκαν μέχρι αλλαγή χρώματος (20 sec). Τέλος, μετρήθηκε η απορρόφηση σε φασματοφωτόμετρο (Hitachi U-2000 Spectrophotometer) στα 570 nm. Το τυφλό δείγμα για το μηδενισμό του φασματοφωτόμετρου, περιείχε 1 mL απιονισμένο νερό. Η συγκέντρωση του δείγματος σε FAN υπολογίστηκε από την πρότυπη καμπύλη αναφοράς εκφρασμένη σε mg/L (**Διάγραμμα 3.6.1**). Για την πρότυπη καμπύλη αναφοράς ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία, χρησιμοποιώντας διαφορετικές αραιώσεις προτύπου διαλύματος γλυκίνης. Η σύσταση των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκε για την μέθοδο FAN περιγράφεται στον παρακάτω πίνακα (**Πίνακας 3.6.1)**.

Πίνακας 3.6.1: Σύσταση αντιδραστηρίων για την μέτρηση FAN.

Αντιδραστήρια για την μέτρηση FAN	Σύσταση
Colour reagent	• 49.71 g όξινο φωσφορικό δινάτριο ($Na_2HPO_4.2H2O$), 5 g νινυδρίνη, 3 g φρουκτόζη και περίπου 60 g όξινο διφωσφορικό κάλιο (KH_2PO_4) διαλυμένα σε 1 L αποσταγμένο νερό. • pH: 6.6-6.8 • Αποθήκευση: 4^oC
Dilution reagent	2 g ιωδικού καλίου (KIO_3) ΣΕ 616 mL αποσταγμένο νερό και προσδθήκη 384 mL αιθανόλης (καθαρότητας 100%).
Αποθεματικό διάλυμα γλυκίνης	• 0.1072 g γλυκίνης σε 100 mL αποσταγμένο νερό • Αποθήκευση: 4^oC
Πρότυπο διάλυμα γλυκίνης	• 1 mL διαλύματος γλυκίνης σε 100 mL αποστειρωμένο νερό • 2 mL από το παραπάνω διάλυμα περιέχει 2 mg/L FAN.



Διάγραμμα 3.6.1: Καμπύλη αναφοράς γλυκίνης με τη μέθοδο FAN.

III. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

III.1 ΓΕΝΙΚΗ ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ

Στόχος της παρούσας εργασίας είναι η μελέτη της βιοφυσιολογικής συμπεριφοράς του ζυμομύκητα *Rhodotorula glutinis* NRRL YB-252 (κινητική της αύξησης του μύκητα, κατανάλωσης των υδρόφιλων υποστρωμάτων) και της βιοσύνθεσης ενδοκυτταρικού λίπους καθώς και η διερεύνηση της σύστασης των μικροβιακών λιπιδίων και των κλάσεων αυτών, κατά την καλλιέργεια του σε υποπροϊόντα βιομηχανιών (ακάθαρτη γλυκερόλη) και σε σακχαρούχα ανανεώσιμα υποστρώματα (εμπορική γλυκόζη, φρουκτόζη, ξυλόζη). Ο εν λόγω ζυμομύκητας κατά την καλλιέργεια του σε συνθήκες που ευνούν την υψηλή συγκέντρωση μικροβιακού λίπους (καλλιέργεια σε ζυμώσεις βυθού με υψηλό λόγο C/N), δύναται να συσσωρεύσει λίπος σε υψηλές συγκεντρώσεις, στο οποίο περιέχονται σε ποικίλα ποσά λιπαρά οξέα τα οποία ομοιάζουν με αυτά των φυτικών λιπών. Συγκεκριμένα, τα υποστρώματα τα οποία χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη αυτή ήταν κυρίως η ακάθαρτη γλυκερόλη και η γλυκόζη, καθώς και μίγματα αυτών, ενώ δευτερευόντως χρησιμοποιήθηκαν και ως υποστρώματα η εμπορική φρουκτόζη και ξυλόζη. Ως πηγή αζώτου προστέθηκαν 1 g/L yeast extract και 2 g/L πεπτόνη.

Συνολικά πραγματοποιήθηκαν 7 ζυμώσεις βυθού με τις εξής αρχικές συγκεντρώσεις (S_0) πηγής άνθρακα: 90 g/L γλυκερόλη, 90 g/L γλυκόζη, 45 g/L γλυκόζη: 45 g/L γλυκερόλη, 67.5 g/L γλυκόζη: 22.5 g/L γλυκερόλη, 22.5 g/L γλυκόζη: 67.5 g/L γλυκερόλη, 90 g/L φρουκτόζη και 90 g/L ξυλόζη ενώ ο λόγος C/N ήταν υψηλός σε κάθε περίπτωση (115 mol/mol) προκειμένου να ευνοηθεί η συσσώρευση ενδοκυτταρικού λίπους. Επίσης, μετά την αριστοποίηση των παραμέτρων της καλλιέργειας, έγινε εφαρμογή της διεργασίας σε βιοαντιδραστήρα και για το σκοπό αυτό επιλέχθηκε η ζύμωση που έδωσε τα πιο ικανοποιητικά αποτελέσματα, ήτοι 90 g/L γλυκερόλη με πηγή αζώτου 1 g/L yeast extract και 2 g/L πεπτόνη.

Στη συνέχεια, παρατίθεται ο συνοπτικός πίνακας (**Πίνακας ΙΙΙ.1**) των σημείων της κινητικής για κάθε ένα από τα προαναφερθέντα υποστρώματα και τα μίγματα τους, στα οποία παρατηρήθηκε η μεγαλύτερη συσσώρευση μικροβιακού λίπους (L_{max}) από το ζυμομύκητα *Rhodotorula glutinis* NRRL YB-252. Αξίζει να σημειωθεί ότι ο ζυμομύκητας αναπτύχθηκε ικανοποιητικά σε όλα τα υποστρώματα (εκτός από την εμπορική ξυλόζη) και παρουσίασε σημαντική κυτταρική αύξηση

(17.8–26.6 g/L), ενώ η ποσότητα του ενδοκυτταρικού λίπους που παρήχθη ήταν ικανοποιητική (4.1-7.1 g/L). Ως καταλληλότερο υπόστρωμα για την αύξηση του ζυμομύκητα φαίνεται να είναι η γλυκερόλη ως μόνη πηγή άνθρακα (90 g/L γλυκερόλη), αφού η ποσότητα της βιομάζας που παρήχθη έφτασε τα 26.6 g/L και σημειώθηκε η μεγαλύτερη παραγωγή ενδοκυτταρικού λίπους (7.1 g/L). Για το λόγο αυτό, επιλέχθηκε η ζύμωση αυτή προκειμένου να εφαρμοστεί σε βιοαντιδραστήρα με αριστοποίηση των συνθηκών καλλιέργειας. Σε όλα τα μέσα ανάπτυξης παρατηρήθηκε πλήρης κατανάλωση της γλυκερόλης, της γλυκόζης και της φρουκτόζης. Η ξυλόζη αντίθετα δεν καταναλώθηκε πλήρως όταν αποτέλεσε τη μοναδική πηγή άνθρακα (90 g/L), καθώς το 50% της αρχικής ποσότητάς της έμεινε ακατανάλωτο (45 g/L). Τέλος, στο βιοαντιδραστήρα με μέσο ανάπτυξης 90 g/L γλυκερόλη, παρατηρήθηκε πλήρης κατανάλωση του υποστρώματος.

Κατά την εξέλιξη της κατανάλωσης των υποστρωμάτων που περιείχαν ως πηγή άνθρακα τη γλυκόζη, είτε ως μοναδική πηγή είτε ως μίγματα με γλυκερόλη, παρατηρήθηκε παραγωγή αραβιτόλης, η συγκέντρωση της οποίας φτάνει σε μια μέγιστη τιμή και στη συνέχεια ανακαταναλώνεται καθώς οι ζυμώσεις προχωρούν προς τη λήξη τους. Αξιοσημείωτο γεγονός παρατηρήθηκε κατά την κατανάλωση υποστρώματος που περιείχε ως μοναδική πηγή άνθρακα τη φρουκτόζη, καθώς παρήχθησαν σε ικανοποιητικές ποσότητες αραβιτόλη και μαννιτόλη. Μάλιστα η μέγιστη τιμή της μαννιτόλης έφθασε τα 10 g/L.

Πίνακας ΙΙΙ.1: Συγκεντρωτικός πίνακας αποτελεσμάτων της καλλιέργειας του ζυμομύκητα *Rhodotorula glutinis* σε σακχαρούχα ανανεώσιμα υποστρώματα με πηγές άνθρακα τη γλυκερόλη, τη γλυκόζη, μίγματα αυτών και της φρουκτόζης.

Υπόστρωμα (g/L)	**S_{0Glol} (g/L)**	**S_{0Glu} (g/L)**	**S_{0Fru} (g/L)**	**Χρόνος (h)**	**S_{con} (g/L)**			**X (g/L)**	**X_f (g/L)**	**L_{max} (g/L)**	**$Y_{L/X}$ (%)**	**$Y_{L/Scon}$ (%)**	**IPs (g/L)**
					Glol	**Glu**	**Fru**						
90 Glol	87.2	-	-	314	83.9	-	-	22.2	13.2	7.1	32.0	8.5	1.9
90 Glu	93.0	-	-	384	91.3	-	-	17.8	12.0	4.7	26.0	5.1	1.1
45 Glol - 45 Glu	41.0	53.1	-	384	41.0	53.1	-	20.4	14.1	4.6	23.0	4.9	1.7
67.5 Glol - 22.5 Glu	63.4	21.0	-	360	63.4	21.0	-	21.4	16.0	4.1	19.0	4.9	1.3
67.5 Glu - 22.5 Glol	19.0	69.4	-	384	19.0	67.4	-	20.4	14.0	4.4	22.0	5.1	2.0
90 Fru	-	-	92.2	264	-	-	79.0	15.7	12.0	2.0	13.0	2.5	1.7
Bioreactor 90 Glol	85.0	-	-	180	71.1	-	-	25.1	13.6	9.0	36.0	12.7	2.5

S_0: Αρχική συγκέντρωση υποστρώματος (g/L)

S_{con}: Καταναλωθέν υπόστρωμα (g/L)

X: Παραγόμενη βιομάζα (g/L)

X_f: Βιομάζα ελεύθερη λίπους και ενδοπολυσακχαριτών (g/L)

L_{max}: Μέγιστο παραγόμενο μικροβιακό λίπος (g/L)

$Y_{L/X}$: Συντελεστής απόδοσης παραγωγής ενδοκυτταρικού λίπους ως προς την παραγωγή βιομάζας (%)

$Y_{L/Scon}$: Συντελεστής απόδοσης παραγωγής ενδοκυτταρικού λίπους ως προς το καταναλωθέν υπόστρωμα (%)

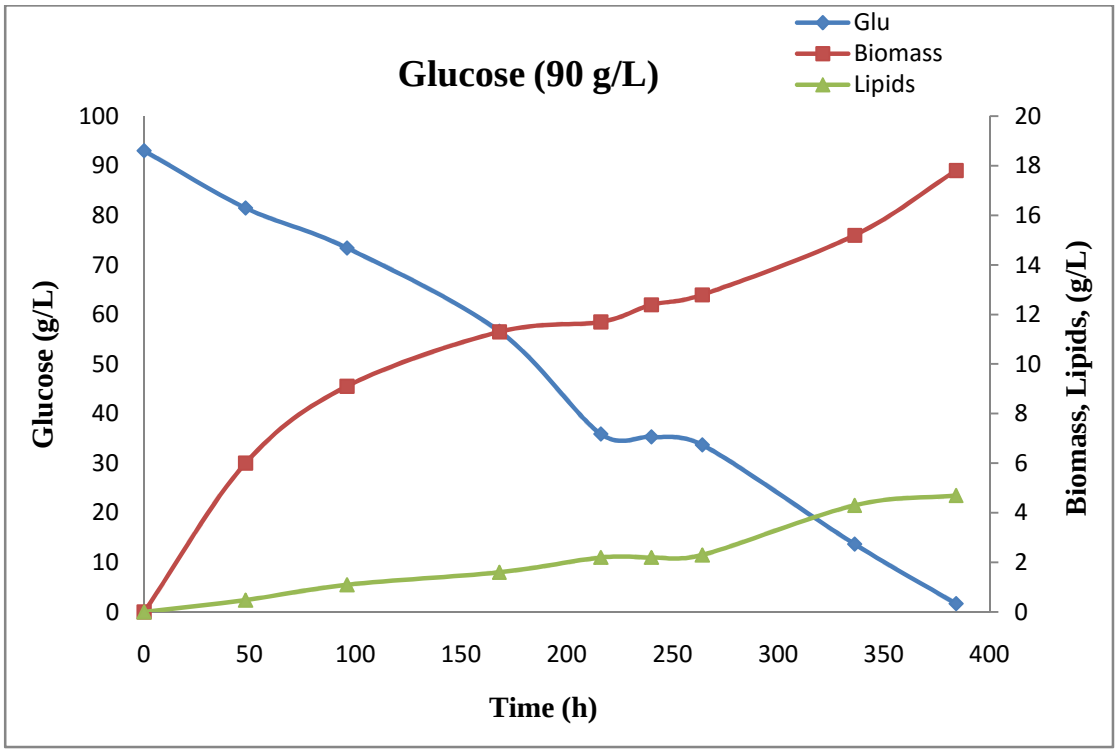
Χρόνος: 'Ωρες που επιτεύχθηκε μέγιστο παραγόμενο μικροβιακό λίπος (h)

IPs: Παραγόμενοι ενδοπολυσακχαρίτες κατά το χρονικό διάστημα επίτευξης μέγιστου παραγόμενου μικροβιακού λίπους (g/L)

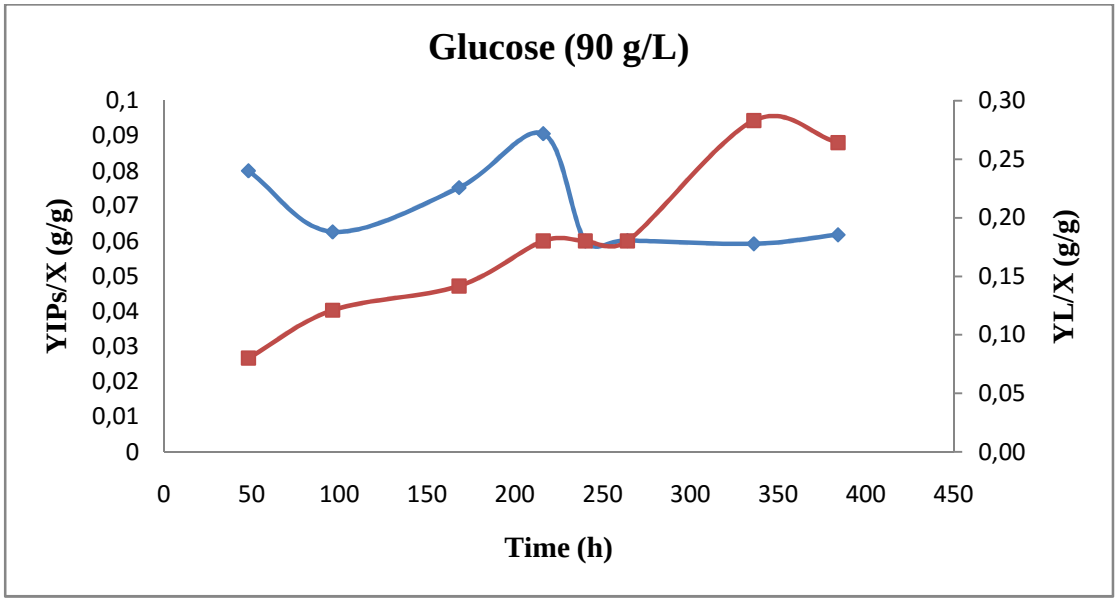
III.2 Καλλιέργεια της ζύμης *Rhodotorula glutinis* σε εμπορική γλυκόζη ($S_{0\ Glu}$ = 90 g/L)

III.2.1 Κινητική της αύξησης, της κατανάλωσης υποστρώματος και της παραγωγής μεταβολικών προϊόντων.

Πρώτο υπόστρωμα που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη ήταν η εμπορική γλυκόζη, μια πηγή άνθρακα εύκολα αφομοιώσιμη, την οποία χρησιμοποιήσαμε ως μάρτυρα για τα υπόλοιπα πειράματα. Στο παρακάτω γράφημα **(Γράφημα ΙΙΙ.2.1)** παρουσιάζεται η κινητική εξέλιξη της βιομάζας, της κατανάλωσης του υποστρώματος και της παραγωγής μεταβολικών προϊόντων από το ζυμομύκητα *Rhodotorula glutinis* κατά την αύξηση της σε θρεπτικό μέσο με το άζωτο ως το περιοριστικό της αύξησης στοιχείο, ενώ στο (**Γράφημα ΙΙΙ.2.2**) παρουσιάζεται το ποσοστό του συσσωρευόμενου λίπους του ζυμομύκητα καθώς και των παραγόμενων ενδοπολυσακχαριτών προς την αντίστοιχη βιομάζα κατά την πορεία της ζύμωσης.



Γράφημα ΙΙΙ.2.1: Κινητική εξέλιξη της βιομάζας (■), της κατανάλωσης γλυκόζης (♦) και της παραγωγής λιπιδίων (▲), συναρτήσει του χρόνου για το στέλεχος *Rhodotorula glutinis* σε ακάθαρτη γλυκόζη ως μόνη πηγή άνθρακα, σε περιοριστικές σε άζωτο συνθήκες. Συνθήκες καλλιέργειας: ανάπτυξη σε ανακινούμενες φιάλες όγκου 250 mL (180±5 rpm), θερμοκρασία 30 ^{o}C, αρχική συγκέντρωση γλυκόζης (Glu) 90 g/L, αρχικό pH=6.0± 0.1.



Γράφημα ΙΙΙ.2.2: Εξέλιξη του ποσοστού του συσσωρευόμενου ενδοκυτταρικού λίπους ως προς την παραγωγή βιομάζας (♦) και των παραγόμενων ενδοπολυσακχαριτών ως προς την παραγωγή βιομάζας (■) συναρτήσει του χρόνου για το στέλεχος *Rhodotorula glutinis* σε ακάθαρτη γλυκόζη ως μόνη πηγή άνθρακα, σε περιοριστικές σε άζωτο συνθήκες. Συνθήκες καλλιέργειας: ανάπτυξη σε ανακινούμενες φιάλες όγκου 250 mL (180±5 rpm), θερμοκρασία 30 ^{o}C, αρχική συγκέντρωση γλυκόζης (Glu) 90 g/L, αρχικό pH=6.0± 0.1.

Η αρχική συγκέντρωση της γλυκόζης είναι περίπου 90 g/L και παρατηρούμε πως εξαντλείται μετά από 384 h ζύμωσης, ενώ η μέγιστη παραγωγή βιομάζας έφτασε τα 17.8 g/L και παρατηρήθηκε μετά από 384 h ζύμωσης. Μπορούμε να δούμε πως όταν η ποσότητα της γλυκόζης στο μέσο ανάπτυξης μειωθεί περίπου στη μέση της αρχικής ποσότητας της, τότε παρατηρείται αύξηση της λιποσυσσώρευσης του ζυμομύκητα ενώ ταυτόχρονα παρατηρείται παραγωγή μικρής ποσότητας αραβιτόλης ($Arab_{max}$ = 4 g/L). Η μέγιστη ποσότητα ενδοκυτταρικού λίπους έφθασε τα 4.7 g/L μετά από 384 h ζύμωσης με ποσοστό λιποσυσσώρευσης $Y_{L/X}$ 26% (0.26 g λίπους ανά g παραγόμενης βιομάζας). Επιπλέον η σύνθεση ενδοπολυσακχαριτών κινήθηκε σε χαμηλά επίπεδα (5 - 9 %) με διακυμάνσεις καθόλη τη διάρκεια της ζύμωσης.

Μετά την παραλαβή του ενδοκυτταρικού λίπους από το μικροοργανισμό ακολούθησε η ανάλυση της σύστασης των λιπιδίων σε λιπαρά οξέα με τη βοήθεια του αέριου χρωματογράφου. Η ανάλυση της σύστασης των λιπιδίων σε λιπαρά οξέα πραγματοποιήθηκε επιλεκτικά στα δείγματα που προέκυψαν από τη ζύμωση αυτή.

Επιλέχθηκαν δείγματα από την μέση και το τέλος της ζύμωσης. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης από τον αέριο χρωματογράφο φαίνονται στον παρακάτω πίνακα **(Πίνακας ΙΙΙ.2.1).**

Πίνακας ΙΙΙ.2.1: Σύσταση των λιπιδίων σε λιπαρά οξέα του ζυμομύκητα *Rhodotorula glutinis* σε υπόστρωμα γλυκόζης 90 g/L.

		Λιπαρά οξέα % (w/w)					
	Χρόνος (h)	**C16:0**	**C18:0**	**$^{\Delta 9}$C18:1**	**$^{\Delta 9,12}$C18:2**	**C16:1**	**C18:3**
Glu 90 g/L	216	26.7	1.9	50.5	14.1	2.4	4.4
	384	25.3	3.1	45.1	17.5	2.6	6.4

Συνθήκες καλλιέργειας: ανάπτυξη σε ανακινούμενες φιάλες όγκου 250 mL (180±5 rpm), θερμοκρασία 30 ^{o}C, αρχική συγκέντρωση γλυκόζης (Glu) 90 g/L, αρχικό pH=6.0± 0.1.

Από τον παραπάνω πίνακα παρατηρούμε ότι τα κυριότερα λιπαρά οξέα για το στέλεχος αυτό είναι το ελαϊκό ($^{\Delta 9}$C18:1) > 45 % και το παλμιτικό οξύ (C16:0) > 25 % και ακολουθούν το λινελαϊκό ($^{\Delta 9,12}$C18:2) > 14 %, το α-λινολενικό οξύ (C18:3), το παλμιτελαϊκό (C16:1) και το στεατικό οξύ (C18:0). Παρατηρούμε ότι με το πέρας της ζύμωσης υπάρχει μια μικρή μείωση τόσο του ελαϊκού όσο και του παλμιτικού οξέος ενώ αντίθετα αυξάνεται το ποσοστό του λινελαϊκού και του α-λινολενικού οξέος. Σταθερή σύσταση παρουσιάζουν τα υπόλοιπα λιπαρά οξέα καθόλη την διάρκεια της ζύμωσης.

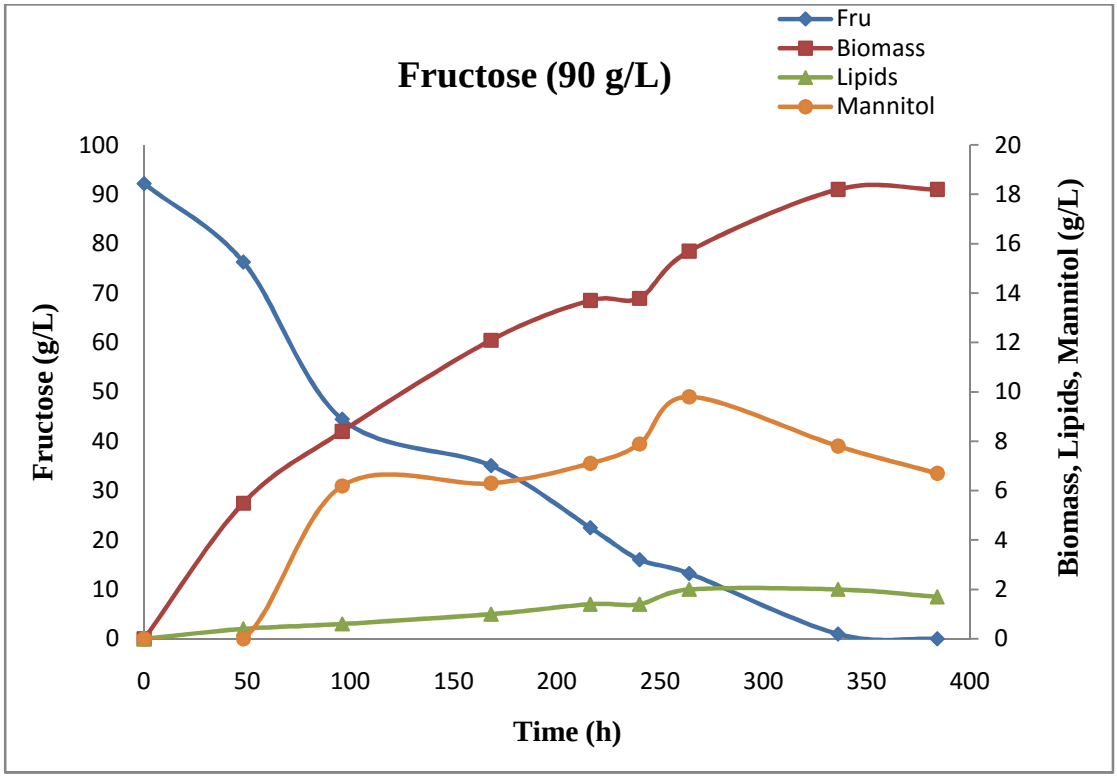
Τέλος μπορούμε να παρατηρήσουμε ότι κατά τη διάρκεια της ζύμωσης αυξάνεται η ακορεστότητα των λιπιδίων, το οποίο μπορεί να μετρηθεί με τον δείκτη ακορεστότητας (UI). Ο δείκτης ακορεστότητας (UI) είναι ένας δείκτης που εκφράζει το πόσο ακόρεστο είναι ένα λιπίδιο. Ακόρεστα λιπαρά οξέα είναι το παλμιτελαϊκό οξύ (C16:1) και το ελαϊκό οξύ (C18:1) με ένα διπλό δεσμό, το λινελαϊκό οξύ (C18:2) με 2 διπλούς δεσμούς και το *α*-λινολενικό οξύ (C18:3) με 3 διπλούς δεσμούς. Όσο μεγαλύτερη είναι η περιεκτικότητα των λιπιδίων σε ακόρεστα λιπαρά οξέα, τόσο περισσότερο ακόρεστα είναι τα λιπίδια και τόσο μεγαλύτερος είναι ο δείκτης ακορεστότητας.

ΙΙΙ.3 Καλλιέργεια της ζύμης *Rhodotorula glutinis* σε εμπορική φρουκτόζη ($S_{0\ Fru}$ = 90 g/L)

ΙΙΙ.3.1 Κινητική της αύξησης, της κατανάλωσης υποστρώματος και της παραγωγής μεταβολικών προϊόντων.

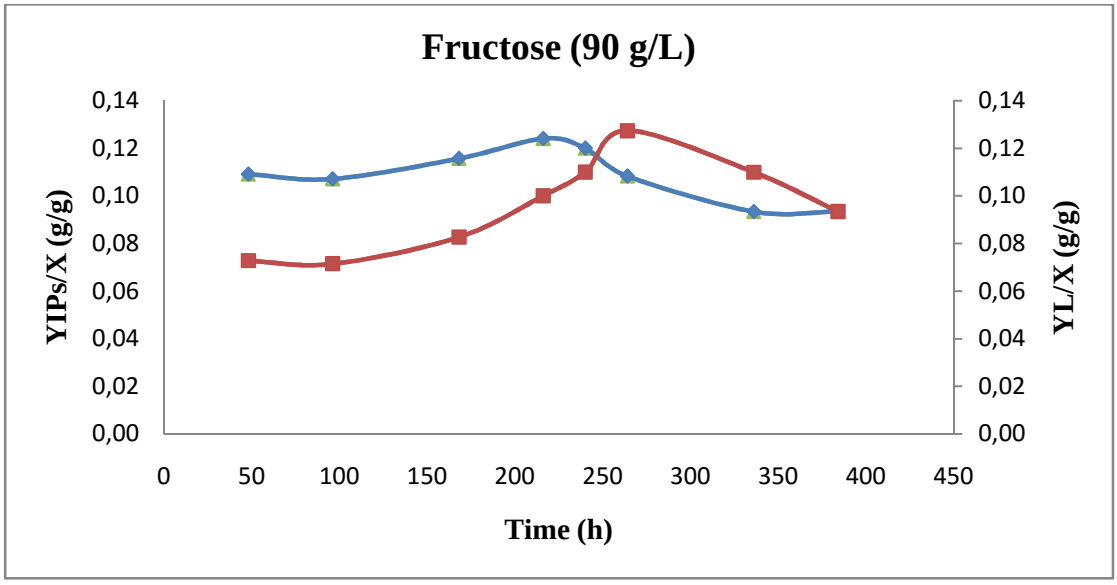
Ως δεύτερο υπόστρωμα χρησιμοποιήθηκε η εμπορική φρουκτόζη, μια πηγή άνθρακα εξίσου εύκολα αφομοιώσιμη και την οποία χρησιμοποιήσαμε ως μάρτυρα για τη συνέχεια των πειραμάτων. Η αρχική συγκέντρωση της φρουκτόζης είναι περίπου 90 g/L και παρατηρούμε πως εξαντλείται μετά από 336 h ζύμωσης, ενώ η μέγιστη παραγωγή βιομάζας έφτασε τα 18.2 g/L και παρατηρήθηκε μετά από 336 h ζύμωσης. Μπορούμε να παρατηρήσουμε πως όταν η ποσότητα της φρουκτόζης στο μέσο ανάπτυξης μειωθεί περίπου στη μέση της αρχικής ποσότητας της, τότε παρατηρείται αύξηση της λιποσυσσώρευσης του ζυμομύκητα ενώ ταυτόχρονα παρατηρείται παραγωγή μικρής ποσότητας αραβιτόλης ($Arab_{max}$ = 4.6 g/L) και ταυτόχρονα παραγωγή μαννιτόλης. Η μέγιστη παραγωγή μαννιτόλης έφθασε τα 9.8 g/L μετά από 264 h ζύμωσης. Όπως ήταν αναμενόμενο η λιποσυσσώρευση του ζυμομύκητα ήταν μειωμένη ενώ η μέγιστη τιμή του ενδοκυτταρικού λίπους έφθασε τα 2 g/L μετά από 264 h ζύμωσης. Επιπλέον η σύνθεση ενδοπολυσακχαριτών κινήθηκε σε υψηλότερα επίπεδα (9 - 12 %) με μικρές διακυμάνσεις καθόλη τη διάρκεια της ζύμωσης.

Στο παρακάτω γράφημα **Γράφημα ΙΙΙ.3.1** παρουσιάζεται η κινητική εξέλιξη της βιομάζας, της κατανάλωσης του υποστρώματος και της παραγωγής μεταβολικών προϊόντων από το ζυμομύκητα *Rhodotorula glutinis* κατά την αύξηση της σε θρεπτικό μέσο με το άζωτο ως το περιοριστικό της αύξησης στοιχείο και μόνη πηγή άνθρακα εμπορική φρουκτόζη, ενώ στο (**Γράφημα ΙΙΙ.3.2**) παρουσιάζεται το ποσοστό του συσσωρευόμενου λίπους του ζυμομύκητα καθώς και των παραγόμενων ενδοπολυσακχαριτών προς την αντίστοιχη βιομάζα κατά την πορεία της ζύμωσης.



Γράφημα ΙΙΙ.3.1: Κινητική εξέλιξη της βιομάζας (■), της κατανάλωσης φρουκτόζης (♦) της παραγωγής λιπιδίων (▲) και της παραγωγής μαννιτόλης (●) συναρτήσει του χρόνου για το στέλεχος *Rhodotorula glutinis* σε ακάθαρτη φρουκτόζη ως μόνη πηγή άνθρακα, σε περιοριστικές σε άζωτο συνθήκες. Συνθήκες καλλιέργειας: ανάπτυξη σε ανακινούμενες φιάλες όγκου 250 mL (180±5 rpm), θερμοκρασία 30 ^{o}C, αρχική συγκέντρωση φρουκτόζης (Fru) 90 g/L, αρχικό pH=6.0± 0.1.

Μετά την παραλαβή του ενδοκυτταρικού λίπους από το μικροοργανισμό ακολούθησε η ανάλυση της σύστασης των λιπιδίων σε λιπαρά οξέα με τη βοήθεια του αέριου χρωματογράφου. Η ανάλυση της σύστασης των λιπιδίων σε λιπαρά οξέα πραγματοποιήθηκε επιλεκτικά στα δείγματα που προέκυψαν από τη ζύμωση αυτή. Επιλέχθηκαν δείγματα από την μέση και το τέλος της ζύμωσης. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης από τον αέριο χρωματογράφο φαίνονται στον παρακάτω πίνακα **(Πίνακας ΙΙΙ.3.1).**



Γράφημα ΙΙΙ.3.2: Εξέλιξη του ποσοστού του συσσωρευόμενου ενδοκυτταρικού λίπους ως προς την παραγωγή βιομάζας (♦) και των παραγόμενων ενδοπολυσακχαριτών ως προς την παραγωγή βιομάζας (■) συναρτήσει του χρόνου για το στέλεχος *Rhodotorula glutinis* σε ακάθαρτη φρουκτόζη ως μόνη πηγή άνθρακα, σε περιοριστικές σε άζωτο συνθήκες. Συνθήκες καλλιέργειας: ανάπτυξη σε ανακινούμενες φιάλες όγκου 250 mL (180±5 rpm), θερμοκρασία 30 ^{o}C, αρχική συγκέντρωση φρουκτόζης (Fru) 90 g/L, αρχικό pH=6.0± 0.1.

Πίνακας ΙΙΙ.3.1: Σύσταση των λιπιδίων σε λιπαρά οξέα του ζυμομύκητα *Rhodotorula glutinis* σε υπόστρωμα φρουκτόζης 90 g/L.

		Λιπαρά οξέα % (w/w)					
	Χρόνος (h)	**C16:0**	**C18:0**	**$^{\Delta 9}$C18:1**	**$^{\Delta 9,12}$C18:2**	**C16:1**	**C18:3**
Fru 90 g/L	198	21.3	2.1	59.3	11.2	2.7	3.4
	336	25.7	2.2	49.7	15.3	2.3	4.9

Συνθήκες καλλιέργειας: ανάπτυξη σε ανακινούμενες φιάλες όγκου 250 mL (180±5 rpm), θερμοκρασία 30 ^{o}C, αρχική συγκέντρωση φρουκτόζης (Fru) 90 g/L, αρχικό pH=6.0± 0.1.

Από τον παραπάνω πίνακα παρατηρούμε ότι τα κυριότερα λιπαρά οξέα για το στέλεχος αυτό είναι το ελαϊκό ($^{\Delta 9}$C18:1) > 49 % και το παλμιτικό οξύ (C16:0) > 21 % και ακολουθούν το λινελαϊκό ($^{\Delta 9,12}$C18:2) > 11 %, το α-λινολενικό οξύ (C18:3), το παλμιτελαϊκό (C16:1) και το στεατικό οξύ (C18:0). Παρατηρούμε ότι με το πέρας της

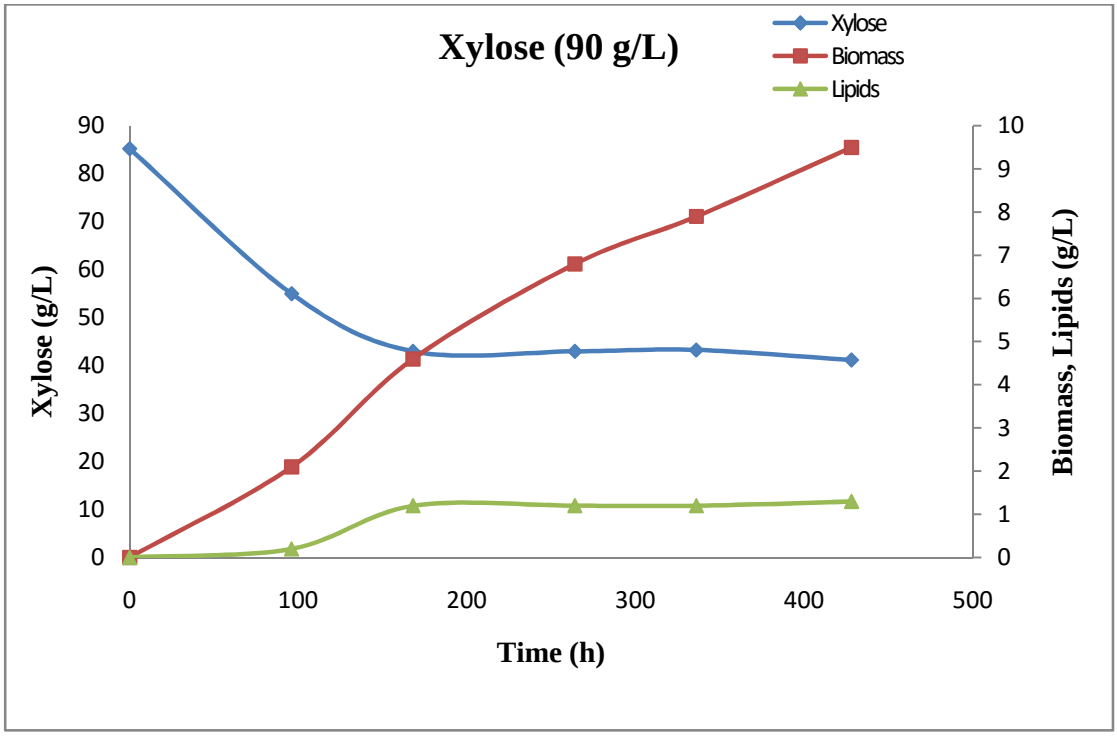
ζύμωσης υπάρχει μια μείωση του ελαϊκού ενώ παρατηρείται μικρή αύξηση του παλμιτικού και του λινελαϊκού οξέος. Επιπλέον αυξάνεται το ποσοστό του α-λινολενικού οξέος. Σταθερή σύσταση παρουσιάζουν τα υπόλοιπα λιπαρά οξέα καθόλη την διάρκεια της ζύμωσης. Τέλος μπορούμε να παρατηρήσουμε από τα παραπάνω ότι κατά τη διάρκεια της ζύμωσης αυξάνεται η ακορεστότητα των λιπιδίων.

III.4 Καλλιέργεια της ζύμης *Rhodotorula glutinis* σε εμπορική ξυλόζη ($S_{0\ Xyl}$ = 90 g/L)

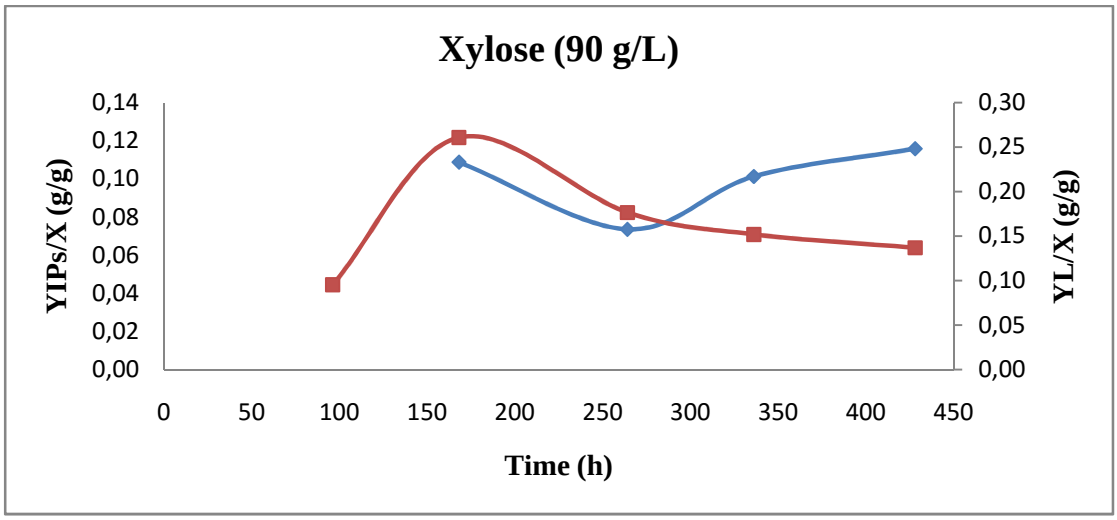
III.4.1 Κινητική της αύξησης, της κατανάλωσης υποστρώματος και της παραγωγής μεταβολικών προϊόντων.

Επόμενο υπόστρωμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν η εμπορική ξυλόζη, μια πηγή άνθρακα πιο δύσκολα αφομοιώσιμη. Ο ζυμομύκητας *Rhodotorula glutinis* φάνηκε ότι δεν μπορούσε να τη μεταβολίσει σε ικανοποιητικό βαθμό, όπως φαίνεται από το παρακάτω γράφημα (**Γράφημα III.4.1)**, ούτε να επιτύχει ικανοποιητική κυτταρική αύξηση. Αυτό παρατηρείται καθώς μετά από 168 h ζύμωσης η ποσότητα του υποστρώματος παραμένει σταθερή. Επομένως η παραγωγή βιομάζας και παράλληλα η συσσώρευση του ενδοκυτταρικού λίπους ήταν μειωμένη.

Στο παρακάτω γράφημα **(Γράφημα III.4.1)** παρουσιάζεται η κινητική εξέλιξη της βιομάζας, της κατανάλωσης του υποστρώματος και της παραγωγής μεταβολικών προϊόντων από το ζυμομύκητα *Rhodotorula glutinis* κατά την αύξηση της σε θρεπτικό μέσο με το άζωτο ως το περιοριστικό της αύξησης στοιχείο και μόνη πηγή άνθρακα εμπορική ξυλόζη, ενώ στο (**Γράφημα III.4.2**) παρουσιάζεται το ποσοστό του συσσωρευόμενου λίπους του ζυμομύκητα καθώς και των παραγόμενων ενδοπολυσακχαριτών προς την αντίστοιχη βιομάζα κατά την πορεία της ζύμωσης.



Γράφημα ΙΙΙ.4.1: Κινητική εξέλιξη της βιομάζας (■), της κατανάλωσης ξυλόζης (♦) και της παραγωγής λιπιδίων (▲) συναρτήσει του χρόνου για το στέλεχος *Rhodotorula glutinis* σε ακάθαρτη ξυλόζη ως μόνη πηγή άνθρακα, σε περιοριστικές σε άζωτο συνθήκες. Συνθήκες καλλιέργειας: ανάπτυξη σε ανακινούμενες φιάλες όγκου 250 mL (180±5 rpm), θερμοκρασία 30 ^{o}C, αρχική συγκέντρωση ξυλόζης (Xyl) 90 g/L, αρχικό pH=6.0± 0.1.

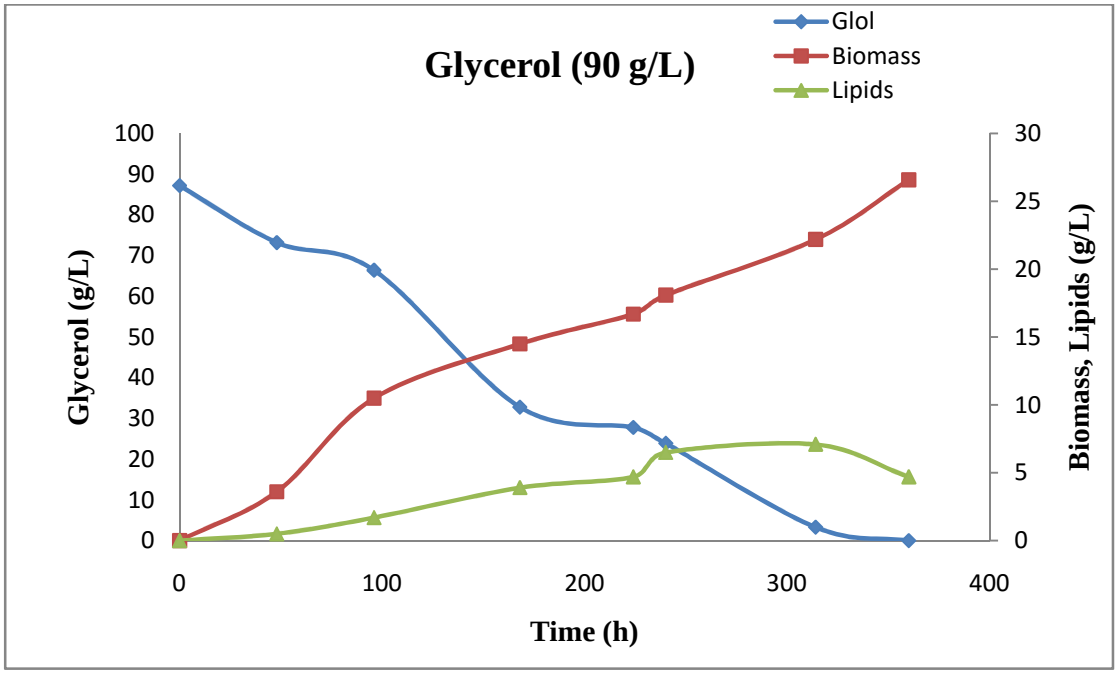


Γράφημα ΙΙΙ.4.2: Εξέλιξη του ποσοστού του συσσωρευόμενου ενδοκυτταρικού λίπους ως προς την παραγωγή βιομάζας (♦) και των παραγόμενων ενδοπολυσακχαριτών ως προς την παραγωγή βιομάζας (■) συναρτήσει του χρόνου για το στέλεχος *Rhodotorula glutinis* σε ακάθαρτη ξυλόζη ως μόνη πηγή άνθρακα, σε περιοριστικές σε άζωτο συνθήκες. Συνθήκες καλλιέργειας: ανάπτυξη σε ανακινούμενες φιάλες όγκου 250 mL (180±5 rpm), θερμοκρασία 30 ^{o}C, αρχική συγκέντρωση ξυλόζης (Xyl) 90 g/L, αρχικό pH=6.0± 0.1.

III.5 Καλλιέργεια της ζύμης *Rhodotorula glutinis* σε ακάθαρτη γλυκερόλη ($S_{0\ Glol}$ = 90 g/L)

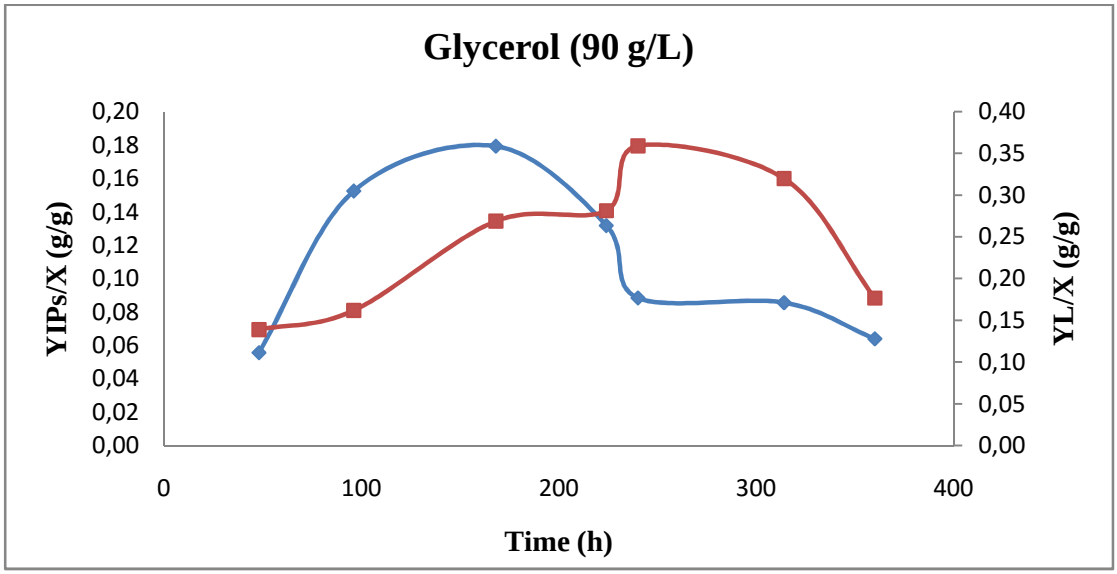
III.5.1 Κινητική της αύξησης, της κατανάλωσης υποστρώματος και της παραγωγής μεταβολικών προϊόντων.

Το τελευταίο υπόστρωμα που χρησιμοποιήθηκε στη μελέτη αυτή και το βασικότερο ήταν η βιομηχανική γλυκερόλη. Μια πηγή άνθρακα μηδενικού κόστους, καθώς προέρχεται από τη βιομηχανία παραγωγής βιοντίζελ. Στο παρακάτω γράφημα **(Γράφημα III.5.1)** παρουσιάζεται η κινητική εξέλιξη της βιομάζας, της κατανάλωσης του υποστρώματος και της παραγωγής μεταβολικών προϊόντων από το ζυμομύκητα *Rhodotorula glutinis* κατά την αύξηση της σε θρεπτικό μέσο με το άζωτο ως το περιοριστικό της αύξησης στοιχείο και μόνη πηγή άνθρακα βιομηχανική γλυκερόλη, ενώ στο (**Γράφημα III.5.2**) παρουσιάζεται το ποσοστό του συσσωρευόμενου λίπους του ζυμομύκητα καθώς και των παραγόμενων ενδοπολυσακχαριτών προς την αντίστοιχη βιομάζα κατά την πορεία της ζύμωσης.



Γράφημα III.4 : Κινητική εξέλιξη της βιομάζας (■), της κατανάλωσης γλυκερόλης (♦) και της παραγωγής λιπιδίων (▲) συναρτήσει του χρόνου για το στέλεχος *Rhodotorula glutinis* σε βιομηχανική γλυκερόλη ως μόνη πηγή άνθρακα, σε περιοριστικές σε άζωτο συνθήκες. Συνθήκες καλλιέργειας: ανάπτυξη σε ανακινούμενες φιάλες όγκου 250 mL (180±5 rpm), θερμοκρασία 30 ^{o}C, αρχική συγκέντρωση βιομηχανικής γλυκερόλης (Glol) 90 g/L, αρχικό pH=6.0± 0.1.

Η αρχική συγκέντρωση της γλυκερόλης είναι περίπου 90 g/L και παρατηρούμε πως εξαντλείται μετά από 314 h ζύμωσης, ενώ η μέγιστη παραγωγή βιομάζας έφτασε τα 26.6 g/L και παρατηρήθηκε μετά από 360 h ζύμωσης. Η λιποσυσσώρευση του ζυμομύκητα ήταν αρκετά υψηλή (36%), ενώ η μέγιστη τιμή του ενδοκυτταρικού λίπους έφθασε τα 7.1 g/L μετά από 314 h ζύμωσης. Επιπλέον η σύνθεση ενδοπολυσακχαριτών κινήθηκε σε ακόμη υψηλότερα επίπεδα (6 - 18 %) με διακυμάνσεις καθόλη τη διάρκεια της ζύμωσης.



Γράφημα ΙΙΙ.5.2: Εξέλιξη του ποσοστού του συσσωρευόμενου ενδοκυτταρικού λίπους ως προς την παραγωγή βιομάζας (♦) και των παραγόμενων ενδοπολυσακχαριτών ως προς την παραγωγή βιομάζας (■) συναρτήσει του χρόνου για το στέλεχος *Rhodotorula glutinis* σε ακάθαρτη γλυκερόλη ως μόνη πηγή άνθρακα, σε περιοριστικές σε άζωτο συνθήκες. Συνθήκες καλλιέργειας: ανάπτυξη σε ανακινούμενες φιάλες όγκου 250 mL (180±5 rpm), θερμοκρασία 30 ^{o}C, αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης (Glol) 90 g/L, αρχικό pH=6.0± 0.1.

Μετά την παραλαβή του ενδοκυτταρικού λίπους από το μικροοργανισμό ακολούθησε η ανάλυση της σύστασης των λιπιδίων σε λιπαρά οξέα και των κλάσεων αυτών με τη βοήθεια του αέριου χρωματογράφου. Η ανάλυση της σύστασης των λιπιδίων σε λιπαρά οξέα πραγματοποιήθηκε επιλεκτικά στα δείγματα που προέκυψαν από τη ζύμωση αυτή. Επιλέχθηκαν δείγματα από το αρχικό στάδιο της ζύμωσης, από την μέση και το τέλος της ζύμωσης. . Αντιθέτως, για την ανάλυση των λιπιδίων στις 3 κλάσεις (ουδέτερα, σφιγγο-γλυκολιπίδια και φωσφολιπίδια) το δείγμα που επιλέχθηκε

αντιπροσώπευε τη στάσιμη (Stationary-S) φάση. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης από τον αέριο χρωματογράφο φαίνονται στον παρακάτω πίνακα **(Πίνακας ΙΙΙ.5.1).**

Πίνακας ΙΙΙ.5.1: Σύσταση των λιπιδίων και των ουδέτερων λιπιδίων (NL) σε λιπαρά οξέα του ζυμομύκητα *Rhodotorula glutinis* σε υπόστρωμα γλυκερόλης 90 g/L.

	Λιπαρά οξέα % (w/w)						
	Χρόνος (h)	**C16:0**	**C18:0**	**$^{\Delta 9}$C18:1**	**$^{\Delta 9,12}$C18:2**	**C16:1**	**C18:3**
Glol 90 g/L	96	21.9	2.2	69.7	3.0	2.8	0.5
	224	19.5	2.5	73.0	2.0	2.7	0.2
	368	19.8	2.3	66.1	7.7	2.9	1.1
NL	240	29.6	1.8	57.9	6.7	3.6	0.4

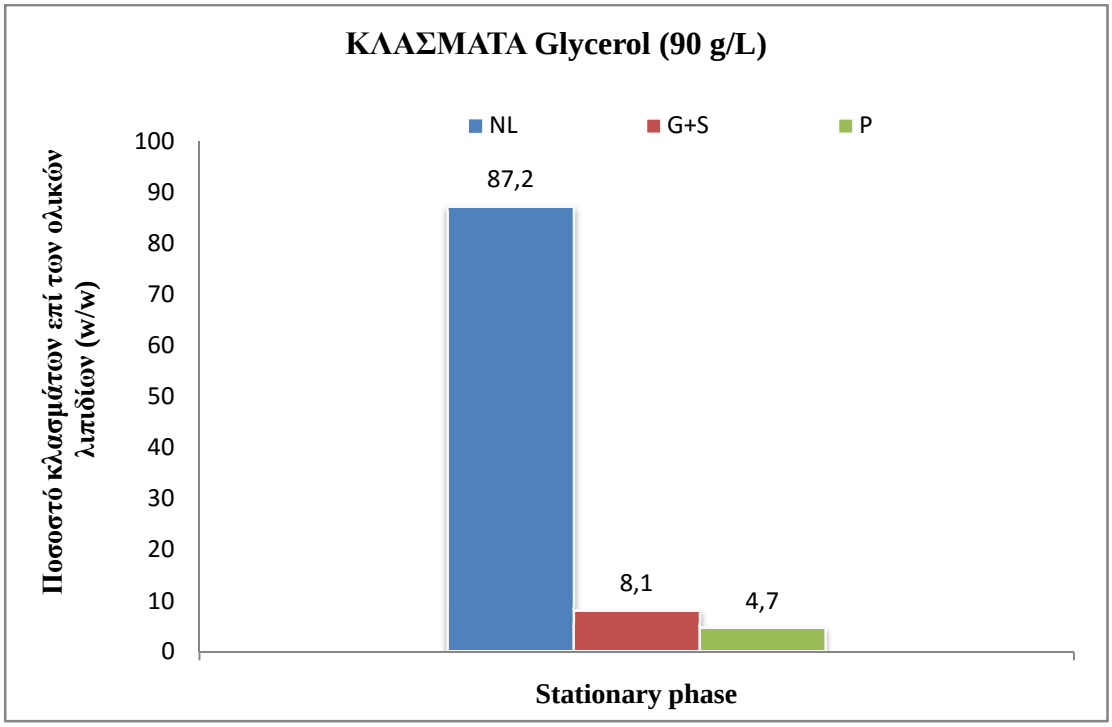
NL: ουδέτερα λιπίδια

Συνθήκες καλλιέργειας: ανάπτυξη σε ανακινούμενες φιάλες όγκου 250 mL (180±5 rpm), θερμοκρασία 30 ^{o}C, αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης (Glol) 90 g/L, αρχικό pH=6.0± 0.1.

Από τον παραπάνω πίνακα παρατηρούμε ότι τα κυριότερα λιπαρά οξέα για το στέλεχος αυτό είναι το ελαϊκό ($^{\Delta 9}$C18:1) > 65 % και το παλμιτικό οξύ (C16:0) > 19 % και ακολουθούν το λινελαϊκό ($^{\Delta 9,12}$C18:2) > 2 %, το παλμιτελαϊκό (C16:1) το στεατικό οξύ (C18:0) και το α-λινολενικό οξύ (C18:3). Παρατηρούμε ότι με το πέρας της ζύμωσης υπάρχει μια μικρή μείωση του ελαϊκού και του παλμιτικού οξέος ενώ παρατηρείται διπλασιασμός του ποσοστού του λινελαϊκού οξέος. Σταθερή σύσταση παρουσιάζουν τα υπόλοιπα λιπαρά οξέα καθόλη την διάρκεια της ζύμωσης. Επίσης παρατηρούμε ότι η σύσταση των λιπαρών οξέων των ουδέτρων λιπιδίων ομοιάζει με το προφίλ των ολικών λιπιδίων. Τέλος μπορούμε να παρατηρήσουμε από τα παραπάνω ότι κατά τη διάρκεια της ζύμωσης αυξάνεται η ακορεστότητα των λιπιδίων.

Εκτός από την ανάλυση της σύστασης των λιπιδίων σε λιπαρά οξέα (%), πραγματοποιήθηκε στο στάδιο αυτό η ανάλυση του μικροβιακού λίπους στα επιμέρους κλάσματα των ουδέτερων λιπιδίων, των σφιγγο-γλυκολιπιδίων και των

φωσφολιπίδιων. Όπως αναφέρθηκε παραπάνω το δείγμα που επιλέχθηκε για την ανάλυση αυτή αντιπροσωπεύει τη στάσιμη (240 h) φάση. Το παρακάτω γράφημα (**Γράφημα ΙΙΙ.5.2)** παρουσιάζει τα ποσοστά των κλασμάτων επί των ολικών λιπιδίων στο δείγμα που αντιπροσωπεύει τη στάσιμη φάση του αυξητικού κύκλου. Από το γράφημα αυτό είναι εμφανές ότι τα ουδέτερα λιπίδια (NL) αποτελούν το μεγαλύτερο ποσοστό επί του συνόλου των λιπιδίων (TL), ενώ τα σφιγγο-γλυκολιπίδια (S+G) και τα φωσφολιπίδια (P) απαντώνται σε πολύ χαμηλότερα ποσοστά (4–8%).



Γράφημα ΙΙΙ.5.3: Ποσοστιαία κατανομή των κλασμάτων (ουδέτερα, σφιγγο-γλυκολιπίδια και φωσφολιπίδια) επί του συνόλου των ολικών λιπιδίων (TL) του ζυμομύκητα *Rhodotorula glutinis* με τη γλυκερόλη ως μόνη πηγή άνθρακα στην στάσιμη φάση. Συνθήκες καλλιέργειας: ασυνεχής ζύμωση σε ανακινούμενες κωνικές φιάλες (180 rpm) και θερμοκρασία T = 30°C, αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης ($S_{0\ Glol}$ = 90 g/L) και πηγές αζώτου 1 g/L yeast extract και 2 g/L πεπτόνη, υπό αερόβιες συνθήκες.

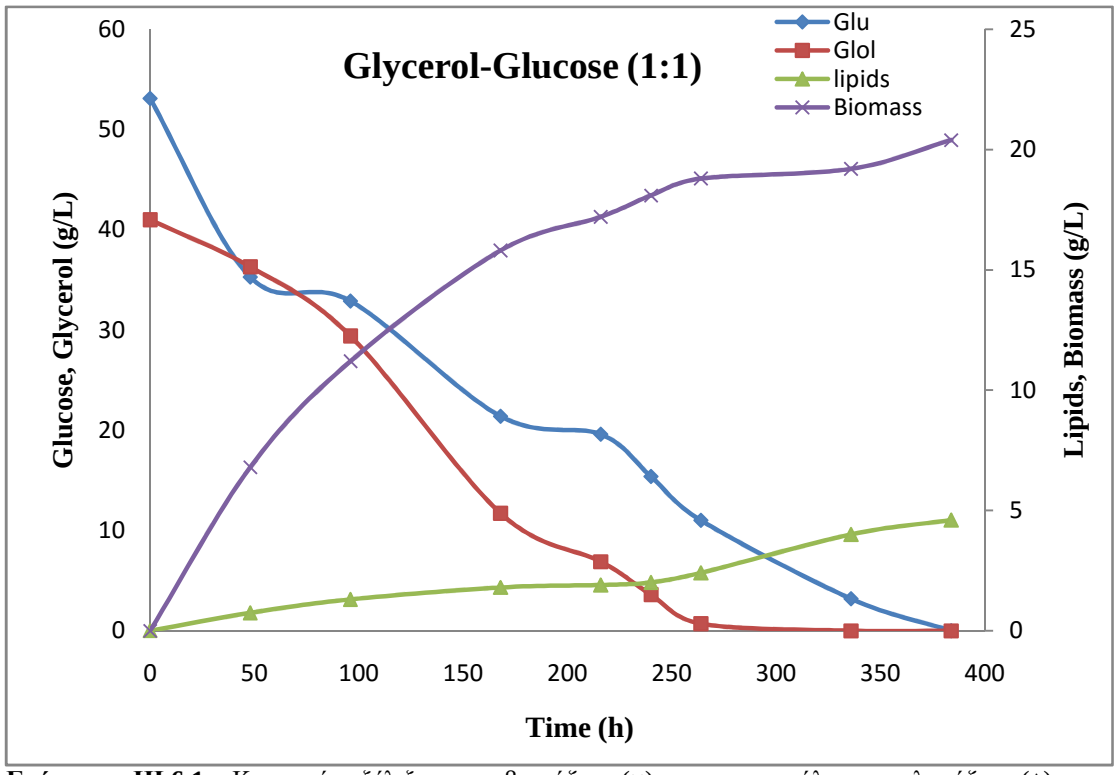
III.6 Καλλιέργεια της ζύμης *Rhodotorula glutinis* σε μίγμα γλυκερόλης και γλυκόζης με αναλογία 1:1 ($S_{0\ Glol}$ = 45 g/L & $S_{0\ Glu}$ = 45 g/L)

III.6.1 Κινητική της αύξησης, της κατανάλωσης υποστρώματος και της παραγωγής μεταβολικών προϊόντων.

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκαν κάποια πειράματα με χρήση της βιομηχανικής γλυκερόλης σε συνυπόστρωμα με την εμπορική γλυκόζη σε διάφορες αναλογίες, καθώς είχε αναφερθεί στη βιβλιογραφία αύξηση της λιποσυσσώρευσης με προσθήκη γλυκόζης στο μέσο της καλλιέργειας.

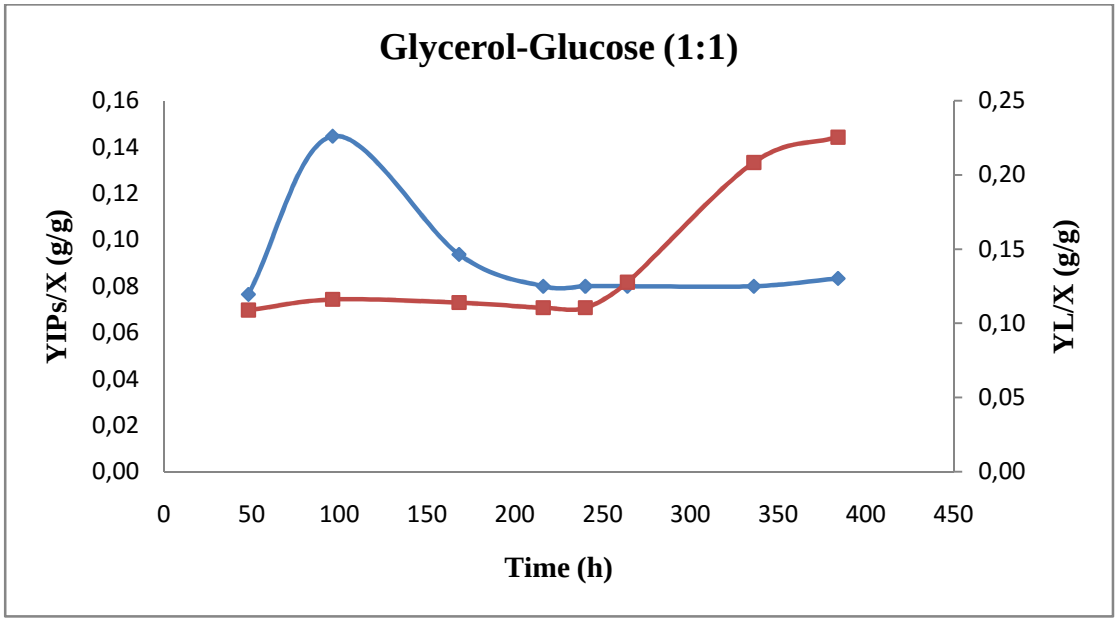
Στο παρακάτω γράφημα **(Γράφημα III.6.1)** παρουσιάζεται η κινητική εξέλιξη της βιομάζας, της κατανάλωσης του υποστρώματος και της παραγωγής μεταβολικών προϊόντων από το ζυμομύκητα *Rhodotorula glutinis* κατά την αύξηση της σε θρεπτικό μέσο με το άζωτο ως το περιοριστικό της αύξησης στοιχείο και πηγή άνθρακα βιομηχανική γλυκερόλη και εμπορική γλυκόζη σε ίση αναλογία, ενώ στο (**Γράφημα III.6.2**) παρουσιάζεται το ποσοστό του συσσωρευόμενου λίπους του ζυμομύκητα καθώς και των παραγόμενων ενδοπολυσακχαριτών προς την αντίστοιχη βιομάζα κατά την πορεία της ζύμωσης.

Η αρχική συγκέντρωση της γλυκερόλης και της γλυκόζης είναι περίπου 45 g/L. Το αξιοσημείωτο που παρατηρείται είναι η ταυτόχρονη κατανάλωση των δύο υποστρωμάτων και ειδικότερα η προτίμηση της γλυκόζης τις πρώτες ώρες της ζύμωσης και εν συνεχεία της γλυκερόλης μέχρι πλήρης κατανάλωσής της. Η ποσότητα της γλυκερόλης εξαντλείται μετά από 264 h ζύμωσης ενώ της γλυκόζης μετά από 336 h ζύμωσης. Η μέγιστη παραγωγή βιομάζας έφτασε τα 20.4 g/L και παρατηρήθηκε μετά από 384 h ζύμωσης. Η λιποσυσσώρευση του ζυμομύκητα ήταν μειωμένη (21%), ενώ η μέγιστη τιμή του ενδοκυτταρικού λίπους έφθασε τα 4.6 g/L μετά από 384 h ζύμωσης. Επιπλέον η σύνθεση ενδοπολυσακχαριτών κινήθηκε σε παρόμοια επίπεδα (7 - 15 %) με διακυμάνσεις καθόλη τη διάρκεια της ζύμωσης.



Γράφημα ΙΙΙ.6.1: Κινητική εξέλιξη της βιομάζας (×), της κατανάλωσης γλυκόζης (♦), της κατανάλωσης γλυκερόλης (■) και της παραγωγής λιπιδίων (▲) συναρτήσει του χρόνου για το στέλεχος *Rhodotorula glutinis* σε βιομηχανική γλυκερόλη και εμπορική γλυκόζη ως πηγές άνθρακα, σε περιοριστικές σε άζωτο συνθήκες. Συνθήκες καλλιέργειας: ανάπτυξη σε ανακινούμενες φιάλες όγκου 250 mL (180±5 rpm), θερμοκρασία 30 ^{o}C, αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης (Glol) 45 g/L, αρχική συγκέντρωση γλυκόζης (Glu) 45 g/L αρχικό pH=6.0± 0.1.

Μετά την παραλαβή του ενδοκυτταρικού λίπους από το μικροοργανισμό ακολούθησε η ανάλυση της σύστασης των λιπιδίων σε λιπαρά οξέα με τη βοήθεια του αέριου χρωματογράφου. Η ανάλυση της σύστασης των λιπιδίων σε λιπαρά οξέα πραγματοποιήθηκε επιλεκτικά στα δείγματα που προέκυψαν από τη ζύμωση αυτή. Επιλέχθηκαν δείγματα από το αρχικό στάδιο και το τέλος της ζύμωσης. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης από τον αέριο χρωματογράφο φαίνονται στον παρακάτω πίνακα **(Πίνακας ΙΙΙ.6.1).**



Γράφημα ΙΙΙ.6.2: Εξέλιξη του ποσοστού του συσσωρευόμενου ενδοκυτταρικού λίπους ως προς την παραγωγή βιομάζας (♦) και των παραγόμενων ενδοπολυσακχαριτών ως προς την παραγωγή βιομάζας (■) συναρτήσει του χρόνου για το στέλεχος *Rhodotorula glutinis* σε μίγμα ακάθαρτης γλυκερόλης και εμπορικής γλυκόζης, σε περιοριστικές σε άζωτο συνθήκες. Συνθήκες καλλιέργειας: ανάπτυξη σε ανακινούμενες φιάλες όγκου 250 mL (180±5 rpm), θερμοκρασία 30 ^{o}C, αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης (Glol) 45 g/L, αρχική συγκέντρωση γλυκόζης (Glu) 45 g/L, αρχικό pH=6.0± 0.1.

Πίνακας ΙΙΙ.6.1: Σύσταση των λιπιδίων σε λιπαρά οξέα του ζυμομύκητα *Rhodotorula glutinis* σε μίγμα γλυκερόλης και γλυκόζης σε αναλογία 1:1 (S_{0T} = 90 g/L).

		Λιπαρά οξέα % (w/w)					
	Χρόνος (h)	**C16:0**	**C18:0**	**$^{\Delta 9}$C18:1**	**$^{\Delta 9,12}$C18:2**	**C16:1**	**C18:3**
Glol-Glu: 1:1	96	23.8	3.0	58.3	10.0	3.7	1.2
	384	14.3	1.6	63.7	17.6	1.7	1.1

Συνθήκες καλλιέργειας: ανάπτυξη σε ανακινούμενες φιάλες όγκου 250 mL (180±5 rpm), θερμοκρασία 30 ^{o}C, αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης (Glol) και γλυκόζης (Glu) 45 g/L, αρχικό pH=6.0± 0.1.

Από τον παραπάνω πίνακα παρατηρούμε ότι τα κυριότερα λιπαρά οξέα για το στέλεχος αυτό είναι το ελαϊκό ($^{\Delta 9}$C18:1) > 58 % και το παλμιτικό οξύ (C16:0) > 14% και ακολουθούν το λινελαϊκό ($^{\Delta 9,12}$C18:2) > 10 %, το παλμιτελαϊκό (C16:1) το στεατικό οξύ (C18:0) και το α-λινολενικό οξύ (C18:3). Παρατηρούμε ότι με το πέρας

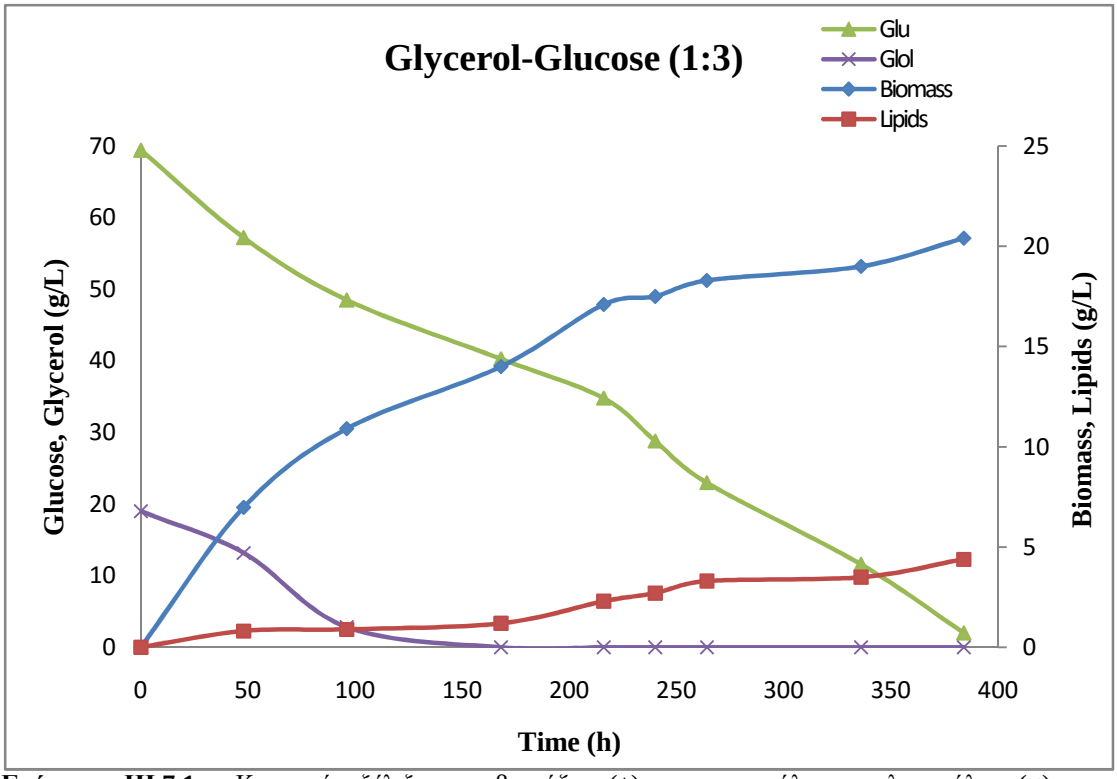
της ζύμωσης υπάρχει μια μικρή αύξηση του ελαϊκού και του λινελαϊκού οξέος ενώ παρατηρείται μείωση του ποσοστού του παλμιτικού οξέος. Σταθερή σύσταση με μικρή πτωτική τάση παρουσιάζουν τα υπόλοιπα λιπαρά οξέα καθόλη την διάρκεια της ζύμωσης. Τέλος μπορούμε να παρατηρήσουμε από τα παραπάνω ότι κατά τη διάρκεια της ζύμωσης αυξάνεται η ακορεστότητα των λιπιδίων.

III.7 Καλλιέργεια της ζύμης *Rhodotorula glutinis* σε μίγμα γλυκερόλης και γλυκόζης με αναλογία 1:3 ($S_{0\ Glol}$ = 22.5 g/L & $S_{0\ Glu}$ = 67.5 g/L)

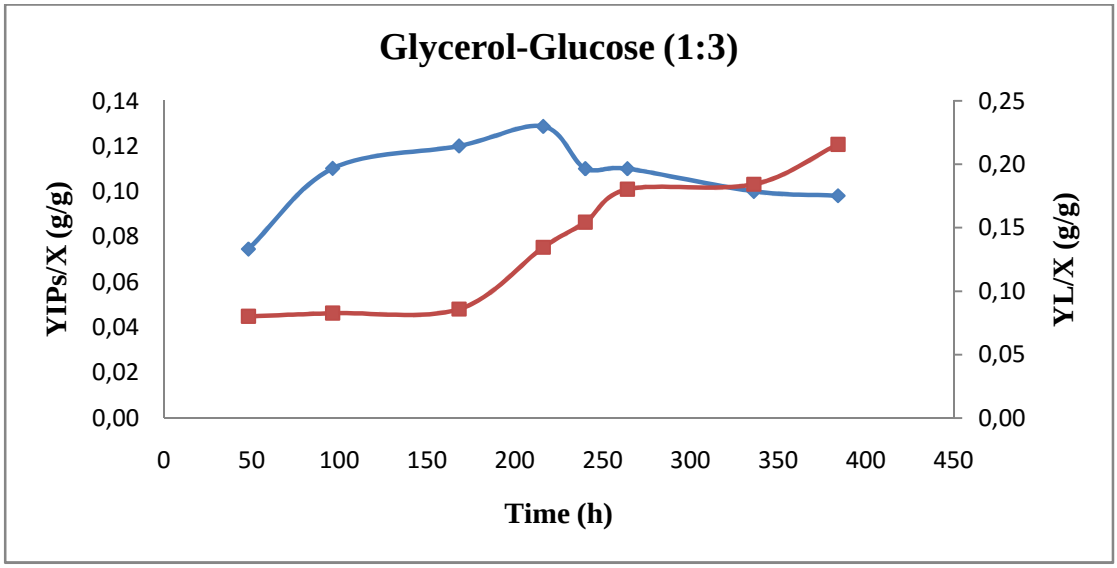
III.7.1 Κινητική της αύξησης, της κατανάλωσης υποστρώματος και της παραγωγής μεταβολικών προϊόντων.

Στο παρακάτω γράφημα **(Γράφημα III.7.1)** παρουσιάζεται η κινητική εξέλιξη της βιομάζας, της κατανάλωσης του υποστρώματος και της παραγωγής μεταβολικών προϊόντων από το ζυμομύκητα *Rhodotorula glutinis* κατά την αύξηση της σε θρεπτικό μέσο με το άζωτο ως το περιοριστικό της αύξησης στοιχείο και πηγή άνθρακα βιομηχανική γλυκερόλη και εμπορική γλυκόζη σε αναλογία 1:3, ενώ στο (**Γράφημα III.7.2**) παρουσιάζεται το ποσοστό του συσσωρευόμενου λίπους του ζυμομύκητα καθώς και των παραγόμενων ενδοπολυσακχαριτών προς την αντίστοιχη βιομάζα κατά την πορεία της ζύμωσης.

Η αρχική συγκέντρωση της γλυκερόλης είναι περίπου 22.5 g/L ενώ της γλυκόζης είναι περίπου 67.5 g/L. Το αξιοσημείωτο που παρατηρείται είναι η ταυτόχρονη κατανάλωση των δύο υποστρωμάτων και ειδικότερα η προτίμηση της γλυκόζης τις πρώτες ώρες της ζύμωσης και εν συνεχεία της γλυκερόλης μέχρι πλήρους κατανάλωσής της. Η ποσότητας της γλυκερόλης εξαντλείται μετά από 96 h ζύμωσης ενώ της γλυκόζης μετά από 384 h ζύμωσης. Η μέγιστη παραγωγή βιομάζας έφτασε τα 20.4 g/L και παρατηρήθηκε μετά από 384 h ζύμωσης. Όπως παρατηρείται η λιποσυσσώρευση του ζυμομύκητα ήταν μειωμένη (22%), ενώ η μέγιστη τιμή του ενδοκυτταρικού λίπους έφθασε τα 4.4 g/L μετά από 384 h ζύμωσης. Επιπλέον η σύνθεση ενδοπολυσακχαριτών κινήθηκε σε χαμηλότερα επίπεδα (7 - 11 %) με διακυμάνσεις καθόλη τη διάρκεια της ζύμωσης.



Γράφημα ΙΙΙ.7.1 : Κινητική εξέλιξη της βιομάζας (♦), της κατανάλωσης γλυκερόλης (×), της κατανάλωσης γλυκόζης (▲) και της παραγωγής λιπιδίων (■) συναρτήσει του χρόνου για το στέλεχος *Rhodotorula glutinis* σε βιομηχανική γλυκερόλη και εμπορική γλυκόζη ως πηγές άνθρακα, σε περιοριστικές σε άζωτο συνθήκες. Συνθήκες καλλιέργειας: ανάπτυξη σε ανακινούμενες φιάλες όγκου 250 mL (180±5 rpm), θερμοκρασία 30 ^{o}C, αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης (Glol) 22.5 g/L, αρχική συγκέντρωση γλυκόζης (Glu) 67.5 g/L αρχικό pH=6.0± 0.1.



Γράφημα ΙΙΙ.7.2: Εξέλιξη του ποσοστού του συσσωρευόμενου ενδοκυτταρικού λίπους ως προς την παραγωγή βιομάζας (♦) και των παραγόμενων ενδοπολυσακχαριτών ως προς την παραγωγή βιομάζας (■) συναρτήσει του χρόνου για το στέλεχος *Rhodotorula glutinis* σε μίγμα ακάθαρτης γλυκερόλης και εμπορικής γλυκόζης, σε περιοριστικές σε άζωτο συνθήκες. Συνθήκες καλλιέργειας: ανάπτυξη σε ανακινούμενες φιάλες όγκου 250 mL (180±5 rpm), θερμοκρασία 30 ^{o}C, αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης (Glol) 22.5 g/L, αρχική συγκέντρωση γλυκόζης (Glu) 67.5 g/L, αρχικό pH=6.0± 0.1.

Μετά την παραλαβή του ενδοκυτταρικού λίπους από το μικροοργανισμό ακολούθησε η ανάλυση της σύστασης των λιπιδίων σε λιπαρά οξέα με τη βοήθεια του αέριου χρωματογράφου. Η ανάλυση της σύστασης των λιπιδίων σε λιπαρά οξέα πραγματοποιήθηκε επιλεκτικά στα δείγματα που προέκυψαν από τη ζύμωση αυτή. Επιλέχθηκαν δείγματα, από την μέση και το τέλος της ζύμωσης. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης από τον αέριο χρωματογράφο φαίνονται στον παρακάτω πίνακα **(Πίνακας ΙΙΙ.7.1).**

Πίνακας ΙΙΙ.7.1: Σύσταση των λιπιδίων σε λιπαρά οξέα του ζυμομύκητα *Rhodotorula glutinis* σε μίγμα γλυκερόλης και γλυκόζης σε αναλογία 1:3 (S_{0T} = 90 g/L).

		Λιπαρά οξέα % (w/w)					
	Χρόνος (h)	**C16:0**	**C18:0**	**$^{\Delta 9}$C18:1**	**$^{\Delta 9,12}$C18:2**	**C16:1**	**C18:3**
Glol-Glu: 1/3	168	29.1	1.6	57.4	11.1	0.0	0.7
	384	26.2	2.0	49.4	14.2	3.0	5.2

Συνθήκες καλλιέργειας: ανάπτυξη σε ανακινούμενες φιάλες όγκου 250 mL (180±5 rpm), θερμοκρασία 30 ^{o}C, αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης (Glol) 22.5 g/L και γλυκόζης (Glu) 67.5 g/L, αρχικό pH=6.0± 0.1

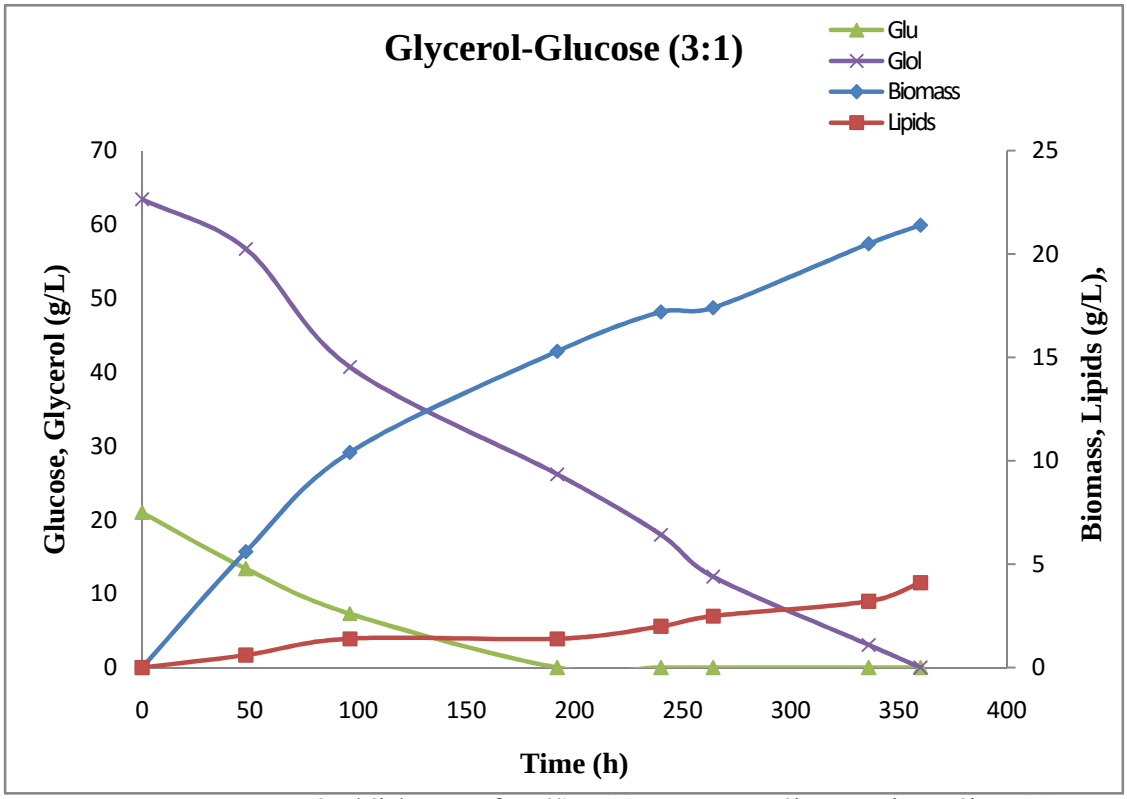
Από τον παραπάνω πίνακα παρατηρούμε ότι τα κυριότερα λιπαρά οξέα για το στέλεχος αυτό είναι το ελαϊκό ($^{\Delta 9}$C18:1) > 49 % και το παλμιτικό οξύ (C16:0) > 26% και ακολουθούν το λινελαϊκό ($^{\Delta 9,12}$C18:2) > 11 %, το παλμιτελαϊκό (C16:1) το στεατικό οξύ (C18:0) και το α-λινολενικό οξύ (C18:3). Παρατηρούμε ότι με το πέρας της ζύμωσης υπάρχει μια μικρή μείωση του ελαϊκού και του παλμιτικού οξέος ενώ παρατηρείται αύξηση του ποσοστού του λινελαϊκού και του α-λινολενικού οξέος. Σταθερή σύσταση με μικρή ανοδική τάση παρουσιάζουν τα υπόλοιπα λιπαρά οξέα καθόλη την διάρκεια της ζύμωσης. Τέλος μπορούμε να παρατηρήσουμε από τα παραπάνω ότι κατά τη διάρκεια της ζύμωσης αυξάνεται η ακορεστότητα των λιπιδίων.

III.8 Καλλιέργεια της ζύμης *Rhodotorula glutinis* σε μίγμα γλυκερόλης και γλυκόζης με αναλογία 3:1 ($S_{0\ Glol}$ = 67.5 g/L & $S_{0\ Glu}$ = 22.5 g/L)

III.8.1 Κινητική της αύξησης, της κατανάλωσης υποστρώματος και της παραγωγής μεταβολικών προϊόντων.

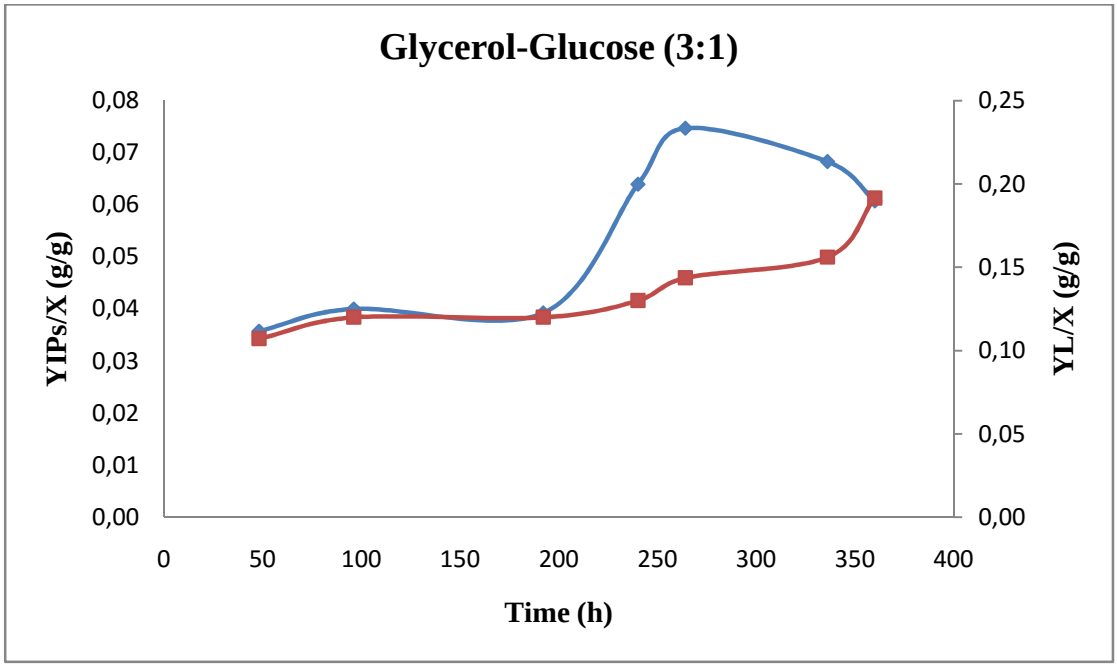
Στο παρακάτω γράφημα **(Γράφημα III.8.1)** παρουσιάζεται η κινητική εξέλιξη της βιομάζας, της κατανάλωσης του υποστρώματος και της παραγωγής μεταβολικών προϊόντων από το ζυμομύκητα *Rhodotorula glutinis* κατά την αύξηση της σε θρεπτικό μέσο με το άζωτο ως το περιοριστικό της αύξησης στοιχείο και πηγή άνθρακα βιομηχανική γλυκερόλη και εμπορική γλυκόζη σε αναλογία 3:1, ενώ στο (**Γράφημα III.8.2**) παρουσιάζεται το ποσοστό του συσσωρευόμενου λίπους του ζυμομύκητα καθώς και των παραγόμενων ενδοπολυσακχαριτών προς την αντίστοιχη βιομάζα κατά την πορεία της ζύμωσης.

Η αρχική συγκέντρωση της γλυκερόλης είναι περίπου 63.4 g/L ενώ της γλυκόζης είναι περίπου 21 g/L. Το αξιοσημείωτο που παρατηρείται είναι η ταυτόχρονη κατανάλωση των δύο υποστρωμάτων και ειδικότερα η προτίμηση της γλυκόζης τις πρώτες ώρες της ζύμωσης και εν συνεχεία της γλυκερόλης μέχρι πλήρης κατανάλωσής της. Η ποσότητας της γλυκόζης εξαντλείται μετά από 190 h ζύμωσης ενώ της γλυκερόλης μετά από 360 h ζύμωσης. Η μέγιστη παραγωγή βιομάζας έφτασε τα 21.4 g/L και παρατηρήθηκε μετά από 360 h ζύμωσης. Όπως παρατηρείται η λιποσυσσώρευση του ζυμομύκητα ήταν μειωμένη (19 %), ενώ η μέγιστη τιμή του ενδοκυτταρικού λίπους έφθασε τα 4.2 g/L μετά από 360 h ζύμωσης. Επιπλέον η σύνθεση ενδοπολυσακχαριτών κινήθηκε σε πολύ χαμηλά επίπεδα (3 - 8 %) με διακυμάνσεις καθόλη τη διάρκεια της ζύμωσης.



Γράφημα ΙΙΙ.8.1: Κινητική εξέλιξη της βιομάζας (♦), της κατανάλωσης γλυκερόλης (×), της κατανάλωσης γλυκόζης (▲) και της παραγωγής λιπιδίων (■) συναρτήσει του χρόνου για το στέλεχος *Rhodotorula glutinis* σε βιομηχανική γλυκερόλη και εμπορική γλυκόζη ως πηγές άνθρακα, σε περιοριστικές σε άζωτο συνθήκες. Συνθήκες καλλιέργειας: ανάπτυξη σε ανακινούμενες φιάλες όγκου 250 mL (180±5 rpm), θερμοκρασία 30 ^{o}C, αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης (Glol) 67.5 g/L, αρχική συγκέντρωση γλυκόζης (Glu) 22.5 g/L αρχικό pH=6.0± 0.1.

Μετά την παραλαβή του ενδοκυτταρικού λίπους από το μικροοργανισμό ακολούθησε η ανάλυση της σύστασης των λιπιδίων σε λιπαρά οξέα με τη βοήθεια του αέριου χρωματογράφου. Η ανάλυση της σύστασης των λιπιδίων σε λιπαρά οξέα πραγματοποιήθηκε επιλεκτικά στα δείγματα που προέκυψαν από τη ζύμωση αυτή. Επιλέχθηκαν δείγματα από το αρχικό στάδιο της ζύμωσης, από την μέση και το τέλος της ζύμωσης. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης από τον αέριο χρωματογράφο φαίνονται στον παρακάτω πίνακα **(Πίνακας ΙΙΙ.8.1).**



Γράφημα ΙΙΙ.8.2: Εξέλιξη του ποσοστού του συσσωρευόμενου ενδοκυτταρικού λίπους ως προς την παραγωγή βιομάζας (♦) και των παραγόμενων ενδοπολυσακχαριτών ως προς την παραγωγή βιομάζας (■) συναρτήσει του χρόνου για το στέλεχος *Rhodotorula glutinis* σε μίγμα ακάθαρτης γλυκερόλης και εμπορικής γλυκόζης, σε περιοριστικές σε άζωτο συνθήκες. Συνθήκες καλλιέργειας: ανάπτυξη σε ανακινούμενες φιάλες όγκου 250 mL (180±5 rpm), θερμοκρασία 30 ^{o}C, αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης (Glol) 67.5 g/L, αρχική συγκέντρωση γλυκόζης (Glu) 22.5 g/L, αρχικό pH=6.0± 0.1.

Πίνακας ΙΙΙ.8.1: Σύσταση των λιπιδίων σε λιπαρά οξέα του ζυμομύκητα *Rhodotorula glutinis* σε μίγμα γλυκερόλης και γλυκόζης σε αναλογία 3:1 (S_{0T} = 90 g/L).

		Λιπαρά οξέα % (w/w)					
	Χρόνος (h)	**C16:0**	**C18:0**	**$^{\Delta 9}$C18:1**	**$^{\Delta 9,12}$C18:2**	**C16:1**	**C18:3**
Glol-Glu: 3/1	96	20.2	1.9	68.2	9.4	0.0	0.3
	240	22.3	3.9	55.5	14.3	2.6	1.3
	336	25.4	2.7	53.9	13.0	2.5	2.5

Συνθήκες καλλιέργειας: ανάπτυξη σε ανακινούμενες φιάλες όγκου 250 mL (180±5 rpm), θερμοκρασία 30 ^{o}C, αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης (Glol) 67.5 g/L και γλυκόζης (Glu) 22.5 g/L, αρχικό pH=6.0± 0.1

Από τον παραπάνω πίνακα παρατηρούμε ότι τα κυριότερα λιπαρά οξέα για το στέλεχος αυτό είναι το ελαϊκό ($^{\Delta 9}$C18:1) > 53 % και το παλμιτικό οξύ (C16:0) > 20% και ακολουθούν το λινελαϊκό ($^{\Delta 9,12}$C18:2) > 9 %, το παλμιτελαϊκό (C16:1) το

στεατικό οξύ (C18:0) και το α-λινολενικό οξύ (C18:3). Παρατηρούμε ότι με το πέρας της ζύμωσης υπάρχει μείωση του ελαϊκού οξέος ενώ παρατηρείται αύξηση του ποσοστού του παλμιτικού και του λινελαϊκού οξέος. Σταθερή σύσταση με μικρή ανοδική τάση παρουσιάζουν τα υπόλοιπα λιπαρά οξέα καθόλη την διάρκεια της ζύμωσης. Τέλος μπορούμε να παρατηρήσουμε από τα παραπάνω ότι κατά τη διάρκεια της ζύμωσης αυξάνεται η ακορεστότητα των λιπιδίων.

III.9 Καλλιέργεια της ζύμης *Rhodotorula glutinis* σε βιοαντιδραστήρα με υπόστρωμα ακάθαρτη γλυκερόλη ($S_{0\ Glol}$ = 90 g/L)

III.9.1 Κινητική της αύξησης, της κατανάλωσης υποστρώματος και της παραγωγής μεταβολικών προϊόντων.

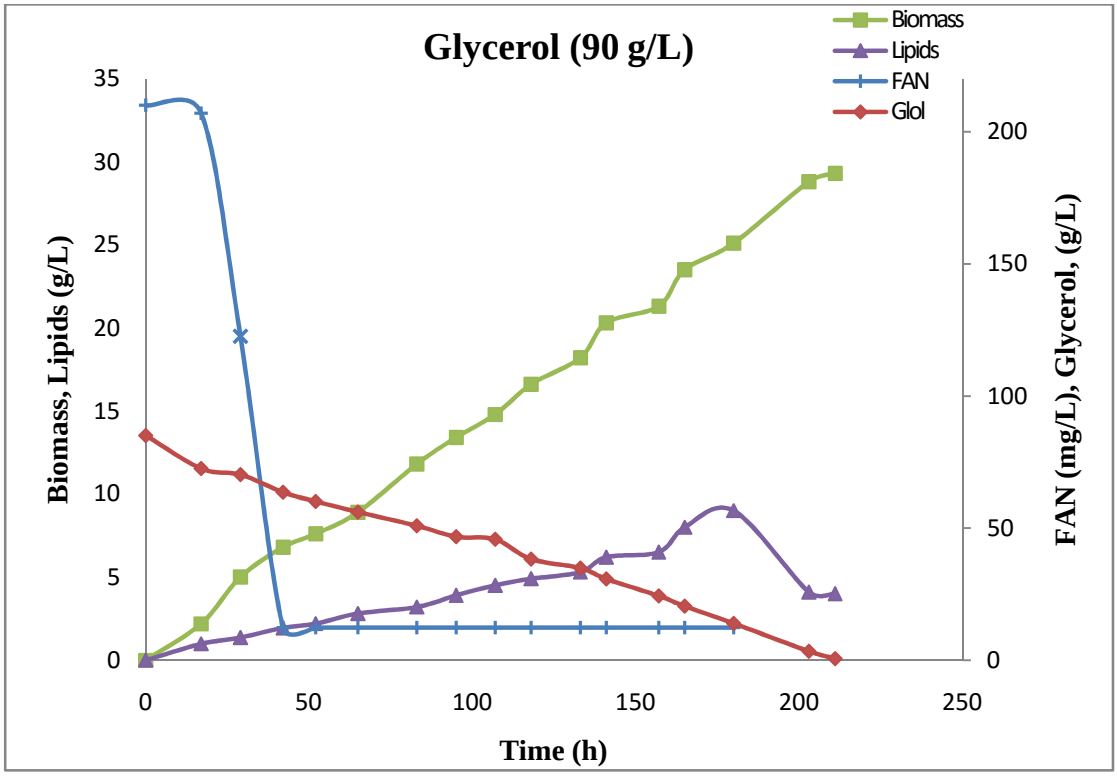
Με βάση τις κινητικές της κυτταρικής αύξησης και της συσσώρευσης ενδοκυτταρικού λίπους των ζυμώσεων που προηγήθηκαν, η καλλιέργεια του ζυμομύκητα σε θρεπτικό μέσο με μόνη πηγή άνθρακα τη γλυκερόλη (90 g/L) εμφάνισε τα περισσότερο ικανοποιητικά αποτελέσματα όσον αφορά την παραγωγή βιομάζας (26.6 g/L) καθώς και τη συσσώρευση μικροβιακού λίπους (L_{max}= 7.1 g/L). Παράλληλα, το ποσοστό της λιποσυσσώρευσης ήταν 36% (0.36 g λίπους ανά g παραγόμενης βιομάζας) και ήταν η υψηλότερη που σημειώθηκε μεταξύ όλων των ζυμώσεων που έλαβαν χώρα. Εξαιτίας των αποτελεσμάτων αυτών επιλέχθηκε να γίνει εφαρμογή της ζύμωσης αυτής (γλυκερόλη 90 g/L) σε βιοαντιδραστήρα χωρητικότητας 3 L και ενεργού όγκου 1.8 L.

Η κινητική της παραγωγής βιομάζας, της κατανάλωσης υποστρώματος και της συσσώρευσης λίπους από τον ζυμομύκητα *Rhodotorula glutinis* όταν αυτός αναπτύχθηκε σε βιοαντιδραστήρα σε θρεπτικό μέσο με μόνη πηγή άνθρακα τη γλυκερόλη (90 g/L) παρουσιάζεται στο παρακάτω γράφημα (**Γράφημα III.9.1**), ενώ στο (**Γράφημα III.9.2**) παρουσιάζεται το ποσοστό του συσσωρευόμενου λίπους του ζυμομύκητα καθώς και των παραγόμενων ενδοπολυσακχαριτών προς την αντίστοιχη βιομάζα κατά την πορεία της ζύμωσης.

Από το γράφημα αυτό φαίνεται ότι ο μικροοργανισμός εμφάνισε ιδιαίτερα ικανοποιητική κυτταρική αύξηση, η οποία έλαβε τη μέγιστη τιμή της 211 h μετά τον

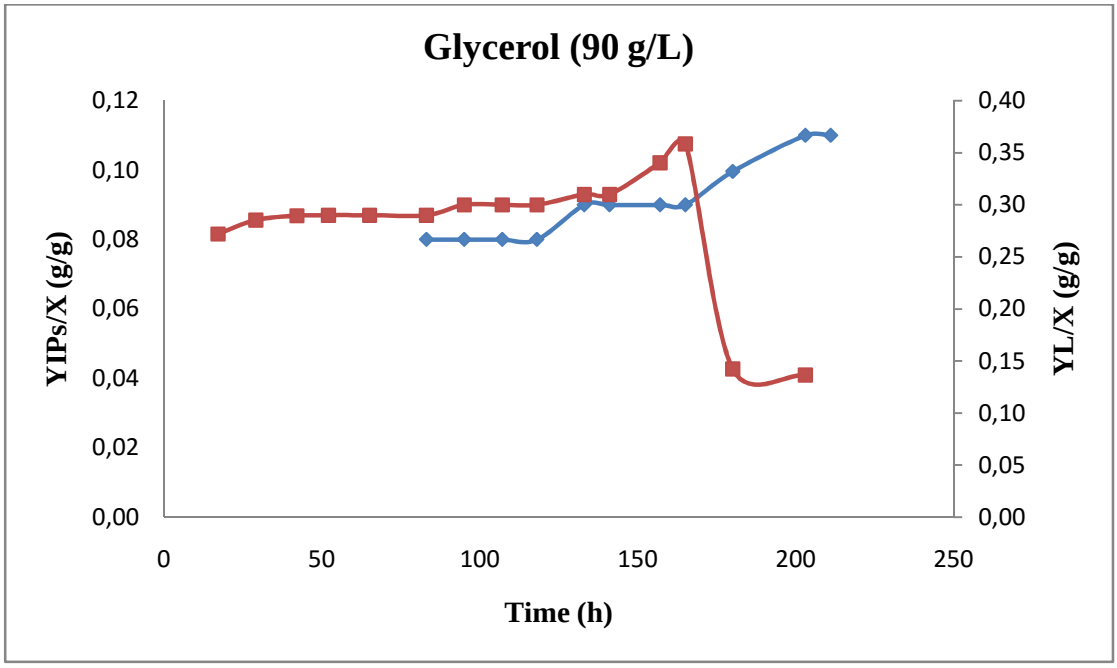
εμβολιασμό, φτάνοντας τα 29.3 g/L. Αξίζει να σημειωθεί ότι η παραγόμενη ποσότητα βιομάζας στο βιοαντιδραστήρα είναι μεγαλύτερη από τη βιομάζα που παρήχθη από το ζυμομύκητα κατά την καλλιέργεια του στις φιάλες στο θρεπτικό υπόστρωμα με γλυκερόλη 90 g/L, η οποία έφτασε τα 26.6 g/L περί τις 360 h. Είναι εμφανές ότι η κυτταρική ανάπτυξη του μικροοργανισμού στο βιοαντιδραστήρα είναι ταχύτερη σε σχέση με τη ζύμωση στις φιάλες με το αντίστοιχο θρεπτικό μέσο.

Η κατανάλωση της γλυκερόλης ξεκινά λίγες ώρες μετά τον εμβολιασμό και καταναλώνεται πλήρως στο τέλος της ζύμωσης (211 h). Σε σύγκριση με την αντίστοιχη καλλιέργεια στις φιάλες, όπου η γλυκερόλη εξαντλείται 360 h μετά τον εμβολιασμό, η κατανάλωση της πηγής άνθρακα προχωρά με γρηγορότερο ρυθμό στον βιοαντιδραστήρα. Όσον αφορά την παραγωγή ενδοκυτταρικού λίπους από τον ζυμομύκητα *Rhodotorula glutinis* στο βιοαντιδραστήρα, η μέγιστη τιμή της φτάνει τα 9.0 g/L περί τις 180 h. Η λιποσυσσώρευση του ζυμομύκητα ήταν 36 %. Η παραγόμενη ποσότητα μικροβιακού λίπους είναι σαφώς αυξημένη σε σχέση με την ποσότητα που παρήχθη στην αντίστοιχη καλλιέργεια στις φιάλες (L_{max} = 7.1 g/L) με τη λιποσυσσώρευση να φτάνει το 34 %. Τέλος η σύνθεση ενδοπολυσακχαριτών κινήθηκε σε επίπεδα της τάξης του 8-9 % καθόλη τη διάρκεια της ζύμωσης, με μικρή αύξηση στο τέλος της φτάνοντας το 11 % και μέγιστη ποσότητα 3.2 g/L.



Γράφημα ΙΙΙ.9.1: Κινητική εξέλιξη της βιομάζας (■), της κατανάλωσης γλυκερόλης (♦), της παραγωγής λιπιδίων (▲) και της κατανάλωσης του ελεύθερου αζώτου (×) (FAN) συναρτήσει του χρόνου για το στέλεχος *Rhodotorula glutinis* σε βιομηχανική γλυκερόλη ως μόνη πηγή άνθρακα, σε περιοριστικές σε άζωτο συνθήκες. Συνθήκες καλλιέργειας: ανάπτυξη σε βιοαντιδραστήρα ενεργού όγκου 1.8 L (150 - 400 rpm), θερμοκρασία 30 ^{o}C, αρχική συγκέντρωση βιομηχανικής γλυκερόλης (Glol) 90 g/L, αρχικό pH=6.0± 0.1.

Μετά την παραλαβή του ενδοκυτταρικού λίπους από το μικροοργανισμό ακολούθησε η ανάλυση της σύστασης των λιπιδίων σε λιπαρά οξέα με τη βοήθεια του αέριου χρωματογράφου. Η ανάλυση της σύστασης των λιπιδίων σε λιπαρά οξέα πραγματοποιήθηκε επιλεκτικά στα δείγματα που προέκυψαν από τη ζύμωση αυτή. Επιλέχθηκαν δείγματα από το αρχικό στάδιο της ζύμωσης, από την μέση και το τέλος της ζύμωσης. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης από τον αέριο χρωματογράφο φαίνονται στον παρακάτω πίνακα **(Πίνακας ΙΙΙ.9.1).**



Γράφημα ΙΙΙ.9.2: Εξέλιξη του ποσοστού του συσσωρευόμενου ενδοκυτταρικού λίπους ως προς την παραγωγή βιομάζας (♦) και των παραγόμενων ενδοπολυσακχαριτών ως προς την παραγωγή βιομάζας (■) συναρτήσει του χρόνου για το στέλεχος *Rhodotorula glutinis* σε ακάθαρτη γλυκερόλη ως μόνη πηγή άνθρακα, σε περιοριστικές σε άζωτο συνθήκες. Συνθήκες καλλιέργειας: ανάπτυξη σε βιοαντιδραστήρα ενεργού όγκου 1.8 L (150 - 400 rpm), θερμοκρασία 30 ^{o}C, αρχική συγκέντρωση βιομηχανικής γλυκερόλης (Glol) 90 g/L, αρχικό pH=6.0± 0.1.

Πίνακας ΙΙΙ.9.1: Σύσταση των λιπιδίων σε λιπαρά οξέα του ζυμομύκητα *Rhodotorula glutinis* σε υπόστρωμα γλυκερόλης ($S_{0\ Glol}$ = 90 g/L).

	Λιπαρά οξέα % (w/w)						
	Χρόνος (h)	**C16:0**	**C18:0**	**$^{\Delta 9}$C18:1**	**$^{\Delta 9,12}$C18:2**	**C16:1**	**C18:3**
Glol 90 g/L	65	18.2	2.0	66.4	11.5	1.5	0.4
	107	25.7	0.0	65.0	6.8	2.2	0.3
	141	34.0	0.0	56.4	5.8	3.8	0.0
	207	29.9	0.0	58.9	7.4	3.8	0.0

Συνθήκες καλλιέργειας: ανάπτυξη σε βιοαντιδραστήρα ενεργού όγκου 1.8 L (150 - 400 rpm), θερμοκρασία 30 ^{o}C, αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης (Glol) 90 g/L, αρχικό pH=6.0± 0.

Από τον παραπάνω πίνακα παρατηρούμε ότι τα κυριότερα λιπαρά οξέα για το στέλεχος αυτό είναι το ελαϊκό ($^{\Delta 9}$C18:1) > 56 % και το παλμιτικό οξύ (C16:0) > 18% και ακολουθούν το λινελαϊκό ($^{\Delta 9,12}$C18:2) > 6 %, το παλμιτελαϊκό (C16:1) το στεατικό οξύ (C18:0) και το α-λινολενικό οξύ (C18:3). Παρατηρούμε ότι με το πέρας της ζύμωσης υπάρχει μείωση του ελαϊκού οξέος και του λινελαϊκού οξέος ενώ παρατηρείται αύξηση του ποσοστού του παλμιτικού και του παλμιτελαϊκού οξέος. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι τόσο το στεατικό όσο και το α-λινολενικό οξύ δεν ανιχνεύονται κατά το πέρας της ζύμωσης. Τέλος μπορούμε να παρατηρήσουμε από τα παραπάνω ότι κατά τη διάρκεια της ζύμωσης μειώνεται η ακορεστότητα των λιπιδίων.

Εικόνα ΙΙΙ.9.1: Μικροβιακό λίπος σε διαλύτη

IV. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η παρούσα ερευνητική μελέτη είχε ως κύριο σκοπό τη διερεύνηση των δυνατοτήτων του μικροοργανισμού *Rhodotorula glutinis* NRRL YB-252 προκειμένου να παράξει μεταβολικά προϊόντα προστιθέμενης αξίας. Ο μικροοργανισμός αυτός χαρακτηρίζεται ελαιογόνος και για το λόγο αυτό το άζωτο αποτελούσε το περιοριστικό στοιχείο της αύξησης, με απώτερο σκοπό την συσσώρευση μικροβιακού λίπους. Σε κάθε περίπτωση η αρχική συγκέντρωση της ακάθαρτης γλυκερόλης και των σακχαρούχων υποπροϊόντων (εμπορική γλυκόζη, φρουκτόζη και ξυλόζη) ήταν 90 g/L, ενώ όλες οι ζυμώσεις έλαβαν χώρα σε υψηλούς λόγους C/N που ευνοείται η λιποσυσσώρευση.

Ως γενικό συμπέρασμα, αξίζει να τονιστεί ότι ο μικροοργανισμός που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη, βρέθηκε ικανός να αποικοδομήσει την ακάθαρτη γλυκερόλη, ως πηγή άνθρακα και ενέργειας, ανεξάρτητα της υψηλής αρχικής συγκέντρωσης της (90 g/L). Παρόμοια ανάπτυξη σε υποστρώματα με πηγή άνθρακα την εμπορική γλυκόζη και φρουκτόζη είχε ο ζυμομύκητας *Rhodotorula glutinis* αποικοδομόντας τα σάκχαρα ανεξάρτητα της υψηλής αρχικής συγκέντρωσης τους (90 g/L). Αντίθετα αποτελέσματα παρατηρήθηκαν σε υπόστρωμα με πηγή άνθρακα την ξυλόζη. Ο μικροοργανισμός παρουσίασε υψηλή φάση υστέρησης ενώ επίσης παρατηρήθηκε παρεμπόδιση από το υπόστρωμα (υψηλή αρχική συγκέντρωση ξυλόζης). Ενδεικτικό του εν λόγω γεγονότος ήταν ότι σε καμία άλλη περίπτωση δεν παρατηρήθηκαν φαινόμενα παρεμπόδισης εκ του υποστρώματος, ενώ η κατανάλωση της πηγής άνθρακα ήταν σχεδόν γραμμική.

Πιο συγκεκριμένα, ο ζυμομύκητας *Rhodotorula glutinis* αυξήθηκε κανονικά σε όλες τις ζυμώσεις όπου το θρεπτικό μέσο αποτελούνταν από ακάθαρτη γλυκερόλη, εμπορική γλυκόζη και μίγματά τους. Γενικότερα μπορεί να λεχθεί πως στην περίπτωση του ζυμομύκητα *Rhodotorula glutinis*, η γλυκερόλη, η γλυκόζη και η φρουκτόζη αποτελούν ιδανικά υποστρώματα ανάπτυξης, ως η μοναδική πηγή άνθρακα για την παραγωγή μικροβιακού λίπους και βιομάζας. Σε ορισμένες περιπτώσεις δε, το μικροβιακό λίπος δύναται να εμφανίζει σύσταση ομοιάζουσα με εκείνη των φυτικών λιπών προοριζόμενα για παραγωγή βιοντίζελ.

Στην παρούσα μελέτη, όταν η μόνη πηγή άνθρακα ήταν η βιομηχανική γλυκερόλη (90 g/L), η μέγιστη τιμή ενδοκυτταρικού λίπους έφθασε τα 7.1 g/L, με το ποσοστό συσσώρευσης ενδοκυτταρικού λίπους προς την παραγώμενη βιομάζα να

είναι $Y_{L/X}$ 0.34. Επιπλέον όταν η πηγή άνθρακα ήταν μόνο η γλυκόζη (control) με αρχική συγκέντρωση (90 g/L), η μέγιστη τιμή ενδοκυτταρικού λίπους έφθασε τα 4.7 g/L, με $Y_{L/X}$ 0.19. Παράλληλα, όταν η πηγή άνθρακα ήταν μόνο η φρουκτόζη (control) με αρχική συγκέντρωση (90 g/L), η μέγιστη τιμή ενδοκυτταρικού λίπους έφθασε τα 2.0 g/L, με $Y_{L/X}$ 0.13. Τέλος, όταν η πηγή άνθρακα ήταν μίγμα γλυκόζης-γλυκερόλης αρχικής συγκέντρωσης 90 g/L σε αναλογία 1:1, η μέγιστη τιμή ενδοκυτταρικού λίπους έφθασε τα 4.6 g/L, με $Y_{L/X}$ 0.23, σε αναλογία 1:3, η μέγιστη τιμή ενδοκυτταρικού λίπους έφθασε τα 4.1 g/L, με $Y_{L/X}$ 0.19, ενώ σε αναλογία 3:1, η μέγιστη τιμή ενδοκυτταρικού λίπους έφθασε τα 4.4 g/L, με $Y_{L/X}$ 0.22. Η παραγωγή μικροβιακού λίπους ήταν σαφώς περισσότερη στο θρεπτικό μέσο που περιείχε μόνη πηγή άνθρακα την βιομηχανική γλυκερόλη. Επιπλέον παρατηρήθηκε ότι η προσθήκη γλυκόζης στο θρεπτικό μέσο δεν βοήθησε στην αύξηση της λιποσυσσώρευσης. Αν και η γλυκόζη είναι ένα πολύ ευρέως απαντώμενο υλικό και εύκολα αφομοιώσιμο από τους περισσότερους μικροοργανισμούς, φάνηκε ότι η γλυκερόλη ως υπόστρωμα δίνει καλύτερα αποτελέσματα ανάπτυξης και παραγόμενων μεταβολιτών (Papanikolaou et al., 2016). Η ποιοτική ανάλυση του μικροβιακού λίπους του ζυμομύκητα *Rhodotorula glutinis* στον αέριο χρωματογράφο έδειξε πως τα επικρατέστερα λιπαρά οξέα για το μικροοργανισμό αυτό είναι το ελαϊκό οξύ ($^{\Delta 9}$C18:1), το παλμιτικό οξύ (C16:0) και το λινελαϊκό οξύ ($^{\Delta 9,12}$C18:2). Τέλος ακολουθούν το στεατικό (C18:0), το παλμιτελαϊκό οξύ ($^{\Delta 9}$C16:1) και το α-λινολενικό οξύ ($^{\Delta 9,12,15}$C18:3). Σαν γενική παρατήρηση μπορούμε να πούμε, οτι σε όλα τα πειράματα με την εξέλιξη των ζυμώσεων παρατηρείται αύξηση του ποσοστού του λινελαϊκού οξέος ενώ τα ποσοστά του στεατικού, παλμιτελαϊκού και α-λινολενικού οξέος παραμένουν σταθερά. Αντίθετα, τα δύο κυριότερα οξέα το ελαϊκό και παλμιτικό οξύ, παρουσιάζουν διαφορετικές συμπεριφορές κατά την εξέλιξη των ζυμώσεων, που οφείλεται στο διαφορετικό υπόστρωμα του εκάστοτε θρεπτικού μέσου. Ένα επίσης αξιοσημείωτο γεγονός που παρατηρείται είναι όταν χρησιμοποιείται η γλυκερόλη ως υπόστρωμα έχουμε αύξηση της συγκέντρωσης του ελαϊκού οξέος κάνοντας το λάδι "τέλειο" για παραγωγή βιοντίζελ.

Σχήμα IV.1: Δομές στεατικού, ελαϊκού, λινελαϊκού και α-λινολενικού οξέος (Διαδύκτιο, 8)

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης όσον αφορά τη σύσταση των λιπαρών οξέων του μικροβιακού λίπους εμφανίζονται παρόμοια με την μελέτη του Saenge, et al., (2011), οι οποίοι χρησιμοποίησαν ως μόνη πηγή άνθρακα την ακάθαρτη γλυκερόλη για παραγωγή μικροβιακού λίπους. Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται τα ποσοστά των βασικότερων λιπαρών οξέων του μικροβιακού λίπους του ζυμομύκητα *Rhodotorula glutinis* TISTR 5159 του ζυμομύκητα *R. glutinis* ATCC 204091 και του ζυμομύκητα *R. glutinis* NRRL YB-252.

Πίνακας IV.1: Σύσταση λιπαρών οξέων μικροβιακού λίπους.

Λιπαρά οξέα	**(%)**		
Παλμιτικό οξυ (C16:0)	16.8	16.0	19.8
Στεατικό (C18:0)	3.7	21.9	2.3
Ελαϊκό οξύ ($^{\Delta 9}$C18:1)	45.8	18.0	66.1
Λινελαϊκό οξύ ($^{\Delta 9,12}$C18:2)	17.9	15.9	7.7
α-Λινολενικό οξύ ($^{\Delta 9,12,15}$C18:3)	4.3	1.8	1.1
Μικροοργανισμοί	*R. glutinis* TISTR 5159	*R. glutinis* ATCC 204091	*R. glutinis* NRRL YB-252
Αναφορά	Saenge et al, 2011	E.R.Easterling et al, 2009	Παρούσα μελέτη

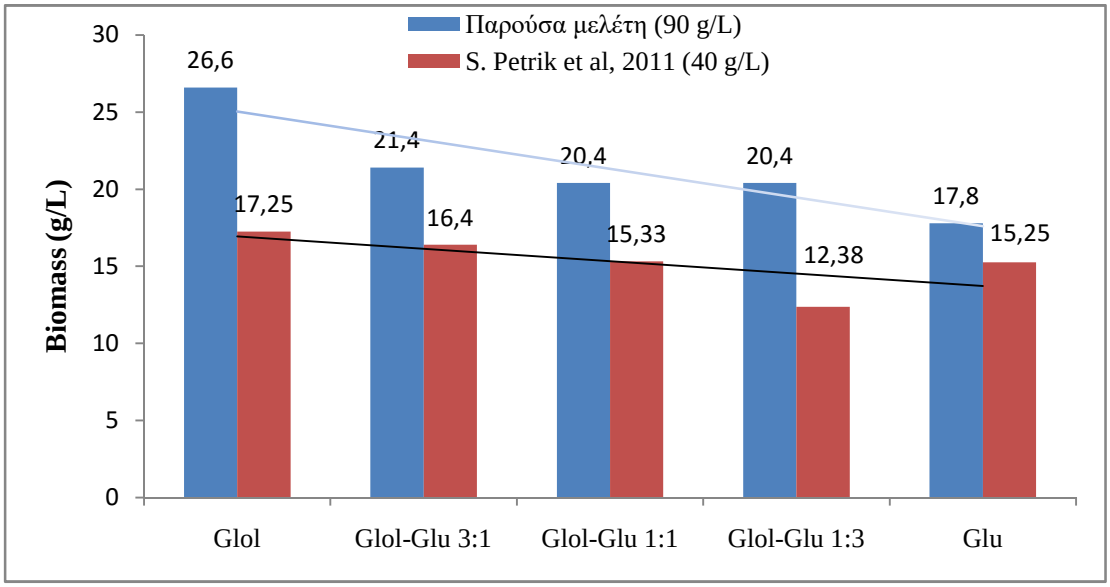
Επιπρόσθετα ο ζυμομύκητας *Rhodotorula glutinis* φάνηκε να αξιοποιεί την πηγή άνθρακα (γλυκερόλη - γλυκόζη - φρουκτόζη) ανεξαρτήτως αρχικής

συγκέντρωσης για την παραγωγή μεγάλης ποσότητας βιομάζας. Η μέγιστη ποσότητα βιομάζας για τις ζυμώσεις με πηγή άνθρακα την βιομηχανική γλυκερόλη έφθασε τα 26.6 g/L ενώ με την εμπορική γλυκόζη και φρουκτόζη τα 17.8 g/L και 18.2 g/L αντίστοιχα. Παρόμοια ήταν τα αποτελέσματα για τις ζυμώσεις με πηγή άνθρακα μίγμα γλυκόζης - γλυκερόλης σε αναλογίες 1:1, 1:3 και 3:1, στις οποίες είχαμε μέγιστες τιμές 20.4 g/L, 21.4 g/L και 20.4 g/L αντίστοιχα. Φάνηκε ότι ο ζυμομύκητας *Rhodotorula glutinis* καταναλώνοντας ακάθαρτη γλυκερόλη ως μόνη πηγή άνθρακα, παράγει μεγαλύτερες συγκεντρώσεις βιομάζας σε σύγκριση με τα σακχαρούχα υποπροϊόντα (γλυκόζη - φρουκτόζη - ξυλόζη) ως πηγή άνθρακα. Στη διεθνή βιβλιογραφία από τις λίγες μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί με ακάθαρτη γλυκερόλη ως μόνη πηγή άνθρακα για ζυμώσεις βυθού, φαίνεται ότι η κυτταρική αύξηση του *Rhodotorula glutinis* επηρεάζεται τόσο από είδος του υποστρώματος και την αρχική συγκέντρωση του, όσο και από την πηγή αζώτου και το χρόνο ζύμωσης. Σαν γενικό συμπέρασμα, η κατανάλωση της γλυκερόλης ως υπόστρωμα παρουσιάζει μεγαλύτερο χρόνο υστέρησης σε σχέση με πηγές άνθρακα, όπως η γλυκόζη και η φρουκτόζη. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα σε ζυμώσεις με μικρές αρχικές συγκεντρώσεις υποστρώματος (π.χ. 30 g/L), η κυτταρική αύξηση να είναι μειωμένη σε σχέση με τις ζυμώσεις όπου η πηγή άνθρακα θα ήταν η γλυκόζη ή η φρουκτόζη. Οι Hong-Wei et al., (2012) παρατήρησαν ότι σε ζυμώσεις με γλυκερόλη και γλυκόζη (S_0 = 30 g/L), η παραγωγή βιομάζας ήταν σαφώς μικρότερη στη ζύμωση όπου το θρεπτικό μέσο περιείχε γλυκερόλη. Αντίθετα σε ζυμώσεις με μεγάλες αρχικές συγκεντρώσεις υποστρώματος (π.χ. 90 g/L), η κυτταρική αύξηση είναι πολύ μεγαλύτερη, όταν το θρεπτικό μέσο αποτελείται από γλυκερόλη σε σχέση με τη γλυκόζη και την φρουκτόζη, καθώς ο αυξημένος χρόνος ζύμωσης επιτρέπει στην καλύτερη αφομοίωση της ακάθαρτης γλυκερόλης. Επιπλέον στην παρούσα μελέτη στις ζυμώσεις με γλυκερόλη και γλυκόζη και οι δύο πηγές άνθρακα καταναλώνονταν ταυτόχρονα από τον ζυμομύκητα *Rhodotorula glutinis* σε αντίθεση με τον ζυμομύκητα *Yarrowia lipolytica*, όπου κυρίως αναλωνόταν η γλυκερόλη και κατόπιν η γλυκόζη, και του *Rhodosporidium toruloides* όπου πρώτα αναλωνόταν η γλυκόζη (Bommareddy et al., 2015; Papanikolaou et al., 2002, 2015).

Στο παρακάτω γράφημα **(Γράφημα IV.1)** γίνεται σύγκριση της πορείας της παραγόμενης βιομάζας δύο διαφοτερικών στελεχών του ζυμομύκητα *Rhodotorula glutinis* σε υπόστρωμα ακάθαρτης γλυκερόλης και σε διαφορετικές αρχικές

συγκεντρώσεις υποστρώματος, καθώς και σύκγριση της πορείας της κυτταρικής αύξησης των στελεχών, όταν το θρεπτικό μέσο αποτελείται μόνο από γλυκόζη ή σε μίγμα με ακάθαρτη γλυκερόλη. Παρατηρείται ότι όσο αυξάνεται η αρχική συγκέντρωση του θρεπτικού μέσου, τόσο μεγαλύτερη κυτταρική αύξηση επιτυγχάνεται και από τα δύο στελέχη, ιδιαίτερα όταν η πηγή άνθρακα του μέσου αποτελείται μόνο από ακάθαρτη γλυκερόλη. Επιπλέον, η κυτταρική αύξηση και των δύο στελεχών παρουσιάζει πτωτική πορεία όταν στο θρεπτικό μέσο γίνεται προσθήκη γλυκόζης. Όπως προαναφέραμε, αυτή η πορεία παρατηρείται όταν η αρχική συγκέντρωση του θρεπτικού μέσου ξεπερνά μία κατώτατη τιμή συγκέντρωσης υποστρώματος (30-40 g/L).

Γράφημα IV.1: Πορεία της παραγόμενης βιομάζας των ζυμομυκήτων *R.glutinis*-CCY 20-2-26 και *R. glutinis* NRRL YB-252 σε υποστρώματα ακάθαρτης γλυκερόλης, γλυκόζης και μίγματα τους σε διάφορες αναλογίες.



Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρατηρήθηκε κατά την ζύμωση του *Rhodotorula glutinis* σε υπόστρωμα φρουκτόζης αρχικής συγκέντρωσης 90 g/L. Η κυτταρική αύξηση του ζυμομύκητα ομοίαζε με την ζύμωση σε υπόστρωμα γλυκόζης. Αντιθέτα, η παραγωγή δευτερογενών προϊόντων διέφερε σημαντικά. Η παραγωγή μικροβιακού λίπους ήταν σχεδόν η μισή φθάνοντας τα 2.0 g/L. Επιπλέον, παρατηρήθηκε παρόμοια παραγωγή αραβιτόλης (4.6 g/L) αντί (4 g/L) στην γλυκόζη, ενώ το αξοιοσημείωτο ήταν η παραγωγή ικανοποιητικής ποσότητας μαννιτόλης φτάνοντας

τα 9.8 g/L μετά από 264 h ζύμωσης. Σε αυτό το σημείο πρέπει να αναφέρουμε, ότι η ύπαρξη πολυολών, ιδιαιτέρως της μαννιτόλης, σε ζυμώσεις βυθού του ζυμομύκητα *Rhodotorula glutinis*, δεν έχει αναφερθεί στην διεθνή βιβλιογραφία. Αντίθετα, έχουν αναφερθεί για το γένος *Rhodotorula*, παραγωγή ξυλιτόλης από υπόστρωμα ξυλόζης. Η αραβιτόλη είναι εναντιομερές της ξυλιτόλης, έχει προσδιοριστεί ως μια από τις κορυφαίες δώδεκα χημικές δομικές ουσίες που προέρχονται από την βιομάζα. 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. 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). Η μαννιτόλη 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 διαφόρους 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.

Στη διεθνή βιβλιογραφία υπάρχουν λίγες μελέτες στις οποίες στελέχη του ζυμομύκητα *Rhodotorula glutinis* χρησιμοποιούνται σε υποστρώματα ακάθαρτης γλυκερόλης για παραγωγή μικροβιακού λίπους. Αντίθετα υπάρχουν πολλές μελέτες στις οποίες στελέχη του ζυμομύκητα καταναλώνουν πληθώρα υποστρωμάτων (γλυκόζη, δεξτρόζες, ξυλόζη, μελάσα, τυρόγαλα, υγρά απόβλητα όξινου γλουταμινικού νατρίου), για την παραγωγή καροτενοειδών, ενζύμων και λιπιδίων [Alvarez et al., (1992); Cheirslip, et al., (2012); Saenge et al., (2011) Davoli et al., (2004); Easterling et al., (2009); Lopes da Silva et al., (2011); Papaparaskevas et al., (1992); Taskin, (2012); Roadjnakamolson and Suntornsuk, (2010)]. Πιο συγκεκριμένα, οι Saenge, et al., (2011) χρησιμοποίησαν ως μόνη πηγή άνθρακα

ακάθαρτη γλυκερόλη, για την παραγωγή λιπιδίων και καροτενοειδών με το ζυμομύκητα *Rhodotorula glutinis* TISTR 5159. Ως πηγή αζώτου χρησιμοποίησαν θειϊκό αμμώνιο και Tween 20 σε fed-batch ζυμώση, παράγωντας 6.05 g/L λιπίδια με ποσοστό λιποσυσσώρευσης 60.7% και 135.25 mg/L καροτενοειδή.

Στην παρούσα μελέτη, με βάση τις κινητικές της κυτταρικής αύξησης και της συσσώρευσης ενδοκυτταρικού λίπους των ζυμώσεων βυθού που προηγήθηκαν στην παρούσα μελέτη, η καλλιέργεια του ζυμομύκητα στη γλυκερόλη εμφάνισε τα περισσότερο ικανοποιητικά αποτελέσματα και για το λόγο αυτό επιλέχθηκε η συγκεκριμένη ζύμωση για να πραγματοποιηθεί σε βιοαντιδραστήρα. Έτσι, ο εν λόγω ζυμομύκητας κατά την καλλιέργεια του στο βιοαντιδραστήρα εμφάνισε ιδιαίτερα ικανοποιητική κυτταρική αύξηση, η οποία έλαβε τη μέγιστη τιμή της 211 h μετά τον εμβολιασμό, φτάνοντας τα 29.3 g/L. Η ποσότητα αυτή της παραγόμενης βιομάζας είναι αντίστοιχη με αυτή που παρήγαγε ο μικροοργανισμός κατά την καλλιέργεια του στις φιάλες με το ίδιο θρεπτικό μέσο, όπου ήταν 26.6 g/L. Ωστόσο, η ζύμωση στο βιοαντιδραστήρα φαίνεται να εξελίσσεται με ταχύτερο ρυθμό, αφού στις φιάλες η μέγιστη παραγωγή βιομάζας σημειώνεται μετά το πέρας των 360 h.

Εικόνα IV.1: Εξέλιξη της ζύμωσης του ζυμομύκητα R. glutinis σε ακάθαρτη γλυκερόλη (πάνω αριστερά: θρεπτικό μέσο πριν τον εμβολιασμό, πάνω δεξιά: θρεπτικό μέσο μετά από 200 h ζύμωσης, κάτω: παραγώμενη βιομάζα όλου του βιοαντιδραστήρα).

Η μέγιστη παραγωγή ενδοκυτταρικού λίπους (L_{max}) ήταν 9.0 g/L με ποσοστό λιποσυσσώρευσης 36%. Παρατηρείται ότι και στον βιοαντιδραστήρα το μέγιστο ποσοστό λιποσυσσώρευσης αγγίζει το 36%, οδηγούμενοι στο συμπέρασμα ότι το συγκεκριμένο στέλεχος δεν δύναται ενδοκυτταρικά να συσσωρεύσει μεγαλύτερα ποσά λίπους. Μάλιστα παρατηρείται και ανακατανάλωση του παραγόμενου μικροβιακού λίπους όταν η πηγή άνθρακα μειωθεί κάτω από 10 g/L. Στον παρακάτω πίνακα **(Πίνακας IV.2)** παρουσιάζονται οι μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί με διαφορετικά στελέχη του *Rhodotorula glutinis* για παραγωγή μικροβιακού λίπους σε ποικίλα υποστρώματα.

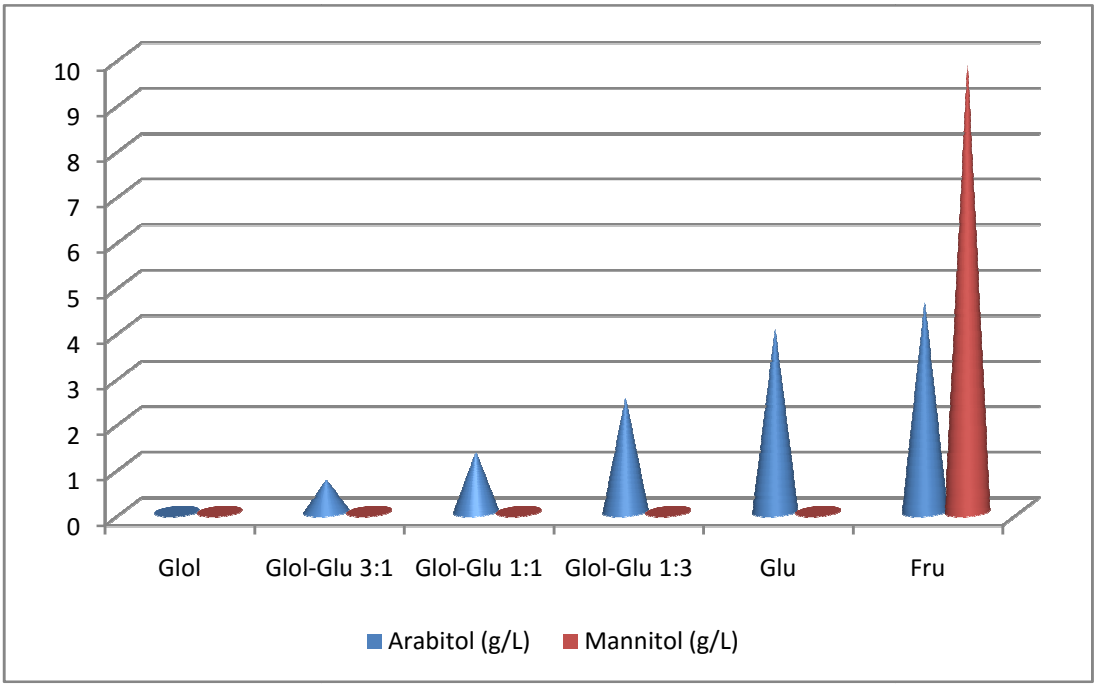
Πίνακας IV.2: Παραγόμενη βιομάζα και λιποσυσσώρευση διαφόρων στελεχών του *R. glutinis* κατά την καλλιέργεια τους σε διάφορα υποστρώματα.

Στέλεχος	X (g/L)	Lipid content %	Πηγή C	Τύπος διεργασίας	Αναφορά
***R. glutinis* ATCC 204091**	-	25.0	Pure glycerol	Flasks	Easterling et al, 2009
***R. glutinis* CCY 20-2-26**	17.3	17.0	Raw glycerol	Flasks	Petrik et al, 2013
***R. glutinis* BCRC 22360**	14.8	36.5	Raw glycerol	Batch bioreactor	Yen et al, 2012
***R. glutinis* TISTR 5159**	13.8	60.7	Raw glycerol	Fed-batch bioreactor	Saenge et al, 2011
R. glutinis	25.0	20.0	Glucose + MSG wastewater	Fed-batch bioreactor	Xue et al, 2008
R. glutinis	18.1	34.2	Populus euramevicana cv leaves	Batch bioreactor	Tao et al, 2010
***R. glutinis* ATCC 15125**	7.4	10.0	Glucose + Brewery effluents	Flasks	Schneider et al, 2013
R. glutinis	60.0	30.0	Starch wastewater	Batch bioreactor	Xue et al, 2010
***R. glutinis* CGMCC 2703**	70.8	47.2	Cornccob hydrolysate	Fed-batch bioreactor	Liu et al, 2015
***R. glutinis* NRRL YB-252**	29.3	36.0	Raw glycerol	Batch bioreactor	Παρούσα μελέτη

Τα αποτελέσματα της παρούσας ερευνητικής μελέτης δεικνύουν ότι ο ζυμομύκητας *Rhodotorula glutinis* NRRL YB-252 κατά την καλλιέργεια του σε ακάθαρτη γλυκερόλη δύναται να αναπτυχθεί ικανοποιητικά και να συσσωρεύσει σημαντικές ποσότητες ενδοκυτταρικού λίπους. Το κόστος και η απόδοση των παραγόμενων προϊόντων σε μικροβιακές καλλιέργειες επηρεάζονται σε σημαντικό βαθμό από την πηγή άνθρακα που χρησιμοποιείται. Οπότε, απαιτείται να εντοπιστούν πηγές διαθεσίμων 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). Γι αυτό το λόγο, η μετατροπή της ακάθαρτης γλυκερόλης σε προϊόντα υψηλής προστιθέμενης αξίας μέσω χημικής ή βιοτεχνολογικής τεχνολογίας ελκύει το ενδιαφέρον όλων (Chi et al., 2007).

Ο ζυμομύκητας *Rhodotorula glutinis* αναπτύχθηκε επιτυχώς σε όλα τα υποστρώματα που δοκιμάστηκε. Η κυτταρική του αύξηση φάνηκε να ευνοείται από την ακάθαρτη γλυκερόλη, η οποία ήταν αρκετά μεγαλύτερη από το control. Η παραγωγή μικροβιακού λίπους ήταν επίσης μεγαλύτερη στο υπόστρωμα με ακάθαρτη γλυκερόλη σε σχέση με τα control. Το ίδιο παρατηρήθηκε και στη συγκέντρωση των ενδοπολυσακχαριτών. Αντίθετα, στα υποστρώματα με γλυκόζη και φρουκτόζη (control) παρατηρήθηκε η παραγωγή πολυολών (αραβιτόλη, μαννιτόλη). Μάλιστα παρατηρήθηκε ότι η γλυκόζη ήταν υπεύθυνη για την παραγωγή της αραβιτόλης, καθώς μικρή ποσότητα παραγόμενης αραβιτόλης παρατηρήθηκε και στα μίγματα γλυκόζης-γλυκερόλης. Ενώ παρουσία μαννιτόλης παρατηρήθηκε μόνο σε θρεπτικό μέσο που αποτελούνταν από φρουκτόζη. Τέλος, σε όλα τα παραπάνω πειράματα ο ζυμομύκητας συσσώρευσε TAGs, ενώ μετά από κλασμάτωση του μικροβιακού λίπους παρατηρήθηκε ότι πάνω από το 80% των ολικών λιπιδίων (TL) αποτελούνται από ουδέτερα λιπίδια (NL).

Γράφημα IV.2: Απεικόνιση παραγόμενων πολυολών του ζυμομύκητα *R. glutinis*.



Συμπερασματικά, η παραγωγή πολύτιμων λιπιδίων από την αξιοποίηση βιομηχανικών παραπροϊόντων (ακάθαρτη γλυκερόλη) καθώς και η δυνατότητα παραγωγής εναλλακτικών βιοκαυσίμων (βιοντήζελ 2^{ης} γενιάς), αποτελεί σημαντικό επίτευγμα για την βιοτεχνολογία των τροφίμων και οδηγεί στην αναβάθμιση του περιβάλλοντος και της οικονομίας. Το είδος της ακάθαρτης γλυκερόλης και η σύστασή της είναι σημαντικοί παράγοντες που επηρεάζουν τις βιοτεχνολογικές διεργασίες. Όμως, η αυξανόμενη παραγωγή βιοντήζελ στο μέλλον, καθιστά αναγκαία την εύρεση αποτελεσματικών βιοεφαρμογών αξιοποίησής της γλυκερόλης, μετατρέποντάς την σε προϊόντα υψηλής προστιθέμενης αξίας.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Abghari, A., and Chen, S., (2014) *Yarrowia lipolytica* as an oleaginous cell factory platform for production of fatty acid-based biofuel and bioproducts. *Front Energy Res*, doi: 10.3389/fenrg.2014.00021.

Afnor, (1984) Recueil desnormes francaises des corps gras, grains oleagineux et prodnits derives (3rd ed.), *Association Francaise pour Normalisation*, Paris p. 95.

Aggelis, G., Komaitis, M., Papanikolaou, S., Papadopoulos, G., (1995a) A mathematical model for the study of lipid accumulation in oleaginous microorganisms. I. Lipid accumulation during growth of *Mucor circinelloides* CBS 172-27 on a vegetable oil. *Gracas y Aceites*, 46:169–173.

Aggelis, G., Komaitis, M., Papanikolaou, S., Papadopoulos, G., (1995b) A mathematical model for the study of lipid accumulation in oleaginous microorganisms. II. Study of cellular lipids of *Mucor circinelloides* during growth on a vegetable oil. *Gracas y Aceites*, 46: 245–250.

Aksu, Z., & Eren, A.T., (2007). Production ofcarotenoids by the isolated yeast of *Rhodotorula glutinis*. Biochemical Engineering Journal, 35, 107–113.

Angerbauer, C., Siebenhofer, M., Mittelbach, M., Guebitz, G. M., (2008) Conversion of sewage sludge into lipids by *Lipomyces starkeyi* for biodiesel production. *Bioresour. Technol*, 99:3051–3056.

Alper, H., Stephanopoulos G., (2009) Engineering for biofuels: exploiting innate microbial capacity or importing biosynthetic potential? *Nature Reviews Microbiology*,**7**: 715-723.

Alvarez, R.M., Rodriguez, B., Romano, J.M., Diaz, A. O., omez, E., Miro, D., Navarro, L., Saura, G., & Garcia, J.L. (1992). Lipid accumulation in *Rhodotorula glutinis* on sugar cane molasses in single-stage continous culture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 8, 214–215.

André, A., Diamantopoulou, P., Philippoussis, A., Sarris, D., Komaitis, M., Papanikolaou, S., (2010) Biotechnological conversions of bio-diesel derived waste glycerol into added-value compounds by higher fungi: production of biomass, single cell oil and oxalic acid. *Industrial Crops and Products*, 31:407–416.

André, A., Chatzifragkou, A., Diamantopoulou, P., Sarris, D., Philippoussis, A., Galiotou-Panayotou, M., Komaitis, M., Papanikolaou, S., (2009) Biotechnological conversions of bio-diesel-derived crude glycerol by *Yarrowia lipolytica* strains. *Eng Life Sci*, 9:468-478.

Belitz Hans Dieter, Grosch Werner and Schieberle Peter, (2009) Food Chemistry [Book]. - [s.l.] : S pringer-Verlag Berlin Heidelberg,. - 4th Edition. - 978-3-540-69933-0.

Bommareddy, R., Sabra, W., Maheshwari, G. and An-Ping Zeng, (2015) Metabolic network analysis and experimental study of lipid production in *Rhodosporidium toruloides* grown on single and mixed substrates. *Microbial Cell Factories*, 14:36.

Boulton, C., Ratledge, C., (1981) Correlation of lipid accumulation in yeasts with possession of ATP-citrate lyase. *J. Gen. Microbiol*, 127:169–176.

Bhosale, P., & Gadre, R.V., (2001a). Production of b-carotene by a mutant of *Rhodotorula glutinis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 55, 423–427.

Bhosale, P., Jogdand, V.V., & Gadre, R.V., (2003). Stability of b-carotene in spray dried preparation of *Rhodotorula glutinis* mutant 32. *Journal of Applied Microbiology*, 95, 584–590.

Braunwald, T., Schwemmlein, L., Graeff-Hönninger, S., French, W. T., Hernandez, R., Holmes, W. E., & Claupein, W., (2013). Effect of different C/N ratios on carotenoid and lipid production by *Rhodotorula glutinis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *97*(14), 6581–6588.

Buzzini, R., & Martini, A., (1999). Production of carotenoids by strain of *Rhodotorula glutinis* cultured in raw materials of agro- industrial origin. *BioresourceTechnology*, 71, 41–44.

Buzzini, P., (2000). An optimization study of carotenoid production by *Rhodotorula glutinis* DBVPG3853 from substrates containing concentrated rectified grape must as the sole carbohydrate source. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 24, 41–45.

Canli, O., Erdal, S., Taskin, M., & Kurbanoglu, E.B. (2011). Effects of extremely low magnetic field on the production of invertase by *Rhodotorula glutinis*. *Toxicology & Industrial Health*, 27(1), 35–39.

Chi, Z., Pyle, D.J., Wen, Z., Frear, C., Chen, S., (2007) A laboratory study of producing docosahexanoic acid from biodiesel-waste glycerol by microalgal fermentation. *Proc Biochem*, 42: 1537-1545.

Cheirslip, B., Kitcha, S., & Torpee, S. (2012). Co-culture of an oleaginous yeast *Rhodotorula glutinis* and a microalga *Chlorella vulgaris* for biomass and lipid production using pure and crude glycerol as a sole carbon source. *Annals of Microbiology*, 62, 987–993.

Chang, G., Luo, Z., Gu. S., Wu, Q., Chang, M., Wang, X., (2013) Fatty acid shifts and metabolic activity changes of *Schizochyrium* sp. S31 cultured on glycerol. *Bioresour Technol*, 142:255-260.

Chatzifragkou, A., Makri, A., Belka ,A., Bellou, S., Mavrou, M., Mastoridou, M., Mystrioti, P., Onjaro, G., Aggelis, G., Papanikolaou, S., (2011a) Biotechnological conversions of biodiesel derived waste glycerol by yeast and fungal species. *Energy*, 36:1097-1108.

Chen, H.C., Chang, C.C., (1996) Production of g-linolenic acid by the fungus *Cunninghamella echinulata* CCRC 31840. *Biotechnol. Prog*, 12: 338–341.

Davies, R.J., Holdsworth, J.E., (1992) Synthesis of lipids in yeasts: Biochemistry, physiology and production. *Adv. Appl. Lipid Res*, 1:119–159.

Davoli, P., Mierau, V., & Weber, R.W.S. (2004). Carotenoids and fatty acids in red yeast *Sporobolomyces roseus* and *Rhodotorula glutinis*. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 40(4), 392–397.

Dedyukhina, E.G., Chistyakova, T.I., Kamzolova, S.V., Vinter, M.V., Vainshtein, M.B., (2012) Arachidonic acid synthesis by glycerol-grown *Mortierella alpine*. *Eur J Lipid Sci Technol*, 114: 833-841.

Dedyukhina, E.G., Chistyakova, T.I., Mironov, A.A., Kamzolova, S.V., Morgunov, I.G., Vainshtein, M.B., (2014) Arachidonic acid synthesis from biodiesel-derived waste by *Mortierella alpina*. *Eur J Lipid Sci Technol*, 116: 429-437.

Diamantopoulou, P., Papanikolaou, S., Kapoti, M., Komaitis, M., Aggelis, G., Philippoussis, A., (2012a) Mushroom polysaccharides and lipids synthesized in liquid agitated and static cultures. Part I: Screening various mushroom species. *Appl Biochem Biotechnol*, 167:536-551.

Diamantopoulou, P., Papanikolaou, S., Katsarou, E., Komaitis, M., Aggelis, G., Philippoussis, A., (2012b) Mushroom polysaccharides and lipids synthesized in liquid agitated and static cultures. Part II: study of Volvariella volvacea. *Appl Biochem Biotechnol*, 167, 1890-1906.

Diamantopoulou, P., Papanikolaou, S., Komaitis, M., Aggelis, G., Philippoussis, A., (2014) Patterns of major metabolites biosynthesis by different mushroom fungi grown on glucose-based submerged cultures. *Bioproc Biosyst Eng*, 37:1385-1400.

Didem Ozcimen and Sevil Yucel, (2011). Novel Methods in Biodiesel Production, Biofuel's Engineering Process Technology, Dr. Marco Aurelio Dos Santos Bernardes (Ed.), ISBN: 978-953-307-480-1.

Duarte, S.H., de Andradea, C.C.P., Ghiselli, S., Maugeri, F., (2013a) Exploration of Brazilian biodiversity and selection of a new oleaginous yeast strain cultivated in raw glycerol. *Bioresour Technol*, 138:377-318.

Duarte, S.H., Ghiselli, S., Maugeri, F., (2013b) Influence of culture conditions on lipid production by *Candida* sp. LEB-M3 using glycerol from biodiesel synthesis. *Biocatal Agric Biotechnol*, 2:339-343.

Dworecka-Kaszak,B., & Kizerwetter-Swida,M. (2011). Pseudomycelium forming *Rhodotorula*–unusual picture of biofilm. *Mikologua Lekarska*, 18(2), 74–78.

Easterling, E.R., French, W.T., Herna´ndez, R., & Licha, M. (2009). The effect of glycerol as a sole and secondary substrate on the growth and fatty acid composition of *Rhodotorula glutinis*. *Bioresource Technology*, 100, 356–361.

Ethier, S., Woisard, K., Vaughan, D., Wen, Z., (2011) Continuous culture of the microalgae *Schizochytrium limacinum* on biodiesel-derived crude glycerol for producing docosahexaenoic acid. *Bioresour Technol*, 102:88-93.

Evans, C.T., Scragg, A.H., Ratledge, C., (1983) A comparative study of citrate efflux from mitochondria of oleaginous and non-oleaginous microorganisms. *Eur. J. Biochem*, 130: 195–204.

Fakas, S., Papanikolaou, S., Galiotou-Panayotou, M., Komaitis, M., Aggelis, G., (2006) Lipids of *Cunninghamella echinulata* with emphasis to gamma-linolenic acid distribution among lipid classes. *Appl Microbiol Biotechnol*, 73:676-83.

Fakas, S., Papanikolaou, S., Galiotou-Panayotou, M., Komaitis, M., Aggelis, G., (2009a) Biochemistry and biotechnology of single cell oil, in: Pandey, A., Larroche, C., Soccol, C.R., Dussard, C.G. (Eds.), New Horizons in Biotechnology, *Asia Tech Publishers Inc., New Delhi (India*), pp. 38–60.

Fakas, S., Papanikolaou, S., Batsos, A., Galiotou-Panayotou, M., Mallouchos, A., Aggelis, G., (2009b) Evaluating renewable carbon sources as substrates for single cell oil production by *Cunninghamella echinulata* and *Mortierella isabellina. Biomass Bioenerg***,** 33:573-580.

Fazenda, M.L., Seviour, R., Moniel, B., Harvey, L.M., (2008) Submerged culture fermentation of higher fungi: The macrofungi. *Avl Appl Microbiology*, 63:33-103.

Fell JW, Boekhout T, Fonseca A, Scorzetti G, Statzell-Tallman A., (2000) Biodiversity and systematics of basidiomycetous yeasts as determined by large-subunit rDNA D1/D2 domain sequence analysis. *Int J Syst Evol Microbiol*, 3:1351-71.

Fontanille, P., Kumar, V., Christophe, G., Nouaille, R., Larroche, C., (2012) Bioconversion of volatile fatty acids into lipids by the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica*. *Bioresour Technol*, 114:443-449.

Folch, J., Lees, M., G., S.S., (1957) A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem*, 199, 833-841.

Frengova, G., Simova, E., & eshkova, D. (1997). Caroteno-protein and exopolysaccharide production by co-cultures of *Rhodotorula glutinis* and *Lactobacillus helveticus*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 18, 272–277.

Galafassi, S., Cucchetti, D., Pizza, F., Franzosi, G., Bianchi, D., Compagno, C., (2012) Lipid production for second generation biodiesel by the oleaginous yeast *Rhodotorula graminis*. *Bioresource Technology*, 111:398-403.

Galiotou-Panayotou, M., Kalatzi, O., Aggelis, G., (1998) Modelling of simultaneous production of polygalactorunase and exopolysaccharide by *Aureobasidium pullulans* ATHUM 2915. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 73:155–162.

Gern, R.M.M., Wisbeck, E., Rampinelli, J.R., Ninow, J.L., Furlan, S.A., (2008) Alternative medium for production of *Pleurotus ostreatus* biomass and potential antitumor polysaccharides. *Bioresource Technology*, , 99:76–82.

Hernandez-Almanza, A., Montanez, J. C., Aguilar-Gonzalez, M. a., Martmez-Avila, C., Rodriguez-Herrera, R., & Aguilar, C. N. (2014). *Rhodotorula glutinis* as source of pigments and metabolites for food industry. *Food Bioscience*, *5*, 64–72.

Horrobin D.F. (1992). Nutritional and medical importance of gamma-linolenic acid. *Progress in Lipid Research* 31, 163-194.

Jeffries, T. W. (2006). Engineering yeasts for xylose metabolism. *Current opinion in Biotechnology*, 17:320-326.

Kachrimanidou V., Kopsahelis N., Chatzifragkou A., Papanikolaou S., Yanniotis S., Kookos I.K., Koutinas A.A., (2013) Utilisation of by-products from sunflower-based biodiesel production processes for the production of fermentation feedstock. *Waste Biomass Valor*, 4:529-537.

Kitcha, S., Cheirslip, B., (2013) Enhancing lipid production from crude glycerol by newly isolated oleaginous yeasts: Strain selection, process optimization, and fed-batch strategy. *Bioenerg Res*, 6:300-310.

Liang, Y.-N., Sarkany, N., Cui, Y., (2009) Biomass and lipid productivities of *Chlorella vulgaris* under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic growth conditions. *Biotechnology Letters*, 31:1043–1049.

Liang, Y., Cui, Y., Trushenski, J., Blackburn, J.W., (2010a) Converting crude glycerol derived from yellow grease to lipids through yeast fermentation. *Bioresour. Technol*, 101:7581–7586.

Liang, Y.N., Sarkany N., Cui Y., Blackburn J.W., (2010b) Batch stage study of lipid production from crude glycerol derived from yellow grease or animal fats through microagal fermentation. *Bioresour Technol*, 101:6745-6750.

Licht, F.O., (2009). World-Biodiesel Production, *World Ethanol and Biofuels Report*, (4), 16:365.

Liu Y, Wang Y, Liu H, Zhang J, (2015) Enhanced lipid production with undetoxified corncob hydrolysate by *Rhodotorula glutinis* using a high cell density culture strategy. *Bioresour Technol* 180:32–39.

Louhasakul, Y., Cheirsilp, B., (2013) Industrial waste utilization for low-cost production of raw material oil through microbial fermentation. *Appl Biochem Biotechnol*, 169:110-122.

Lopes da Silva, T., Feijao, D., Roseiro, J.C., & Reis, A. (2011). Monitoring *Rhodotorula glutinis* CCMI 145 physiological response and oil production growing on xylose and glucose using multi-parameter flowcytometry. *BioresourceTechnology*, 102, 2998–3006.

Malisorn, C., & Suntornsuk,W. (2009). Improved β-carotene production of *Rhodotorula glutinis* in fermented radish brine by continuous cultivation. *Biochemical Engineering Journal*, 43, 27–32.

Makri, A., Fakas, S., Aggelis, G., (2010) Metabolic activities of biotechnological interest in *Yarrowia lipolytica* grown on glycerol in repeated batch cultures. *Bioresour. Technol*, 101: 2351–2358.

Marova, I., Carnecka, M., Halienova, A., Certik, M., Dvorakova, T., & Haronikova, A. (2012). Use of several waste substrates for carotenoid-rich yeast biomass production. *Journal of Environmental Management*, 95, S338–S342.

Meesters, P.A.E.P., Huijberts, G.N.M., Eggink, G., (1996) High cell density cultivation of the lipid accumulating yeast *Cryptococcus curvatus* using glycerol as a carbon source. *Appl. Microbiol. Biotechnol*, 45: 575–579.

Meng, X., Yang, J., Xu, X., Zhang, L., Nie, Q., Xian, M., (2009) Biodiesel production from oleaginous microorganisms. *Renew Energ.;* 34(1): 1-5.

Miller, G.L., (1959) Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Anal Chem*, 31:426-428.

Neidigh, J.W., Darwanto, A., Williams, A.A., Wall, N.R., & Sowers, L. A. (2009). Cloning and characterization of *Rhodotorula glutinis* thymine hydroxylase. *Chemical Research in Toxicology*, 22, 885–893.

Pagliaro Mario and Rossi Michele Glycerol: Properties and Production [Book Section] // The Future of Glycerol. - Cambridge : Royal Society of Chemistry, 2010. - 2nd Edition : Vol. No8. - 978-1-84973-046-4/1757-7039.

Papanikolaou, S., Aggelis, G., (2002) Lipid production by *Yarrowia lipolytica* growing on industrial glycerol in a single-stage continuous culture. *Bioresour Technol*, 82: 43-49.

Papanikolaou, S., Aggelis, G., (2009) Biotechnological valorization of biodiesel derived glycerol waste through production of single cell oil and citric acid by *Yarrowia lipolytica*. *Lipid Technol*, 21: 83–87.

Papanikolaou, S., Aggelis, G., *Yarrowia lipolytica*: (2010) A model microorganism used for the production of tailor-made lipids. *Eur. J. Lipid Sci. Technol*, 112: 639–654.

Papanikolaou, S., Aggelis G., (2011a) Lipids of oleaginous yeasts. Part I: Biochemistry of single cell oil production. *Eur J Lipid Sci Technol*, 113:1031-1051.

Papanikolaou, S., Aggelis G., (2011b) Lipids of oleaginous yeasts. Part II: Technology and potential applications. *Eur J Lipid Sci Technol*, 113:1052-1073.

Papanikolaou, S., 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*, 80: 215–224.

Papanikolaou, S., Aggelis, G., (2002) Lipid production by *Yarrowia lipolytica* growing on industrial glycerol in a single-stage continuous culture. *Bioresour Technol*, 82: 43-49.

Papanikolaou, S.; Aggelis, G., (2003a) Selective uptake of fatty acids by the yeast *Yarrowia lipolytica. Eur. J. Lipid Sci. Technol*, 105: 651–655.

Papanikolaou, S., Aggelis, G., (2003b) Modeling lipid accumulation and degradation in *Yarrowia lipolytica* cultivated on industrial fats. *Curr. Microbiol*, 46: 398–402.

Papanikolaou, S., Galiotou-Panayotou, M., Fakas, S., Komaitis, M., Aggelis, G., (2008a) Citric acid production by *Yarrowia lipolytica* cultivated on olive-mill wastewater-based media. *Bioresour Technol*, 99:2419-2428.

Papanikolaou, S., Fakas, S., Fick, M., Chevalot, I., et al., (2008b) Biotechnological valorisation of raw glycerol discharged after bio-diesel (fatty acid methyl-esters) manufacturing process: Production of 1,3-propanediol, citric acid and single cell oil. *Biomass Bioenergy*, 32: 60–71.

Papanikolaou, S., Aggelis, G., (2009) Biotechnological valorization of biodiesel derived glycerol waste through production of single cell oil and citric acid by *Yarrowia lipolytica*. *Lipid Technol*, 21: 83–87.

Papanikolaou, S., Aggelis G., (2011a) Lipids of oleaginous yeasts. Part I: Biochemistry of single cell oil production. *Eur J Lipid Sci Technol*, 113:1031-1051.

Papanikolaou, S., Aggelis G., (2011b) Lipids of oleaginous yeasts. Part II: Technology and potential applications. *Eur J Lipid Sci Technol*, 113:1052-1073.

Papanikolaou S, Muniglia L, Chevalot I, Aggelis G, Marc I., (2002) *Yarrowia lipolytica* as a potential producer of citric acid from raw glycerol. *J Appl Microbiol*., 92:737–44.

Papaparaskevas, D., Christakopoulos, P., Kckos, D., & Macris, B.J. (1992). Optimizating production of extracellular lipase from *Rhodotorula glutinis*. *Biotechnology Letters*, 14(5), 397–402.

Petrik, S., Marova, I., Haronikova, A., Kostovova, I., & Breierova, E. (2013). Production of biomass, carotenoid and other lipid metabolites by several red yeast strains cultivated on waste glycerol from biofuel production – a comparative screening study. *Annals of Microbiology*, *63*(4), 1537–1551.

Peters D., (2007) Raw Materials. Advances in Biochemical Engineering/ *Biotechnology* 105, 1-30.

Ratledge, C., (1988) Biochemistry, stoichiometry, substrates and economics. In: Moreton RS(ed) Single cell oil, *Longman Scientific and Technical*, Harlow, England, pp 33-70.

Ratledge, C., (1997) Microbial Lipids. In: Rehm HJ (ed) Products of secondary methabolism, *Biotechnology 2nd. Vol.7. VCH*, Weinheim, Germany, pp 133-197.

Ratledge, C., (2006) Microbial production of γ-Linolenic Acid. In: Akoh (ed) Handbook of Functional Lipids. *CRC Press Taylor and Francis Group*, pp 19-46.

Ratledge, C., Evans, C.T., (1989) Lipids and their metabolism. In: Rose AH, Harrison JS, editors. The Yeasts. Ed 2. London: *Academic Press*, 3:368–446.

Ratledge, C., Tan, K.H., (1990) Oils and fats: production, degradation and utilization by yeasts. *Marcel Dekker*, New York:, Vol. 223.

Ratledge, C., Wynn J.P., (2002) The biochemistry and molecular biology of lipid accumulationin oleaginous microorganisms. *Adv Appl Microbiol*, 51:1-51.

Ratlege C., Wynn J.P., (1997) The biochemistry and molecular biology of lipid accumulationin oleaginous microorganisms. *Adv Appl Microbiol*, 51:1-5.

Reiss, E., Jean, H., & Marshall-Lyon, G. (2012). Fundamental medical mycology. *Wiley-Blackwell*.

Rivaldi, J.D., Sarrouh, B., Silvério da Silva, S., (2009) Development of biotechnological processes using glycerol from biodiesel production. *Applied Microbiology* and *Microbial Biotechnology*, , 429-433.

Roadjnakamolson, M., & Suntornsuk, W. (2010). Production of β-carotene-enriched rice bran using solid-state fermentation of *Rhodotorula glutinis*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 20(3), 525–531.

Rodríguez N.R, Beltrán S., Jaime I., Diego S.M., Sanz M.T., Carballido J.R. (2010). Production of omega-3 polyunsaturated fatty acid concentrates: A review. Innovative *Food Science and Emerging Technologies* 11, 1-12.

Rymowicz, W., Rywińska, A., Gładkowski, W., (2008) Simultaneous production of citric acid and erythritol from crude glycerol by *Yarrowia lipolytica* Wratislavia K1. *Chem Pap*, 62:239-246.

Rywińska, A., Juszczyk, P., Wojtatowicz, M., Robak, M., Lazar, Z., Tomaszewska, L., Rymowicz, W., (2013a) Glycerol as a promising substrate for *Yarrowia lipolytica* biotechnological applications. *Biomass Bioenerg*, 48:148-166.

Subramaniam, R., Dufreche, S., Zappi, M., Bajpai, R., (2010) Microbial lipids from renewable resources: Production and characterization. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol*, 37:1271–1287.

Saenge, C., Cheirsilp, B., Suksaroge, T.T., Bourtoom, T., (2011) Potential use of oleaginous red yeast *Rhodotorula glutinis* for the bioconversion of crude glycerol from biodiesel plant to lipids and carotenoids. *Proc Biochem*, 46:210-218.

Sarris, D., Galiotou-Panayotou, M., Koutinas, A.A., Komaitis, M., Papanikolaou, S., (2011) Citric acid, biomass and cellular lipid production by *Yarrowia lipolytica*

strains cultivated on olive mill wastewater-based media. *J Chem Technol Biotechnol*, 86:1439-1448.

Sarris, D., Giannakis, M., Philippoussis, A., Komaitis, M., Koutinas, A.A., Papanikolaou, S., (2013) Conversions of olive mill wastewater-based media by *Saccharomyces cerevisiae* through sterile and non-sterile bioprocesses. *J ChemTechnolBiotechnol*, 88:958-969.

Sánchez C., (2009) Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi. *Biotechnology Advances* 27, 185-194.

Stacey, M., Barker. S., *Uglevody zhivykh tkanei*. Moscow, (1965). (Translated from English.) *Khimiia uglevodov*. Moscow, (1967).

Sidoine Sadjeu Tchakouteu, Afroditi Chatzifragkou, Ourania Kalantzi, Apostolis A. Koutinas, George Aggelis, Seraphim Papanikolaou, (2015) Peculiarities of major metabolites biosynthesis by the oleaginous yeast *Cryptococcus curvatus* cultivated on sugar-based substrates. *European Journal of Lipid Science and Technology.*

Sidoine Sadjeu Tchakouteu, Ourania Kalantzi, Chryssavgi Gardeli, Apostolis A. Koutinas, George Aggelis, Seraphim Papanikolaou, 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* (Under revision)

Seviour, R.J., Stasinopoulos, S.J., Auer, D.P.F., (1992) Production of pullulan and other exopolysaccharides by filamentous fungi. *Critical Reviews in Biotechnology*, 12: 279–298.

Schneider, T., Graeff-Hönninger, S., French, W. T., Hernandez, R., Merkt, N., Claupein, W., Pham, P., (2013). Lipid and carotenoid production by oleaginous red yeast *Rhodotorula glutinis* cultivated on brewery effluents. *Energy*, *61*, 34–43.

Tang, Y.J., Zhong, J.J., (2002) Fed-batch fermentation of *Ganoderma lucidum* for hyperproduction of polysaccharide and ganoderic acid. *Enzyme Microbial Technol*, 31:20–28.

Tang, Y-J, Zhu, L.L., Li, D.S., Mi, Z.Y., Li, H.M., (2008) Significance of inoculation density and carbon source on the mycelial growth and Tuber polysaccharides production by submerged fermentation of Chinese truffle *Tuber sinense*. *Proc Biochem*, 43:576-586.

Tang, D.H., Han, W., Li, P.L., Miao, X.L. Zhong, J.J., (2011) CO(2) biofi xation and fatty acid composition of *Scenedesmus obliquus* and *Chlorella pyrenoidosa* in response to different CO(2) levels. *Bioresource Technol*, 102:3071–3076.

Tao J, Dai CC, Yang QY, Guan XY and Shao WL, (2010) Production of biodiesel with acid hydrolysate of populus euramevicana cv leaves by *Rhodotorula glutinis*. *Int J Green Energy* **7:**387–396.

Taskin, M., Sisman, T., Erdal, S., & Kurbanoghu, E.B. (2011). Use of waste chicken feathers as pepone for production of carotenoids in submerged culture of *Rhodotorula glutinis* MT-5. *European Food Research and Technology*, 233, 657–665.

Taskin, M. (2012). Co-production of tannase and pectinase by free and immobilized cells of the yeast *Rhodotorula glutinis* MP-10 isolated from tann-rich persimmon(Diospyroskaki L.) fruits. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 36(2), 165–172.

Thornburg, L.D., Lai, M.T., Wishnok, J.S., & Stubbe, J. (1993). A non-heme iron proteins with heme tendencies: An investigation of the substrate specificity of thymine hydroxylase. *Biochemistry*, 32, 14023–14033.

Tsakona, S., Kopsahelis, N., Chatzifragkou, A., Papanikolaou. S., Kookos I.K., Koutinas, A. A., (2014) Formulation of fermentation media from flour-rich waste streams for microbial lipid production by *Lipomyces starkeyi*. *Journal of Biotechnology*, 189: 36–45.

Vicente, G., Bautista, L.F., Rodriguez, R., Gutierrez, F.J., Sadaba, I., Ruiz-Vazquez, R.M., (2009) Biodiesel production from biomass of an oleaginous fungus. *Biochem Eng J*, 48:22–27.

Wen, Z., Pyle, D.J., Athalye, S.K., (2009a) Glycerol waste from biodiesel manufacturing. In: Microbial Conversions of Raw Glycerol, Aggelis, G. (*Ed*) *Nova Science Publishers Inc.*, New York, , pp. 1-7.

Wen, Z., Pyle, D.J., Athalye, S.K., (2009b) Production of omega-3 polyunsaturated fatty acids from biodiesel-derived crude glycerol by microalgal and fungal fermentation. In: Microbial Conversions of Raw Glycerol, Aggelis, G. (*Ed*) *Nova Science Publishers Inc.*, New York, pp. 41-63.

Wensel, P., Helms, G., Hiscox, B., Davis, W.C., Kirchhoff, H., Bule, M., Yu, L., Chen, S. (2014) Isolation, characterization, and validation of oleaginous, multi-trophic, and haloalkaline-tolerant microalgae for two-stage cultivation. *Algal Res*, 4: 2-11.

Wu, J., Ding, Z.Y., Zhang, K.C., (2006) Improvement of exopolysaccharide production by macro fungus *Auricularia auriculain* submerged culture. *Enzyme and Microbial Technology*, 39:743–749.

Wu S., Hu, C., Zhao X., Zhao Z.B., (2010) Production of lipid from *N*-acetylglucosamine by *Cryptococcus curvatus*. *Eur J Lipid Sci Technol*, 112:727-733.

Xue F,Miao J, ZhangX, Luo H, Tan T, (2008) Studies on lipid production by *Rhodotorula glutinis* fermentation using monosodium glutamate wastewater as culture medium. *Bioresour Technol* 99:5923–5927.

Xue F,Gao B, ZhuY, Zhang X, FengW, Tan T, (2010) Pilot-scale production of microbial lipid using starch wastewater as raw material. *Bioresour Technol* 101:6092–6095.

Yazdani, S.S., Gonzalez, R., (2007) Anaeobic fermentation of glycerol: a path to economic viability for the biofuels industry. *Curr Opin Biotechnol*, 18:213-219.

Yen, H.-W., Yang, Y.-C., & Yu, Y.-H. (2012). Using crude glycerol and thin stillage for the production of microbial lipids through the cultivation of *Rhodotorula glutinis*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, *114*(4), 453–456.

[Διαδίκτυο, 1] http://www.ebb-eu.org/

[Διαδίκτυο, 2] http://www.biofuels.gr/biodiesel/conventional-technology-industrial-transesterification-and-esterification/

[Διαδίκτυο, 3] http://biophysics.biol.uoa.gr/courses/biophysics/XRAY/askisi.htm

[Διαδίκτυο, 4] http:// http://en.wikipedia.org/wiki/Lignin

[Διαδίκτυο, 5] https://en.wikipedia.org/wiki/Xylose_metabolism

[Διαδίκτυο, 6] https://el.wikipedia.org/wiki/Αμυλόζη

[Διαδίκτυο, 7] http://www.food-info.net/gr/qa/qa-wi6.htm

[Διαδίκτυο, 8] http://www.lipinutramed.gr/λιπαρά-οξέα/