

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

**Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου
Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων**

**ΠΜΣ: Επιστήμη και Τεχνολογία Τροφίμων και Διατροφή του
ανθρώπου**

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

*«Μελέτη και επιλογή ελαιογόνων ζυμών που παράγουν μικροβιακά
έλαια σε διάφορες ανανεώσιμες πρώτες ύλες»*

Επιβλέπων:

Απόστολος Κουτίνας, Επίκουρος Καθηγητής

Μαρία Κυριάκου

ΑΘΗΝΑ 2016

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

«Μελέτη και επιλογή ελαιογόνων ζυμών που παράγουν μικροβιακά έλαια σε διάφορες ανανεώσιμες πρώτες ύλες»

Εξεταστική Επιτροπή:

*Απόστολος Κουτίνας, Επίκουρος Καθηγητής
Σεραφείμ Παπανικολάου, Αναπληρωτής Καθηγητής
Βασιλική Ευαγγελίου, Επίκουρη Καθηγήτρια*

Επιβλέπων:

Απόστολος Κουτίνας, Επίκουρος Καθηγητής

Μαρία Κυριάκου

ΑΘΗΝΑ 2015

Ευχαριστίες

Η παρούσα μελέτη εκπονήθηκε στο εργαστήριο Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, στα πλαίσια του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών «Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου».

Ολοκληρώνοντας τον μεταπτυχιακό κύκλο σπουδών και την διατριβή μου επιθυμώ να εκφράσω τις ευχαριστίες μου σε όλους τους ακαδημαϊκούς δασκάλους και τους συναδέλφους που συνέβαλαν στη μέχρι τώρα πορεία μου και ιδιαίτερω, όλους εκείνους που ασχολήθηκαν με την παρούσα μελέτη και βοήθησαν στην υλοποίησή της.

Ευχαριστώ πρωτίστως τον επίκουρο καθηγητή κ. Απόστολο Κουτίνα, για την ανάθεση, την επίβλεψη και την επιστημονική καθοδήγηση της παρούσας μελέτης, καθώς και για την εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπό μου καθ' όλη τη διάρκεια της συνεργασίας μας.

Ευχαριστώ θερμά τον αναπληρωτή καθηγητή κ. Σεραφείμ Παπανικολάου για τις εύστοχες παρατηρήσεις του και την πρόθυμη βοήθεια του που συνέλαβαν καθοριστικά στην παρούσα μελέτη, καθώς και για τη συμμετοχή του στην τριμελή εξεταστική επιτροπή.

Την επίκουρη καθηγήτρια κα. Βασιλική Ευαγγελίου για τη συμμετοχή της στην τριμελή εξεταστική επιτροπή καθώς και για το χρόνο που αφιέρωσε για τη μελέτη του παρόντος κειμένου.

Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω την υποψήφια διδάκτωρ Κατερίνα Παπαδάκη, με την οποία είχα την τύχη να συνεργαστώ κατά τη διεξαγωγή της παρούσας μελέτης, για την σημαντικότερη βοήθεια της, την καθοδήγηση και τις υποδείξεις που μου προσέφερε καθ' όλη τη διάρκεια της συνεργασίας μας.

Τέλος ευχαριστώ την οικογένεια μου και τους ανθρώπους που με παρότρυναν και με στήριξαν να ακολουθήσω και να πραγματοποιήσω τα όνειρά μου.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη ενός μεγάλου αριθμού ζυμών ως προς την ικανότητά τους να αφομοιώνουν διάφορες πηγές άνθρακα. Οι υπο εξέταση μικροοργανισμοί ήταν στελέχη του *Yarrowia lipolytica*, είδη του γένους *Rhodotorula*, *Rhodospiridium*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces* καθώς και οι μικροοργανισμοί *Lipomyces starkeyi*, *Schizosaccharomyces octosporus* και *Metschnikowia poulcherima*, οι οποίοι εξετάστηκαν ως προς την αφομοίωση 9 διαφορετικών πηγών άνθρακα: αραβινόζη, γαλακτόζη, γαλακτουρονικό οξύ, N-ακέτυλο-D-γλυκοζαμίνη, μαννόζη, ξυλόζη, ραμνόζη, σακχαρόζη και φρουκτόζη. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα του πειράματος τα στελέχη *Yarrowia lipolytica* στην πλειοψηφία τους ήταν ικανά να αφομοιώνουν μαννόζη, σακχαρόζη και φρουκτόζη. Αντιθέτως, η ανάπτυξή τους δεν ευνοήθηκε από τις πηγές άνθρακα αραβινόζη, γαλακτόζη, ξυλόζη, ραμνόζη και γαλακτουρονικό οξύ, ενώ εμφάνισαν ασθενή ανάπτυξη όταν χρησιμοποιήθηκε N-ακέτυλο-D-γλυκοζαμίνη. Οι μικροοργανισμοί του γένους *Rhodospiridium* και *Rhodotorula* αφομοίωσαν τα σάκχαρα μαννόζη, σακχαρόζη και φρουκτόζη, ενώ δεν ήταν σε θέση να αφομοιώσουν αραβινόζη, γαλακτόζη, ξυλόζη, ραμνόζη και γαλακτουρονικό οξύ. Επίσης, παρουσίασαν ασθενή ανάπτυξη όταν η κύρια πηγή άνθρακα ήταν η N-ακέτυλο-D-γλυκοζαμίνη. Οι μικροοργανισμοί του γένους *Cryptococcus*, *Debaryomyces* και *Metschnikowia* εμφάνισαν ικανοποιητική ανάπτυξη παρουσία N-ακέτυλο-D-γλυκοζαμίνης, σε αντίθεση με τις ζύμες *Lipomyces starkeyi* DSM 70296 και *Schizosaccharomyces octosporus*, οι οποίοι δεν αναπτύχθηκαν παρουσία αυτής. Ιδιαίτερο, δε, ενδιαφέρον παρουσίασαν οι μικροοργανισμοί *Rhodospiridium kratochvilovae* EMBT Y-43 και *Rhodospiridium toruloides* DSM 4444 οι οποίοι αφομοίωσαν γαλακτουρονικό οξύ.

Στη συνέχεια της μελέτης επιλέχθηκαν πραγματοποιήθηκαν υγρές ζυμώσεις χρησιμοποιώντας την γλυκόζη ως πηγή άνθρακα. Το υπόστρωμα είχε υψηλό λόγο C/N έτσι ώστε να κατευθυνθεί ο μεταβολισμός προς την παραγωγή λίπους με σκοπό να επιλεγθούν ελαιογόνες ζύμες για το τελικό στάδιο της πειραματικής μελέτης. Τα αποτελέσματα των ζυμώσεων σε υπόστρωμα γλυκόζης προς παραγωγή μικροβιακών λιπιδίων, έδειξαν ότι στους ελαιογόνους μικροοργανισμούς μπορούν να καταταχθούν οι μικροοργανισμοί *Rhodospiridium toruloides* DSM 4444, *Rhodospiridium toruloides* Y-27012, *Rhodospiridium kratochvilovae* Y-43, *Rhodotorula glutinis* YB252, *Cryptococcus curvatus* ATCC 20509, *Lipomyces starkeyi* DSM 70296 των οποίων η λιποπεριεκτικότητα είναι μεγαλύτερη του 17%. Επίσης, οι μικροοργανισμοί

Cryptococcus curvatus Y-1511 και *Cryptococcus uzbekistanensis* Y-44 παρουσίασαν λιποσυσσώρευση της τάξεως του 13 και 14%.

Τέλος, μελετήθηκε η δυνατότητα παραγωγής μικροβιακού λίπους των *Rhodosporidium toruloides* DSM 4444 και *Cryptococcus curvatus* ATCC 20509 κατά την υγρή καλλιέργειά τους σε υπόστρωμα που περιείχε ως κύρια πηγή άνθρακα γαλακτουρονικό οξύ ή N-ακέτυλο-D-γλυκοζαμίνη. Η ζύμη *Rhodosporidium toruloides* DSM 4444 παρουσίασε 5,1 % λιποπεριεκτικότητα παρουσία N-ακέτυλο-D-γλυκοζαμίνης και 4,5 % σε υπόστρωμα γαλακτουρονικού οξέος. Παρόμοια αποτελέσματα όσον αφορά στην παραγωγή λίπους είχε και η καλλιέργεια της ζύμης *Cryptococcus curvatus* ATCC 20509 η οποία παρουσίασε λιποπεριεκτικότητα 3,5 % και 5,1 % παρουσία N-ακέτυλο-D-γλυκοζαμίνης και γαλακτουρονικού οξέος, αντίστοιχα.

Λέξεις κλειδιά: ελαιογόνες ζύμες, μικροβιακό λίπος, N-ακέτυλο-D-γλυκοζαμίνη, γαλακτουρονικό οξύ.

ABSTRACT

The purpose of this thesis was to study a large number of yeasts in their ability to assimilate various carbon sources. Microorganisms tested include strains of *Yarrowia lipolytica*, species of the genus *Rhodotorula*, *Rhodospiridium*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces* and the yeasts *Lipomyces starkeyi*, *Schizosaccharomyces octosporus* and *Metschnikowia poulcherima*, who were examined for the assimilation of 9 different carbon sources namely: arabinose, galactose, galacturonic acid, N-acetyl-D-glucosamine, mannose, xylose, rhamnose, sucrose and fructose. According to the results the majority of *Yarrowia lipolytica* strains seem to assimilate mannose, sucrose and fructose. Also, their growth is not favored by carbon sources arabinose, galactose, xylose, rhamnose and galacturonic acid, while showing weak growth in source N-acetyl-D-glucosamine. In contrast, their growth is not favored by arabinose, galactose, xylose, rhamnose and galacturonic acid, while showing weak growth in source N-acetyl-D-glucosamine. *Rhodospiridium* and *Rhodotorula* yeasts seem to assimilate mannose, sucrose and fructose, but their growth is not favored by the presence of arabinose, galactose, xylose, rhamnose and galacturonic acid in the substrate, while showing weak growth when the primary carbon source was N-acetyl-D-glucosamine. *Cryptococcus* microorganisms, *Debaryomyces* and *Metschnikowia* seem to assimilate N-acetyl-D-glucosamine, unlike *Lipomyces starkeyi* and *Schizosaccharomyces octosporus*. Of special interest are microorganisms *Rhodospiridium kratochvilovae* EMBT Y-43 and *Rhodospiridium toruloides* DSM 4444 which assimilated galacturonic acid.

Then liquid fermentations took place using glucose as a carbon source so the direct metabolism be directed to lipid accumulation and oleaginous yeasts could be selected for the final stage, which included liquid fermentations using carbon sources examined during the first stage. According to the glucose fermentation results, within oleaginous yeasts *Rhodospiridium toruloides* DSM 4444, *Rhodospiridium toruloides* Y-27012, *Rhodospiridium kratochvilovae* Y-43, *Rhodotorula glutinis* YB252, *Cryptococcus curvatus* ATCC 20509 and *Lipomyces starkeyi* DSM 70296 can be classified, whose lipid content is higher than 17% and marginally *Cryptococcus curvatus* Y-1511 and *Cryptococcus uzbekistanensis* Y-44 whose lipid content is 13 and 14% respectively.

Finally, microbial oil production using galacturonic acid and N-acetyl-D-glucosamine as substrates, showed *Rhodospiridium toruloides* DSM 4444 and *Cryptococcus curvatus* ATCC

20509. More specifically, *Rhodospiridium toruloides* DSM 4444 showed lipid content of 5,12 % using N-acetyl-D-glucosamine as carbon source and 4,53% using galacturonic acid, while *Cryptococcus curvatus* ATCC 20509 showed a lipid content of 3,48% and 5,05% respectively.

Keywords: oleaginous yeasts, microbial oil, N-acetyl-D-glucosamine, galacturonic acid

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	ii
ABSTRACT.....	iv
ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ.....	vi
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ	viii
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ ΚΑΙ ΣΧΗΜΑΤΩΝ.....	x
1.Εισαγωγή	1
1.1.Γενικά.....	1
1.2. Ελαιογόνοι μικροοργανισμοί.....	2
1.3. Μικροβιακό λίπος.....	3
1.3.1 Βιοχημεία σύνθεσης λιπιδίων	4
1.3.2 Μέθοδοι εκχύλισης και ποσοτικοποίησης λίπους	7
1.4.Ανανεώσιμες Ά ύλες ως υποστρώματα ανάπτυξης μικροοργανισμού	8
1.4.1.Γαλακτουρονικό οξύ.....	10
1.4.2.N-ακέτυλο-D-γλυκοζαμίνη.....	11
1.5. Μικροοργανισμοί που παρουσιάζουν ερευνητικό ενδιαφέρον.....	12
1.5.1. Ζύμες του είδους <i>Yarrowia lipolyrica</i>	12
1.5.2. Ζύμες του γένους <i>Rhodotorula</i> και <i>Rhodosporidium</i>	13
1.5.3. Ζύμες του γένους <i>Cryptococcus</i> και <i>Lipomyces</i>	14
1.6. Σκοπός της εργασίας.....	15
2.Υλικά και μέθοδοι.....	16
2.1. Βιολογικό υλικό	16
2.2. Παρασκευή εμβολίου.....	17
2.3. Θρεπτικό μέσο και συνθήκες	17
2.3.1.Ικανότητα ζυμών ως προς την αφομοίωση διαφορετικών πηγών άνθρακα	17

2.3.2. Υγρές ζυμώσεις σε γλυκόζη για την παραγωγή μικροβιακού λίπους	18
2.3.3. Υγρές ζυμώσεις σε γαλακτουρονικό οξύ και N-ακέτυλο-D-γλυκοζαμίνη για την παραγωγή μικροβιακού λίπους.....	19
2.4. Αναλυτικές μέθοδοι	20
2.4.1. Ποσοτικός προσδιορισμός πηγών ανθράκων με την μέθοδο δινιτροσαλικυλικού οξέος (DNS) και με υγρή χρωματογραφία υψηλής αποδόσεως (HPLC)	20
2.4.2. Προσδιορισμός ξηρής βιομάζας.....	21
2.4.3. Εκχύλιση ενδοκυτταρικού λίπους.....	21
2.4.4. Προσδιορισμός pH.....	22
3. Αποτελέσματα	23
3.1. Ικανότητα ζυμών ως προς την αφομοίωση διαφορετικών πηγών άνθρακα	23
3.1.1. <i>Yarrowia lipolytica</i>	23
3.1.2. <i>Rhodotorula</i> sp. και <i>Rhodospiridium</i> sp.....	26
3.1.3. <i>Cryptococcus</i> sp., <i>Lipomyces</i> sp., <i>Debaryomyces</i> sp., <i>Metschnikowia</i> και <i>Schizosaccharomyces</i> sp.....	29
3.2. Μελέτη παραγωγής μικροβιακού λίπους ζυμών κατά την υγρή ζύμωσή τους σε υπόστρωμα γλυκόζης	33
3.3. Μελέτη παραγωγής μικροβιακού λίπους ζυμών κατά την υγρή ζύμωσή τους χρησιμοποιώντας ως κύρια πηγή άνθρακα το γαλακτουρονικό οξύ ή τη N-ακέτυλο-D-γλυκοζαμίνη.....	37
4. Βιβλιογραφία	41

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1.1: Σύνθεση λιπαρών οξέων των λιπιδίων που παράγονται από διάφορα στελέχη ζυμομυκήτων που αναπτύσσονται σε υποστρώματα σακχάρων, σε συνθήκες καλλιέργειας που ευνοούν τη συσσώρευση των μικροβιακών λιπιδίων (Papanikolaou and Aggelis, 2011)...4

Πίνακας 2.1.1: Οι ζύμες που εξετάστηκαν στην παρούσα μελέτη16

Πίνακας 2.3.1: Οι πηγές άνθρακα που χρησιμοποιήθηκαν και ο χημικός τους τύπος.18

Πίνακας 2.3.2: Ζύμες που μελετήθηκαν ως προς την ικανότητά τους να λιποσυσσωρεύουν σε υπόστρωμα γλυκόζης..... 19

Πίνακας 2.3.3: Ζύμες που μελετήθηκαν ως προς την ικανότητά τους να λιποσυσσωρεύουν σε υπόστρωμα που περιείχε γαλακτουρονικό οξύ ή N-ακέτυλο-D-γλυκοζαμίνη ως πηγή άνθρακα.....
.....20

Πίνακας 3.1.1: Αποτελέσματα αφομοίωσης πηγών άνθρακα από στελέχη του είδους *Yarrowia lipolytica*.....24

Πίνακας 3.1.2: Μικροβιακή παραγωγή λιπιδίων από στελέχη *Yarrowia lipolytica*, υπό καλλιέργεια διαφορετικών πηγών άνθρακα που συγκεντρώθηκαν από διάφορες βιβλιογραφικές αναφορές..25

Πίνακας 3.1.3: Αποτελέσματα αφομοίωσης πηγών άνθρακα από τα είδη τα γένη *Rhodotorula* και *Rhodospiridium*27

Πίνακας 3.1.4: Μικροβιακή παραγωγή λιπιδίων από στελέχη *Rhodospiridium toruloides* και *Rhodotorula glutinis*, κατά την υγρή καλλιέργειά τους σε διαφορετικές πηγές άνθρακα.... 29

Πίνακας 3.1.5: Αποτελέσματα αφομοίωσης πηγών άνθρακα από τις ζύμες *Cryptococcus*, *Debaryomyces hansenii*, *Metshcikowia poulcherima*, *Schizosaccharomyces octosporus* και *Lipomyces starkeyi*.....31

Πίνακας 3.1.6: Μικροβιακή παραγωγή λιπιδίων από μικροοργανισμούς *Cryptococcus*, *Debaryomyces hansenii*, *Metshcikowia poulcherima*, *Schizosaccharomyces octosporus* και *Lipomyces starkeyi*, με βάση τη βιβλιογραφία....32

Πίνακας 3.2.1: Παραγωγή μικροβιακού λίπους κατά την υγρή ζύμωση διαφόρων ζυμών χρησιμοποιώντας ως κύρια πηγή άνθρακα την γλυκόζη σε συγκέντρωση 60-80 g/L....33

Πίνακας 3.3.1: Παραγωγή μικροβιακού λίπους από τις ζύμες *Rhodosporidium toruloides* Y-27012, *Rhodosporidium toruloides* DSM 4444 και *Cryptococcus curvatus* ATCC 20509 κατά την υγρή ζύμωσή τους σε υπόστρωμα αποτελούμενο αρχικά από 30 g/L N-ακέτυλο-D-γλυκοζαμίνης (Nag) και με προσθήκη γλυκόζης (Glu) μετά την κατανάλωση της N-ακέτυλο-D-γλυκοζαμίνης.....38

Πίνακας 3.3.2: Παραγωγή μικροβιακού λίπους από τις ζύμες *Rhodosporidium toruloides* DSM 4444 και *Cryptococcus curvatus* ATCC 20509 κατά την υγρή ζύμωσή τους σε υπόστρωμα αποτελούμενο από 40 g/L γαλακτουρονικό οξύ (Gal).....39

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ ΚΑΙ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 1.1: Εξιδανικευμένη μορφή της συσσώρευσης λιπιδίων σε ελαιογόνες ζύμες ή μύκητες (Radledge, 1994).....	6
Σχήμα 1.2: Βιοσυνθετικό μονοπάτι τριακυλογλυκερολών (TAGs) από γλυκόζη σε ελαιογόνους μικροοργανισμούς.....	7
Σχήμα 1.4.1: Δομή πολυγαλακτουρονικού οξέος (Khan et al., 2015).....	11
Σχήμα 1.4.2: Χημική σύσταση παραπροϊόντων που προκύπτουν από την βιομηχανία παραγωγής χυμού πορτοκαλιού.....	11
Εικόνα 2.2.7: Φιάλη εξάτμισης πριν (α) και μετά (β) την εξάτμιση όπου α) μίγμα διαλυτών χλωροφόρμιο:μεθανόλη για εκχύλιση του λίπους και β) μικροβιακό έλαιο.....	22
Εικόνα 3.2.2: Μικροσκοπική παρατήρηση συσσώρευσης μικροβιακού λίπους από την ζύμη <i>Rhodospiridium kratochvilovae</i> EMBTY-43.	34

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Γενικά

Τα περιβαλλοντικά προβλήματα, συμπεριλαμβανομένων των εκπομπών αερίων του θερμοκηπίου που προκαλούνται από τη χρήση των ορυκτών καυσίμων και η ανάγκη για αειφόρο ανάπτυξη, έχουν στρέψει την προσοχή στην αξιοποίηση των ανανεώσιμων καυσίμων (Meng et al., 2009). Ειδικότερα, στον τομέα των μεταφορών, που αντιπροσωπεύει ένα σημαντικό μέρος της συνολικής κατανάλωσης ενέργειας στην Ευρωπαϊκή Ένωση (ΕΕ), πάνω από το 30%, τα υγρά καύσιμα αποτελούν τους πιο κοινούς φορείς ενέργειας. Η βιοαιθανόλη και το βιοντίζελ είναι οι δύο πιο σημαντικές πηγές ανανεώσιμων καυσίμων για την αντικατάσταση των υγρών καυσίμων με βάση το πετρέλαιο. Το βιοντίζελ αποτελείται από ένα μίγμα από μεθυλεστέρες λιπαρών οξέων (Free Fatty Acid Methyl Esters, FAMES), τα οποία παράγονται από την μετεστεροποίηση των τριγλυκεριδίων (Triacylglycerols, TGAs) με αλκοόλες παρουσία ενός καταλύτη (Fukuda et al., 2001). Τα TGAs χρησιμοποιούνται ως πρώτη ύλη για την παραγωγή βιοντίζελ και η πηγή προέλευσής τους μπορεί να είναι φυτική (φυτικά έλαια όπως π.χ. σογιέλαιο) ή και ζωική (ζωικά λίπη) και αντιπροσωπεύουν έως και το 75% του κόστους της παραγωγής βιοντίζελ (Wu et al., 2011). Ωστόσο, η αυξημένη ζήτηση των εν λόγω ελαίων και λιπών για χρησιμοποίησή τους στα τρόφιμα, τις ζωοτροφές και την παραγωγή καυσίμων προκαλεί ραγδαίες αυξήσεις στις τρέχουσες τιμές τους.

Αυτός ο ανταγωνισμός τροφίμων - καυσίμων και το υψηλό κόστος των λιπιδίων έχουν οδηγήσει στην αναζήτηση εναλλακτικών πηγών TGAs για την παραγωγή βιοντίζελ, όπως τα έλαια από μονοκύτταρους μικροοργανισμούς (Single Cell Oils, SCOs) (Liu et al., 2007). Τα SCOs είναι λιπίδια που παράγονται από ελαιογόνους μικροοργανισμούς όπως βακτήρια, ζύμες, μύκητες και φύκη (Ratlidge, 1982). Το πλεονέκτημα χρησιμοποίησης τέτοιων μικροοργανισμών είναι ότι η παραγωγή τους δεν ανταγωνίζεται αυτή των τροφίμων, δεδομένου ότι υπάρχει η δυνατότητα αξιοποίησης αγρο-βιομηχανικών αποβλήτων και παραπροϊόντων, όπως λιγνοκυτταρινούχα υλικά (Yen et al., 2011). Άλλα πλεονεκτήματα της χρήσης SCOs έναντι των φυτικών ελαίων είναι ότι δεν απαιτείται αρόσιμη γη ενώ περιβαλλοντικές παράμετροι (όπως οι καιρικές συνθήκες) είναι άνευ σημασίας (Li et al., 2008).

Αν και η τιμή του βιοντίζελ από SCOs είναι υψηλότερη από αυτή του βιοντίζελ πρώτης γενιάς, αναμένεται να έχει πτωτική τάση, καθώς μπορεί να επιτευχθεί μείωση του κόστους εάν χρησιμοποιούνται απόβλητα μηδενικής αξίας ως υποστρώματα ανάπτυξης των μικροοργανισμών, όπως γεωργικά παραπροϊόντα και υποπροϊόντα της βιομηχανίας τροφίμων, και με την προϋπόθεση ότι πωλούνται τα προϊόντα προστιθέμενης αξίας που παράγονται παράλληλα με τα μικροβιακά έλαια, όπως καρροτενοειδή, οργανικά οξέα και άλλα (Jin et al., 2012; Sobus et al., 1976).

1.2 Ελαιογόνοι μικροοργανισμοί

Ελαιογόνοι μικροοργανισμοί, καλούνται οι μικροοργανισμοί που έχουν την ικανότητα να παράγουν ένα μεγάλο εύρος λιπιδίων είτε από φυτά είτε από ζώα (Radledge, 1994). Πιο συγκεκριμένα, ελαιογόνοι ονομάζονται οι μικροοργανισμοί που μπορούν να συσσωρεύσουν έλαια σε μορφή λιπιδίων περισσότερο από το 20 % της βιομάζας τους (Radledge, 2002). Ορισμένα γένη ζυμομυκήτων όπως *Rhodospiridium* sp., *Rhodotorula* sp. και *Lipomyces* sp. μπορούν να συσσωρεύσουν ενδοκυτταρικά λιπίδια έως και 70 % επί του ξηρού βάρους της βιομάζας τους (Kitcha et al, 2011).

Τα μικροβιακά λιπίδια άρχισαν να μελετώνται το 1878 όταν μελετήθηκε η σύνθεση των λιπαρών οξέων που παρήχθησαν από τη ζύμη *Saccharomyces cerevisiae*. Το 1899, ο Lindner παρατήρησε ότι μικροοργανισμοί *Metschnikowia pulcherrima* θα μπορούσαν να συσσωρεύσουν υψηλά επίπεδα ενδοκυτταρικούς λίπους. Το αντικείμενο μελέτης των ελαιογόνων μικροοργανισμών πήρε όλο και περισσότερη διάσταση αφού από τη δεκαετία του 1930 απομόνωση και ταυτοποίηση λιπαρών οξέων πραγματοποιήθηκε σε ολόένα και περισσότερους μικροοργανισμούς όπως: *Galactomyces candidus*, *Lipomyces lipofera*, *Lipomyces starkeyi*, *Metschnikowia gruessii*, *Rhodotorula glutinis* κ.α. (Sitepu et al., 2014). Επίσης, αναφορές έχουν γίνει και για τους μικροοργανισμούς *Penicillium chrysogenum*, *Rhodotorula gracilis*, *Rhodotorula graminis*, *Hansenula anomala* και *Candida lipolytica* (Turcotte et al., 2005). Ενδιαφέρον, δε, παρουσιάζει και ο μικροοργανισμός *Cryptococcus curvatus* για τον οποίο έχουν αναφερθεί λιποπεριεκτικότητες από 25 % έως και 65 % (Meesters et al., 1996). Ανάμεσα στους ελαιογόνους

μικροοργανισμούς βρίσκονται και μικροοργανισμοί του γένους *Yarrowia* και *Trichosporon* (Sha, 2013).

1.3 Μικροβιακό λίπος

Τα μικροβιακά λιπίδια αποτελούνται κυρίως από τριγλυκερίδια (TAG)s και σε μικρότερο βαθμό από ελεύθερα λιπαρά οξέα, ουδέτερα λιπίδια όπως μονοακυλγλυκερίνες, διακυλγλυκερίνες, στερόλες και πολικά κλάσματα όπως φωσφολιπίδια, σφιγγολιπίδια και γλυκολιπίδια (Papanikolaou & Aggelis, 2011). Μερικά από αυτά τα λιπίδια, περιέχουν υψηλές αναλογίες πολυακόρεστων λιπαρών οξέων με θρεπτική και διαιτητική σημασία για αυτό και βρίσκονται σε εμπορική παραγωγή (Radledge 2002).

Ανάλογα με το στέλεχος του κάθε μικροοργανισμού και το εφαρμοζόμενο σύστημα καλλιέργειας, η σύνθεση λιπαρών οξέων διαφοροποιείται αποδίδοντας ποικίλες ιδιότητες στο παραγόμενο κάθε φορά μικροβιακό λίπος (Tsakona et al., 2014). Για παράδειγμα οι ελαιογόνοι μύκητες χαρακτηρίζονται από υψηλότερο επίπεδο ακορεστότητας συγκριτικά με τα λιπίδια που συσσωρεύονται από ζύμες. Αυτός είναι και ο κύριος λόγος για τον οποίο ελαιογόνοι μύκητες χρησιμοποιούνται για την παραγωγή λιπαρών οξέων με ευεργετική επίδραση στον ανθρώπινο οργανισμό όπως το αραχιδονικό (ARA), το δεικοσιδυα-εξα-εν-οϊκό οξύ (DHA), το γ-λινολενικό (GLA) και το εικοσαπενταενοϊκό οξύ (EPA) (Papanikolaou and Aggelis, 2011).

Στον Πίνακα 1.1 παρουσιάζεται η σύνθεση λιπαρών οξέων των λιπιδίων που παράγονται από διάφορα στελέχη ζυμομυκήτων που αναπτύσσονται σε υποστρώματα σακχάρων σε συνθήκες καλλιέργειας που ευνοούν τη συσσώρευση των μικροβιακών λιπιδίων (Papanikolaou and Aggelis, 2011). Τα κυριότερα λιπαρά οξέα που συναντώνται στα μικροβιακά λιπίδια είναι το παλμιτικό οξύ (16:0), παλμιτελαικό οξύ (16:1), στεατικό οξύ (18:0), ολειακό οξύ (18:1), λινολεϊκό οξύ (18:2) και λινολενικό οξύ (18:3).

Πίνακας 1.1 Σύνθεση λιπαρών οξέων των λιπιδίων που παράγονται από διάφορα στελέχη ζυμομυκήτων που αναπτύσσονται σε υποστρώματα σακχάρων, σε συνθήκες καλλιέργειας που ευνοούν τη συσσώρευση των μικροβιακών λιπιδίων (Papanikolaou and Aggelis, 2011).

Strain	Lipid (% w/w)	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3
<i>Candida</i> sp. 107 ^{a)}	37.1	37	1	14	36	7	T.
<i>Candida</i> sp. 107	n.r.	28	n.r.	8	41	17	17
<i>Candida</i> sp.	40.3	23	13	3	54	5	2
<i>Rhodotorula gracilis</i>	41.0	21	T.	13	51	11	3
<i>Candida curvata</i> ^{b)}	29.1	36	T.	14	40	7	T.
<i>Candida curvata</i> ^{b)}	28.0	37	T.	10	44	6	T.
<i>Apiotrichum curvarum</i> ^{b)}	31.0	34	T.	10	43	7	2
<i>Cryptococcus curvatus</i> ^{b)}	38.0	24	T.	10	46	9	6
<i>Cryptococcus curvatus</i> ^{b)}	25.0	18	T.	16	50	16	T.
<i>Cryptococcus curvatus</i> ^{b)}	50.0	31	-	22	42	1	n.r.
<i>Cryptococcus albidus</i>	46.3	14	T.	9	53	18	2
<i>Cryptococcus albidus</i>	n.r.	20	n.r.	11	59	6	6
<i>Yarrowia lipolytica</i>	43.2	15	2	11	47	21	3
<i>Yarrowia lipolytica</i>	30.7	12	11	9	57	11	T.
<i>Yarrowia lipolytica</i> ^{a)}	22.3	13	17	6	55	7	n.r.
<i>Rhodospiridium toruloides</i>	67.5	20	1	15	47	13	3
<i>Rhodospiridium toruloides</i>	65.2	34	T.	13	48	1	T.
<i>Rhodospiridium toruloides</i>	62.1	26	2	5	62	3	T.
<i>Rhodospiridium toruloides</i>	55.6	43	T.	16	35	2	T.
<i>Lipomyces starkeyi</i>	68.0	56	2	14	26	T.	T.
<i>Lipomyces starkeyi</i>	61.5	37	4	6	49	1	T.
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	48.6	22	2	9	55	11	T.
<i>Trichosporon capitatum</i>	37.6	12	1	2	74	9	n.r.
<i>Rhodotorula</i> sp.	22.0	22	1	7	56	12	n.r.
<i>Candida oleophila</i>	15.3	13	3	7	66	11	n.r.

T. <0.5% w/w; n.r.: not reported.

^{a)} Representation of the neutral fraction of microbial lipids produced.

^{b)} *Cryptococcus curvatus* was formerly *Candida curvata* and then *Apiotrichum curvarum*; thus these microorganisms in fact are the same species.

1.3.1 Βιοχημεία σύνθεσης μικροβιακών λιπιδίων

Το έναυσμα για την έναρξη συσσώρευσης λιπιδίων από τους ελαιογόνους μικροοργανισμούς αποτελεί η εξάντληση ενός βασικού θρεπτικού συστατικού από το μέσο ανάπτυξης, το οποίο συνήθως είναι το άζωτο. Το μέσο καλλιέργειας για να ενθαρρύνει τη συσσώρευση των λιπιδίων πρέπει να είναι σκόπιμα σχεδιασμένο με χαμηλή περιεκτικότητα σε άζωτο και υψηλή σε διαθέσιμο άνθρακα.

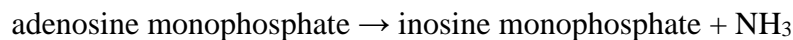
Όπως φαίνεται στο Σχήμα 1.4 όταν το άζωτο έχει εξαντληθεί τα κύτταρα δεν είναι πλέον σε θέση να πολλαπλασιαστούν καθώς το άζωτο είναι απαραίτητο για τη βιοσύνθεση πρωτεΐνης και νουκλεϊκού οξέος. Ωστόσο, η περίσσεια του άνθρακα (συνήθως γλυκόζη ή άλλοι

υδατάνθρακες) εξακολουθεί να αφομοιώνεται από τα κύτταρα, τα οποία στη συνέχεια μετατρέπουν το υπόστρωμα σε λιπαρά οξέα και στη συνέχεια σε TAGs. Άλλα θρεπτικά συστατικά εκτός αζώτου μπορεί να επιλεγούν ως περιοριστικοί παράγοντες όπως φώσφορος, μαγνήσιο, σίδηρος ή διάφορα θειικά. Ωστόσο, αν αυτά τα θρεπτικά συστατικά περιορίζουν και άλλες μεταβολικές διεργασίες μπορεί να επηρεάσουν αρνητικά την ανάπτυξη και την απόδοση.

Η διαδικασία της συσσώρευσης λιπιδίων περιλαμβάνει δύο στάδια. Στο πρώτο στάδιο όλες οι θρεπτικές ουσίες είναι διαθέσιμες στα κύτταρα. Αυτή η φάση τελειώνει όταν το επιλεγμένο θρεπτικό συστατικό (περιοριστικός παράγοντας) εξαντληθεί.

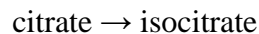
Κατά το δεύτερο στάδιο λαμβάνει χώρα η εξάντληση της πηγής άνθρακα και η λυποσυσσώρευση. Το ένζυμο κλειδί που κατέχουν μόνο οι ελαιογόνοι μικροοργανισμοί καλείται κιτρική λυάση (ACL) και χρησιμεύει για να παρέχει ακέτυλο-CoA το οποίο αποτελεί πρόδρομη ένωση για τη σύνθεση των λιπαρών οξέων. Η όλη διαδικασία συνοδεύεται από την NH_4^+ του μέσου καλλιέργειας και μπορεί να συνοψιστεί ως εξής:

- Όταν ο μικροοργανισμός εξαντλεί όλο το άζωτο από το θρεπτικό μέσο καλλιέργειας ενεργοποιείται το ένζυμο AMP δεαμινάση που καταλύει αντίδραση:



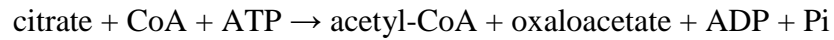
Ως αποτέλεσμα της δράσης του ενζύμου, η συγκέντρωση της AMP μέσα το κύτταρο μειώνεται γρήγορα και η ποσότητα αζώτου που απελευθερώνεται καταναλώνεται γρήγορα.

- Ακολούθως η ισοκιτρική αφυδρογονάση (ICDH), η οποία ενεργοποιείται από το ένζυμο AMP καταλύει τον μεταβολισμό του ισοκιτρικού με το κιτρικό οξύ να αποτελεί άμεσο προϊόν του μεταβολισμού της γλυκόζης ως εξής:



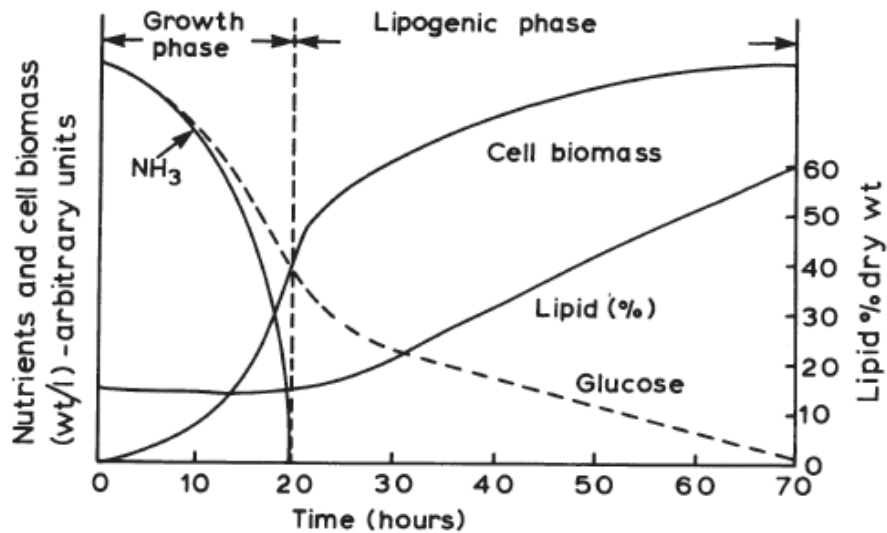
Όταν η ισοκιτρική αφυδρογονάση (ICDH) παύει να λειτουργεί, ή τουλάχιστον επιβραδύνει το ρυθμό της αντίδρασης, λόγω της έλλειψης του AMP, το ισοκιτρικό συσσωρεύεται. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την συσσώρευση του κιτρικού λόγω της εξισορρόπησης τους.

- Στη συνέχεια το κιτρικό εξέρχεται από τα μιτοχόνδρια και αμέσως διασπάται από την κιτρική λυάση ACL σε ακετυλο-CoA και οξαλοξικό ως εξής:

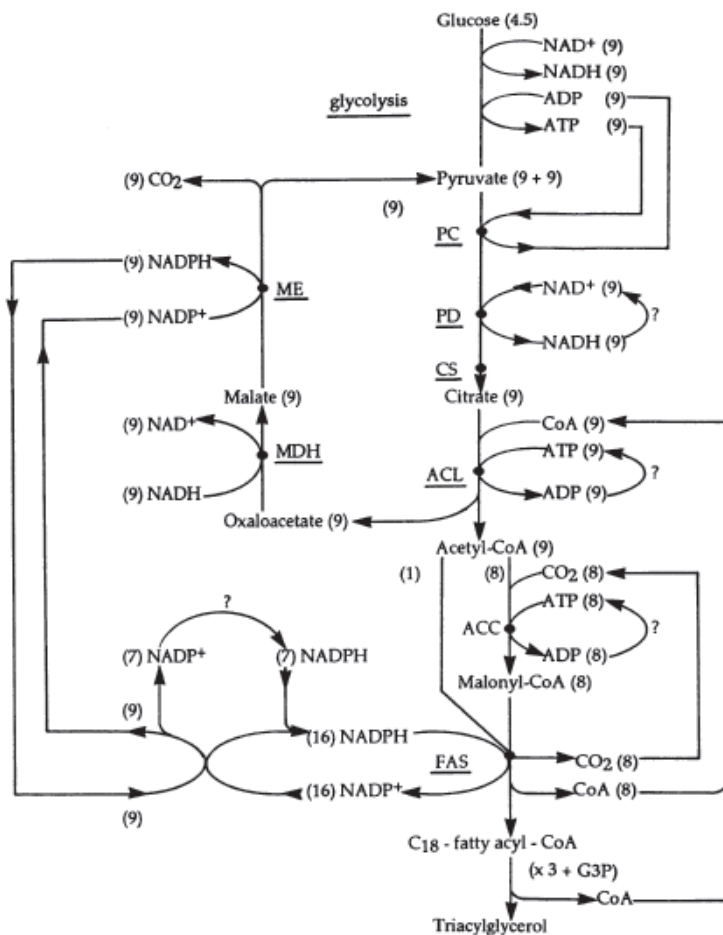


- Το ακέτυλο-CoA που παράγεται από το κιτρικό είναι το έναυσμα για την βιοσύνθεση λιπαρού οξέος μέσω της ακετυλ-CoA καρβοξυλάση που θα δώσει το μηλονυλο-συνένζυμο A και το σύμπλοκο συνθετάσης λιπαρού οξέος.
- Το οξαλοξικό οξύ μειώνεται σε μηλικό από μηλική αφυδρογενάση και το μηλικό, στη συνέχεια, αποκαρβοξυλιώνεται σε πυροσταφυλικό από μηλικό ένζυμο.

Η συνολική ροή του άνθρακα από γλυκόζη σε ακέτυλο-CoA και στη συνέχεια σε τριακυλγλυκερόλη φαίνεται στο Σχήμα 1.2. Η συνολική στοιχειομετρία έχει ως εξής (Radledge, 1994):



Σχήμα 1.1: Εξειδικευμένη μορφή της συσσώρευσης λιπιδίων σε ελαιογόνες ζύμες ή μύκητες (Radledge, 1994).



Σχήμα 1.2: Βιοσυνθετικό μονοπάτι τριακυλογλυκερολών (TAGs) από γλυκόζη σε ελαιογόνους μικροοργανισμούς (Radledge, 1994).

1.3.2 Μέθοδοι εκχύλισης και ποσοτικοποίησης μικροβιακού λίπους

Οι μέθοδοι ταυτοποίησης και ποσοτικοποίησης των πολικών και μη πολικών λιπιδίων παρουσιάζουν ολοένα και περισσότερη βελτίωση. Οι αναλυτικές αυτές μέθοδοι για τον εντοπισμό και την ποσοτικοποίηση λιπιδίων περιλαμβάνουν αέρια χρωματογραφία με ανιχνευτή φλόγας ιονισμού, Gas chromatography- Flame ionization detector (GC-FID), αέρια χρωματογραφία με φασματομετρία μάζας, Gas Chromatography Mass Spectrometry (GC-MS), χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας με ανιχνευτή φλόγας ιονισμού, Thin layer chromatography- Flame ionization detector (TLC-FID), φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού, Nuclear magnetic

resonance spectroscopy (NMR) και υγρή χρωματογραφία υψηλής αποδόσεως, High Performance Liquid Chromatography (HPLC) (Sitepu et al., 2014).

Πριν από περίπου μία δεκαετία δημοσιεύθηκε μια ταχεία μέθοδος φθορισμού για την εκτίμηση του λιπιδικού περιεχομένου σε κύτταρα ζύμης χρησιμοποιώντας ερυθρά χρώση Nile (Kimura et al., 2004). Μια μέθοδος η οποία χρησιμοποιήθηκε κατά καιρούς και πλεονεκτεί έναντι των συμβατικών μεθόδων προσδιορισμού λιπιδίων λόγω της απουσίας πολύπλοκων και χρονοβόρων σταδίων όπως η εκχύλιση, ο καθαρισμός και η συμπύκνωση (Sitepu et al., 2012).

Αναφορές έχουν γίνει και για μια νέα μέθοδο που ονομάζεται Sulfo-phospho-vanillin (SPV), Σούλφο-φώσφο-βανιλίνη, η οποία θεσπίστηκε για πρώτη φορά από τους Chabrol και Charonnat το 1937 και χρησιμοποιήθηκε ως πρότυπο για την εκτίμηση των ολικών λιπιδίων στο ανθρώπινο εγκεφαλονωτιαίο υγρό. Μια βελτιωμένη έκδοση της μεθόδου αυτής παρουσιάστηκε από τους Drevon και Schmit το 1964, ενώ μέχρι σήμερα, αποτελεί ένα ευρέως χρησιμοποιούμενο εργαλείο στην ιατρική για την ακριβή και ταχεία ποσοτικοποίηση των λιπιδίων εντός ανθρώπινου ορού (Mishra et al., 2014). Πρόκειται για μια γρήγορη φωτομετρική μέθοδο διαλογής ελαιογόνων μικροοργανισμών, που πλεονεκτεί έναντι των υπόλοιπων μεθόδων εφόσον δεν απαιτεί οποιαδήποτε εκχύλιση, χρειάζεται μικρή ποσότητα βιολογικού υλικού, ενώ επιτρέπει την ακριβή ποσοτική και ποιοτική ανάλυση των λιπιδίων (Izard et al., 2003).

Η μέθοδος εκχύλισης των λιπιδίων που χρησιμοποιείται ευρέως είναι η μέθοδος κατά Folch. Πρόκειται για μια μέθοδο στην οποία χρησιμοποιούνται οι διαλύτες χλωροφόρμιο:μεθανόλη σε αναλογία 2:1 οι οποίοι στοχεύουν στην ρήξη των κυττάρων και κατ' επέκταση την εκχύλιση του ενδοκυτταρικού λίπους (Folch et al., 1957).

1.4 Ανανεώσιμες πρώτες ύλες ως υποστρώματα ανάπτυξης μικροοργανισμών

Τα λιγνοκυτταρινούχα υλικά, ήτοι γεωργικά, βιομηχανικά και δασικά υπολείμματα αποτελούν ποτελούν την πλειονότητα της συνολικής βιομάζας που υπάρχουν στο κόσμο. Χαρακτηρίζονται, δε, ως ένα σημαντικό ανανεώσιμο υπόστρωμα για την παραγωγή προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας μέσω μικροβιακών ζυμώσεων, που δεν ανταγωνίζεται την παραγωγή τροφίμων και ζωοτροφών (Limayem et al., 2012). Σημαντική πηγή λιγνοκυτταρινούχων είναι τα

φρούτα και τα λαχανικά. Στην Ευρώπη υπολογίζεται ότι τουλάχιστον το 45 % της παραγωγής φρούτων και λαχανικών καταλήγει σε απόβλητα σε διαφορετικά στάδια της αλυσίδας εφοδιασμού τροφίμων. Συγκεκριμένα περίπου 20 % χάνεται στην καλλιέργεια του εκάστοτε φρούτου/λαχανικού, 4 % σε μετασυλλεκτικές εργασίες, 1 % στην επεξεργασία, 7 % κατά την διανομή και το 13 % κατά την κατανάλωση (King, 2013).

Τα λιγνοκυτταρινούχα υλικά αποτελούνται κυρίως από κυτταρίνη (30-50%), ημικυτταρίνη (15-35%) και λιγνίνη (10-20%). Η λιγνίνη είναι ένα αρωματικό και άκαμπτο βιοπολυμερές με μοριακό βάρος 10.000 Da συνδεδεμένο μέσω ομοιοπολικούς δεσμούς με ξυλάνες (ημικυτταρίνη) που προσδίδει ακαμψία στο φυτικό κύτταρο (Limayem et al., 2012). Η κυτταρίνη και η ημικυτταρίνη αποτελούν περίπου το 70% του συνόλου της βιομάζας και είναι στενά συνδεδεμένες με τη λιγνίνη μέσω ομοιοπολικών και δεσμών υδρογόνου. Η ημικυτταρίνη σχηματίζεται από ετεροπολυμερή συμπεριλαμβανομένων εξοζών όπως D-γλυκόζης, D-γαλακτόζης και D-μαννόζης καθώς και πεντοζών όπως D-ξυλόζης και L-αραβινόζης, ενώ μπορεί να περιλαμβάνουν και D-γλυκουρονικό και D-γαλακτουρονικό οξύ. Η κυτταρίνη είναι ένα δομικό γραμμικό συστατικό που απαντάται στο κυτταρικό τοίχωμα των φυτών και αποτελείται από μια μακρά αλυσίδα μονομερών γλυκόζης που συνδέονται με β-1,4-γλυκοζιτικούς δεσμούς. Αντιπροσωπεύει το 40-60% των αστικών στερεών αποβλήτων, ενώ βρίσκεται σε αφθονία σε απόβλητα από δασικά προϊόντα, τη γεωργία, και επεξεργασίας φρούτων και λαχανικών, ενώ το βαμβάκι και λινάρι αντιπροσωπεύουν τις πιο αγνές πηγές της κυτταρίνης (Mandels et al., 1974).

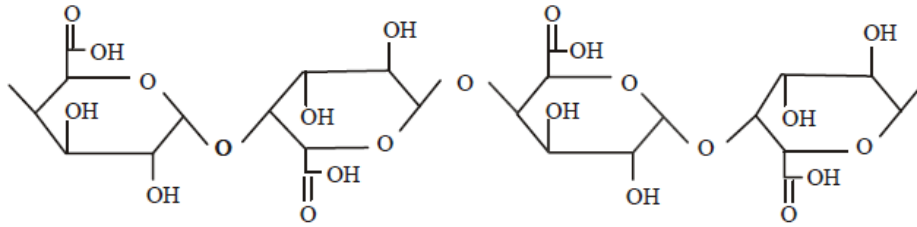
Στην μέχρι στιγμής υπάρχουσα βιβλιογραφία έχει αναφερθεί χρησιμοποίηση πληθώρας ανανεώσιμων υποστρωμάτων από διάφορους μικροοργανισμούς προς παραγωγή δευτερογενών μεταβολιτών, αιθανόλης και παραγωγής προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας. Οι μικροοργανισμοί *Pichia stipites* και *Debaryomyces hansenii* αποτελούν παραδείγματα παραγωγής αιθανόλης σε υποστρώματα D-ξυλόζης και άλλων πηγών άνθρακα προερχόμενα από την υδρόλυση ημικυτταρίνης υπολειμμάτων ζαχαροκάλαμου (Kurian et al., 2010). Αιθανόλη μπορεί να παραχθεί και από υποστρώματα πλούσια σε μαννόζη και γλυκόζη (Lawford et al., 1993), ενώ υπάρχουν αναφορές και για υποστρώματα L-αραβινόζης τα οποία χρησιμοποιούνται σε ζυμώσεις με μικροοργανισμούς του γένους *Candida*. Μικροοργανισμοί *Yarrowia lipolytica* δύναται να παράξουν μικροβιακό λίπος κατόπιν ζύμωσης σε γλυκερόλη (Papanikolaou et al., 2002), ενώ άλλες πηγές άνθρακα που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την παραγωγή λίπους αποτελούν η

φρουκτόζη, σακχαρόζη και N-ακέτυλο-D-γλυκοζαμίνη από μικροοργανισμούς του γένους *Rhodospiridium* (Zhao et al., 2010; Zhang et al., 2010). Εκτός από αιθανόλη και μικροβιακό λίπος η σακχαρόζη έχει χρησιμοποιηθεί στο παρελθόν και για την παραγωγή κιτρικού οξέος (Forster et al., 2007).

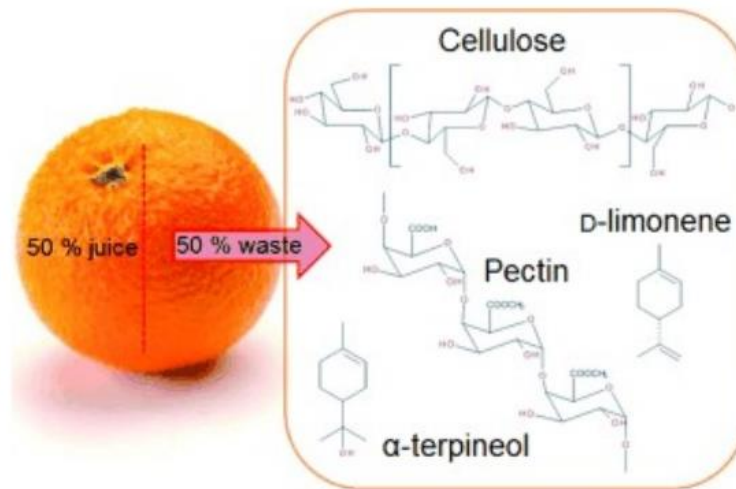
1.4.1 Γαλακτουρονικό οξύ

Το γαλακτουρονικό οξύ (D-γαλακτουρονικό οξύ) είναι ένα σάκχαρο-οξύ, μια οξειδωμένη μορφή της D-γαλακτόζης και αποτελεί το κύριο συστατικό της πηκτίνης, στην οποία απαντάται σαν πολυμερές πολυγαλακτουρονικού οξέος (Σχήμα 1.6.1). Πλούσιες πηγές γαλακτουρονικού οξέος αποτελούν τα εσπεριδοειδή φρούτα που καλλιεργούνται και καταναλώνονται σε όλο τον κόσμο. Η παραγωγή πορτοκαλιών αποτελεί περίπου το 55 % της παγκόσμιας παραγωγής εσπεριδοειδών. Η φλούδα του πορτοκαλιού, στην οποία απαντάται η πηκτίνη, αντιπροσωπεύει περίπου το 50% του συνολικού βάρους των καρπών και παρά το γεγονός ότι είναι πλούσια σε θρεπτικά συστατικά, τα υπολείμματα εσπεριδοειδών δεν βρίσκουν καμία εμπορική σημασία (Σχήμα 1.6.2). Πιο συγκεκριμένα στη φλούδα η πηκτίνη απαντάται σε ποσοστό 25 % (επί ξηρού). Πλούσια σε πηκτίνη και γαλακτουρονικό οξύ αποτελούν και τα μήλα και η πουλπα ζαχαροτεύτλων (Kar et al., 1999). Η πούλπα ζαχαροτεύτλων περιέχει 30 % ημικυτταρίνη, 24 % πηκτίνη, 24 % κυτταρίνη και 21 % αραβινάνης (Richard et al., 2009).

Εφόσον τα εσπεριδοειδή είναι πλούσια σε ζυμώσιμα σάκχαρα, δηλαδή γλυκόζη, φρουκτόζη, και σακχαρόζη, μαζί με αδιάλυτους πολυσακχαρίτες κυτταρίνης και πηκτίνης αποτελούν ιδανικά υποστρώματα ζύμωσης προς παραγωγή αιθανόλης, μικροβιακών λιπιδίων και άλλων μεταβολιτών. Ωστόσο, η παρουσία της πηκτίνης απαιτεί είτε σκληρή προεπεξεργασία είτε εφαρμογή ενζύμων για την απελευθέρωση των σακχάρων (Oberoi et al., 2010). Τα τελευταία χρόνια το επιστημονικό ενδιαφέρον έχει στραφεί στην αξιοποίηση τέτοιων ανανεώσιμων πηγών άνθρακα. Συγκεκριμένα το γαλακτουρονικό οξύ έχει μελετηθεί προσφάτως σε μικροβιακές ζυμώσεις προς παραγωγή μικροβιακού λίπους (Wu et al., 2010).



Σχήμα 1.4.1: Δομή πολυγαλακτουρονικού οξέος (Khan et al., 2015).



Σχήμα 1.4.2: Χημική σύσταση παραπροϊόντων που προκύπτουν από την βιομηχανία παραγωγής χυμού πορτοκαλιού.

1.4.2 N-ακετυλο-D-γλυκοζαμίνη

Η χιτίνη αποτελεί το δεύτερο πιο σημαντικό φυσικό πολυμερές στον κόσμο. Οι κύριες πηγές της είναι θαλάσσια καρκινοειδή, γαρίδες και καβούρια (Rinaudo, 2006). Η χιτίνη είναι βασικό συστατικό για την σύνθεση των εξωσκελετών αρθρόποδων αλλά και του κυτταρικού τοιχώματος των μυκήτων (Zhang et al., 2010).

Το μονομερές της χιτίνης είναι ένα αμινοσάκχαρο, η γλυκοζαμίνη. Εμπορικά η γλυκοζαμίνη βρίσκεται υπό την μορφή της N-ακετυλο-D-γλυκοζαμίνης, ενός αμιδίου μεταξύ της γλυκοζαμίνης και του οξικού οξέος και χρησιμοποιείται ως συμπλήρωμα διατροφής προς την ενίσχυση της δομής και λειτουργίας των αρθρώσεων (Zhang et al., 2010). Επιπρόσθετα η χιτίνη

και τα παράγωγα της έχουν ένα ευρύ φάσμα βιολογικών δραστηριοτήτων συμπεριλαμβανομένων της αντιοξειδωτικής και αντιμικροβιακής δράσης, που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν στα τρόφιμα. Πιο συγκεκριμένα δρά έναντι του καρκίνου, της ρευματοειδούς αρθρίτιδας και διάφορων φλεγμονών. Ως συντηρητικό στα τρόφιμα μπορεί να χρησιμοποιηθεί προστατεύοντας το τρόφιμο από μικροβιακή αλλοίωση. Η αντιβακτηριακή αυτή δράση της χιτίνης έχει συνδεθεί με τα θετικά φορτία της τα οποία αλληλεπιδρούν με τα αρνητικά φορτία των βακτηριακών κυτταρικών τοιχωμάτων αναστέλλοντας την ανάπτυξη μικροοργανισμών (Hamed et al., 2016).

Η χιτοζάνη, N-απακετυλιωμένο παράγωγο της χιτίνης, έχει χρησιμοποιηθεί ως εδώδιμο υλικό συσκευασίας. Οι βιομεμβράνες που σχηματίζονται από χιτοζάνη επιτρέπουν την μακροπρόθεσμη αποθήκευση τροφίμων όπως λαχανικά, φρούτα και δημητριακά καθώς δρουν ως προστατευτικό φράγμα για την ενίσχυση της αισθητηριακής και τη διατροφικής ποιότητας τους (Hamed et al., 2016).

Τα υποπροϊόντα από την επεξεργασία γαρίδων, τα κεφάλια και τα κελύφη, περιέχουν πληθώρα πηγής άνθρακα με τη μορφή πρωτεϊνών και χιτίνης που θα μπορούσαν να μετατραπούν σε πολύτιμα έλαια ή άλλες ενώσεις μέσω μικροοργανισμών, ενώ το περιεχόμενο λίπος των υποπροϊόντων αυτών θα μπορούσε να μετατραπεί σε βιοντίζελ (Zhang et al., 2010). Υπολογίζεται ότι, περισσότεροι από 10.000 τόνοι οστρακοειδών αποβλήτων είναι διαθέσιμοι κάθε χρόνο, οι οποίοι μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως πρώτη ύλη για την παραγωγή προϊόντων προστιθέμενης αξίας (Hamed et al., 2016).

1.5 Μικροοργανισμοί που παρουσιάζουν ερευνητικό ενδιαφέρον

1.5.1 Ζύμες του είδους *Yarrowia lipolytica*

Ο μικροοργανισμός *Yarrowia lipolytica* αποτελεί μια από τις πιο μελετημένες «μη συμβατικές» ζύμες, όντας αυστηρά αερόβιος μικροοργανισμός ικανός να παράγει σημαντικούς μεταβολίτες και χαρακτηρίζεται από έντονη εκκριτική δραστηριότητα, πράγμα που δικαιολογεί τις προσπάθειες χρησιμοποίησης του στη βιομηχανία (ως βιοκαταλύτης), στη μοριακή βιολογία και στην γενετική. Πρόκειται για έναν μη παθογόνο μικροοργανισμό ενώ όποιοσδήποτε μέθοδοι σχετίζονται με τον μικροοργανισμό αυτό έχουν ταξινομηθεί ως ασφαλής GRAS (Generally

Recognised As Safe) σύμφωνα με τον Οργανισμό Τροφίμων και Φαρμάκων (FDA, USA). Η αλληλουχία του γονιδιώματος του έχει αποκαλύψει ότι ο μικροοργανισμός αυτός έχει μακρινή συγγένεια με την ζύμη *Saccharomyces cerevisiae*. Ωστόσο, οι γενετικοί μηχανισμοί φαίνεται να είναι σημαντικά διαφορετικοί (Wang et al., 1999).

Ένα από τα πιο σημαντικά προϊόντα που εκκρίνονται από αυτή την ν λόγω ζύμη αποτελεί η λιπάση, ένα ένζυμο που προσελκύει το ενδιαφέρον των επιστημόνων και των βιομηχανικών ερευνητών επειδή μπορεί να αξιοποιηθεί για διάφορες εφαρμογές στους τομείς των απορρυπαντικών, τροφίμων, φαρμάκων, και των περιβαλλοντικών βιομηχανιών. Όντας αυστηρά αερόβιος ζυμομύκητας, η ανάπτυξη και η έκκριση επηρεάζονται από την ποσότητα οξυγόνου που βρίσκεται διαθέσιμο στο μέσο καλλιέργειας.

Μια άλλη δυνατότητα των στελεχών *Yarrowia lipolytica* είναι η παραγωγή κιτρικού οξέος από μία ποικιλία πηγών άνθρακα, συμπεριλαμβανομένων των σακχάρων, αλκανίων, φυτικών ελαίων, προϊόντων υδρόλυσης αμύλου, αιθανόλης και γλυκερόλης (το κύριο υποπροϊόν των μονάδων παραγωγής βιοντίζελ) (Coelho et al., 2003).

1.5.2 Ζύμες του γένους *Rhodotorula* και *Rhodospiridium*

Οι ζύμες του γένους *Rhodotorula* ανήκουν στην κατηγορία των μικροοργανισμών που παράγουν β-καροτένιο. Πιο συγκεκριμένα τα είδη *Rhodotorula glutinis*, *Rhodotorula minuta*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Rhodotorula acheniorum* και *Rhodotorula graminis* αναγνωρίζονται ως καροτενοειδείς παραγωγοί (Gomez et al., 2014). Το γένος *Rhodotorula* περιλαμβάνει αυστηρά αερόβιες ζύμες με χαρακτηριστικά, όπως η ικανότητα να παράγουν γλυκογόνο κατά την διάρκεια της εκθετικής φάσης ανάπτυξης τους καθώς επίσης και μεγάλες ποσότητες λιπιδίων (Almanza et al., 2013).

Οι μικροοργανισμοί του γένους *Rhodospiridium*, και πιο συγκεκριμένα οι ζύμες *Rhodospiridium toruloides* παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον τόσο γιατί μπορούν να λιποσυσσωρεύσουν πάνω από το 50% της ξηρής βιομάζας όσο και για την ικανότητα τους να χρησιμοποιούν ως υπόστρωμα προϊόντα υδρόλυσης φυτικής βιομάζας με 5 και 6 άτομα άνθρακα (Wiebe et al., 2012).

1.5.3 Ζύμες του γένους *Cryptococcus* και *Lipomyces*

Οι μικροοργανισμοί του γένους *Cryptococcus* ανήκουν στην κατηγορία των ελαιογόνων μικροοργανισμών μαζί με μικροοργανισμούς του γένους *Yarrowia*, *Candida*, *Rhodotorula*, *Rhodospiridium*, *Trichosporon* και *Lipomyces* και έχουν μελετηθεί εκτενώς σε μικροβιακές ζυμώσεις. Το είδος *Cryptococcus curvatus* είναι ένας από τους ελαιώδεις ζυμομύκητες που μπορεί να συσσωρεύσει μεγάλες ποσότητες μικροβιακού λίπους, μέχρι 60-65 % του ξηρού βάρους (Ratledge, 1991), χρησιμοποιώντας φθηνές πηγές άνθρακα όπως ο ορός γάλακτος (Ykema, 1989) και άλλα υποστρώματα πλούσια σε υδατάνθρακες όπως γεωργικά απόβλητα ή απόβλητα επεξεργασίας τροφίμων. Η σύσταση του λίπους που παράγεται από τον εν λόγω μικροοργανισμό μοιάζει με αυτή των φυτικών ελαίων, όπως το φοινικέλαιο (Davies, 1988). Το λίπος που συσσωρεύει ο μικροοργανισμός αυτός βρίσκεται υπό την μορφή τριακυλογλυκερολών που περιλαμβάνουν κυρίως ελαϊκό (18:1), λινελαϊκό (18:2), στεατικό (18:0) παλμιτικό (16:0) και παλμιτελαϊκό οξύ (C16:1) (Thiru et al., 2011).

Τέλος, τα στελέχη του μικροοργανισμού *Lipomyces starkeyi* ανήκουν επίσης στην κατηγορία των ελαιογόνων ζυμών με ικανότητα λιποσυσσώρευσης έως και 70% της ξηρής βιομάζας (Wild et al., 2010).

1.6 Σκοπός της μελέτης

Η παρούσα μελέτη χωρίζεται χωρίζεται σε τρεις βασικές ενότητες: η πρώτη αφορά στην μελέτη ενός μεγάλου αριθμού ζυμών ως προς την ικανότητά τους να αφομοιώνουν διάφορες πηγές άνθρακα. Οι πηγές άνθρακα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν αραβινόζη, γαλακτόζη, μαννόζη, ξυλόζη, ραμνόζη σακχαρόζη και φρουκτόζη, οι οποίες απαντώνται στη φύση στο κυτταρικό τοίχωμα ή σε άλλα μέρη των φυτών. Τέτοια λιγνινοκυτταρινούχα υλικά μπορούν

Κατά τη δεύτερη ενότητα της παρούσας εργασίας πραγματοποιήθηκαν υγρές ζυμώσεις σε θρεπτικό μέσο που περιείχε γλυκόζη ως πηγή άνθρακα και με υψηλό λόγο άνθρακα προς άζωτο (C/N) έτσι ώστε να κατευθυνθεί ο μεταβολισμός προς την παραγωγή λιπιδίων και να επιλεγθούν ελαιογόνες ζύμες για το τρίτο πειραματικό στάδιο.

Στην τελευταία ενότητα της μελέτης επιλέχθηκαν εκείνες οι ελαιογόνες ζύμες οι οποίες παρουσίασαν ανάπτυξη στο γαλακτουρονικό οξύ και στη N-ακέτυλο-D-γλυκοζαμίνη κατά το πρώτο πειραματικό στάδιο, και πραγματοποιήθηκαν υγρές ζυμώσεις στις εν λόγω πηγές άνθρακα με απώτερο σκοπό την μελέτη της δυνατότητας παραγωγής μικροβιακών λιπιδίων σε τέτοια υποστρώματα.

2. Υλικά και μέθοδοι

2.1 Βιολογικό υλικό

Στην παρούσα μελέτη επιλέχθηκαν διάφορα γένη και είδη ζυμών που βρίσκονται στην τράπεζα του Εργαστηρίου Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων, στο Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών. Πρόκειται για 39 ζύμες οι οποίες παρουσιάζονται αναλυτικά στον πίνακα 2.1.1. Συγκεκριμένα μελετήθηκαν στελέχη του είδους *Yarrowia lipolytica* και είδη του γένους *Rhodotorula*, *Rhodospiridium*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Lipomyces*, *Metschnikowia* και *Shizosaccharomyces*.

Πίνακας 2.1.1: Οι ζύμες που εξετάστηκαν στην παρούσα μελέτη.

Γένος	Είδος	Γένος	Είδος
<i>Yarrowia</i>	<i>Y. lipolytica</i> 1281	<i>Rhodospiridium</i>	<i>R. kratochvilovae</i> EMBT Y-42
	<i>Y. lipolytica</i> 1203		<i>R. kratochvilovae</i> EMBT Y-43
	<i>Y. lipolytica</i> 1204		<i>R. toruloides</i> DSM 4444
	<i>Y. lipolytica</i> 5031		<i>R. toruloides</i> Y-27012
	<i>Y. lipolytica</i> 5030	<i>Cryptococcus</i>	<i>C. curvatus</i> ATCC 20509
	<i>Y. lipolytica</i> 5029		<i>C. curvatus</i> Y-1511
	<i>Y. lipolytica</i> LPMB 20		<i>C. curvatus</i> Y-44
	<i>Y. lipolytica</i> 50109		<i>C. uzbekistanensis</i> EMBT Y-44
	<i>Y. lipolytica</i> W29	<i>Debaryomaces</i>	<i>D. hansenii</i> EMBT Y-41
	<i>Y. lipolytica</i> 399		<i>D. hansenii</i> EMBT Y-36
	<i>Y. lipolytica</i> 179	<i>Rhodotorula</i>	<i>R. sp.</i> LFMB 6
	<i>Y. lipolytica</i> 5033		<i>R. sp.</i> Y-48
	<i>Y. lipolytica</i> LGAM		<i>R. sp.</i> Y-49
	<i>Y. lipolytica</i> 794		<i>R. sp.</i>
	<i>Y. lipolytica</i> 330		<i>R. glutinis</i> YB 252
	<i>Y. lipolytica</i> 1267		<i>R. glutinis</i>
	<i>Y. lipolytica</i> 798	<i>Lipomyces</i>	<i>L. starkeyi</i> DSM 70296
	<i>Y. lipolytica</i> Y-45	<i>Schizosaccharomyces</i>	<i>S. octosporus</i>
	<i>Y. lipolytica</i> Y-46	<i>Metschnikowia</i>	<i>M. poulcherima</i> (TEI)
	<i>Y. lipolytica</i> Y-47		

2.2 Παρασκευή εμβολίου

Για την παρασκευή και ανάπτυξη του εμβολίου (προκαλλιέργεια) οι μικροοργανισμοί καλλιεργήθηκαν αρχικά σε θρεπτικό μέσο (Yeast Peptone Dextrose, YPD) αποτελούμενο από (g/L): 10 εκχύλισμα ζύμης, 10 πεπτόνη, 10 γλυκόζη για 24 ώρες και επώαστηκαν σε θερμοκρασία από 20-30 °C ανάλογα με τις απαιτήσεις του εκάστοτε μικροοργανισμού. Στη συνέχεια το εμβόλιο (10%, v/v) μεταφερόταν υπό ασηπτικές συνθήκες σε υάλινα σωληνάκια ή σε κωνικές φιάλες των 250 mL για την διεξαγωγή του εκάστοτε πειράματος με θρεπτικό μέσο σύστασης που περιγράφεται σε επόμενη ενότητα.

2.3 Θρεπτικό μέσο και συνθήκες

2.3.1 Ικανότητα ζυμών ως προς την αφομοίωση διαφορετικών πηγών άνθρακα

Για την εξέταση της ικανότητας των ζυμών του πίνακα 2.1.1 ως προς την αφομοίωση διαφορετικών πηγών άνθρακα χρησιμοποιήθηκαν 9 διαφορετικές πηγές άνθρακα όπως παρουσιάζονται στον πίνακα 2.3.1. Για την διεξαγωγή αυτού του πειράματος χρησιμοποιήθηκαν υάλινα σωληνάκια χωρητικότητας 5 mL τα οποία πληρώθηκαν με 67 g/L εμπορικού μείγματος ανόργανης πηγής αζώτου (Nitrogen base, Difco), κατάλληλο για μελέτες αφομοίωσης πηγών άνθρακα, και 20 M πηγή άνθρακα. Τα υάλινα σωληνάκια που χρησιμοποιήθηκαν αποστειρώθηκαν σε αυτόκλειστο στους 121°C για 20 λεπτά ενώ η πηγή αζώτου και οι πηγές άνθρακα αποστειρώθηκαν ξεχωριστά μέσω φίλτρου με πορώδες 0,2 μm και υπό ασηπτικές συνθήκες προστέθηκαν στο θρεπτικό μέσο. Στη συνέχεια εμβολιάζονταν με προκαλλιέργεια (10%, v/v) ακολουθώντας επώαση στους 25 °C για 10 ημέρες. Η αφομοίωση των πηγών άνθρακα από τις ζύμες εκτιμήθηκε με μακροσκοπική και μικροσκοπική παρατήρηση των σωλήνων κατά την 4^η και 10^η ημέρα επώασης ενώ συγκρίθηκαν και με τα αντίστοιχα τυφλά. Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκαν δύο είδη τυφλών: α) σωληνάκια πληρωμένα με υπόστρωμα, όπως περιγράφηκε πιο πάνω, αλλά με προσθήκη αποστειρωμένου απιονισμένου νερού αντί για προκαλλιέργεια ζύμης και β) σωληνάκια με υπόστρωμα, όπως περιγράφηκε πιο πάνω, με προσθήκη αποστειρωμένου απιονισμένου νερού αντί της εξεταζόμενης πηγής άνθρακα.

Τα αποτελέσματα της αφομοίωσης των διαφορετικών πηγών άνθρακα εκφράστηκαν με τα σύμβολα «+» όταν παρατηρούνταν ανάπτυξη του μικροοργανισμού κατά την 4^η ημέρα επώασης και «-» όταν δεν παρατηρούνταν καμία ανάπτυξη έως και την 10^η ημέρα επώασης. Στην περίπτωση που κάποιος μικροοργανισμός δεν παρουσίαζε ανάπτυξη κατά την 4^η ημέρα αλλά είχε

εμφανή ανάπτυξη κατά την 10^η ημέρα επώασης τότε η δυνατότητα του μικροοργανισμού να αφομοιώνει την εξεταζόμενη πηγή άνθρακα χαρακτηριζόταν ως «ασθενής» (Weak).

Πίνακας 2.3.1: Οι πηγές άνθρακα που χρησιμοποιήθηκαν και ο χημικός τους τύπος.

Πηγές άνθρακα	Χημικός τύπος
Αραβινόζη	C ₅ H ₁₀ O ₅
Γαλακτόζη*	C ₆ H ₁₂ O ₆
Γαλακτουρονικό οξύ	C ₆ H ₁₀ O ₇
N-ακετυλο-D-γλυκοζαμίνη	C ₆ H ₁₃ NO ₅
Μαννόζη**	C ₆ H ₁₂ O ₆
Ξυλόζη	C ₅ H ₁₀ O ₅
Ραμνόζη	C ₆ H ₁₂ O ₅
Σακχαρόζη	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁
Φρουκτόζη	C ₆ H ₁₂ O ₆

*C-4 επιμερή της γλυκόζης, **C-2 επιμερή της γλυκόζης

2.3.2 Υγρές ζυμώσεις σε γλυκόζη για την παραγωγή μικροβιακού λίπους

Στο επόμενο στάδιο της παρούσας μελέτης επιλέχθηκαν συγκεκριμένα γένη και είδη (Πίνακας 2.3.2) για την εκτίμηση της ικανότητάς τους να λιποσυσσωρεύουν σε υπόστρωμα γλυκόζης. Για την παραγωγή μικροβιακού λίπους οι μικροοργανισμοί που επιλέχθηκαν καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό μέσο με σύσταση (g/L): ~80 γλυκόζη, 0,5 εκχύλισμα ζύμης, 0,5 (NH₄)₂SO₄, 7,0 KH₂PO₄, 2,5 Na₂HPO₄, 1,5 MgSO₄·7H₂O, 0,15 CaCl₂·2H₂O, 0,15 FeCl₃·6H₂O, 0,06 MnSO₄·H₂O και 0,02 ZnSO₄·7H₂O. Ο λόγος C/N ήταν υψηλός (~ 200 mol/mol) ώστε να ευνοηθεί η συσσώρευση ενδοκυτταρικού λίπους. Οι ζυμώσεις πραγματοποιήθηκαν σε κωνικές φιάλες των 250ml, με 50 ml τελικό όγκο ζύμωσης για να επιτευχθεί επαρκώς αερόβιο περιβάλλον. Τα υλικά και θρεπτικά μέσα που χρησιμοποιήθηκαν αποστειρώθηκαν σε αυτόκλειστο στους 121 °C για 20 λεπτά. Τα πειράματα των ζυμώσεων υγρής κατάστασης πραγματοποιήθηκαν σε θερμοκρασίες 28°C και 30°C, ανάλογα τις απαιτήσεις του κάθε μικροοργανισμού και υπό συνθήκες ανάδευσης (180 rpm).

Πίνακας 2.3.2: Ζύμες που μελετήθηκαν ως προς την ικανότητά τους να λιποσυσσωρεύουν σε υπόστρωμα γλυκόζης.

Είδη ζύμης	Στέλεχος
<i>Shizosaccharomyces octosporus</i>	
<i>Rhodotorula sp.</i>	Y-48
<i>Rhodotorula sp.</i>	Y-49
<i>Rhodotorula sp.</i>	
<i>Rhodotorula glutinis</i>	YB-252
<i>Rhodotorula glutinis</i>	
<i>Rhodotorula sp.</i>	LFMB 6
<i>Rhodospiridium toruloides</i>	DSM 4444
<i>Rhodospiridium toruloides</i>	Y-27012
<i>Rhodospiridium kratochvilovae</i>	EMBT Y-42
<i>Rhodospiridium kratochvilovae</i>	EMBT Y-43
<i>Lipomyces starkeyi</i>	DSM 70296
<i>Debaryomyces hansenii</i>	Y-36
<i>Debaryomyces hansenii</i>	Y-41
<i>Cryptococcus curvatus</i>	ATCC 20509
<i>Cryptococcus curvatus</i>	Y-44
<i>Cryptococcus curvatus</i>	Y-1511
<i>Cryptococcus uzbekistanensis</i>	EMBT Y-44

2.3.3 Υγρές ζυμώσεις σε γαλακτουρονικό οξύ και N-ακέτυλο-D-γλυκοζαμίνη για την παραγωγή μικροβιακού λίπους

Στο τελικό στάδιο επιλέχθηκαν οι μικροοργανισμοί που παρουσιάζονται στον πίνακα 2.3.3 για την μελέτη παραγωγής μικροβιακού λίπους χρησιμοποιώντας γαλακτουρονικό οξύ ως πηγή άνθρακα. Το θρεπτικό μέσο είχε την ακόλουθη σύσταση (g/L): ~20 γαλακτουρονικό οξύ, 0,5 εκχύλισμα ζύμης, 0,5 (NH₄)₂SO₄, 7,0 KH₂PO₄, 2,5 Na₂HPO₄, 1,5 MgSO₄·7H₂O, 0,15 CaCl₂·2H₂O, 0,15 FeCl₃·6H₂O, 0,06 MnSO₄·H₂O και 0,02 ZnSO₄·7H₂O. Για την παραγωγή μικροβιακού λίπους σε υπόστρωμα με N-ακέτυλο-D-γλυκοζαμίνη ως πηγή άνθρακα η σύσταση ήταν η ίδια χωρίς όμως προσθήκη (NH₄)₂SO₄. Οι ζυμώσεις πραγματοποιήθηκαν σε κωνικές φιάλες των 100 ml, με 20 ml τελικό όγκο ζύμωσης για να επιτευχθεί επαρκώς αερόβιο περιβάλλον. Τα υλικά και

θρεπτικά μέσα που χρησιμοποιήθηκαν αποστειρώθηκαν σε αυτόκλειστο στους 121 °C για 20 λεπτά. Τα εν λόγω πειράματα εμβολιάστηκαν με προκαλλιέργεια (10 %, v/v) και επώστηκαν σε θερμοκρασίες 28°C και 30°C, ανάλογα τις απαιτήσεις του κάθε μικροοργανισμού και υπό συνθήκες ανάδευσης (180 rpm).

Πίνακας 2.3.3: Ζύμες που μελετήθηκαν ως προς την ικανότητά τους να λιποσυσσωρεύουν σε υπόστρωμα που περιείχε γαλακτουρονικό οξύ ή N-ακέτυλο-D-γλυκοζαμίνη ως πηγή άνθρακα.

Πηγή άνθρακα	Είδος Ζύμης
N-ακέτυλο-D-γλυκοζαμίνη	<i>Cryptococcus curvatus</i> ATCC 20509
	<i>Rhodospiridium toruloides</i> DSM 4444
	<i>Rhodospiridium kratochvilovae</i> EMBT Y-42
	<i>Rhodospiridium kratochvilovae</i> EMBT Y-43
	<i>Rhodospiridium toruloides</i> Y-27012
	<i>Rhodotorula glutinis</i> YB 252
	<i>Rhodotorula</i> sp. LFMB 6
Γαλακτουρονικό οξύ	<i>Cryptococcus curvatus</i> ATCC 20509
	<i>Rhodospiridium toruloides</i> DSM 4444

2.4 Αναλυτικές μέθοδοι

2.4.1 Προσδιορισμός γλυκόζης με την μέθοδο δινιτροσαλικυλικού οξέος (DNS) και άλλων πηγών άνθρακα με υγρή χρωματογραφία υψηλής αποδόσεως (HPLC)

Όσον αφορά στα πειράματα των υγρών ζυμώσεων σε γλυκόζη ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης της γλυκόζης πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο του δινιτροσαλικυλικού οξέος (DNS). Πρόκειται για μια φωτομετρική μέθοδο η οποία χρησιμοποιείται για των προσδιορισμό αναγόντων σακχάρων (Miller, 1959). Πιο συγκεκριμένα, η αλδεϋδική ομάδα της γλυκόζης ανάγει το 3,5-δινιτροσαλικυλικού οξύ προς 3-αμινο-5- νιτροσαλικυλικό οξύ παρουσία NaOH ενώ ταυτόχρονα οξειδώνεται η γλυκόζη σε γλυκονικό οξύ. Η διαδικασία πραγματοποιήθηκε σε υάλινα σωληνάκια στα οποία προστέθηκαν 0,5 ml κατάλληλα αραιωμένο δείγμα και 0,5 ml αντιδραστήριο DNS, ενώ ταυτόχρονα παρασκευάστηκε τυφλό το οποίο περιλάμβανε νερό έναντι δείγματος. Μετά από έντονη ανάδευση με τη βοήθεια vortex τα σωληνάκια υπέστησαν βρασμό στους 100°C για 5 λεπτά. Ακολούθως 5ml απιονισμένου νερού προστέθηκαν στα σωληνάκια

ύστερα από την ψύξη τους με νερό και μετρήθηκε η απορρόφηση στα 540 nm. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν με τη βοήθεια πρότυπης καμπύλης γλυκόζης σε g/L καλλιέργειας.

Ο προσδιορισμός του γαλακτουρονικού οξέος και της N-ακετυλό-D-γλυκοζαμίνης πραγματοποιήθηκε με την βοήθεια της Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Αποδόσεως, (High Performance Liquid Chromatography, HPLC). Η ταυτοποίηση των πηγών άνθρακα βασίστηκε στον χρόνο κατακράτησης, ο οποίος συγκρίθηκε με γνωστά πρότυπα αυτών. Ως κινητή φάση χρησιμοποιήθηκε υδατικό διάλυμα H₂SO₄ (10 mM), η ροή ρυθμίστηκε στα 0,6 ml/min και η θερμοκρασία στους 45 °C. Η στήλη με την οποία επιτεύχθηκε ο διαχωρισμός του μίγματος ήταν τύπου Aminex HPX- 87H (300 mm × 7,8 mm).

2.4.2 Προσδιορισμός ξηρής βιομάζας

Ο προσδιορισμός της ξηρής βιομάζας πραγματοποιήθηκε με την συλλογή της σε 2 ή 3 διαφορετικά σημεία κατά την διάρκεια της ζύμωσης και φυγοκέντρηση (9000 rpm, 5 °C) για 10 λεπτά σε φυγόκεντρο τύπου Heraeus Sepatech Suprafuge 22. Ακολούθησε έκπλυση με προσθήκη απιονισμένου νερού και φυγοκέντρηση. Στη συνέχεια η καθαρή βιομάζα μεταφέρθηκε σε προζυγισμένα φιαλίδια McCartney και τοποθετήθηκε σε φούρνο ξήρανσης (90±5°C) μέχρι σταθερού βάρους. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν σε g/L καλλιέργειας.

2.4.3 Εκχύλιση ενδοκυτταρικού λίπους

Σε κάθε ζύμωση που έλαβε χώρα πραγματοποιήθηκε ποσοτικός προσδιορισμός του ενδοκυτταρικού λίπους με δύο μεθόδους. Χρησιμοποιήθηκε κυρίως η μέθοδος Folch (Folch et al., 1957) ενώ για επιλεγμένες ζύμες η μέθοδος του υδροχλωρίου (HCl) (Tapia et al., 2012, Tsakona et al., 2014). Στη μέθοδο του HCl, σε κάθε 300 mg ξηρής βιομάζας προστέθηκαν 4 ml HCl 2M και ακολούθησε θέρμανση στους 80°C για 45 λεπτά. Έπειτα από διήθηση το δείγμα τοποθετήθηκε σε φιαλίδιο Mc Cartney όπου και προστέθηκε μίγμα διαλυτών CHCl₃:MeOH σε αναλογία 2:1. Με το συγκεκριμένο μίγμα διαλυτών εκχλίζεται το συνολικό μικροβιακό λίπος, ήτοι και τα αποθηκευτικά και τα δομικά λιπίδια. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε διαχωρισμός του HCl από το μίγμα διαλυτών και το δείγμα συλλέχθηκε σε προζυγισμένη φιάλη εξάτμισης, ακολουθώντας εξάτμιση σε περιστροφικό εξάτμιστήρα (BUCHI Water bath B-480, BUCHI Rotavapor R-114) για την απομάκρυνση των διαλυτών. Στην απλή μέθοδο Folch μίγμα διαλυτών CHCl₃:MeOH σε αναλογία 2:1 προστέθηκε στην ξηρή βιομάζα και έπειτα από 72 ώρες παραμονής σε ξηρό και

σκοτεινό μέρος, έγινε απομάκρυνση της βιομάζας με διήθηση, ενώ το εκχύλισμα λίπους τοποθετήθηκε σε προζυγισμένη φιάλη και διαχωρίστηκε από το μίγμα διαλυτών με εξάτμιση υπό κενό. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν σε g/g ξηρής μάζας και g/L καλλιέργειας (Εικόνα 2.2.7).



Εικόνα 2.2.7: Φιάλη εξάτμισης πριν (α) και μετά (β) την εξάτμιση όπου α) μίγμα διαλυτών χλωροφόρμιο:μεθανόλη για εκχύλιση του λίπους και β) μικροβιακό έλαιο.

2.4.4 Προσδιορισμός pH

Κατά την διάρκεια διεξαγωγής των ζυμώσεων υγρής κατάστασης πραγματοποιείται καθημερινός έλεγχος της τιμής pH έτσι ώστε να διατηρείται στο 5,5.

3. Αποτελέσματα

3.1 Ικανότητα ζυμών ως προς την αφομοίωση διαφορετικών πηγών άνθρακα

Η ικανότητα των υπο εξέταση μικροοργανισμών ως προς την αφομοίωση διάφορων πηγών άνθρακα (αραβινόζη, γαλακτόζη, γαλακτουρονικό οξύ, μαννόζη, N-ακετυλό-D-γλυκοζαμίνη, ραμνόζη, σακχαρόζη, ξυλόζη και φρουκτόζη) παρουσιάζεται στους πιο κάτω πίνακες όπου για κάθε μικροοργανισμό η αφομοίωση άνθρακα συμβολίζεται με «+» και αντίστοιχα η μη αφομοίωση με «-». Επιπρόσθετα, όταν παρατηρούνταν ανάπτυξη του μικροοργανισμού μόνο κατά την δεύτερη παρατήρηση, δηλαδή κατά την 10^η ημέρα, τότε αυτή χαρακτηρίζονταν ως ασθενής (Weak).

3.1.1 *Yarrowia lipolytica*

Στον πίνακα 3.1.1 παρουσιάζεται η ικανότητα αφομοίωσης των προαναφερόμενων πηγών ανθράκων από διαφορετικά στελέχη του είδους *Yarrowia lipolytica*. Όπως φαίνεται και από τον πίνακα και τα 20 στελέχη του είδους *Yarrowia lipolytica* αφομοιώνουν την φρουκτόζη και την N-ακέτυλο-D-γλυκοζαμίνη. Αφομοιώνουν επίσης σακχαρόζη εκτός από τα στελέχη 1204, 179 και 330. Ξυλόζη φαίνεται να αφομοιώνουν μόνο τα στελέχη 1281, 1203, 1204, 50109, 5033, 330 και Y-46 ενώ μαννόζη φαίνεται να αφομοιώνουν όλα τα στελέχη εκτός των 399, 179, 794, 330 και 1267. Γαλακτόζη αφομοιώνουν μόνο 5 στελέχη (5031, LPMB 20, 5033, Y-46 και Y-47), ενώ αραβινόζη αφομοιώνουν τα εξής 4 στελέχη: 1281, 1203, 1204 και 5033. Τέλος, η ραμνόζη και το γαλακτουρονικό οξύ ήταν από τις πηγές άνθρακα που δεν προτιμήθηκαν από τους μικροοργανισμούς εφόσον ραμνόζη αφομοίωσαν μόνο 4 στελέχη, τα 5031, 50109, W29 και 1267, και γαλακτουρονικό οξύ μόνο τα στελέχη 1204 και Y-45.

Συμπερασματικά, τα υποεξέταση στελέχη στην πλειοψηφία τους φαίνεται να αφομοιώνουν μαννόζη, σακχαρόζη και φρουκτόζη. Επίσης, η ανάπτυξή τους δεν ευνοείται από τις πηγές άνθρακα αραβινόζη, γαλακτόζη, ξυλόζη, ραμνόζη και γαλακτουρονικό οξύ, ενώ εμφάνισαν ασθενή ανάπτυξη στην πηγή N-ακέτυλο-D-γλυκοζαμίνη.

Πίνακας 3.1.1: Αποτελέσματα αφομοίωσης πηγών άνθρακα από στελέχη του είδους *Yarrowia lipolytica*.

Στέλεχος	Αραβινόζη	Γαλακτόζη	Γαλακτουρονικό οξύ	N-ακέτυλο-D-γλυκοζαμίνη	Μαννόζη	Ξυλόζη	Ραμνόζη	Σακχαρόζη	Φρουκτόζη
1281	+	-	-	Weak	+	+	-	+	+
1203	+	-	-	Weak	+	+	-	+	+
1204	+	-	+	Weak	+	+	-	-	+
5031	-	+	-	Weak	+	-	Weak	+	+
5030	-	-	-	Weak	+	-	-	+	+
5029	-	-	-	Weak	+	-	-	+	+
LPMB 20	-	Weak	-	Weak	+	-	-	+	+
50109	-	-	-	Weak	+	Weak	Weak	+	+
W29	-	-	-	Weak	Weak	-	Weak	+	+
399	-	-	-	Weak	-	-	-	+	+
179	-	-	-	Weak	-	-	-	-	+
5033	+	+	-	Weak	+	+	-	+	+
LGAM	-	-	-	Weak	+	-	-	+	+
794	-	-	-	Weak	-	-	-	+	+
330	-	-	-	Weak	-	+	-	-	+
1267	-	-	-	Weak	-	-	+	+	+
798	-	-	-	Weak	Weak	-	-	+	+
Y-45	-	-	+	Weak	+	-	-	+	+
Y-46	-	Weak	-	Weak	+	+	-	+	+
Y-47	-	+	-	Weak	+	-	-	+	+

Στον πίνακα 3.1.2 παρουσιάζονται συνοπτικά αποτελέσματα δημοσιευμένων μελετών σχετικά με την ζύμωση διάφορων πηγών άνθρακα προς την παραγωγή λιπιδίων από στελέχη *Yarrowia lipolytica*. Είναι γεγονός ότι ανάλογα με τις συνθήκες καλλιέργειας, το στέλεχος και το χρησιμοποιούμενο υπόστρωμα, οι ελαιογόνες ζύμες δύνανται να συσσωρεύσουν μικροβιακά λιπίδια σε υψηλά ποσοστά. Διαφορετικά στελέχη *Yarrowia lipolytica* έχουν τη δυνατότητα να αφομοιώνουν πηγές άνθρακα όπως ξυλόζη, αραβινόζη και σακχαρόζη και να συσσωρεύσουν λίπος σε υψηλά ποσοστά της τάξεως των 48-58% (Tsigie et al., 2012). Το στέλεχος είναι μία πολύ σημαντική παράμετρος που καθορίζει την αφομοίωση των πηγών ανθράκων, ειδικότερα άλλα στελέχη του είδους *Y. lipolytica* που έχουν μελετηθεί δεν δύνανται να αφομοιώνουν ξυλόζη (Sha, 2013). Επιπρόσθετα, υπάρχουν μελέτες που αφορούν στην αφομοίωση ξυλόζης από διάφορα στελέχη του είδους *Yarrowia lipolytica* και μπορούν να χρησιμοποιηθούν και για την παραγωγή κιτρικού οξέος (Max et al., 2010). Σύμφωνα με τον Tempel (2000), μικροοργανισμοί *Yarrowia lipolytica* δεν είχαν την ικανότητα να αφομοιώνουν γαλακτόζη σε μια προσπάθεια χρησιμοποίησης τους ως καλλιέργειες εκκίνησης σε τυρί Danish blue, ενώ το στέλεχος *Yarrowia lipolytica* W29 μπορεί να αφομοιώσει φρουκτόζη και σακχαρόζη παράγοντας 9,15 g/L λίπος (Lazar et al., 2014). N-ακέτυλο-D-γλυκοζαμίνη μπορούν να αφομοιώσουν οι ζύμες *Yarrowia lipolytica* ενώ για τις πηγές άνθρακα ραμνόζη και γαλακτουρονικό οξύ δεν βρέθηκαν σχετικές αναφορές (Limtong et al., 2008).

Πίνακας 3.1.2: Μικροβιακή παραγωγή λιπιδίων από στελέχη *Yarrowia lipolytica*, υπό καλλιέργεια διαφορετικών πηγών άνθρακα που συγκεντρώθηκαν από διάφορες βιβλιογραφικές αναφορές.

Στέλεχος	Συνθήκες καλλιέργειας	Πηγή άνθρακα	Λιποπεριεκτικότητα ² (%)	Αναφορά
<i>Y. lipolytica</i> Po1g	AΦ ¹	Ξυλόζη 4,93 g/L	48,0	
<i>Y. lipolytica</i> Po1g	AΦ ¹	Αραβινόζη 2,09 g/L	48,0	Tsigie et al., 2012
<i>Y. lipolytica</i> Po1g	-	Ξυλόζη 13,59 g/L	58,5	
<i>Y. lipolytica</i>	-	Σουκρόζη 100 g/L	-	Max et al., 2010

¹ AΦ: Αναδεδυόμενες φιάλες, ² g λίπους ανά g ξηρής βιομάζας επί τοις εκατό.

3.1.2 *Rhodotorula* sp. και *Rhodosporidium* sp.

Η αφομοίωση των εξεταζόμενων πηγών άνθρακα από μικροοργανισμούς του γένους *Rhodotorula* και *Rhodosporidium* παρουσιάζεται στον Πίνακα 3.1.3. Όπως παρατηρείται όλοι οι μικροοργανισμοί του γένους *Rhodotorula* και του γένους *Rhodosporidium* έχουν την δυνατότητα να αφομοιώνουν την σακχαρόζη, την φρουκτόζη και την N-ακέτυλο-D-γλυκοζαμίνη. Αντιθέτως, ξυλόζη έχουν την δυνατότητα να αφομοιώνουν μόνο τα εξής 5 στελέχη: *Rhodotorula* sp. Y-48 και Y-49, *Rhodosporidium kratochvilovae* EMBT Y-42, *Rhodosporidium toruloides* DSM 4444 και *Rhodosporidium toruloides* Y-27012. Μαννόζη αφομοιώνουν όλοι οι μικροοργανισμοί εκτός των *Rhodotorula* sp. LFMB 6 και *Rhodotorula glutinis* YB 252. Γαλακτόζη αφομοιώνουν οι μικροοργανισμοί *Rhodotorula* sp. Y-48 και Y-49, *Rhodosporidium kratochvilovae* EMBT Y-42 και EMBT Y-43, *Rhodosporidium toruloides* DSM 4444 και Y-27012 ενώ αραβινόζη αφομοιώνουν οι μικροοργανισμοί *Rhodotorula* sp. Y-48 και Y-49, και *Rhodosporidium toruloides* DSM 4444 και Y-27012. Τέλος ραμνόζη αφομοιώνουν μόνο 2 μικροοργανισμοί, οι *Rhodotorula* sp. Y-48 και *Rhodotorula* sp., ενώ γαλακτουρονικό οξύ μόνο οι μικροοργανισμοί *Rhodosporidium kratochvilovae* EMBT Y-43 και *Rhodosporidium toruloides* DSM 4444.

Συμπερασματικά, οι μικροοργανισμοί του γένους *Rhodosporidium* και *Rhodotorula* φαίνεται να αφομοιώνουν μαννόζη, σακχαρόζη και φρουκτόζη. Επίσης, η ανάπτυξή τους δεν ευνοήθηκε από την παρουσία αραβινόζης, γαλακτόζης, ξυλόζης, ραμνόζης και γαλακτουρονικού οξέος στο υπόστρωμα, ενώ εμφάνισαν ασθενή ανάπτυξη όταν η κύρια πηγή άνθρακα ήταν N-ακέτυλο-D-γλυκοζαμίνη.

Πίνακας 3.1.3: Αποτελέσματα αφομοίωσης πηγών άνθρακα από τα είδη τα γένη *Rhodotorula* και *Rhodosporidium*.

Είδος/Στέλεχος	Αραβινόζη	Γαλακτόζη	Γαλακτουρονικό οξύ	N-ακέτυλο-D-γλυκοζαμίνη	Μαννόζη	Ξυλόζη	Ραμνόζη	Σακχαρόζη	Φρουκτόζη
<i>Rhodotorula</i> sp. LFMB 6	-	-	-	Weak	-	-	-	+	+
<i>Rhodotorula</i> sp. Y-48	Weak	Weak	-	Weak	+	Weak	+	+	+
<i>Rhodotorula</i> sp. Y-49	Weak	+	-	Weak	+	+	-	+	+
<i>Rhodotorula</i> sp.	-	-	-	Weak	+	-	+	+	+
<i>Rhodotorula glutinis</i> YB 252	-	-	-	Weak	-	-	-	+	+
<i>Rhodotorula glutinis</i>	-	-	-	Weak	+	-	-	+	+
<i>Rhodosporidium kratochvilovae</i> EMBT Y-42	-	+	-	Weak	+	+	-	+	+
<i>Rhodosporidium kratochvilovae</i> EMBT Y-43	-	+	weak	Weak	+	-	-	+	+
<i>Rhodosporidium toruloides</i> DSM 4444	+	Weak	+	Weak	+	+	-	+	+
<i>Rhodosporidium toruloides</i> Y-27012	Weak	Weak	-	Weak	+	+	-	+	+

Στον πίνακα 3.1.4 που ακολουθεί παρουσιάζονται αποτελέσματα μελετών σχετικά με την παραγωγή μικροβιακών λιπιδίων από μικροοργανισμούς του γένους *Rhodotorula* και *Rhodospiridium*, με βάση τη σύγχρονη βιβλιογραφία. Στελέχη του μικροοργανισμού *Rhodospiridium toruloides* μπορούν να αφομοιώσουν ξυλόζη και αραβινόζη, με δυνατότητα λιποσυσσώρευσης μέχρι και 42% (Bonturi et al, 2015). Υπάρχουν όμως και αναφορές σχετικά με στελέχη του μικροοργανισμού αυτού που δεν δύναται να αφομοιώσουν την ξυλόζη ακόμα και σε μικρές ποσότητες (Suomalainen et al., 1989). Επιπρόσθετα, στελέχη του μικροοργανισμού *Rhodotorula glutinis* μπορούν να αφομοιώσουν ξυλόζη με δυνατότητα λιποσυσσώρευσης 25% (Yu et al., 2010), ενώ ο μικροοργανισμός *Rhodotorula glutinis* ATCC 15125 αφομοιώνει N-ακέτυλο-D-γλυκοζαμίνη με χαμηλό όμως ποσοστό λιποσυσσώρευσης (Zhang et al., 2010). Όσον αφορά την φρουκτόζη και σακχαρόζη, μπορούν να αφομοιωθούν εύκολα από στελέχη *Rhodospiridium toruloides*, παρουσιάζοντας λιποσυσσώρευση έως και 40% (Zhao et al., 2010). Παρομοίως, σακχαρόζη αφομοιώνουν και στελέχη *Rhodotorula glutinis* με λιποπεριεκτικότητα 17% (Dai et al., 2007). Σύμφωνα με τον Sitepu (2014) το στέλεχος *Rhodotorula glutinis* 50309 μπορεί να αφομοιώσει μαννόζη και γαλακτόζη ενώ δεν δύναται να αφομοιώσει αραβινόζη, ραμνόζη και γαλακτουρονικό οξύ. Παρομοίως, το στέλεχος *Rhodospiridium toruloides* 68264 μπορεί να αφομοιώσει μαννόζη και γαλακτουρονικό οξύ ενώ δεν δύναται να αφομοιώσει γαλακτόζη και ραμνόζη (Sitepu et al., 2014).

Πίνακας 3.1.4: Μικροβιακή παραγωγή λιπιδίων από στελέχη *Rhodosporidium toruloides* και *Rhodotorula glutinis*, κατά την υγρή καλλιέργειά τους σε διαφορετικές πηγές άνθρακα.

Είδος/Στέλεχος	Συνθήκες καλλιέργειας	Πηγή άνθρακα/ Αρχική συγκέντρωση (g/L)	Λιποπεριεκτικότητα ³ (%)	Αναφορά
<i>R. toruloides</i> ^a	AΦ ¹	Ξυλόζη/ 40	38,9%	Pan et al., 2009
<i>R. toruloides</i> CBS14 ^a	Ημισυνεχής - B ²	Ξυλόζη/ 30	36-45 %	Wiebe et al., 2012
<i>R. toruloides</i> CBS15 ^a	Ημισυνεχής - B ²	Αραβινόζη/ 30	15-19 %	
<i>R. toruloides</i> ^a	-	Ξυλόζη/ 10-17	42 %	Bonturi, 2015
<i>R. toruloides</i> ATCC 26194 ^a	AΦ ¹	Ξυλόζη/ 40		Suomalainel et al., 1989
<i>R. toruloides</i> Y4 ^a	Ημισυνεχής - B ²	Φρουκτόζη & Σακχαρόζη/ 40	40 %	Zhao et al., 2010
<i>R. toruloides</i> ATCC 10788 ^a	AΦ ¹	Ξυλόζη/ 10	25 %	Yu et al., 2010
<i>R. glutinis</i> ATCC 204091 ^β	AΦ ¹	Ξυλόζη/ 10	20-25 %	
<i>R. glutinis</i> ATCC 15125 ^β	AΦ ¹	N-ακέτυλο-D-Γλυκοζαμίνη/ 50	2,8 %	Zhang et al., 2010

¹ AΦ: Αναδεδυόμενες φιάλες, ² B: Βιοαντιδραστήρας, ³ g λίπους ανά g ξηρής βιομάζας επί τοις εκατό.

^a Στέλεχη του γένους *Rhodosporidium*, ^β Στέλεχη του γένους *Rhodotorula*

3.1.3 *Cryptococcus* sp., *Lipomyces* sp., *Debaryomyces* sp., *Metschnikowia*, και *Schizosaccharomyces* sp.

Στον πίνακα 3.1.5 που ακολουθεί παρουσιάζεται η αφομοίωση των πηγών άνθρακα από ζύμες του γένους *Cryptococcus*, στελέχη του είδους *Debaryomyces hansenii* καθώς και από τους μικροοργανισμούς *Metschnikowia poulcherima*, *Schizosaccharomyces octosporus* και *Lipomyces starkeyi*. Πιο συγκεκριμένα, σακχαρόζη και φρουκτόζη αφομοιώνουν όλοι οι μικροοργανισμοί, ενώ N-ακέτυλο-D-γλυκοζαμίνη αφομοιώνουν όλοι εκτός των μικροοργανισμών *Lipomyces starkeyi* και *Schizosaccharomyces octosporus*. Η ξυλόζη αφομοιώνεται από όλους τους μικροοργανισμούς εκτός των *Cryptococcus uzbekistanensis* EMBT Y-44, *Debaryomyces hansenii* EMBT Y-36 και τον μικροοργανισμό *Schizosaccharomyces octosporus*. Η μαννόζη ως πηγή άνθρακα αφομοιώνεται από όλους τους μικροοργανισμούς εκτός των *Cryptococcus uzbekistanensis* EMBT Y-44 και *Schizosaccharomyces octosporus*. Γαλακτόζη αφομοιώνουν μόνο οι μικροοργανισμοί *Cryptococcus curvatus* 20509 και Y-44, *Debaryomyces hansenii* EMBT

Y-36 και *Lipomyces starkeyi*. Η αραβινόζη αφομοιώνεται μόνο από τους *Cryptococcus curvatus* Y-44, *Debaryomyces hansenii* EMBT Y-41 και *Lipomyces starkeyi*. Τέλος, η ραμνόζη αφομοιώνεται σε χαμηλό βαθμό μόνο από τον μικροοργανισμό *Lipomyces starkeyi* και το γαλακτουρονικό οξύ μόνο από τον μικροοργανισμό *Cryptococcus curvatus* 20509.

Παρομοίως, συγκεντρώθηκαν αποτελέσματα μελετών σχετικά με την παραγωγή μικροβιακών λιπιδίων από μικροοργανισμούς *Cryptococcus*, *Debaryomyces hansenii*, *Metshcikowia poullcherima*, *Schizosaccharomyces octosporus* και *Lipomyces starkeyi*, τα οποία παρουσιάζονται στον πίνακα 3.1.6.

Συμπερασματικά, μικροοργανισμοί του γένους *Cryptococcus* αναλόγως είδους και στελέχους μπορούν να αφομοιώσουν διάφορες πηγές άνθρακα. Συγκεκριμένα, το στέλεχος *Cryptococcus curvatus* 76559 μπορεί να αφομοιώσει ξυλόζη, αραβινόζη, μαννόζη, γαλακτόζη, ραμνόζη, σακχαρόζη και γαλακτουρονικό οξύ (Sitepu et al., 2014). Επιπρόσθετα έχει γίνει και αναφορά για την αφομοίωση της N-ακέτυλο-D-γλυκοζαμίνης από το στέλεχος *Cryptococcus curvatus* ATTC 20509 με λιποπεριεκτικότητα 52% (Wu et al., 2010). Ακολούθως, μικροοργανισμοί *Debaryomyces hansenii* δύναται να αφομοιώσουν ξυλόζη ενώ, για το στέλεχος του μικροοργανισμού *Metshcikowia poullcherima* 111039 έχει γίνει αναφορά αφομοίωσης ξυλόζης, μαννόζης, γαλακτόζης και σακχαρόζης ενώ δεν δύναται να αφομοιώσει αραβινόζη, ραμνόζη και γαλακτουρονικό οξύ (Sitepu et al., 2014). Τέλος, αναφορές σχετικά με τον μικροοργανισμό *Lipomyces starkeyi* υποστηρίζουν ότι μπορεί να αφομοιώσει ξυλόζη και μαννόζη (Gong et al., 2012; Yang et al., 2014). Επιπρόσθετα, το στέλεχος *Lipomyces starkeyi* 7823 μπορεί να αφομοιώσει ξυλόζη, αραβινόζη, μαννόζη, γαλακτόζη, ραμνόζη, σακχαρόζη και γαλακτουρονικό οξύ (Sitepu et al., 2014).

Πίνακας 3.1.5: Αποτελέσματα αφομοίωσης πηγών άνθρακα από τις ζύμες *Cryptococcus*, *Debaryomyces hansenii*, *Metshcikowia poulcherima*, *Schizosaccharomyces octosporus* και *Lipomyces starkeyi*.

Είδος/ Στέλεχος	Αραβινόζη	Γαλακτόζη	Γαλακτουρονικό οξύ	N-ακέτυλο-D-γλυκοζαμίνη	Μαννόζη	Ξυλόζη	Ραμνόζη	Σακχαρόζη	Φρουκτόζη
<i>Cryptococcus curvatus</i> ATCC 20509	-	+	weak	Weak	+	+	-	+	+
<i>Cryptococcus curvatus</i> Y-1511	-	-	-	Weak	+	+	-	+	+
<i>Cryptococcus curvatus</i> Y-44	Weak	+	-	Weak	+	+	-	+	+
<i>Cryptococcus uzbekistanensis</i> EMBT Y-44	-	-	-	Weak	-	-	-	+	+
<i>Debaryomyces hansenii</i> EMBT Y-41	+	-	-	Weak	+	Weak	-	+	+
<i>Debaryomyces hansenii</i> EMBT Y-36	-	+	-	Weak	+	-	-	+	+
<i>Metshcikowia poulcherima</i>	-	-	-	Weak	+	+	-	+	+
<i>Schizosaccharomyces octosporus</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	+
<i>Lipomyces starkeyi</i> DSM 70296	+	+	-	-	+	+	Weak	+	+

Πίνακας 3.1.6: Βιβλιογραφική ανασκόπηση παραγωγής μικροβιακών λιπιδίων από ζύμες του γένους *Cryptococcus*, *Debaryomyces* και *Lipomyces starkeyi* σε διάφορες πηγές άνθρακα.

Είδος/ Στέλεχος	Συνθήκες καλλιέργειας	Πηγή άνθρακα/ Αρχική συγκέντρωση (g/L)	Λιποπεριεκτικότητα ² (%)	Αναφορά
<i>C. curvatus</i> ATCC 20509	AΦ ¹	N-ακέτυλο-D-Γλυκοζαμίνη 90 g/L	54%	Wu et al., 2010
<i>C. curvatus</i>	AΦ ¹	Φρουκτόζη 51 g/L	22%	Hassan et al., 2014
<i>C. curvatus</i>	-	Ξυλόζη	-	Yu et al., 2014
<i>D. hansenii</i> DTIA 77	AΦ ¹	Ξυλόζη 90 g/L	-	Roseiro et al., 1991
<i>D. hansenii</i>	-	Ξυλόζη 50 g/L	-	Girio et al., 1996
<i>D. hansenii</i> CCM1 941	-	Ξυλόζη 15 g/L	-	Duarte et al., 2005
<i>D. hansenii</i> NRRL Y-7426	AΦ ¹	Ξυλόζη 279 g/L	-	Dominguez et al., 1997
<i>L. starkeyi</i>	-	Ξυλόζη	19%	Gong et al., 2012
<i>L. starkeyi</i>	-	Μαννόζη	12%	Yang et al., 2014

¹AΦ: Αναδευόμενες φιάλες, ² g λίπους ανά g ξηρής βιομάζας επί τοις εκατό.

3.2 Μελέτη παραγωγής μικροβιακού λίπους ζυμών κατά την υγρή ζύμωσή τους σε υπόστρωμα γλυκόζης

Στην συνέχεια της παρούσας εργασίας μελετήθηκε η δυνατότητα παραγωγής λίπους από όλα τα προαναφερθέντα στελέχη ζυμών, εκτός του γένους *Yarrowia* και *Metschnikowia*. Ο λόγος που αποκλείστηκαν αυτά τα γένη είναι διότι ο μεταβολισμός των μεν *Yarrowia* sp. στρέφεται κυρίως προς την παραγωγή κιτρικού οξέος, οι δε *Metschnikowia* sp. φαίνεται να μην είναι «συμβατικές» ελαιογόνες ζύμες καθώς απαιτούν ιδιαίτερες συνθήκες ζύμωσης για την παραγωγή λίπους (Santamauro et al., 2014). Οι εξεταζόμενες ζύμες καλλιεργήθηκαν σε υπόστρωμα με υψηλό λόγο C/N, έτσι ώστε να ευνοηθεί η λιποσυσσώρευση, χρησιμοποιώντας γλυκόζη ως κύρια πηγή άνθρακα. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον πίνακα 3.2.1 που ακολουθεί.

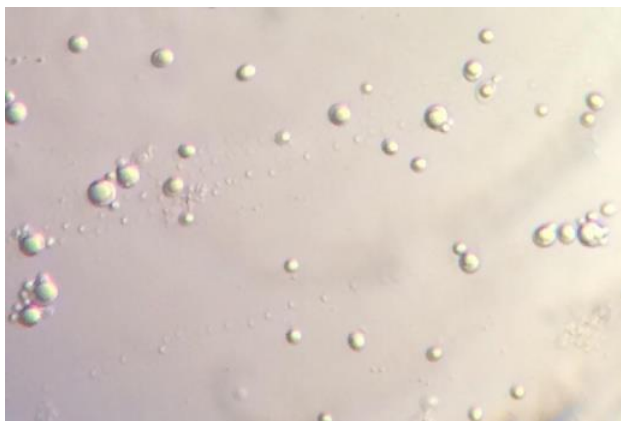
Πίνακας 3.2.1: Παραγωγή μικροβιακού λίπους κατά την υγρή ζύμωση διαφόρων ζυμών χρησιμοποιώντας ως κύρια πηγή άνθρακα την γλυκόζη σε συγκέντρωση 60-80 g/L.

Είδος/Στέλεχος	Χρόνος (h)	Καταναλωθείσα γλυκόζη (%)	Βιομάζα (g/L)	Λίπος (g/L)	Λιποπεριεκτικότητα (%)
<i>R. toruloides</i> DSM 4444 ¹	96	93,2	9,5	2,17	22,8
<i>R. toruloides</i> Y-27012 ¹	92	87,4	22,2	7,03	31,7
<i>R. kratochvilovae</i> Y-42 ¹	112	87,7	16,3	1,40	8,8
<i>R. kratochvilovae</i> Y-43 ¹	112	91,0	17,4	3,15	18,5
<i>R. glutinis</i> ²	130	95,3	13,7	0,57	4,3
<i>R. LFMB 6</i> ²	130	97,4	15,8	1,75	11,1
<i>R. glutinis</i> YB 252 ²	48	88,7	16,8	2,84	16,9
<i>R. sp.</i> Y-48 ²	134	94,5	16,8	0,48	2,6
<i>R. sp.</i> Y-49 ²	92	87,2	14,1	1,15	8,2
<i>R. sp.</i> ²	130	97,8	14,7	0,73	5,0
<i>C. curvatus</i> ATCC 20509	92	93,1	20,9	4,40	21,0
<i>C. curvatus</i> Y-1511	134	93,8	18,7	2,75	14,7
<i>C. curvatus</i> Y-44	48	97,9	7,4	0,70	7,1
<i>C. uzbekistanensis</i> Y-44	68	95,8	10,5	1,32	13,6
<i>D. hansenii</i> Y-36	95	88,5	18,5	0,44	2,5
<i>D. hansenii</i> Y-41	95	96,9	21,0	0,70	3,3
<i>L. starkeyi</i> DSM 70296	92	83,4	23,2	4,02	17,4
<i>S. octosporus</i>	48	81,7	3,2	0,18	5,6

¹ Στελέχη του γένους *Rhodospiridium*, ² Στελέχη του γένους *Rhodotorula*

Πιο αναλυτικά, όπως παρατηρείται και από τον παραπάνω πίνακα, οι ζύμες που παρουσίασαν την μεγαλύτερη παραγωγή λίπους και λιποσυσσώρευσης είναι: τα στελέχη *Rhodosporidium toruloides* DSM 4444 και Y-27012, *Rhodosporidium kratochvilovae* EMBT Y-43, *Rhodotorula glutinis* YB 252, τα στελέχη ATCC 20509 και Y-1511 του μικροοργανισμού *Cryptococcus curvatus*, *Cryptococcus uzbekisatnensis* Y-44 και το *Lipomyces starkeyi* DSM 70296.

Ειδικότερα για τα στελέχη *Rhodosporidium toruloides* DSM 4444 και Y-27012 προσδιορίστηκαν 2,17 και 7,03 g/L λίπος, αντίστοιχα, παρουσιάζοντας την μεγαλύτερη λιποπεριεκτικότητα μεταξύ των υπο εξέταση μικροοργανισμών (22,8 % και 31,7 %, αντίστοιχα). Επιπρόσθετα, παρουσίασαν βιομάζα 9,5 g/L και 22,2 g/L, επί ξηρού, σε ζύμωση διάρκειας περίπου 95 ωρών καταναλώνοντας το 87,4 και 93,2 % της γλυκόζης, αντίστοιχα. Η ζύμη *Rhodosporidium kratochvilovae* EMBT Y-43 παρουσίασε επίσης υψηλή λιποπεριεκτικότητα της τάξεως του 18,5 %, παραγωγή λίπους 3,15 g/L και παραγωγή ξηρής βιομάζας 17,4 g/L, έπειτα από 112 ώρες ζύμωσης (Εικόνα 3.2.2). Τα στελέχη *Cryptococcus curvatus* ATCC 20509 και Y-1511 κατανάλωσαν 93 % της πηγής άνθρακα παράγοντας 20,9 g/L και 18,7 g/L ξηρής βιομάζας, και συσσωρεύοντας ενδοκυτταρικά 21 % και 14,7 % λίπος, αντίστοιχα.



Εικόνα 3.2.2: Μικροσκοπική παρατήρηση συσσώρευσης μικροβιακού λίπους από την ζύμη *Rhodosporidium kratochvilovae* EMBTY-43.

Χαμηλότερη λιποπεριεκτικότητα παρουσίασαν οι μικροοργανισμοί *Rhodotorula glutinis* YB 252, *Cryptococcus uzbekisatnensis* Y-44 και *Lipomyces starkeyi* DSM 70296. Ειδικότερα, οι *Rhodotorula glutinis* YB 252 και *Lipomyces starkeyi* DSM 70296 παρουσίασαν λιποπεριεκτικότητα 16,9 και 17,4 % συσσωρεύοντας 2,84 g/L και 4,02 g/L λίπους, καταναλώνοντας περίπου 85 % γλυκόζη. Η βιομάζα που παρήχθει αντιστοιχεί σε 23,2 g/L για τον *Lipomyces starkeyi* DSM 70296 και 16,8 g/L για τον *Rhodotorula glutinis* YB 252. Για τον μικροοργανισμό *Cryptococcus uzbekisatnensis* Y-44 ο οποίος αφομοίωσε 96% γλυκόζη σε ζύμωση διάρκειας 68 ωρών, προσδιορίστηκαν 10,5 g/L βιομάζας και 1,32 g/L λίπους παρουσιάζοντας λιποσυσσώρευση 13,6 %.

Τέλος, οι μικροοργανισμοί *Rhodosporidium kratochvilovae* EMBT Y-42, *Rhodotorula glutinis*, *Rhodotorula* sp. LFMB 6, *Rhodotorula* sp. Y-48 και Y-49, *Cryptococcus curvatus* Y-44, *Debaryomyces hansenii* Y-36 και Y-41, και *Schizosaccharomyces octosporus*, παρουσίασαν λιποπεριεκτικότητα κάτω του 10% έπειτα από 80-95 % κατανάλωση της γλυκόζης.

Σύμφωνα με την σύγχρονη βιβλιογραφία, μικροοργανισμοί *Rhodosporidium toruloides* δύναται να λιποσυσσωρεύσουν έως και 40% (Turcotte et al., 2005). Σε βιβλιογραφική αναφορά με αρχική συγκέντρωση γλυκόζης 30 g/L ο μικροοργανισμός *Rhodosporidium toruloides* παρουσίασε λιποσυσσώρευση 7 % (Kraisintu et al., 2010)., ενώ σύμφωνα με τον Ratledge (2002) ο μικροοργανισμός *Rhodosporidium toruloides* μπορεί να παρουσιάσει λιποσυσσώρευση έως και 66%. Οι Li et al. (2007) αναφέρουν ότι το στέλεχος *Rhodosporidium toruloides* Y4 παρουσίασε λιποσυσσώρευση 48% έπειτα από την αφομοίωση 150 g/L γλυκόζης. Ωστόσο, υψηλή παραγωγή ενδοκυτταρικού λίπους έχει επιτευχθεί από την *Rhodosporidium toruloides* DSM 4444 σε υδρολυμένα υποστρώματα προερχόμενα από απόβλητα ζαχαροπλαστικής. Ειδικότερα η εν λόγω ζύμη παρουσίασε λιποπεριεκτικότητα της τάξεως του 61,8 % σε ασυνεχείς υγρές ζυμώσεις (Tsakona et al., 2015). Όσο αφορά στους μικροοργανισμούς *Rhodosporidium kratochvilovae* δεν βρέθηκαν αναφορές που να παρέχουν πληροφορίες για την ζύμωση τους σε υπόστρωμα γλυκόζης.

Οι ζύμες *Rhodotorula glutinis* συγκαταλέγονται στην κατηγορία των ελαιογόνων αφού η λιποπεριεκτικότητά τους μπορεί να φτάσει το 62% (Turcotte et al., 2005). Επίσης, ο Ratledge (2002) υποστηρίζει πως ο μικροοργανισμός *Rhodotorula glutinis* μπορεί να παρουσιάσει μέγιστη λιποπεριεκτικότητα 72%, ενώ ο Sha (2013) αναφέρει λιποπεριεκτικότητα για *Rhodotorula glutinis* 45 % σε υπόστρωμα γλυκόζης. Άλλες αναφορές υποστηρίζουν ότι τέτοιοι μικροοργανισμοί

παρουσιάζουν λιποπεριεκτικότητα περίπου 11 % έπειτα από ζύμωση σε υπόστρωμα γλυκόζης (Kaneko et al., 1976). Είδη του γένους *Rhodotorula* sp. όπως *Rhodotorula mucilaginosa* δύνανται να λιποσυσσωρεύουν έως και 51 % χρησιμοποιώντας ως πηγή άνθρακα την γλυκόζη. Στην σύγχρονη βιβλιογραφία έχουν μελετηθεί και τα είδη *Rhodotorula glacialis* και *Rhodotorula terpenoidalis* τα οποία παρουσίασαν λιποσυσσώρευση 68 % και 27 %, αντίστοιχα (Sitepu et al., 2014).

Όσο αφορά στους μικροοργανισμούς *Cryptococcus curvatus*, το στέλεχος ATCC 20509 δύνανται να παράξει λίπος 1,1 g/L έπειτα από την κατανάλωση λιγνοκυτταρινούχων υλικών ως πηγή άνθρακα (Chi et al., 2011). Με την αφομοίωση γλυκόζης τέτοιοι μικροοργανισμοί μπορούν να παράξουν λίπος αποδίδοντας 0,167 g λίπους ανά g καταναλωθείσας γλυκόζης (Lian et al., 2010). Σύμφωνα με τον Hassan (1996), η συγκεκριμένη ζύμη παρουσίασε λιποπεριεκτικότητα έως και 53 % παράγοντας κυρίως ελαϊκό, παλμιτικό και στεατικό οξύ σε υπόστρωμα γλυκόζης. Επιπρόσθετα, ανάλογα με την αρχική συγκέντρωση της πηγής άνθρακα που παρέχεται αναμένεται και διαφορετική παραγωγή λίπους αφού η ζύμη *Cryptococcus curvatus* δύνανται να λιποσυσσωρεύσει από 17 % έως και 60 % σε διαφορετικές συγκεντρώσεις γλυκόζης (Chang et al.,). Αναφορά γίνεται και για το στέλεχος *Cryptococcus curvatus* UfaM3 το οποίο παρουσίασε λιποσυσσώρευση 21 % έπειτα από την κατανάλωση γλυκόζης σε υπόστρωμα από χυμό αχλάδι (Hassan et al., 1995).

Οι μικροοργανισμοί *Debaryomyces hansenii* παρουσιάζουν σύμφωνα με την βιβλιογραφία, λιποπεριεκτικότητα περίπου 7 %, ενώ για τον μικροοργανισμό *Lipomyces starkeyi* αναφέρεται λιποπεριεκτικότητα 32 % (Kaneko et al., 1976). Επιπρόσθετα, ο μικροοργανισμός *Lipomyces starkeyi* δύνανται να λιποσυσσωρεύσει σύμφωνα με τον Ratledge (1994) έως και 63% και σύμφωνα με Sha (2013) έως και 27 % σε υπόστρωμα γλυκόζης. Πιο συγκεκριμένα τα στελέχη DSM 70295, AS 2.1560 και GIM2.142 παρουσίασαν λιποσυσσώρευση 56 %, 61,5 % και 24,7 % αντιστοίως (Tsakona et al., 2014). Τέλος, δεν βρέθηκαν αναφορές που να αναφέρονται στον μικροοργανισμό *Shizosaccharomyces octosporus*, παρόλα αυτά βιβλιογραφική αναφορά αναφέρει λιποσυσσώρευση έως και 9 % για την ζύμη *Shizosaccharomyces pombe* (Kaneko et al., 1976)

Εν κατακλείδι, από τα αποτελέσματα του πειράματος αυτού εντός ελαιογόνων μικροοργανισμών μπορούν να καταταχθούν οι μικροοργανισμοί *Rhodosporidium toruloides* DSM 4444, *Rhodosporidium toruloides* Y-27012, *Rhodosporidium kratochvilovae* Y-43, *Rhodotorula*

glutinis YB252, *Cryptococcus curvatus* ATCC 20509, *Lipomyces starkeyi* DSM 70296 των οποίων η λιποπεριεκτικότητα είναι μεγαλύτερη του 15%, και οριακά οι μικροοργανισμοί, *Cryptococcus curvatus* Y-1511 και *Cryptococcus uzbekistanensis* Y-44 (14,7 % και 13,6 %, αντίστοιχα).

3.3 Μελέτη παραγωγής μικροβιακού λίπους ζυμών κατά την υγρή ζύμωσή τους χρησιμοποιώντας ως κύρια πηγή άνθρακα το γαλακτουρονικό οξύ ή τη N-ακέτυλο-D-γλυκοζαμίνη

Με βάση τα προηγούμενα αποτελέσματα, της αφομοίωσης διαφορετικών πηγών άνθρακα και της παραγωγής λίπους σε υπόστρωμα γλυκόζης, επιλέχθηκαν οι ζύμες *Cryptococcus curvatus* ATCC 20509, *Rhodospiridium toruloides* DSM 4444, *Rhodospiridium kratochvilovae* EMBT Y-42, *Rhodospiridium kratochvilovae* EMBT Y-43, *Rhodospiridium toruloides* Y-27012, *Rhodotorula glutinis* YB 252 και *Rhodotorula* sp. LFMB 6 για να μελετηθούν περαιτέρω σε πιο πολύπλοκες πηγές άνθρακα, όπως το γαλακτουρονικό οξύ και την N-ακέτυλο-D-γλυκοζαμίνη. Ειδικότερα οι *Cryptococcus curvatus* ATCC 20509 και *Rhodospiridium toruloides* DSM 4444 μελετήθηκαν σε υπόστρωμα γαλακτουρονικού οξέος και οι *Cryptococcus curvatus* ATCC 20509, *Rhodospiridium toruloides* DSM 4444, *Rhodospiridium kratochvilovae* EMBT Y-42, *Rhodospiridium kratochvilovae* EMBT Y-43, *Rhodospiridium toruloides* Y-27012, *Rhodotorula glutinis* YB 252 και *Rhodotorula* sp. LFMB 6 σε N-ακέτυλο-D-γλυκοζαμίνη.

Στον πίνακα 3.3.1 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της ανάπτυξης και της παραγωγής μικροβιακού λίπους των *Rhodospiridium toruloides* Y-27012, *Rhodospiridium toruloides* DSM 4444 και *Cryptococcus curvatus* ATCC 20509 σε υπόστρωμα N-ακέτυλο-D-γλυκοζαμίνης. Η εν λόγω ζύμωση χωρίστηκε σε δύο στάδια. Κατά το πρώτο στάδιο οι ζύμες καταναλώνουν την N-ακέτυλο-D-γλυκοζαμίνη αλλά δεν παρατηρείται παραγωγή λιπιδίων. Κατόπιν, πραγματοποιήθηκε προσθήκη περίπου 40 g/L γλυκόζης έτσι ώστε να ευνοηθεί η παραγωγή λίπους. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η *Rhodospiridium toruloides* DSM 4444 κατανάλωσε σε 66 ώρες 19,5 g/L N-ακέτυλο-D-γλυκοζαμίνη, παρουσιάζοντας βιομάζα 2,7 g/L. Έπειτα από 90 ώρες συνολικής ζύμωσης και επιπλέον κατανάλωσης 28,7 g/L γλυκόζης παρήγαγε συνολικά 16,5 g/L ξηρή βιομάζα, λίπος 0.84 g/L και 5,1 % απόδοση λίπους ανά g βιομάζας. Αντίστοιχα, ο μικροοργανισμός *Cryptococcus curvatus* ATCC 20509, κατανάλωσε σε 66 ώρες 22,1 g/L N-ακέτυλο-D-γλυκοζαμίνη

παρουσιάζοντας βιομάζα 9,2 g/L ενώ στις 90 ώρες συνολικής ζύμωσης κατανάλωσε επιπλέον 32,7 g/L γλυκόζης παρουσιάζοντας βιομάζα 19,6 g/L, λίπος 0,68 g/L και λιποπεριεκτικότητα 3,5 %.

Όσο αφορά στους μικροοργανισμούς *Rhodosporidium kratochvilovae* EMBT Y-42, *Rhodosporidium kratochvilovae* EMBT Y-43, *Rhodotorula glutinis* YB 252 και *Rhodotorula* sp. LFMB 6 δεν κατανάλωσαν την N-ακέτυλο-D-γλυκοζαμίνη κατά την ζύμωσή τους. Επίσης, ο μικροοργανισμός *Rhodosporidium toruloides* Y-27012 ενώ κατανάλωσε την N-ακέτυλο-D-γλυκοζαμίνη και εμπλουτίστηκε με γλυκόζη δεν παρουσίασε λιποσυσσώρευση, αλλά παράγαγε υψηλή συγκέντρωση βιομάζας (37,4 g/L).

Πίνακας 3.3.1: Παραγωγή μικροβιακού λίπους από τις ζύμες *Rhodosporidium toruloides* Y-27012, *Rhodosporidium toruloides* DSM 4444 και *Cryptococcus curvatus* ATCC 20509 κατά την υγρή ζύμωσή τους σε υπόστρωμα αποτελούμενο αρχικά από 30 g/L N-ακέτυλο-D-γλυκοζαμίνης (Nag) και με προσθήκη γλυκόζης (Glu) μετά την κατανάλωση της N-ακέτυλο-D-γλυκοζαμίνης.

Ζύμη	Χρόνος (h)	Πηγή άνθρακα	Nag/ Glu αρχ. ¹ (g/L)	Nag/ Glu τελ. ² (g/L)	Βιομάζα (g/L)	Λίπος (g/L)	Λιποπεριεκτικότητα (%)
<i>R. toruloides</i> Y-27012	70	Nag	29,9±1,81	0,10±0,01	20,0±0,04	-	-
	70	Glu	38,4±2,12	8,0±0,00	37,4±2,40	-	-
<i>R. toruloides</i> DSM 4444	66	Nag	28,1±0,00	8,6±0,54	2,7±0,08	-	-
	90	Glu	41,4±0,33	12,7±0,04	16,5±0,09	0,84±0,20	5,1±1,3
<i>C. curvatus</i> ATCC 20509	66	Nag	29,1±0,38	7,0±1,41	9,2±0,03	-	-
	90	Glu	42,8±0,01	10,1±0,01	19,6±0,62	0,68±0,29	3,5±1,6

¹ Αρχική συγκέντρωση, ² Τελική συγκέντρωση.
Οι τιμές είναι οι μέσοι όροι δύο επαναλήψεων.

Τα αποτελέσματα των ζυμώσεων με γαλακτουρονικό οξύ ως υπόστρωμα παρουσιάζονται στον πίνακα 3.3.2 όπου η ζύμη *Rhodosporidium toruloides* DSM 4444, έπειτα από την κατανάλωση 34,3 g/L γαλακτουρονικού οξέος σε 44 ώρες, παρουσίασε βιομάζα 4,5 g/L, λίπος 0,20 g/L και λιποπεριεκτικότητα 4,5 %. Παρομοίως, η ζύμη *Cryptococcus curvatus* ATCC 20509

κατανάλωσε 31,8 g/L γαλακτουρονικού οξέως σε 20 ώρες με βιομάζα 5,7 g/L, λίπος 0,28 g/L και λιποπεριεκτικότητα 5,1 %.

Πίνακας 3.3.2: Παραγωγή μικροβιακού λίπους από τις ζύμες *Rhodospiridium toruloides* DSM 4444 και *Cryptococcus curvatus* ATCC 20509 κατά την υγρή ζύμωσή τους σε υπόστρωμα αποτελούμενο από 40 g/L γαλακτουρονικό οξύ (Gal).

Ζύμη	Χρόνος (h)	Gal. αρχ. ¹ (g/L)	Gal. τελ. ² (g/L)	Βιομάζα (g/L)	Λίπος (g/L)	Λιποπεριεκτικότητα (%)
<i>R. toruloides</i> DSM 4444	44	35,3±2,77	1,0±0,33	4,5±0,10	0,2±0,01	4,5±0,10
<i>C. curvatus</i> ATCC 20509	20	38,0±4,04	6,2±0,67	5,7±0,29	0,3±0,13	5,1±0,29

¹ Αρχική συγκέντρωση Γαλακτουρονικού οξέως, ² Τελική συγκέντρωση Γαλακτουρονικού οξέως. Οι τιμές είναι οι μέσοι όροι δύο επαναλήψεων.

Σύμφωνα με λίγες δημοσιευμένες εργασίες που υπάρχουν σχετικά με την παραγωγή λίπους σε υποστρώματα γαλακτουρονικού οξέως και N-ακετυλο-D-γλυκοζαμίνη μικροοργανισμοί του γένους *Rhodotorula* μπορούν να λιποσυσσωρεύσουν σε χαμηλό βαθμό με υπόστρωμα την N-ακέτυλο-D-γλυκοζαμίνη (λιγότερο από 5%), ενώ ο μικροοργανισμός *Cryptococcus curvatus* δύναται να λιποσυσσωρεύσει έως και 28,4 % έπειτα από την κατανάλωση 50 g/L N-ακέτυλο-D-γλυκοζαμίνης (Zhang et al., 2011). Επιπρόσθετα, σύμφωνα με τους Wu et al., (2010), το στέλεχος *Cryptococcus curvatus* ATCC 20509 παρουσίασε υψηλή λιποσυσσώρευση (45,4 %) σε υπόστρωμα που περιείχε 70 g/L N-ακέτυλο-D-γλυκοζαμίνης.

Συμπερασματικά θα μπορούσε να ειπωθεί ότι οι μικροοργανισμοί *Rhodospiridium toruloides* DSM 4444 και *Cryptococcus curvatus* ATCC 20509 αποτελούν ζύμες με υποσχόμενη προοπτική παραγωγής μικροβιακών λιπιδίων χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα την N-ακέτυλο-D-γλυκοζαμίνη και το γαλακτουρονικό οξύ. Το γεγονός ότι οι μικροοργανισμοί δεν μπόρεσαν να λιποσυσσωρεύσουν παρουσία N-ακέτυλο-D-γλυκοζαμίνης οδηγεί στο συμπέρασμα ότι πιθανότατα λόγω της παρουσίας αζώτου στο μόριο της N-ακέτυλο-D-γλυκοζαμίνης δεν

ευνοήθηκε η έναρξη της λιποσυσσώρευσης. Το γεγονός αυτό σημαίνει ότι είναι εξέχουσας σημασίας η περαιτέρω μελέτη της σύστασης του υποστρώματος όπως π.χ. ο λόγος C/N ή C/P. Δεδομένου ότι η ενίσχυση του υποστρώματος με γλυκόζη ήταν ικανή για να στρέψει τον μεταβολισμό προς την συσσώρευση λιπιδίων, άλλες πηγές άνθρακα, όπως αυτές που χρησιμοποιήθηκαν κατά την μελέτη αφομοίωσης, δύναται να λειτουργήσουν συνεργιστικά με την N-ακέτυλο-D-γλυκοζαμίνη και να οδηγήσουν στην παραγωγή λίπους αξιοποιώντας με αυτόν τον τρόπο ένα συνδυασμό αποβλήτων.

Βιβλιογραφία

Almanza, A., Montaneza, J., Aguilar-Gonzalez, M., Martinez-Avila, C., Rodriguez-Herrera, R., Cristobal, A. (2013). *Rhodotorula glutinis* as source of pigments and metabolites for food industry. *Food Bioscience*, 5, 64–72.

Bonturi, N., Matsakas, L., Nilsson, R., Christakopoulos, P., Miranda, E., Belglund, K., Rova, U. (2015). Single Cell Oil Producing Yeasts *Lipomyces starkeyi* and *Rhodospiridium toruloides*: Selection of Extraction Strategies and Biodiesel Property Prediction. *Energies*, 8(6), 5040-5052.

Chang, Y., Chang, K., Jang, H., Hsu, C. Effect of carbon source and high C/N ratio in the cellulosic hydrolysate- based media on the crude lipid contents and unsaturated fatty acid compositions of yeasts.

Chi, Z., Zheng, Y., Ma, J., Chen, S. (2011). Oleaginous yeast *Cryptococcus curvatus* culture with dark fermentation hydrogen production effluent as feedstock for microbial lipid production. *International Journal of Hydrogen Energy*, 36, 9542–9550.

Dai, C., Tao, J., Xie, F., Dai, Y., Zhao, M. (2007). Biodiesel generation from oleaginous yeast *Rhodotorula glutinis* with xylose assimilating capacity. *African Journal of Biotechnology*, 6, 2130-2134.

Davies, R.J. (1988). Yeast oil from cheese whey; process development. In: Moreton, R.S. (Ed.), *Single Cell Oil*. Longman, London, 99–145.

Dominguez, J., Gong, C., Tsao, G. (1997). Production of Xylitol from D-Xylose by *Debaryomyces hansenii*. *Biotechnology for Fuels and Chemicals*, 63-65, 117-127.

Duarte, L., Carvalheiro, F., Neves, I., Girio, F. (2005). Effects of aliphatic acids, furfural, and phenolic compounds on *Debaryomyces hansenii* CCMI 941. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 121, 413-425.

Folch J., Lees M., Stanley G.H.S. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *The Journal of Biological Chemistry*, 226, 497-509.

- Folch J., Lees M., Stanley G.H.S. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *The Journal of Biological Chemistry*, 226, 497-509.
- Fukuda, H.; Kondo, A.; Noda, H. (2001). Biodiesel fuel production by transesterification of oils. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 92, 405–416.
- Girio. F., Pelica. F., Amaral-Collago. M. (1996). Characterization of xylitol dehydrogenase from *Debaryomyces hansenii*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 56, 79-87.
- Gomez, L., Montanez, J., Méndez-Zavala, A., Noé Aguilar, C. (2014). Biotechnological production of carotenoids by yeasts: an overview. *Microbial Cell Factories*.
- Gong. Z., Wang. Q., Shen. H., Hu. C., Jin. G., Zhao. Z. (2012). Co-fermentation of cellobiose and xylose by *Lipomyces starkeyi* for lipid production. *Bioresource Technology*, 117, 20–24.
- Hamed, I., Ozogul, F., Regenstein, J. (2016). Industrial applications of crustacean by-products (chitin, chitosan, and chitooligosaccharides): A review. *Trends in Food Science & Technology*, 48, 40-50.
- Izard, J., Limberger, R. (2003). Rapid screening method for quantitation of bacterial cell lipids from whole cells. *Journal of Microbiological Methods*, 55, 411 – 418.
- Jin, G., Yang, F., Hu, C., Shen, H., Zhao, Z.K. (2012). Enzyme-assisted extraction of lipids directly from the culture of the oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides*. *Bioresource Technology*, 111, 378–382.
- Kaneko. H., Hosohara. M., Tanaka. M., Toh. T. (1976). Lipid Composition of 30 Species of Yeast. *Lipids*, 11, 12.
- Kar, F., Arslan, N. (1999). Characterization of orange peel pectin and effect of sugars, l-ascorbic acid, ammonium persulfate, salts on viscosity of orange peel pectin solutions. *Carbohydrate Polymers*, 40, 285–291.
- Khan, M., Bibi, N., Zeb, A. (2015). Optimization of Process Conditions for Pectin Extraction from Citrus Peel. *Science, Technology and Development*, 34, 9-15.

Kimura, K., Yamaoka, M., Kamisaka, Y. (2004). Rapid estimation of lipids in oleaginous fungi and yeasts using Nile red fluorescence. *Journal of Microbiological Methods*, 56, 331– 338.

Kitcha, S., Cheirsilp, B. (2011). Screening of Oleaginous Yeasts and Optimization for Lipid
Kraisintu. P., Yongmanitchai. W., Limtong. S. (2010). Selection and Optimization for Lipid Production of a Newly Isolated Oleaginous Yeast, *Rhodospiridium toruloides* DMKU3-TK16. *Kasetsart Journal : Natural Science*, 44, 436 – 445.

Kumar, R., Singh, S., Singh, O. Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives. (2008). *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. 35, 377-391.

Kurian, J., Ashok, M., Banerjee, A., Kishore, V. (2010). Bioconversion of hemicellulose hydrolysate of sweet sorghum bagasse to ethanol by using *Pichia stipitis* NCIM 3497 and *Debaryomyces hansenii* sp. *Bioresources*, 5, No 4.

Lawford, H., Rousseau, J. (1993). Mannose fermentation by an ethanologenic recombinant *Escherichia coli*. *Biotechnology Letters*, 15, 615-620.

Lazar. Z., Dulermo. T., Neueglise. C., Crutz-Le Coq. A., Nicaud. J. (2014). Hexokinase—A limiting factor in lipid production from fructose in *Yarrowia lipolytica*. *Metabolic Engineering*, 26, 89–99.

Li, Q., Du, W., Liu, D. (2008). Perspectives of microbial oils for biodiesel production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 80, 749–756.

Lian. J., Chen. S., Zhou. S., Wang. Z., Fallon. J., Li. C. (2010). Separation, hydrolysis and fermentation of pyrolytic sugars to produce ethanol and lipids. *Bioresource Technology*, 101, 9688–9699.

Limayem, A., Ricke, S. (2012). Lignocellulosic biomass for bioethanol production: Current perspectives, potential issues and future prospects. *Progress in Energy and Combustion Science*, 38, 449-467.

Limtong. S., Youngmanitchai. W., Kawasaki. H., Seki. T. (2008). *Candida phangngensis* sp. nov., an anamorphic yeast species in the *Yarrowia* clade, isolated from water in mangrove forests in

Phang-Nga Province, Thailand. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58, 515-519.

Liu, B., Zhao, Z.K. (2007). Biodiesel production by direct methanolysis of oleaginous microbial biomass. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 82, 775–780.

Meesters, P., Huijberts, G., Eggink, G. (1996). High-cell-density cultivation of the lipid accumulating yeast *Cryptococcus curvatus* using glycerol as a carbon source. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 45, 575-579.

Meng, X., Yang, J.M., Xu, X., Zhang, L., Nie, Q.J., Xian, M. (2009). Biodiesel production from oleaginous microorganisms. *Renewable Energy Journal*, 34, 1–5.

Miller, G.L. (1959). Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Journal of Analytical Chemistry*, 31, 426-428.

Mishra, S., Suh, W., Farooq, W., Moon, M., Shrivastav, A., Park, M., Yang, J. (2014). Rapid quantification of microalgal lipids in aqueous medium by a simple colorimetric method. *Bioresource Technology*, 155, 330–333.

Oberoi, H., Vadlani, P., Madl, R., Saida, L., Abeykoon, P. (2010). Ethanol Production from Orange Peels: Two-Stage Hydrolysis and Fermentation Studies Using Optimized Parameters through Experimental Design. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 3422–3429.

Pan, L., Yang, D., Shao, L., Chen, C., Liang, Z. (2009). Isolation of the Oleaginous Yeasts from the Soil and Studies of Their Lipid-Producing Capacities. *Food Technology & Biotechnology*, 47, 215-220.

Papanikolaou S., Aggelis G., (2011). Lipids of oleaginous yeasts. Part I: biochemistry of single cell oil production. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 113, 1031–1051.

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

Production Using Crude Glycerol as a Carbon Source. *Energy Procedia*, 9, 274 – 282.

Ratledge, C. (1982). Microbial oils and fats: an assessment of their commercial potential [Algae, yeasts, fungi].

- Ratledge, C. (1994). Yeasts, molds, algae and bacteria as sources of lipids. In: Technological advances in improved and alternative sources of lipids, Kamel B.S., Kakuda Y. (Eds), Blackie academic and professional, London, 235-291.
- Ratledge, C. (2002). Regulation of lipid accumulation in oleaginous microorganisms. *Biochemical Society*, 1047-1050.
- Ratledge, C., (1991). Microorganisms for lipids. *Acta Biotechnologia*, 11, 429–438.
- Richard, P., Hilditch, S. (2009). D-Galacturonic acid catabolism in microorganisms and its biotechnological relevance. *International Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, 82, 597–604.
- Rinaudo, M. (2006). Chitin and chitosan: Properties and applications. *Progress in Polymer Science*, 31, 603-632.
- Roseiro, J., Peito, M., Girio, F., Amaral-Collaco, M. (1991). The effects of the oxygen transfer coefficient and substrate concentration on the xylose fermentation by *Debaryomyces hansenii*. *Archives of Microbiology*, 156, 484-490.
- Sha, Q. (2013). A comparative study on four oleaginous yeasts on their lipid accumulating capacity. *The Faculty of Natural Resources and Agricultural Sciences*, 1-32.
- Sitepu, I., Garay, L., Sestric, R., Levin, D., Block, D., German, J., Boundy-Mills, K. (2014). Oleaginous yeasts for biodiesel: Current and future trends in biology and production. *Biotechnology Advances*, 32, 1336–1360.
- Sitepu, I., Ignatia, L., Franz, A., Wong, D., Falina, S., Tsui, M., Kanti, A., Boundy-Mills, K. (2012). An improved high-throughput Nile red fluorescence assay for estimating intracellular lipids in a variety of yeast species. *Journal of Microbiological Methods*, 91, 321–328.
- Sobus, M.T., Holmlund, C.E. (1976). Extraction of lipids from yeast. *Lipids*, 11, 341–348.
- Suomalainen, I., Londerborough, J., Korhola, M. (1989). An Oxidoreductive Pathway for D-Xylose Assimilation by *Rhodospiridium toruloides*. *Journal of General Microbiology*, 135, 1537-1545.

Tapia. E., Anschau. A., Coradini, A., Franco. T., Deckmann, A. (2012). Optimization of lipid production by the oleaginous yeast *Lipomyces starkeyi* by random mutagenesis coupled to cerulenin screening.

Tempel. T., Jakobsen. M. (2000). The technological characteristics of *Debaryomyces hansenii* and *Yarrowia lipolytica* and their potential as starter cultures for production of Danablu. *International Dairy Journal*, 10, 263-270.

Thiru, M., Sankh, S., Rangaswamy, V. (2011). Process for biodiesel production from *Cryptococcus curvatus*. *Bioresource Technology*, 102, 10436–10440.

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.

Tsakona. S., Skiadaresis. A., Kopsahelis. N., Chatzifragkou. A., Papanikolaou. S., Kookos. I., Koutinas. A. (2015). Valorisation of side streams from wheat milling and confectionery industries for consolidated production and extraction of microbial lipids. *Food Chemistry*, 198, 85–92.

Tsigie. Y., Wang. C., Kasim. N., Diem. Q., Huynh. L., Ho. Q., Truong. C., Ju. Y. (2012). Oil Production from *Yarrowia lipolytica* P01g Using Rice Bran Hydrolysate. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 12, 1-10.

Turcotte, C., Kosaric, N. (2005). *Lipid Biosynthesis in Oleaginous Yeasts*. Department of Chemical and Biochemical Engineering, The University of Western Ontario, London, Ontario, Canada, N6A 5B9.

Wang, H., Le Dall, M., Wache, Y., Laroche, C., Belin, J., Gaillardin, C., Nicaud, J. (1999). Evaluation of acyl coenzyme A oxidase (Aox) isozyme function in the n-alkane-assimilating yeast *Yarrowia lipolytica*. *Journal of Bacteriology*, 181, 5140-5148.

Wiebe, M., Koivuranta, K., Penttilä, M., Ruohonen, L. (2012). Lipid production in batch and fed-batch cultures of *Rhodospiridium toruloides* from 5 and 6 carbon carbohydrates. *BMC Biotechnology*.

- Wild, R., Patil, S., Popovik, M., Zappi, M., Dufreche, S., Bajpai, R. (2010). 2 Lipids from *Lipomyces starkeyi*. Food Technology and Biotechnology, 48, No.3 Kolovoz 2010.
- Wu, H., Li, Y., Chen, L., Zong, M. (2011). Production of microbial oil with high oleic acid content by *Trichosporon capitatum*. Applied Energy Journal, 88, 138–142.
- Wu, S., Hu, C., Zhao, X., Zhao, Z. (2010). Production of lipid from N-acetylglucosamine by *Cryptococcus curvatus*. European Journal of Lipid Science and Technology, 112, 727-733.
- Yen, H.W., Zhang, Z.Y. (2011). Effects of dissolved oxygen level on cell growth and total lipid accumulation in the cultivation of *Rhodotorula glutinis*. Journal of Bioscience and Bioengineering, 112, 71–74.
- Ykema, A., (1989). Lipid production in the oleaginous yeast *Apiotrichum curvatum*. PhD Thesis. Free University Amsterdam, The Netherlands.
- Yu, X., Zheng, Y., Dorgan, K., Chen, S. (2010). Oil production by oleaginous yeasts using the hydrolysate from pretreatment of wheat straw with dilute sulfuric acid. Bioresource Technology, 102, 6134–6140.
- Zhang, G., French, W., Hernandez, R., Hall, J., Sparksa, D., Holmesb, W. (2011). Microbial lipid production as biodiesel feedstock from N-acetylglucosamine by oleaginous microorganisms.. Published online in Wiley Online Library: 3 March 2011.
- Zhao, X., Hu, C., Wu, S., Shen, H., Zhao, Z., (2012). Lipid production by *Rhodospiridium toruloides* Y4 using different substrate feeding strategies. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 38, 627-632.