



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

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

«Μελέτη της παραγωγής πολυολών κατά την
ανάπτυξη της ζύμης *Yarrowia lipolytica* σε
υπόστρωμα γλυκερόλης»

Ελένη - Σταυρούλα Βασταρούχα

Επιβλέπων Καθηγητής
Σεραφείμ Παπανικολάου

Αθήνα, 2017

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

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

«Μελέτη της παραγωγής πολυολών κατά την ανάπτυξη της ζύμης *Yarrowia lipolytica* σε υπόστρωμα γλυκερόλης»

Ελένη - Σταυρούλα Θ. Βασταρούχα

Επιβλέπων Καθηγητής
Σεραφείμ Παπανικολάου

Αθήνα, 2017

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

Μελέτη της παραγωγής πολυολών κατά την ανάπτυξη της ζύμης *Yarrowia lipolytica*
σε υπόστρωμα γλυκερόλης

Εξεταστική Επιτροπή:

Σεραφείμ Παπανικολάου, Αναπληρωτής Καθηγητής Γ.Π.Α.

Απόστολος Κουτίνας, Επίκουρος Καθηγητής Γ.Π.Α.

Νικόλαος Στοφόρος, Καθηγητής Γ.Π.Α.

Ελένη – Σταυρούλα Βασταρούχα

Αθήνα, 2017

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα μεταπτυχιακή μελέτη πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων του τμήματος Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου, του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών υπό την επίβλεψη του αναπληρωτή καθηγητή Σεραφείμ Παπανικολάου.

Θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου σε όλους όσους συντέλεσαν και βοήθησαν με τον έναν ή τον άλλον τρόπο, ώστε να ολοκληρώσω αυτό μου το εγχείρημα, ιδιαίτερα τον επιβλέποντα αναπληρωτή καθηγητή μου Σεραφείμ Παπανικολάου για την εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπο μου, για την πολύτιμη βοήθεια και στήριξη του, τόσο κατά την διάρκεια της μελέτης όσο και καθ' όλη την διάρκεια του μεταπτυχιακού.

Τον αξιότιμο καθηγητή Νικόλαο Στοφόρο και τον αξιότιμο επίκουρο καθηγητή Απόστολο Κουτίνα, που συνθέτουν την εξεταστική επιτροπή, για τον χρόνο που αφιέρωσαν στη διόρθωση και βαθμολόγηση της παρούσας μεταπτυχιακής μελέτης.

Όλο το ανθρώπινο δυναμικό του εργαστηρίου Μικροβιολογίας & Βιοτεχνολογίας Τροφίμων και ιδιαίτερα την κα Ουρανία Καλαντζή (ΕΔΙΠ) για όλη της την βοήθεια, καθοδήγηση, υπομονή και στήριξη, τους υποψήφιους διδάκτορες Ροζανίνα Φιλιπούση και Βαγγέλη Ξενόπουλο για την πολύτιμη και ανιδιοτελή βοήθεια τους, τις συμφοιτήτριες μου για την άριστη συνεργασία μας και το ευχάριστο κλίμα που επικράτησε αυτά τα δύο χρόνια.

Τέλος, να ευχαριστήσω την οικογένεια μου που στέκεται στο πλευρό μου όλα αυτά τα χρόνια στηρίζοντας με στην πραγματοποίηση των στόχων μου.

Σας ευχαριστώ όλους θερμά!

Περίληψη

Ο σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η διερεύνηση της ικανότητας της ζύμης *Yarrowia lipolytica* να αναπτύσσεται σε υδρόφιλο υπόστρωμα χαμηλού κόστους και συγκεκριμένα σε γλυκερόλη, η οποία είναι παραπροϊόν της βιομηχανικής παραγωγής βιοκαυσίμου (biodiesel). Ειδικότερα, η ικανότητα της ζύμης να μεταβολίζει την γλυκερόλη προς παραγωγή βιομάζας, δευτερογενών μεταβολιτών όπως μικροβιακό λίπος και ενδοπολυσακχαρίτες, προϊόντα με ισχυρές αντιοξειδωτικές ικανότητες, κατάλληλα για χρήση τόσο στη φαρμακοβιομηχανία όσο και στη βιομηχανία τροφίμων, καθώς και διαφόρων μεταβολικών προϊόντων (π.χ. μαννιτόλη, αραβιτόλη, ερυθριτόλη). Απώτερος σκοπός της μελέτης αυτής είναι η αριστοποίηση των συνθηκών καλλιέργειας, με στόχο τη μέγιστη παραγωγή μαννιτόλης. Οι καλλιέργειες διενεργήθηκαν σε διαφορετικές συγκεντρώσεις υποστρώματος και pH και σε σταθερές συνθήκες ανάδευσης και θερμοκρασίας. Η γλυκερόλη που χρησιμοποιήθηκε ήταν διαχωρισμένη και καθαρότητας 88% και 100% κατά βάρος.

Στην πειραματική διαδικασία χρησιμοποιήθηκαν τα στελέχη του γένους *Yarrowia lipolytica* LMBF Y-46 και LMBF Y-47.

Πραγματοποιήθηκαν υγρές καλλιέργειες, ασυνεχούς και συνεχούς τύπου, σε αναδευόμενες φιάλες Erlenmeyer των 250mL, χρησιμοποιώντας ως πηγή άνθρακα γλυκερόλη, σε διαφορετικές συγκεντρώσεις (40 g L^{-1} , 60 g L^{-1} , 80 g L^{-1} και 120 g L^{-1}) με περιοριστικό παράγοντα αύξησης το άζωτο σε συνθήκες καλλιέργειας (30°C , pH 3.0 - 7.0). Έγινε προσδιορισμός του ξηρού βάρους βιομάζας, πραγματοποιήθηκε μέτρηση της βιομάζας με ξήρανση και στη συνέχεια εκχύλιση των λιπιδίων για τον ποσοτικό προσδιορισμό τους (Papanikolaou *et al.*, 2003). Διαπιστώθηκε επίσης η παραγωγή ενδοπολυσακχαριτών, ο προσδιορισμός των οποίων έγινε με DNS (Miller, 1959). Η παραγωγή μαννιτόλης, η κατανάλωση των σακχάρων αλλά και ο ποιοτικός προσδιορισμός των παραγόμενων ενδοπολυσακχαριτών προσδιορίστηκε μέσω υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC).

Η παρούσα μελέτη χωρίστηκε σε τέσσερα πειραματικά στάδια.

Στο πρώτο πείραμα εξετάστηκαν τα δυο στελέχη σε υγρές καλλιέργειες με υπόστρωμα βιομηχανικής γλυκερόλης, συγκέντρωσης 40 g L^{-1} σε διαφορετικές τιμές pH (3.0, 4.0, 5.0, 6.0 και 7.0). Η συγκριτική τους αξιολόγηση βασίστηκε στην ικανότητα τους να καταναλώνουν την γλυκερόλη και να την μετατρέπουν σε βιομάζα, ενδοπολυσακχαρίτες και δευτερογενείς μεταβολίτες. Οι μετρήσεις έδειξαν ότι και τα δυο στελέχη προσαρμόστηκαν στο υπόστρωμα της γλυκερόλης, παράγοντας ικανοποιητικές ποσότητες βιομάζας, ενώ το στέλεχος LMBF Y-46 παρατηρήθηκε ότι παρήγαγε μεγαλύτερες ποσότητες πολυολών.

Στο δεύτερο πείραμα, έγινε σύγκριση αποτελεσμάτων για υπόστρωμα καθαρής και ακάθαρτης γλυκερόλης, συγκέντρωσης 40 g L^{-1} για pH 3.5 για το στέλεχος LMBF Y-46.

Στο τρίτο πείραμα επιλέχτηκε το στέλεχος με την μεγαλύτερη παραγωγή πολυολών και συγκεκριμένα μαννιτόλης, 19.6 g L^{-1} στις 48h σε pH 3.0. Μελετήθηκε περαιτέρω σε υγρές καλλιέργειες με υπόστρωμα βιομηχανικής γλυκερόλης σε διαφορετικές συγκεντρώσεις 60 g L^{-1} , 80 g L^{-1} και 120 g L^{-1} σε pH 3.5. Παρατηρήθηκε ωστόσο, υψηλότερη παραγωγή μαννιτόλης, 21.7 g L^{-1} στις 312h, σε συγκέντρωση υποστρώματος 120 g L^{-1} .

Στο τέταρτο πείραμα μελετήθηκε σε fed batch καλλιέργεια το στέλεχος LMBF Y-46 σε υπόστρωμα βιομηχανικής γλυκερόλης, συγκέντρωσης 40 g L^{-1} και παρατηρήθηκε ευνοϊκή επίδραση του νέου στείρου θρεπτικού υλικού στην παραγωγή των προϊόντων.

Λέξεις Κλειδιά: Ζύμες, βιομηχανική γλυκερόλη, μαννιτόλη, πολυόλες

Abstract

The purpose of this study is to investigate the ability of *Yarrowia lipolytica* to grow on a low-cost hydrophilic substrate, particular glycerol, which is a by-product of the industrial production of biodiesel. In particular, the ability of the yeast to metabolize glycerol to produce biomass, secondary metabolites such as single cell oil and intra-cellular polysaccharides, products with strong antioxidant capabilities, suitable for use in both the pharmaceutical and food industries as well as various metabolic products (e.g., mannitol, arabitol, erythritol). The ultimate purpose of this study is to optimize the cultivation conditions to maximize the production of mannitol. The fermentation were performed at different substrate concentrations and pH and at constant stirring and temperature. The glycerol used was separated and had 88% and 100% purity by weight.

In the experimental procedure, strains of the genus *Yarrowia lipolytica* LMBF Y-46 and LMBF Y-47 were used.

Liquid, discontinuous and continuous cultures were conducted in Erlenmeyer flasks 250mL, using glycerol as the carbon source at different concentrations (40 g L^{-1} , 60 g L^{-1} , 80 g L^{-1} and 120 g L^{-1} , with nitrogen limiting factor in crop conditions (30°C , pH 3.0 – 7.0). Dry biomass weight was determined, biomass was measured by drying and then extraction of the lipids for quantitative determination (Papanikolaou *et al.*, 2003). The production of intra-cellular polysaccharides, determined by DNS (Miller, 1959), was also found. Production of mannitol, consumption of sugars as well as qualitative determination of the produced intra-cellular polysaccharides was determined by high performance liquid chromatography (HPLC).

This study was divided into four experimental stages.

In the first experiment, the two strains were examined in liquid cultures with industrial glycerol substrate, concentration 40 g L^{-1} at different pH (3.0, 4.0, 5.0, 6.0 and 7.0). The comparative assessment was based on their ability to consume glycerol and convert it into biomass, intra-cellular polysaccharides and secondary metabolites. The results showed that both strains were adapted to the glycerol substrate producing sufficient quantities of biomass, whereas the LMBF Y-46 was observed to produce larger amounts of polyols.

In the second experiment, we had a comparison of results for a pure and crude glycerol substrate, the concentration was 40 g L^{-1} and pH was 3.5 for the LMBF Y-46 strain.

In the third experiment the strain with the highest production of polyols, particular mannitol, 19.6 g L^{-1} at 48h at pH 3.0 was selected. It was further studied in liquid cultures with industrial glycerol substrate at different concentrations of 60 g L^{-1} , 80 g L^{-1} and 120 g L^{-1} at pH 3.5. Higher mannitol production, 21.7 g L^{-1} at 312h, at 120 g L^{-1} substrate concentration, was observed.

In the fourth experiment, the LMBF Y-46 strain was cultured in a fed batch culture of 40 g L⁻¹ industrial glycerol substrate. A favorable effect of the new sterile nutritional material on the production of the products has been observed.

Keywords: Yeasts, industrial glycerol, mannitol, polyols

Πίνακας περιεχομένων

I. Εισαγωγή.....	12
1. Βιογραφική Σύνθεση	14
1.1 Γλυκερόλη και Βιοντίζελ	15
1.1.1 Γλυκερόλη	15
1.1.2 Βιοντίζελ.....	16
1.1.3 Η γλυκερόλη ως παραπροϊόν παραγωγής βιοντίζελ.....	17
1.1.4 Παραγωγή βιολογικού πετρελαίου (βιοντίζελ) πρώτης γενιάς.....	20
1.2 Ζύμες – Η ζύμη <i>Yarrowia lipolytica</i>	23
1.2.1 Ζύμες	23
1.2.2 Η ζύμη <i>Yarrowia lipolytica</i>	24
1.2.2.1 Βιοτεχνολογικές χρήσεις της <i>Yarrowia lipolytica</i>	26
1.3 Παραγόμενα μεταβολικά προϊόντα από την ζύμη <i>Yarrowia lipolytica</i>	27
1.3.1 Πολυόλες.....	27
1.3.1.1 Μαννιτόλη.....	27
1.3.1.2 Αραβιτόλη	28
1.3.1.3 Ερυθριτόλη.....	28
1.3.2 Ενδοπολυσακχαρίτες	28
1.3.3 Λιπίδια.....	30
1.4 Βιοτεχνολογική παραγωγή λιπιδίων, πολυολών και ενδοπολυσακχαριτών	30
1.4.1 Βιοσύνθεση λιπιδίων	30
1.4.2 Βιοσύνθεση πολυολών	34
1.4.3 Βιοσύνθεση ενδοπολυσακχαριτών (IPS)	34
1.5 Σκοπός της μελέτης	36
2. Υλικά και Μέθοδοι	37
2.1 Βιολογικό υλικό.....	38
2.2 Συνθήκες καλλιέργειας.....	38
2.2.1 Παρασκευή υγρού εμβολίου	38
2.2.2 Θρεπτικό μέσο καλλιέργειας	38
2.2.3 Ανάλυση πειραματικών σταδίων.....	39
2.2.3.1 Συγκριτική αξιολόγηση των δυο στελεχών σε κωνικές φιάλες (S_0 40 g L ⁻¹)	39
2.2.3.2 Σύγκριση αποτελεσμάτων καθαρής και ακάθαρτης γλυκερόλης ως υπόστρωμα για το στέλεχος LMBF Y – 46 της ζύμης <i>Yarrowia lipolytica</i>	40
2.2.3.3 Καλλιέργεια του στελέχους LMBF Y – 46 της ζύμης <i>Yarrowia lipolytica</i> σε διαφορετικές αρχικές συγκεντρώσεις υποστρώματος (S_0 60 g L ⁻¹ , 80 g L ⁻¹ & 120 g L ⁻¹)	40
2.2.3.4 Ημισυνεχής τροφοδοτούμενη καλλιέργεια του στελέχους LMBF Y – 46 της ζύμης <i>Yarrowia lipolytica</i>	40
2.3 Χημικές αναλύσεις	41
2.3.1 Προσδιορισμός του pH στο μέσο ανάπτυξης των μικροοργανισμών	41
2.3.2 Προσδιορισμός της παραγόμενης βιομάζας	41
2.3.3 Προσδιορισμός ενδοκυτταρικού λίπους	41

2.3.4 Προσδιορισμός ενδοπολυσακχαριτών (IPS)	42
2.3.4.1 Ποσοτικός προσδιορισμός	42
2.3.4.2 Ποιοτικός προσδιορισμός	43
2.3.5 Προσδιορισμός γλυκερόλης και πολυολών (μαννιτόλη, ερυθριτόλη, αραβιτόλη)	43
3. Αποτελέσματα	44
4. Συζήτηση	54
5. Βιβλιογραφία.....	63

I. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Με δεδομένη την αυξημένη ζήτηση του πετρελαίου και την σταδιακή μείωση των αποθεμάτων του τις τελευταίες δεκαετίες, δημιουργήθηκε η ανάγκη εξεύρεσης εναλλακτικών καυσίμων όπως το βιοντίζελ. Το βιοντίζελ θεωρείται ανανεώσιμη πηγή ενέργειας λόγω της ανανεώσιμης προέλευσης των πρώτων υλών που συμμετέχουν στην παραγωγή του και η χρήση του παρουσιάζει σημαντικά περιβαλλοντικά και ενεργειακά οφέλη. Κύριο παραπροϊόν του είναι η γλυκερόλη που θεωρείται ένα υπόστρωμα χαμηλού κόστους. Η χρήση της στην επιστήμη της Βιοτεχνολογίας οδηγεί στην παραγωγή μεταβολικών προϊόντων που μπορούν να αξιοποιηθούν με ποικίλους τρόπους σε φάρμακα, τρόφιμα κλπ.

Στόχος την μελέτης αυτής, είναι η χρήση της γλυκερόλης ως υπόστρωμα για την παραγωγή μεταβολικών προϊόντων, μέσω της ζύμης *Yarrowia lipolytica* και τα στοιχεία που μπορεί να δώσει η περαιτέρω ανάλυση προς αξιοποίηση.

1. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΣΥΝΘΕΣΗ

1.1 Γλυκερόλη και Βιοντίζελ

1.1.1 Γλυκερόλη

Με την εμπειρική ονομασία γλυκερίνη, (*glycerin* ή *glycerol*), φέρεται η χημική οργανική ένωση προπανοτριόλη, η οποία αποτελείται από τρία άτομα άνθρακα όπου ο πρώτος και ο τελευταίος συνδέονται με 2 άτομα υδρογόνου και μια ρίζα υδροξυλίου, ενώ ο μεσαίος με ένα άτομο υδρογόνου και ένα υδροξύλιο, όπως περιγράφεται στο συντακτικό τύπο: **HOCH₂-CHOH-CH₂OH**. Ειδικότερα στην αγγλική και γαλλική ορολογία ο όρος γλυκερόλη χαρακτηρίζει την καθαρή χημική ένωση, ενώ ο όρος γλυκερίνη αποδίδεται περισσότερο, στα διάφορα εμπορικά παρασκευάσματα γλυκερόλης στο νερό, όπου η περιεχόμενη καθαρή ουσία είναι περισσότερη του 95%. Την εμπειρική ονομασία γλυκερίνη την οφείλει στον Σεβρέλ (Chevreul) που πρώτος την ονομάτισε από τη γλυκιά γεύση της (Pagliaro *et al.*, 2007).

Η γλυκερόλη είναι από τις περισσότερο πολλαπλά χρήσιμες και πολύτιμες χημικές ουσίες που είναι γνωστές στον άνθρωπο και ανακαλύφθηκε από τον Σέελε (Scheele) Σουηδό χημικό το 1779. Πρόκειται για ουσία ημίρρευστη σε κανονική θερμοκρασία με σημείο τήξης τους 17°C και σημείο ζέσεως τους 290°C όπου και παρατηρείται ταυτόχρονη αποσύνθεση, υπό συνθήκες ατμοσφαιρικής πίεσης. Χαμηλότερα των 17°C βρίσκεται σε κατάσταση ιξώδους μορφής (πυκνόρρευστο) με ειδικό βάρος περίπου 1.265 g mL⁻¹, έχει σημείο τήξης τους 17.8°C και σημείο βρασμού τους 290°C. Είναι μια τρισεθνής αλκοόλη (τριόλη) η οποία, υπό την επίδραση ήπιων οξειδωτικών μέσων, μετατρέπεται σε γλυκερόζη, ενώ υπό την επίδραση ισχυρών οξειδωτικών μετατρέπεται σε γλυκερινικό οξύ. Θερμαινόμενη με KHSO₄ σχηματίζει την ακόρεστη αλδεΐδη ακρολεΐνη (Pagliaro *et al.*, 2007).

Η γλυκερόλη παρέχει εστέρες, τα λεγόμενα γλυκερίδια, εκ των οποίων σημαντικότερα είναι τα λιπίδια που σχηματίζονται με τα λιπαρά οξέα. Αναμιγνύεται εύκολα με το νερό και την αιθυλική αλκοόλη και είναι ελαφρά διαλυτή σε πολλούς κοινούς διαλύτες (π.χ. αιθέρας), όμως είναι αδιάλυτη σε υδρογονάνθρακες. Συνολικά, διαθέτει ένα μοναδικό συνδυασμό φυσικών και χημικών ιδιοτήτων, οι οποίες χρησιμοποιούνται σε χιλιάδες εμπορικά προϊόντα.

Βιομηχανικά η γλυκερίνη παρασκευάζεται ως ακατέργαστο υποπροϊόν υδρόλυσης λιπών και ελαίων κατά την παραγωγή λιπαρών οξέων ή σαπώνων. Η προκύπτουσα "ακατέργαστη γλυκερίνη" υποβάλλεται σε καθαρισμό και στη συνέχεια σε απόσταξη, ώστε να περιοριστεί η περιεκτικότητα σε νερό μέχρι ποσοστού 3%, προκειμένου έτσι να χρησιμοποιηθεί σε φαρμακευτικά ή βιομηχανικά προϊόντα (Chatzifragkou and Papanikolaou, 2012).

Επειδή, όμως, με αυτή τη διεργασία δεν καλύπτονται όλες οι ανάγκες της αγοράς, για την παρασκευή γλυκερίνης χρησιμοποιείται επίσης, ως πρώτη ύλη, και το προπένιο από το οποίο, ως ενδιάμεσο προϊόν, παράγεται γλυκιδόλη.

Η γλυκερίνη παρουσιάζει ένα ευρύ φάσμα χρήσεων, καθώς έχει πάνω από 1,500 γνωστές χρήσεις, μεταξύ των οποίων ως διαλύτης, μέσο διαβροχής, πλαστικοποιητής, θρεπτικό συστατικό σε ζυμοτεχνικές βιομηχανίες καθώς και ως πρώτη ύλη στην παραγωγή φαρμάκων, καλλυντικών, βερνικιών, σαπώνων και εκρηκτικών υλών (νιτρογλυκερίνη), στο ηλεκτρονικό τσιγάρο ως υγρό - βάση αναπλήρωσης φίλτρων, εντός της οποίας προστίθενται αρώματα και νικοτίνη. Σημαντική, επίσης, χρήση της γίνεται και ως υποκατάστατο της ζάχαρης σε διαβητικούς, ενώ χρησιμοποιείται με τη μορφή υπόθετου σαν καθαρτικό. Επιπλέον, χρησιμοποιείται στη θεατρική και κινηματογραφική σκηνοθεσία ως "τρικ" υποκαθιστώντας τα πραγματικά δάκρυα. Τέλος, είναι εξαιρετικά σταθερή υπό κανονικές συνθήκες αποθήκευσης, συμβατή με πολλές άλλες χημικές ουσίες, σχεδόν με ερεθιστική σε διάφορες χρήσεις της και δεν έχει γνωστές αρνητικές περιβαλλοντικές επιπτώσεις (Pagliaro *et al.*, 2010).

Η παραγωγή της γλυκερόλης επιτυγχάνεται είτε μέσω των μικροβιακών ζυμώσεων, με πιο γνωστή την περίπτωση της ζύμης *Saccharomyces cerevisiae* κατά την τέλεση της αλκοολικής ζύμωσης και συγκεκριμένα κατά τον σχηματισμό των δευτερογενών μεταβολικών προϊόντων της αλκοολικής ζύμωσης μέσω της γλυκεροπυροσταφυλικής ζύμωσης, είτε χημικά από την επεξεργασία πρώτων υλών πετροχημικής φύσεως, με την μέθοδο της επιχλωρυδίνης (Sarris and Papanikolaou, 2016). Παραδοσιακά, η γλυκερόλη παράγεται μέσω της υδρόλυσης των λιπών κατά την διαδικασία παρασκευής σαπώνων. Ωστόσο, η αντικατάσταση των σαπώνων με μη σαπωνοειδούς φύσεως απορρυπαντικά, έχει μειώσει σημαντικά την παραγωγή της γλυκερόλης από τη βιομηχανία σαπώνων σε παγκόσμιο επίπεδο. Γενικά, η γλυκερόλη αποτελεί υλικό εκκινήσεως για μια πληθώρα χημικών μετατροπών, μέσω δύο διακριτών οδών. Η πρώτη οδός περιλαμβάνει την οξείδωση ή την αναγωγή της γλυκερόλης σε προϊόντα με τρία άτομα άνθρακα, ενώ η δεύτερη οδός περιλαμβάνει την αντίδραση της γλυκερόλης με άλλα μόρια για τη δημιουργία νέων προϊόντων (Pagliaro *et al.*, 2007). Από την επιλεκτική οξείδωση ή αναγωγή της γλυκερόλης, δύναται να παραληφθούν χαρακτηριστικά προϊόντα όπως η δι-υδροξυακετόνη, το γαλακτικό οξύ, το πυροσταφυλικό οξύ, η προπανόλη, η ισοπροπανόλη, η ακετόνη, η ακρολεΐνη, η προπιοναλδεΐδη, αλλά και το υδροξυ-πυροσταφυλικό οξύ (Claunde, 1999; da Silva *et al.*, 2009; Rahmat . *et al.*, 2010). Ενδιαφέρον παρουσιάζει, εξάλλου, η παραγωγή της ανθρακικής γλυκερόλης (glycerol carbonate) η οποία επιτυγχάνεται μέσω της κατεργασίας της γλυκερόλης παρουσία διοξειδίου του άνθρακα (Pagliaro *et al.*, 2007; Rahmat , *et al.* 2010).

1.1.2 Βιοντίζελ

Βιοντίζελ ονομάζεται κάθε φυσικής προέλευσης λίπος ή έλαιο ή χημικό παράγωγό του (π.χ. FAMES) που έχει συγκρίσιμες ιδιότητες ως καύσιμο με το ντίζελ και για το λόγο αυτό μπορεί να

χρησιμοποιηθεί ως βιολογικής προέλευσης υποκατάστατο του τελευταίου. Χημικά αποτελείται από μακράς αλυσίδας καρβοξυλικούς αλκυλεστέρες (RCOOR), μεθυλεστέρες (RCOOCH_3), αιθυλεστέρες ($\text{RCOOCH}_2\text{CH}_3$) ή προπυλεστέρες ($\text{RCOOCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$). Τυπικά, παράγεται μετά την χημική αντίδραση λιπιδίων με μια αλκοόλη. Η αντίδραση αυτή λέγεται εστεροποίηση και παράγονται αντίστοιχοι εστέρες των χρησιμοποιούμενων λιπαρών οξέων.

Έχει σκοπό να χρησιμοποιείται σε κανονικούς κινητήρες ντίζελ και γι' αυτό διακρίνεται από φυτικά και απόβλητα έλαια που χρησιμοποιούνται ως καύσιμα μόνο σε κινητήρες ντίζελ, οι οποίοι έχουν υποστεί κατάλληλη μετατροπή. Το βιοντίζελ μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως καύσιμο ντίζελ, τόσο μόνο του, όσο και σε μίγματα με πετροντίζελ, σε οποιεσδήποτε αναλογίες, καθώς και να χρησιμοποιηθεί ως πετρέλαιο θέρμανσης (Van Gerpen *et al.*, 2004).

Αντίθετα με ότι έχει επικρατήσει στην καθημερινή γλώσσα, ο όρος βιοντίζελ εκφράζει μια πολύ συγκεκριμένη ομάδα χημικών ενώσεων τους μεθυλεστέρες των ανώτερων λιπαρών οξέων οι οποίοι προέρχονται από οργανικά έλαια και όχι οποιοδήποτε καύσιμο οργανικής προέλευσης, το οποίο μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε κινητήρες έναυσης με συμπίεση. Το γεγονός ότι οι μεθυλεστέρες προέρχονται από πρώτες ύλες οργανικής βάσης, οι οποίες είναι ανανεώσιμες, δικαιολογεί το χαρακτηρισμό τους ως βιοκαύσιμα (Van Gerpen *et al.*, 2004).

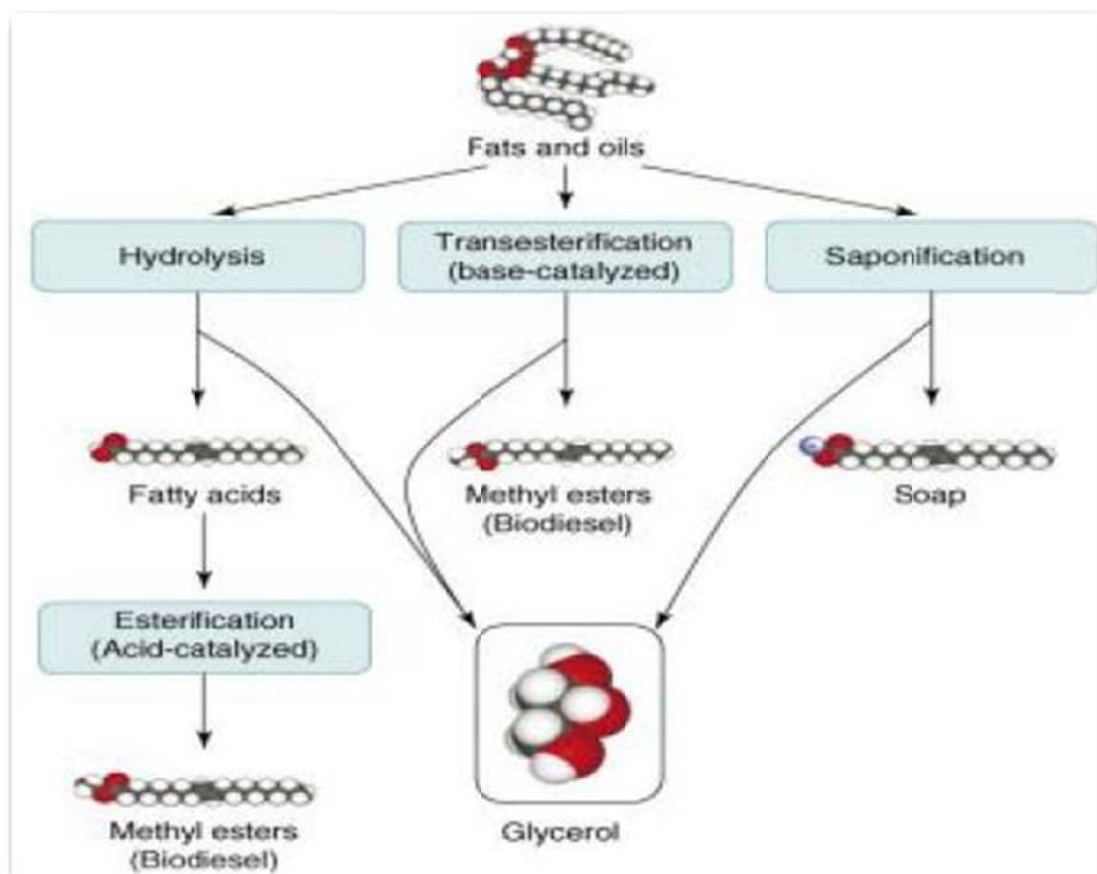
Η δυνατότητα του βιοντίζελ να υποκαταστήσει το συμβατικό ντίζελ σε κινητήρες εσωτερικής καύσης είναι γνωστή εδώ και δύο δεκαετίες. Το βιοντίζελ προτάθηκε σαν εναλλακτική λύση ως προς τα σκέτα φυτικά έλαια τα οποία τις περισσότερες φορές παρουσιάζουν χαρακτηριστικά που τα καθιστούν ακατάλληλα για χρήση στους κινητήρες αυτούς. Τα τελευταία 10 χρόνια η παραγωγή βιοντίζελ έχει σημειώσει ιδιαίτερη ανάπτυξη στην Ευρωπαϊκή Ένωση, που είναι και ο μεγαλύτερος παραγωγός παγκοσμίως και ιδιαίτερα στην Γερμανία. Η αύξηση της παραγωγής ενισχύεται από την επιταγή της κοινοτικής οδηγίας 2003/30/EK η οποία προβλέπει την εισαγωγή των βιοκαυσίμων στις αγορές των κρατών μελών.

Οι ιδιότητες και τα χαρακτηριστικά του βιοντίζελ το οποίο διακρίνεται στην ευρωπαϊκή αγορά προδιαγράφονται από το ευρωπαϊκό πρότυπο EN14214.

1.1.3 Η γλυκερόλη ως παραπροϊόν της παραγωγής βιοντίζελ

Η παραγωγή της γλυκερόλης μπορεί να πραγματοποιηθεί κυρίως σύμφωνα με τρεις μεθόδους: α) μέσω μικροβιακών ζυμώσεων από πληθώρα μικροοργανισμών, όπως βακτήρια, ζύμες, μύκητες και φύκη (Vijaikishore & Karanth, 1986; Rehm, 1996; Wang *et al.*, 2001; Taherzadeh *et al.*, 2002), β) μέσω χημικής σύνθεσης από την βιομηχανία πετροχημικών και γ) μπορεί να ανακτηθεί ως παραπροϊόν της υδρόλυσης λιπών και ελαίων κατά την παραγωγή σαπώνων ή λιπαρών οξέων (Wang *et al.*, 2001; Taherzadeh *et al.*, 2002; Peters, 2007; Behr *et al.*,

2008). Επιπλέον, τις τελευταίες δεκαετίες έχει παρατηρηθεί σε παγκόσμιο επίπεδο ραγδαία αύξηση των διαθέσιμων ποσοτήτων ακάθαρτης γλυκερόλης, διότι αποτελεί το κύριο παραπροϊόν της παραγωγής του βιολογικού πετρελαίου (βιοντίζελ). Οδοί δημιουργίας της γλυκερόλης, ως υποπροϊόν χημικής διεργασίας δίνονται και στο ακόλουθο σχήμα (Johnson & Taconi, 2007; Yazdani & Gonzalez, 2007; da Silva *et al.*, 2009; Wolfson *et al.*, 2009; Gupta & Kumar, 2012; Leoneti *et al.*, 2012).

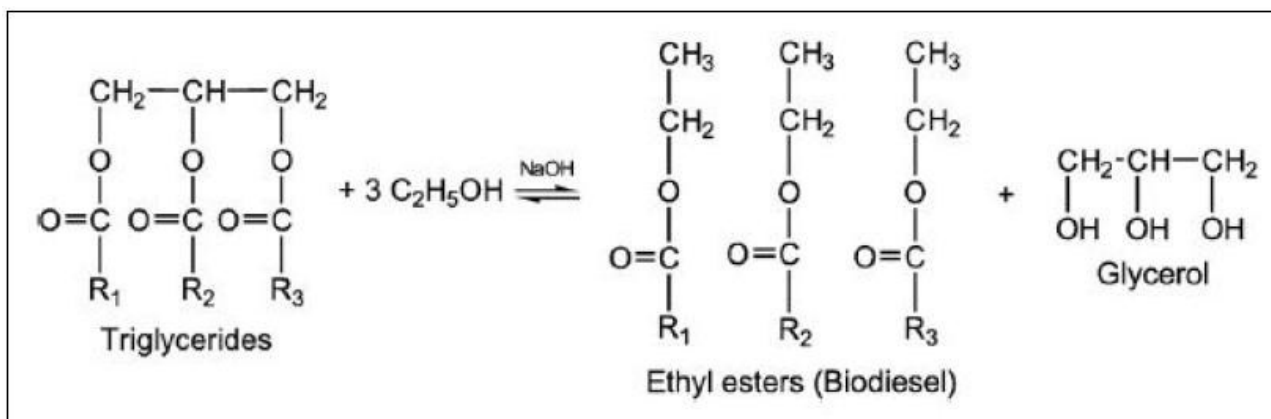


Σχήμα 1.1: Σχηματισμός γλυκερόλης ως το κύριο παραπροϊόν της παραγωγής βιοντίζελ (Yazdani & Gonzalez, 2007).

Η σχετική μέθοδος παραγωγής βιοντίζελ, που εφαρμόζεται παγκοσμίως σε βιομηχανικό επίπεδο, περιλαμβάνει την μετεστεροποίηση των τριγλυκεριδίων των ελαίων με μεθανόλη ή, σε μικρότερο βαθμό, με αιθανόλη, που καταλύεται με NaOH ή KOH (σχήμα 2), σύμφωνα με την αντίδραση:

$100\text{kg έλαιο} + 10.5\text{kg Me OH} = 100\text{kg βιοντίζελ} + 10.5\text{kg γλυκερόλη}$

Οι παραγόμενοι μεθυλεστέρες των λιπαρών οξέων συνιστούν το βιοντίζελ.



Σχήμα 1.2: Χημική αντίδραση μετεστεροποίησης της γλυκερόλης με αιθανόλη (da Silva et al., 2009).

Οι πρώτες ύλες από τις οποίες παράγεται το βιοντίζελ είναι ο ηλίανθος και η ελαιοκράμβη, διάφορα σπορέλαια όπως βαμβακέλαιο, σογιέλαιο, φοινικέλαιο, αλλά και χρησιμοποιημένα έλαια (used-waste cooking oils) από εργοστάσια τροφίμων, εστιατόρια κτλ. Στην Ευρώπη για την διεργασία αυτή χρησιμοποιείται κυρίως κραμβέλαιο, ενώ στη Βραζιλία έλαια από σπέρματα σόγιας και ηλίανθου, καθώς και φοινικέλαιο (da Silva et al., 2009).

Τα επιμέρους στάδια της διαδικασίας παραγωγής περιγράφονται στη συνέχεια. Αρχικά τα έλαια, μετά από κατάλληλη επεξεργασία ραφινάρισματος, ώστε να απομακρυνθούν η λεκιθίνη, ο φώσφορος και τα ελεύθερα λιπαρά οξέα, θερμαίνονται στους 55°C με περίσσεια μεθανόλης και καταλύτη, και μετά από αντίδραση 2 ωρών το μίγμα αφήνεται σε ηρεμία. Το μίγμα μεθανόλης – γλυκερόλης είναι βαρύτερο, με συνέπεια να καθιζάνει στον πυθμένα, από όπου και απομακρύνεται. Το υπόλοιπο μίγμα υφίσταται αρχικά απόσταξη για να απομακρυνθεί η μεθανόλη, η οποία, λόγω υψηλού κόστους, επαναχρησιμοποιείται στην αντίδραση, ενώ ακολουθείται από βιοντίζελ και νερό, οπότε και ξηραίνεται υπό κενό (Pagliaro & Rossi, 2008). Τα μίγματα της ακάθαρτης γλυκερόλης περιέχουν γλυκερόλη σε ποσοστά που κυμαίνονται από 55% έως 90%, καθώς και νερό, μεθανόλη, ανόργανα άλατα (κατάλοιπα του εκάστοτε διαλύτη), ελεύθερα λιπαρά οξέα και πληθώρα άλλων οργανικών ενώσεων σε ποικίλες αναλογίες, ενώ το χρώμα τους είναι από κίτρινο έως σκούρο καφέ.



Σχήμα 1.2: Διεργασία παραγωγής βιοντίζελ (Van Gerpen et al., 2004).

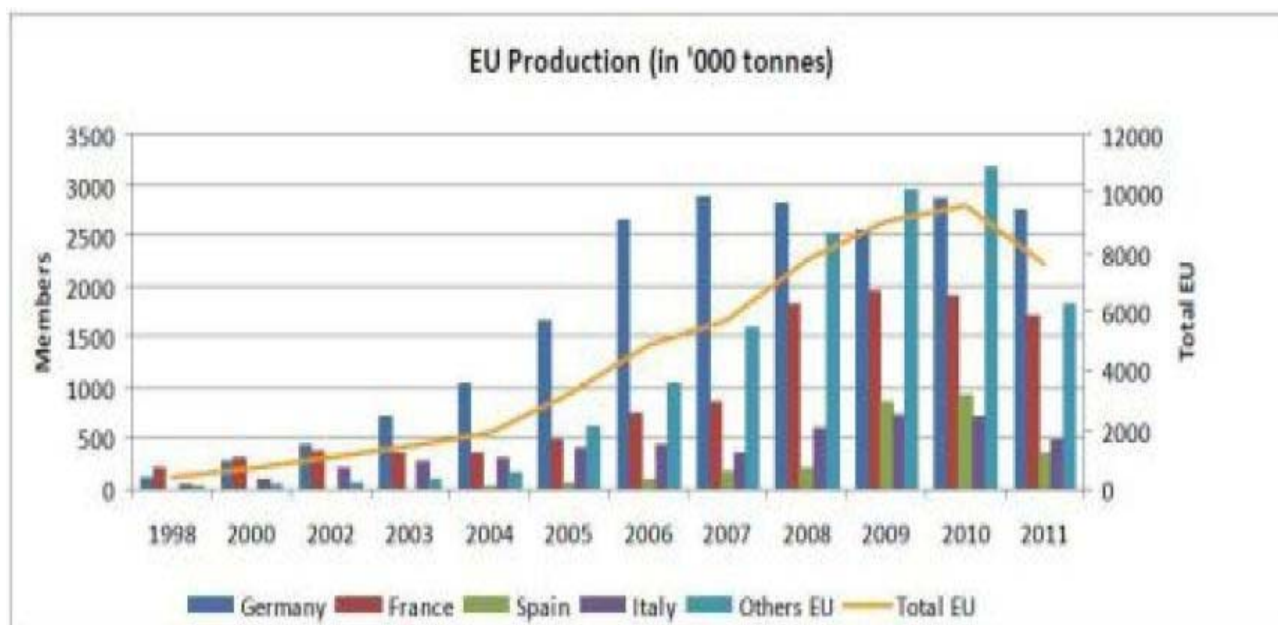
Τα καύσιμα που προέρχονται από την παραπάνω μέθοδο παρασκευής χαρακτηρίζονται ως βιοκαύσιμα πρώτης γενιάς ή τυπικά βιοκαύσιμα. Τα τελευταία χρόνια η έρευνα και η τεχνολογία των βιοκαυσίμων έχει δημιουργήσει τα πρωτοποριακά βιοκαύσιμα δεύτερης γενιάς, τα οποία παράγονται με πρωτοποριακές διεργασίες και από περισσότερους τύπους βιομάζας όπως λιγνοκυτταρινούχα υποστρώματα, ξυλώδη φυτά, γεωργικά υπολείμματα ακόμα και απόβλητα. Ο στόχος της παραγωγής δεύτερης γενιάς βιοκαυσίμων είναι γενικότερα η χρήση βιομάζας μη εδώδιμων τμημάτων των καλλιεργειών, όπως φύλλα, βλαστοί και φλούδες, μη εδώδιμες καλλιέργειες όπως το γρασίδι, μίσχανθοι, δημητριακά μικρών σιτηρών, καθώς επίσης και γεωργο-βιομηχανικά απόβλητα όπως πολτός φρούτων (Papanikolaou and Aggelis, 2009; 2011a; 2011b). Τέλος, στα βιοκαύσιμα τρίτης γενιάς η χρησιμοποιούμενη πρώτη ύλη για την παραγωγή τους είναι τα φύκη, δηλαδή μικροφύκη και μακροφύκη, τα οποία καλλιεργούνται σε νερό και επομένως δεν απαιτούν αρόσιμες εκτάσεις, ενώ ταυτόχρονα έχουν υψηλές αποδόσεις (Costa & de Moraes, 2011; Lam & Lee, 2012).

1.1.4 Παραγωγή βιολογικού πετρελαίου (βιοντίζελ) πρώτης γενιάς

Τις τελευταίες δεκαετίες η αυξημένη ζήτηση πετρελαίου από τις αναπτυσσόμενες χώρες, η σταδιακή μείωση των αποθεμάτων του και η συνεπακόλουθη αύξηση των τιμών του, οδήγησαν στην ανάγκη εξεύρεσης εναλλακτικών καυσίμων όπως το βιοντίζελ, η βιοαιθανόλη και το βιοαέριο. Το βιοντίζελ θεωρείται ανανεώσιμη πηγή ενέργειας λόγω της ανανεώσιμης προέλευσης των πρώτων υλών που συμμετέχουν στην παραγωγή του και η χρήση του παρουσιάζει σημαντικά περιβαλλοντικά και ενεργειακά οφέλη. Στον τομέα των μεταφορών το βιοντίζελ κατέχει την κυριότερη θέση καθώς μπορεί να χρησιμοποιηθεί είτε αναμεμιγμένο με συμβατικό ντίζελ σε διάφορες αναλογίες ή αυτούσιο με περιορισμένης έκτασης μετατροπές στους κινητήρες. Η Οδηγία 2003/30/EK της Ευρωπαϊκής Ένωσης, όριζε τη χρήση βιοκαυσίμων στον τομέα των μεταφορών, σε

ποσοστό 2% για το 2005, με σκοπό να φτάσει το 5.75% μέχρι το 2010. Πρόσφατα σύμφωνα με την Οδηγία 2009/28/EK της Ευρωπαϊκής Ένωσης, έως το 2020 τα κράτη μέλη υποχρεούνται να καλύπτουν τουλάχιστον το 10% της κατανάλωσης ενέργειας στον τομέα των μεταφορών με ανανεώσιμες πηγές ενέργειας. Ως εκ τούτου, η παραγωγή βιοντίζελ, τόσο σε ευρωπαϊκό (σχήμα 3), όσο και σε παγκόσμιο επίπεδο, αυξήθηκε σημαντικά για να καλύψει τις ανάγκες της αγοράς (da Silva *et al.*, 2009). Σήμερα στην Ευρώπη, σύμφωνα με τα επίσημα στοιχεία του Ευρωπαϊκού Συμβουλίου Βιοντίζελ (European Biodiesel Board, EBB), λειτουργούν περίπου 250 μονάδες παραγωγής βιοντίζελ και η συνολική ετήσια παραγωγή για το 2010 ανήλθε στα 9.7 εκατομμύρια μετρικούς τόνους. Κυριότερες χώρες παραγωγής σε ευρωπαϊκό επίπεδο, όπως φαίνεται και στο σχήμα 3, είναι η Γερμανία και η Γαλλία και ακολουθούν η Ισπανία και η Ιταλία, ενώ παγκοσμίως παράγεται στις ΗΠΑ, Αργεντινή, Βραζιλία, Μαλαισία και Ινδονησία (Amaral *et al.*, 2012).

Η Ελλάδα εναρμόνισε την εθνική της νομοθεσία με την Οδηγία 2003/30/EK, σχετικά με την προώθηση της χρήσης βιοκαυσίμων ή άλλων ανανεώσιμων καυσίμων στις μεταφορές, το Δεκέμβριο του 2005. Σύμφωνα με τον Νόμο 3423/05 ορίζονται οι διάφοροι τύποι βιοκαυσίμων και τίθεται ως στόχος για το 2010 η κατανάλωση 5.75% βιοκαυσίμων ως ποσοστό στα καύσιμα μεταφορών. Η παραγωγή βιοντίζελ στην Ελλάδα ξεκίνησε πριν από μερικά χρόνια και δραστηριοποιούνται στο χώρο αυτό 16 εταιρείες.



Σχήμα 1.3: Ετήσια παραγωγή βιοντίζελ στην Ευρώπη (European Biodiesel Board, 2011).

Άμεση συνέπεια της αυξημένης παραγωγής βιοντίζελ είναι η συσσώρευση αντίστοιχα μεγάλων ποσοτήτων ακάθαρτης γλυκερόλης δεδομένου ότι παράγεται βιοντίζελ καθαρότητας 80% κατά βάρος.

Οι ποσότητες αυτές υπερβαίνουν τη ζήτηση σε γλυκερόλη με αποτέλεσμα αφενός μεν την δραματική μείωση της τιμής της γλυκερόλης, αφετέρου δε την αδυναμία διάθεσης των παραγόμενων ποσοτήτων που συχνά οδηγεί στη δαπανηρή λύση της απόρριψής της. Στις ΗΠΑ η τιμή της ακάθαρτης γλυκερόλης υποδεκαπλασιάστηκε την διετία 2004-2006, με άμεση συνέπεια τη μείωση της επιχειρηματικής δραστηριότητας ή ακόμα και το κλείσιμο εργοστασίων χημικής παραγωγής γλυκερόλης (McCoy 2006; Yazdani & Gonzalez, 2007).

Επιπλέον σοβαρά προβλήματα αντιμετωπίζουν πλέον και ορισμένες εταιρείες παραγωγής βιοντίζελ. Ενώ κατά το παρελθόν η ακάθαρτη γλυκερόλη αποτελούσε ένα επιθυμητό παραπροϊόν που μπορούσε να συμβάλει στην οικονομική βιωσιμότητα των εργοστασίων, τα τελευταία χρόνια θεωρείται απόβλητο με μηδενική ή/και αρνητική αξία. Το 2007, η αξία της ακάθαρτης ήταν 0 \$/kg, δηλαδή ένα απόβλητο, χρησιμοποιούμενο μόνο για την παραγωγή βιοαερίου (Papanikolaou & Aggelis, 2009). Εξαιτίας των προσμίξεων που περιέχει η ακάθαρτη γλυκερόλη έχει περιορισμένες χρήσεις, σε αντίθεση με το ευρύ φάσμα εφαρμογών της καθαρής γλυκερόλης. Ως εκ τούτου αρκετά συχνά οι μονάδες παραγωγής επιβαρύνονται είτε με το κόστος καθαρισμού, ή με το κόστος μεταφοράς και απόρριψης, με αποτέλεσμα η συνολική αξία της επεξεργασίας να φτάνει ή/και να ξεπερνά την αξία της γλυκερόλης (Dasari, 2007; Johnson & Taconi, 2007; Yazdani & Gonzalez, 2007). Η σημαντική μείωση της τιμής της γλυκερόλης έχει άμεσο αντίκτυπο και κόστος παραγωγής του βιοντίζελ, καθώς εκτιμάται ότι το 75-95% του τελικού κόστους του βιοντίζελ προκύπτει από το οικονομικό αποτέλεσμα της διάθεσης ή επεξεργασίας των παραπροϊόντων (Yuste & Dorado, 2006; Vlysidis *et al.*, 2011α).

Για να ενισχυθεί ουσιαστικά η παραγωγή βιοντίζελ, κυρίως από μικρές και μεσαίες μονάδες παραγωγής είναι επιτακτική πλέον η ανάγκη εξεύρεσης προηγμένων και καινοτόμων διεργασιών μετατροπής της ακάθαρτης γλυκερόλης σε προϊόντα υψηλής προστιθέμενης αξίας. Οι τεχνολογίες αυτές θα μπορούσαν εύκολα να ενσωματωθούν στις υπάρχουσες εγκαταστάσεις βιοντίζελ, βοηθώντας έτσι τόσο στην αύξηση των εσόδων όσο και στην επέκταση της αγοράς των προϊόντων τους. Ο συνδυασμός των μέχρι τώρα συμβατικών χημικών τεχνικών, αλλά και των νέων βιοτεχνολογικών διεργασιών σε βιομηχανικό επίπεδο, ενδέχεται να ενισχύσει την βιωσιμότητα και την κερδοφορία των μονάδων. Ήδη τα τελευταία χρόνια υπάρχει μεγάλος αριθμός δημοσιεύσεων και άρθρων ανασκόπησης σχετικά με τις μεθόδους αξιοποίησης της γλυκερόλης (Johnson & Taconi, 2007; Amaral *et al.*, 2009; Papanikolaou and Aggelis, 2009; 2011a; 2011b; Chatzifragkou and Papanikolaou, 2012).

1.2 Ζύμες – Η ζύμη *Yarrowia lipolytica*

1.2.1 Ζύμες

Οι ζύμες είναι ευκαρυωτικοί μονοκύτταροι μικροοργανισμοί και ανήκουν στο βασίλειο των μυκήτων. Μέχρι σήμερα υπολογίζεται ότι έχουν αναγνωριστεί περίπου 1,500 είδη, τα οποία αποτελούν περίπου το 1% όλων των μυκήτων. Η λέξη ζύμη προέρχεται από ινδοευρωπαϊκή ρίζα και σημαίνει «αφρός» ή «φούσκα». Η χρήση των ζυμών χρονολογείται από τις αρχαίες ημέρες και είναι υπεύθυνες για την παραγωγή εκ των κορυφαίων προϊόντων ζύμωσης σε όλο τον κόσμο. Το 1680, ο Ολλανδός Antonie van Leeuwenhoek που θεωρείται ένας εκ των πρώτων θεμελιωτών της Μικροβιολογίας, παρατήρησε τα πρώτα κύτταρα μικροοργανισμών, πιθανώς ζύμες, αλλά δεν τις θεώρησε ζωντανούς οργανισμούς αλλά μάλλον σφαιρικές δομές. Το 1837, ο Schwann αναγνώρισε τις ζύμες ως μύκητες. Ενώ το 1857, ο Γάλλος μικροβιολόγος Louis Pasteur απέδειξε στο άρθρο του “Mémoire sur la fermentation alcoolique” ότι η αλκοολική ζύμωση διεξάγεται από ζώντες ζυμομύκητες και όχι από χημικό καταλύτη. Συγκεκριμένα, έδειξε ότι με διοχέτευση οξυγόνου στο ζωμό της ζύμης, η ανάπτυξη των κυττάρων θα μπορούσε να αυξηθεί, αλλά η ζύμωση παρεμποδίζεται, φαινόμενο το οποίο ονομάστηκε αργότερα «φαινόμενο Pasteur» (Barnett *et al.*, 2004).

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

Εφαρμογή	Στέλεχος ζύμης
Ζύμωση μύρας τύπου “ale”	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Διόγκωση ψωμιών και ζυμών (προζύμι)	<i>S. cerevisiae</i> , <i>Saccharomyces exiguus</i>
D – Αραβιτόλη (γλυκαντική ουσία)	<i>Candida diddensiae</i>
Γαλακτωματοποιητές	<i>Candida lipolytica</i>
Ζύμωση αιθανόλης	<i>S. cerevisiae</i>
Ιχθυοτροφές και πτηνοτροφές (ασταξανθίνη)	<i>Phaffia rhodozyma</i>
Ζωοτροφές και μονοκυτταρική πρωτεΐνη	<i>Candida utilis</i>

Ζύμωση λακτόζης και γάλακτος	<i>Candida pseudotropicalis</i> , “ <i>Kluyveromyces fragilis</i> ”
Ζύμωση μύρας τύπου “lager”	“ <i>Saccharomyces carlsbergensis</i> ” (= <i>S. pastorianus</i>)
Μαννιτόλη (ενυδατική ουσία)	“ <i>Torulopsis mannitofaciens</i> ”
Σάλτσα και πάστα σόγιας	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>
Ζύμωση κρασιού	<i>S. cerevisiae</i>
Ξυλιτόλη (γλυκαντική ουσία)	“ <i>Torulopsis candida</i> ”
Ζύμωση D – Ξυλόζης	<i>Candida shehataae</i> , <i>Pichia stiritis</i> , <i>Pichia segobiensis</i>
Παρασκευή κεφίρ	<i>Saccharomyces kefir</i>
Λαχανικά	<i>Guehomyces</i>
Ωρίμανση ροκφόρ	<i>Penicillium roqueforti</i>

Πίνακας 1.1: Χρήσεις των ζυμών στις βιομηχανίες τροφίμων, ποτών και ζύμωσης (Demain *et al.*, 1998).

1.2.2 Η ζύμη *Yarrowia lipolytica*

Kingdom	Fungi
Phylum	Ascomycota
Class	Saccharomycetes
Order	Saccharomycetales
Family	Hemiascomycetes
Genus	<i>Yarrowia</i>
Species	<i>Yarrowia lipolytica</i>

Πίνακας 1.2: Ταξινόμηση της ζύμης *Yarrowia lipolytica*

Η ζύμη *Yarrowia lipolytica* ανήκει στο Φύλο Ascomycota, στην ομάδα Saccharomycetes, στην τάξη Saccharomycetales και στην οικογένεια Dipodascaceae. Το φύλο Ascomycota είναι ένα ευρύτατο άθροισμα που περιλαμβάνει 18,000 σαπροφυτικά και παρασιτικά είδη και έναν εξίσου μεγάλο αριθμό (περίπου 14,000) ειδών που δημιουργούν λειχήνες. Στην τάξη Saccharomycetales περιλαμβάνονται οι ζύμες, μικροοργανισμοί μεγάλης σπουδαιότητας για τη βασική βιολογική έρευνα, τη βιομηχανία τροφίμων και ποτών, την ιατρική και τη βιοτεχνολογία. Τα στελέχη του γένους *Yarrowia*, όπως και όλες οι ζύμες πολλαπλασιάζονται αγενώς με εκβλάστηση ή διχοτόμηση των κυττάρων ενώ εγγενώς πολλαπλασιάζονται με ασκοσπόρια, σπόρια χαρακτηριστικά των Ascomycota που παράγονται σε εξειδικευμένα κύτταρα, τους ασκούς. Αρχικά τα στελέχη του

γένους *Yarrowia lipolytica* είχαν τοποθετηθεί στο γένος *Candida*. Όμως το 1945, όταν έγινε γνωστός ο εγγενής τρόπος αναπαραγωγής τους από τον Wickerham, μετονομάστηκαν *Endomycopsis lipolytica* (Wickerham *et al.*, 1970), κατόπιν *Saccharomycopsis lipolytica* (Yarrow, 1972) και τελικά ως *Yarrowia lipolytica*. Τα στελέχη του γένους δε θεωρούνται παθογόνα (Holzschu *et al.*, 1979) και έχει ταξινομηθεί ως ασφαλές από την Αμερικανική Παραγωγή Τροφίμων και Φαρμάκων (FDA) για την παραγωγή κιτρικού οξέος (Fickers *et al.*, 2005). Τα περισσότερα στελέχη αυτής της ζύμης δεν παρουσιάζουν την ικανότητα να αναπτύσσονται πάνω από 32°C, γι' αυτό είναι είδος αυστηρώς αερόβιο. Ανήκει στις ζύμες που είναι λιγότερο πλούσιες σε λίπος, καθώς έχει περιεκτικότητα σε λίπος περίπου 36%. Φυσικά στελέχη του μικροοργανισμού αυτού δύνανται να παραγάγουν μεγαλύτερες ποσότητες λίπους, όμως τούτο απαιτεί «χειρισμό» του θρεπτικού μέσου και του τρόπου καλλιέργειας του μικροοργανισμού αυτού (Papanikolaou and Aggelis, 2010; 2011a; 2011b). Είναι μια πολυμορφική ζύμη που απαντάται με τη μορφή απλών κυττάρων, αληθούς μυκηλίου ή ψευδομυκηλίου. Ωστόσο, το γενετικό υπόβαθρο του εκάστοτε μικροβιακού στελέχους καθώς και το περιβάλλον της αύξησης (π.χ. ο αερισμός, η πηγή άνθρακα και αζώτου, το pH) επηρεάζουν την μορφολογία της ζύμης και τη μετάβαση από την μια μορφή στην άλλη (Van der Walt, 1980; Barnett *et al.*, 1990).

Στην φύση, τα στελέχη της ζύμης αυτής απομονώνονται από υποστρώματα πλούσια σε λίπη και πρωτεΐνες (Sinigaglia *et al.*, 1994) όπως γαλακτοκομικά προϊόντα, λουκάνικα, από το έδαφος, τα λύματα και τα έλαια που είναι μολυσμένα με πετρέλαιο και το γεγονός ότι είναι αυστηρά αερόβιοι μικροοργανισμοί, βοηθάει στην εξάλειψη τους από αυτά. Η ικανότητα να αποικοδομεί πρωτεΐνες και λιπίδια μπορεί να είναι ορατή με την παραγωγή εξωκυτταρικών λιπολυτικών και πρωτεολυτικών δράσεων (Roostita and Fleet, 1996). Η γλυκόζη, οι αλκοόλες, το οξικό οξύ, υδρόφοβα υποστρώματα και διάφορα παραπροϊόντα, όπως η βιομηχανική γλυκερόλη, συγκαταλέγονται στις πηγές άνθρακα που μπορούν να αφομοιωθούν από τα στελέχη του είδους, ενώ η σακχαρόζη δεν συγκαταλέγεται ανάμεσα τους. (Kreger-van, 1984; Barnett *et al.*, 1990; Arzumanov *et al.*, 2000; Papanikolaou *et al.*, 2008; Darvishi *et al.*, 2009). Η μη ικανότητα αύξησης της άγριων στελεχών της ζύμης *Yarrowia lipolytica* επί υποστρωμάτων τα οποία περιέχουν σακχαρόζη ως πηγή άνθρακα απέκλειε τη χρήση της μελάσας το οποίο είναι υπόστρωμα χαμηλού σχετικά κόστους. Ωστόσο, ιδιαίτερο οικονομικό ενδιαφέρον παρουσιάζει η τροποποίηση των άγριων στελεχών με τη βοήθεια της γενετικής μηχανικής. Τα στελέχη στα οποία ενσωματώθηκε το γονίδιο *SUC2* από τη ζύμη *Saccharomyces cerevisiae*, το οποίο κωδικοποιεί στη σύνθεση του ένζυμο ιμπερτάση (Nicaud *et al.*, 1989; Förster *et al.*, 2007; Walczak & Robak, 2009) είναι ικανά να αυξάνονται επί σακχαρόζης υψηλής καθαρότητας αλλά και επί μελάσας και να εκκρίνουν υψηλά ποσοστά κιτρικού οξέος, όταν η αύξηση πραγματοποιείται σε περιοριστικά σε N μέσα.

Υπάρχει ένας μεγάλος όγκος μελετών που χρησιμοποιούν την *Yarrowia* ως μοντέλο οργανισμού λόγω των ιδιόμορφων χαρακτηριστικών και φαινοτύπων του. Στα μέσα της δεκαετίας του '60, όταν η μικροβιακή πρωτεΐνη προτάθηκε ως εναλλακτική των φυτικών ή ζωικών πρωτεϊνών, η ζύμη *Yarrowia lipolytica* απέσπασε το ενδιαφέρον πολλών ερευνητών λόγω της ικανότητας της να χρησιμοποιεί n-παραφίνες ως μοναδική πηγή άνθρακα και ενέργειας και να παράγει σημαντικές ποσότητες κυτταρικής μάζας και οργανικών οξέων, όπως 2-κετογλουταρικού και κιτρικού (Ratledge, 1991; 1994; Papanikolaou and Aggelis, 2010). Ας σημειωθεί ότι εκείνη την περίοδο τα υποπροϊόντα πετρελαίου, συμπεριλαμβανομένων των παραφινών, ήταν άφθονα και είχαν χαμηλό κόστος. Σήμερα, παρά το γεγονός ότι το ενδιαφέρον για τη μικροβιακή πρωτεΐνη έχει μειωθεί ή εκλείψει παντελώς, αφού η παραγωγή της κρίνεται οικονομικά βιώσιμη μόνον όταν αυτή παράγεται ως υποπροϊόν άλλων βιοτεχνολογικών εφαρμογών, η ζύμη *Yarrowia lipolytica* εξακολουθεί να βρίσκεται στο επίκεντρο της βιοτεχνολογικής έρευνας (Aggelis *et al.*, 1997; Casaregola *et al.*, 2000; Papanikolaou *et al.*, 2001; Papanikolaou and Aggelis, 2010; 2011a; 2011b; Nicaud, 2012).

1.2.2.1 Βιοτεχνολογικές χρήσεις της *Yarrowia lipolytica*

Η ζύμη αυτή, παρουσιάζει ενδιαφέρον για τη βιοτεχνολογία και είναι από τις περισσότερο μελετημένες μη-συμβατικές ζύμες. Συνεπώς, υπάρχει αυξανόμενο επιστημονικό ενδιαφέρον που φαίνεται από τον αυξανόμενο αριθμό άρθρων και κεφαλαίων που αφιερώνονται στην *Yarrowia lipolytica*. Το ενδιαφέρον των ερευνητών έχει εν προκειμένω στραφεί σε έρευνες για την παραγωγή λιπαρών υλών edικής δομής και σύστασης, για την παραγωγή κιτρικού και άλλων οργανικών οξέων, μικροβιακής πρωτεΐνης, λακτονών και διαφόρων ενζύμων. Η βιοχημική δυνατότητα της να παράγει τα ανωτέρω μεταβολικά προϊόντα, μερικά μάλιστα των οποίων είναι υψηλής προστιθέμενης αξίας, σε συνδυασμό με την ευχέρεια που επιδεικνύει να μεταβολίζει βιομηχανικά παραπροϊόντα μικρού κόστους που δεν μπορούν να αξιοποιηθούν από άλλους μικροοργανισμούς εξηγούν το επιστημονικό και βιομηχανικό ενδιαφέρον για τη ζύμη αυτή. Επιπροσθέτως, έχει προσελκύσει το ενδιαφέρον των βασικών βιολογικών επιστημών, της Γενετικής, της Μοριακής και Αναπτυξιακής Βιολογίας. Ενδεικτικά, είναι ο μοναδικός ελαιογόνος μικροοργανισμός του οποίου έχει ταυτοποιηθεί το γονιδίωμα, χρησιμοποιείται δε ως πρότυπο για την έρευνα των διεργασιών συσσώρευσης και αποδόμησης λιπιδίων ενώ οι Pembroke *et al.*, την προτείνουν ως πρότυπο για την μελέτη της παχυσαρκίας (Pembroke *et al.*, 2006; Najjar *et al.*, 2011).

Επιπλέον, η ζύμη αυτή έδειξε την ικανότητα που έχει να καλλιεργείται σε διάφορα υποστρώματα για την παραγωγή προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας, όπως μονοκυτταρική πρωτεΐνη (SCP), ενδοκυτταρικό λίπος (SCO), ένζυμα και οργανικά οξέα (Papanikolaou and

Aggelis, 2010; Nicaud, 2012). Τα στελέχη του είδους, όπως φαίνεται και από το όνομα «*lipolytica*» έχουν την ικανότητα να υδρολύουν λιπαρές ύλες και να χρησιμοποιούν τα προϊόντα υδρόλυσης ως πηγή άνθρακα και ενέργειας. Η ιδιότητα τους αυτή τους προσδίδει ανταγωνιστικό πλεονέκτημα έναντι άλλων μικροοργανισμών σε ενδιαιτήματα υψηλών συγκεντρώσεων υδροφοβών υλών, όπως περιβάλλοντα που παρατηρείται ρύπανση από πετρέλαιο (Barth & Gaillardin, 1996, 1997; Bankar *et al.*, 2009). Μάλιστα έχει εξεταστεί το ενδεχόμενο βιο-εξυγίανσης επιβαρυμένων περιβαλλόντων (π.χ. από αλειφατικές και αρωματικές ενώσεις, οργανικούς ρύπους και μέταλλα) με τη βοήθεια στελεχών του γένους (Bankar *et al.*, 2009).

Αρκετές πηγές άνθρακα και ενέργειας, όπως μελάσα, n-παραφίνες, υδρογονάνθρακες, εδώδιμα λίπη, γλυκόζη και υδρολύματα αμύλου, έχουν χρησιμοποιηθεί από ερευνητές για την παραγωγή κιτρικού οξέος και λιπιδίων από στελέχη του μικροοργανισμού αυτού (Wojtatowicz *et al.*, 1991; Rane & Sims 1993; Barth & Gaillardin 1997; Moeller *et al.*, 2011). Συνεπώς, η χρήση της ζύμης αυτής παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον, επειδή η εμπορική αξία της είναι αρκετά χαμηλή, όταν χρησιμοποιείται σε υπόστρωμα βιομηχανικής γλυκερόλης. Προβλέπεται δε να μειωθεί περαιτέρω μετά την εφαρμογή της, στις χώρες της Ευρωπαϊκής Ένωσης στην τεχνολογία για την παραγωγή του βιολογικού πετρελαίου (biodiesel) μέσω της μετεστεροποίησης φυτικών ελαίων με μεθανόλη. Τέλος, καλλιεργείται με σχετική ευχέρεια σε βιομηχανικά παραπροϊόντα μικρού κόστους που δεν μπορούν να αξιοποιηθούν από άλλους μικροοργανισμούς και για το λόγο αυτό παρουσιάζει οικονομικό ενδιαφέρον (Aggelis, 2007).

1.3 Παραγόμενα μεταβολικά προϊόντα από την ζύμη *Yarrowia lipolytica*

1.3.1 Πολυόλες

Οι πολυόλες είναι αλκοόλες που περιέχουν πολλές ομάδες υδροξυλίου και έχουν ιδιαίτερη σημασία τόσο για την επιστήμη των τροφίμων όσο και για την χημεία των πολυμερών. Είναι ουσιαστικά αλδόζες ή κετόζες, οι οποίες με αναγωγικά μέσα, ανάγονται στο σημείο της καρβονυλικής ομάδας πολυσθενείς αλκοόλες, τις αλδιτόλες. Οι πολυόλες που παράγονται από την *Y. Lipolytica* είναι η μαννιτόλη, η ερυθριτόλη και η αραβιτόλη (Belitz *et al.*, 2009).

1.3.1.1 Μαννιτόλη

Η μαννιτόλη ($C_6H_{14}O_6$) είναι μια πολυσθενής αλκοόλη που αποτελείται από έξι άτομα άνθρακα και έχει πολλές εφαρμογές στις βιομηχανίες τροφίμων, φαρμάκων και στις ιατρικές επιστήμες. Υπάρχει ευρέως στη φύση, σε διάφορα φυτά, φύκη, μύκητες και αποτελεί έναν από τους κύριους υδατάνθρακες των μανιταριών. Αυτή τη στιγμή παράγεται βιομηχανικώς με χημική

σύνθεση χρησιμοποιώντας την τεχνική υδρογόνωσης της φρουκτόζης σε υψηλή θερμοκρασία και πίεση. Αυτή η διαδικασία δεν είναι πολύ αποτελεσματική και απαιτεί υψηλή καθαρότητα υποστρωμάτων. Ως εκ τούτου, η μικροβιολογική παραγωγή μαννιτόλης θα ήταν μια ενδιαφέρουσα εναλλακτική λύση.

1.3.1.2 Αραβιτόλη

Η αραβιτόλη ή αραβινιτόλη ($C_5H_{12}O_5$) είναι αλκοόλη που αποτελείται από πέντε άτομα άνθρακα, είναι εξαιρετικά διαλυτή στο νερό και σχηματίζει λευκούς κρυστάλλους σε καθαρή μορφή. Αυτή η πολυόλη μπορεί να παραχθεί από ζύμες με τη διαδικασία της βιομετατροπής ή με τη βιομετατροπή των αποβλήτων από τη γεωργία, τη δασοκομία και τη βιομηχανία βιοντίζελ (γλυκερόλη). Η αραβιτόλη συντίθεται μέσω της οδού των φωσφορικών πεντοζών. Παρόλο που ο αριθμός των αναφορών σχετικά με τη μικροβιακή παραγωγή αραβιτόλης είναι περιορισμένος, η έρευνα για το θέμα τα τελευταία χρόνια έχει αυξηθεί, με ερευνητές να αναζητούν νέους μικροοργανισμούς, υποστρώματα και τεχνολογίες.

Χρησιμοποιείται στην βιομηχανία τροφίμων ως γλυκαντικό και στην παραγωγή θεραπευτικών ουσιών. Μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί ως υπόστρωμα για χημικά προϊόντα όπως αραβινικά και ξυλονικά οξέα, προπυλένιο, ξυλιτόλη κ.α. (Koganti *et al.*, 2011).

1.3.1.3 Ερυθριτόλη

Η ερυθριτόλη ($C_4H_{10}O_4$) είναι μια αλκοόλη που αποτελείται από τέσσερα άτομα άνθρακα και παράγεται με μικροβιολογικές μεθόδους. Ανακαλύφθηκε από τον σκωτσέζο χημικό John Stenhouse το 1848, εμφανίζεται φυσικά σε μερικά φρούτα και ζυμωμένα τρόφιμα. Σε βιομηχανικό επίπεδο, παράγεται από γλυκόζη με ζύμωση με ζύμη. Είναι τόσο γλυκιά (60-70%) όσο η σακχαρόζη, ωστόσο είναι σχεδόν μη θερμική, δεν επηρεάζει το σάκχαρο του αίματος, δεν προκαλεί τερηδόνα και απορροφάται εν μέρει από το σώμα. Έχει εγκριθεί η χρήση της ως πρόσθετο τροφίμων σε ολόκληρο τον κόσμο (Tomaszewska *et al.*, 2012).

1.3.2 Ενδοπολυσακχαρίτες

Οι ενδοπολυσακχαρίτες είναι πολυμερή αποτελούμενα από μονοσακχαρίτες και ο γενικός χημικός τους τύπος είναι $(C_6H_{10}O_5)_n$, συνήθως με $n > 100$. Αποτελούνται από μονάδες γλυκοζυλίου σε γραμμική ή διακλαδισμένη διάταξη, αλλά οι περισσότεροι αποτελούνται από πολλούς περισσότερους 20 μονοσακχαρίτες, που είναι το όριο για τους ολιγοσακχαρίτες. Ο αριθμός των

μονάδων μονοσακχαρίτη σε έναν πολυσακχαρίτη, ονομάζεται βαθμός πολυμερισμού και ποικίλλει. Μόνο λίγοι πολυσακχαρίτες έχουν ένα βαθμό πολυμερισμού μικρότερο από 100, οι περισσότεροι έχουν εντός του εύρους 200-3000.

Χρησιμοποιούν ως αποταμιευτικές και δομικές ύλες σε ζωικούς και φυτικούς οργανισμούς. Εκτιμάται ότι περισσότερο από το 90% της σημαντικής μάζας υδατάνθρακα στη φύση είναι στη μορφή των πολυσακχαριτών. Ο γενικός επιστημονικός όρος για τους πολυσακχαρίτες είναι γλυκάνες (Belitz *et al.*, 2009).

Πολυμερή που έχουν μικρό μοριακό βάρος και αποτελούνται από δυο έως εννιά μονοσακχαρίτες καλούνται ολιγοσακχαρίτες. Οι πολυσακχαρίτες ανάλογα με το είδος των σακχάρων που τους αποτελούν διακρίνονται σε διάφορες κατηγορίες. Έτσι πολυσακχαρίτες, όπως το άμυλο ή η κυτταρίνη καλούνται “ομοπολυσακχαρίτες”. Αντίθετα, πολυσακχαρίτες όπως οι πηκτίνες καλούνται “ετεροπολυσακχαρίτες”.

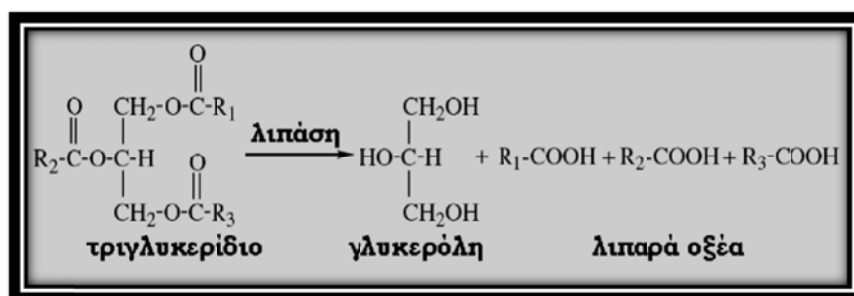
Πολλοί πολυσακχαρίτες, συμπεριλαμβανομένου του αμύλου, τις κυτταρίνες και των πηκτινών, χρησιμοποιούνται ευρέως στις φαρμακευτικές βιομηχανίες αλλά και στις βιομηχανίες τροφίμων, καθώς και σε διάφορες ιατρικές εφαρμογές (Stacey, 1967). Οι μύκητες έχουν ευρέως μελετηθεί για την παραγωγή πολυσακχαριτών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

Οι πολυσακχαρίτες που παράγουν οι μύκητες προέρχονται είτε από υγρές καλλιέργειες βυθού είτε από ζυμώσεις στερεής κατάστασης. Η σύσταση των παραγόμενων των παραγόμενων πολυσακχαριτών επηρεάζεται σημαντικά από τις συνθήκες που τελείται η ζύμωση, ακόμα περισσότερο επηρεάζει η σύσταση του μέσου καλλιέργειας (Wu *et al.*, 2006). Η γνώση αυτών είναι απαραίτητη, έτσι ώστε να οδηγηθεί ο μεταβολισμός των μυκήτων προς την παραγωγή των επιθυμητών μεταβολιτών. Διάφορες μελέτες έχουν δείξει ότι η παραγωγή των πολυσακχαριτών επηρεάζεται θετικά από πηγές άνθρακα όπως η γλυκόζη, αλλά και από διάφορες οργανικές πηγές αζώτου (π.χ. yeast extract, peptone, corn steep liquor) (Gern *et al.*, 2008; Tang and Zhong, 2002). Επιπλέον παράγοντες όπως το pH, η θερμοκρασία της ζύμωσης αλλά και ο αερισμός παίζουν

σημαντικό ρόλο στη βιοσύνθεση των πολυσακχαριτών. Παρόλα αυτά, οι συνθήκες που ευνοούν την παραγωγή βιομάζας μπορεί να μην ευνοούν την συσσώρευση των πολυσακχαριτών και αντιστρόφως (Diamantopoulou *et al.*, 2012a; 2012b; 2014, Tang and Zhong, 2002). Οι ενδοπολυσακχαρίτες που παράγονται από ανώτερους μύκητες περιλαμβάνουν μονοσακχαρίτες (π.χ. φρουκτόζη), δισακχαρίτες (π.χ. τρεχαλόζη), πολυόλες (π.χ. μαννιτόλη) αλλά κυρίως πολυσακχαρίτες όπως το γλυκογόνο, πολλουάνες, β-γλυκάνες και άλλα (Seviour *et al.*, 1992; Galiotou-Panayotou *et al.*, 1998; Tang and Zhong, 2002; Fazenda *et al.*, 2008; Tang *et al.*, 2008; 2011; Diamantopoulou *et al.*, 2014).

1.3.3 Λιπίδια

Είναι ουσίες βιολογικής προέλευσης που είναι διαλυτές σε μη πολικούς διαλύτες. Αποτελούνται από μια ομάδα φυσικών μορίων που περιλαμβάνουν λίπη, κηρούς, στερόλες, λιποδιαλυτές βιταμίνες, μονογλυκερίδια, διγλυκερίδια, τριγλυκερίδια, φωσφολιπίδια και άλλα. Γενικά μπορούν να οριστούν ως υδρόφοβα ή αμφίφυλα μικρά μόρια. Οι κύριες βιολογικές τους λειτουργίες σχετίζονται με την αποθήκευση ενέργειας και τη λειτουργία ως δομικά συστατικά κυτταρικών μεμβρανών. Τα λιπίδια έχουν εφαρμογές στις βιομηχανίες καλλυντικών, τροφίμων καθώς και στη νανοτεχνολογία. (Maitland *et al.*, 1998).



Σχήμα 1.4: Αποικοδόμηση των λιπιδίων (Papanikolaou and Aggelis, 2011).

1.4 Βιοτεχνολογική παραγωγή λιπιδίων, πολυολών και ενδοπολυσακχαριτών

1.4.1 Βιοσύνθεση λιπιδίων

Όλοι οι μικροοργανισμοί είναι ικανοί να συνθέσουν λιπίδια με σκοπό να εφοδιάσουν τις δομές, καθώς και για διάφορους λειτουργικούς σκοπούς. Όμως, μόνο τα χαρακτηριζόμενα ως ελαιογόνα στελέχη ενδέχεται να συσσωρεύσουν στο εσωτερικό των κυττάρων τους σημαντικές ποσότητες λιπιδίων. Έχει αποδειχθεί ότι οι ελαιογόνοι μικροοργανισμοί δεν διαθέτουν ένα

υπερδραστήριο σύστημα της βιοσύνθεσης λιπαρών οξέων, αλλά είναι ικανοί να παράγουν σημαντικές ποσότητες ακετυλο-συνενζύμου Α (acetyl-CoA), τη βασική μονάδα βιοσύνθεσης λιπαρών οξέων. Η βιοσυνθετική οδός των λιπαρών οξέων στους περισσότερους ελαιογόνους μικροοργανισμούς είναι ίδια με αυτή στους μη-ελαιογόνους. Για παράδειγμα ορισμένα είδη ζυμών δεν είναι ικανά να συσσωρεύσουν περισσότερο από 10% κατά βάρος έλαιο στην κυτταρική τους μάζα, όπως συμβαίνει για παράδειγμα στους *Saccharomyces cerevisiae* και *Candida utilis*, ενώ σε ορισμένα είδη ζυμών η συσσώρευση του ελαίου στη βιομάζα ξεπερνά το 70%, για παράδειγμα στους μικροοργανισμούς *Rhodotorula* και *Lipomyces*. Παρόλα αυτά, υπάρχει σημαντική διαφορά ανάμεσα στους ελαιογόνους και μη-ελαιογόνους μικροοργανισμούς (Ratledge, 2004).

Όταν η γλυκόζη ή παρομοίως μεταβολιζόμενα υλικά χρησιμοποιούνται ως πηγή άνθρακα και παράλληλα επικρατούν περιοριστικές συνθήκες αζώτου, επιτυγχάνεται η συσσώρευση λιπιδίων σε έναν μικροοργανισμό. Μετά την εξάντληση του αζώτου, η αύξηση του μικροοργανισμού περιορίζεται, καθώς το άζωτο αποτελεί δομικό συστατικό των πρωτεϊνών και των νουκλετιδίων, ενώ η περίσσεια του άνθρακα (συνήθως γλυκόζη ή κάποιος άλλος υδατάνθρακας) που συνεχίζει να αφομοιώνεται από τα κύτταρα του μικροοργανισμού μετατρέπεται μέσα στην κυτταρική του μάζα σε τριγλυκερίδια (*de novo* συσσώρευση λιπιδίων). Αντίθετα, όταν για τη συσσώρευση των λιπιδίων ως μοναδική πηγή άνθρακα και ενέργειας χρησιμοποιούνται υδροφοβικά υποστρώματα (*ex novo* συσσώρευση λιπιδίων), όπως είναι για παράδειγμα τα φυτικά έλαια, τα βιομηχανικά λίπη, τα ελεύθερα λιπαρά οξέα, εστέρες των λιπαρών οξέων κ.α., τότε η συσσώρευση των λιπιδίων είναι ανεξάρτητη από την εξάντληση της πηγής αζώτου στο μέσο ανάπτυξης του μικροοργανισμού. Σε αυτήν την περίπτωση η συσσώρευση των λιπιδίων πραγματοποιείται ταυτόχρονα με τη σύνθεση της βιομάζας ελεύθερης ελαίου του μικροοργανισμού (Papanikolaou and Aggelis, 2011a; Ratledge, 2004).

Ο μηχανισμός της *de novo* συσσώρευσης ελαίου δεν ισχύει στους μη ελαιογόνους μικροοργανισμούς, οι οποίοι όταν καλλιεργούνται σε θρεπτικό υπόστρωμα με περιορισμένη πηγή αζώτου, τείνουν να περιορίζουν τον περαιτέρω κυτταρικό πολλαπλασιασμό ή αν συνεχίζουν να αφομοιώνουν την περίσσεια του άνθρακα, τον μετατρέπουν μέσα στην κυτταρική τους μάζα σε διάφορες μορφές πολυσακχαριτών (Philippoussis and Diamantopoulou, 2012). Έτσι, η συσσώρευση ελαίου στους μη ελαιογόνους μικροοργανισμούς δεν ξεπερνά το 10% της βιομάζας.

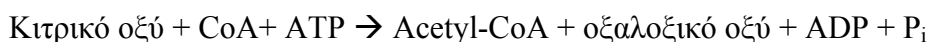
Επομένως, η ικανότητα ενός μικροοργανισμού να συσσωρεύει μεγάλες ποσότητες ελαίου στην κυτταρική του μάζα εξαρτάται κυρίως από δυο παράγοντες: α) την ικανότητα του μικροοργανισμού να παράγει συνεχώς ακετυλο-συνένζυμο Α (Acetyl-CoA) κατευθείαν στο κυτταρόπλασμα του κυττάρου, το οποίο δρα ως πρόδρομο μόριο για τη σύνθεση λιπαρών οξέων και β) την ικανότητα του μικροοργανισμού να παράγει επαρκή ποσότητα NADPH, το οποίο αποτελεί απαραίτητο αναγωγικό μέσο στη βιοσύνθεση των λιπαρών οξέων.

Έτσι, μετά τη εξάντληση του αζώτου από το μέσο ανάπτυξης του μικροοργανισμού ακολουθεί μια σειρά αντιδράσεων με αποτέλεσμα τον σχηματισμό ακέτυλο-CoA. Αναλυτικότερα, έπειτα από την κατανάλωση του αζώτου ενεργοποιείται το ένζυμο της απαμινάσης της AMP (μονοφωσφορική αδενοσίνη) σύμφωνα με την ακόλουθη βιοχημική αντίδραση:



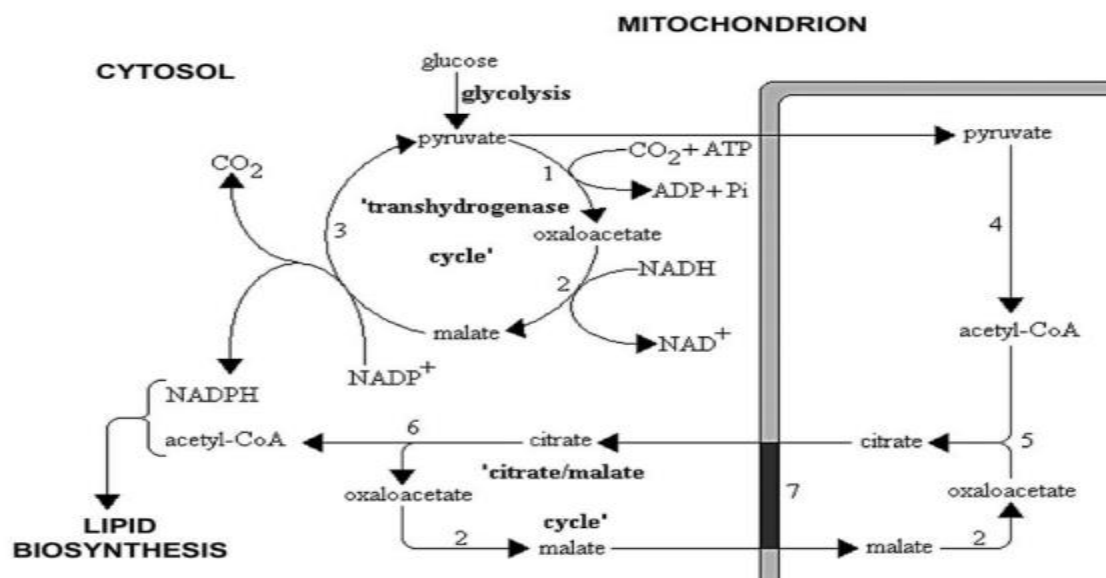
Όπου IMP είναι η μονοφωσφορική ινόςίνη.

Η παραπάνω αντίδραση έχει στόχο την «ελάφρυνση» του κυττάρου από την έλλειψη του αζώτου, με αποτέλεσμα τη μείωση της περιεκτικότητας του κυττάρου σε AMP. Το μειωμένο περιεχόμενο της AMP στο μιτοχόνδριο διακόπτει τη δράση του ενζύμου ισοκιτρικής αφυδρογονάσης (ICDH), καθώς η ενεργότητα αυτού του ενζύμου στους ελαιογόνους μικροοργανισμούς εξαρτάται αυστηρά από τη AMP. Έτσι, το κιτρικό οξύ δεν μεταβολίζεται με αποτέλεσμα να συσσωρεύεται στο μιτοχόνδριο. Στη συνέχεια το κιτρικό οξύ εισέρχεται στο κυτταρόπλασμα και διασπάται από την ATP: κιτρική λυάση (ACL), η οποία δεν απαντάται στην πλειονότητα των μη-ελαιογόνων ειδών, σε ακέτυλο-CoA και οξαλοξικό οξύ. Η αντίδραση που λαμβάνει χώρα είναι η εξής:



Όπου ADP είναι η διφωσφορική αδενοσίνη και P_i είναι το ορθοφωσφορικό ανιόν.

Το ακέτυλο-CoA χρησιμοποιείται για τη βιοσύνθεση λιπαρών οξέων, ενώ το οξαλοξικό οξύ μετατρέπεται μέσω της μηλικής αφυδρογονάσης σε μηλικό οξύ, το οποίο στη συνέχεια χρησιμοποιείται στον κύκλο του κιτρικού/μηλικού οξέος όπως φαίνεται και στο ακόλουθο σχήμα:



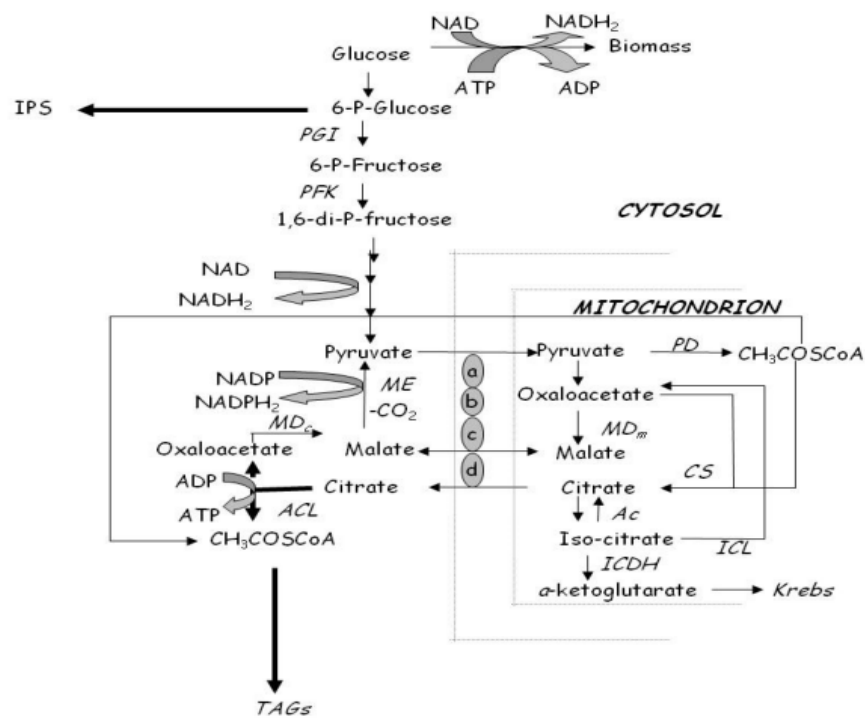
Σχήμα 1.5: Σχηματική απεικόνιση του κύκλου του κιτρικού/μηλικού οξέος (citrate/malate cycle) και του κύκλου του Krebs (transhydrogenase cycle) στην παραγωγή του Acetyl-CoA και του NADPH για την ελαιογένεση στους ελαιογόνους μικροοργανισμούς. Ένζυμα: 1. αποκαρβοξυλάση του πυρουβικού οξέος, 2. αφυδρογονάση του μηλικού οξέος, 3. μηλικό ένζυμο, 4. αφυδρογονάση του πυροσταφυλικού οξέος, 5. κιτρική συνθάση, 6. ATP:κιτρική λυάση, 7. ένζυμο μεταφοράς κιτρικού/μηλικού οξέος (Ratledge, 2004).

Για τη βιοσύνθεση των λιπαρών οξέων, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, είναι απαραίτητη και η παροχή επαρκούς ποσότητας NADPH, καθώς για τη σύνθεση 1 mol του λιπαρού οξέος C18 απαιτούνται 16 mols NADPH. Το μηλικό ένζυμο λειτουργεί ως προμηθευτής NADPH σύμφωνα με την ακόλουθη αντίδραση:



Η δράση του μηλικού ενζύμου απαντάται στην πλειοψηφία των ελαιογόνων μικροοργανισμών, όπου σχηματίζει ένα μεταβολικό σύμπλοκο, το οποίο σε συνδυασμό με την ATP: κιτρική λυάση και την συνθάση των λιπαρών οξέων (FAS), εξασφαλίζει τη μετατροπή του acetyl-CoA σε λιπαρά οξέα. Στη συνέχεια, τα λιπαρά οξέα εστεροποιούνται με γλυκερόλη σε τριγλυκερίδια και ενσωματώνονται μέσω του ενδοπλασματικού δικτύου σε σταγονίδια λιπαρών οξέων. Τα ένζυμα που είναι υπεύθυνα για τη συσσώρευση ελαίου στους ελαιογόνους μικροοργανισμούς είναι η ATP: κιτρική λυάση και το μηλικό ένζυμο, τα οποία απαντώνται στην πλειονότητα αυτών των μικροοργανισμών (Ratledge, 2004).

Εξαίρεση προκαλεί το γεγονός ότι ορισμένες ελαιογόνες ζύμες παράγουν μεγάλες ποσότητες ενδοπολυσακχαριτών κατά την ισόρροπη φάση της αύξησης, ενώ υπάρχει και «interplay» σύνθεσης πολυσακχαριτών και λιπιδίων.



Σχήμα 1.7: Συσσώρευση ενδοπολυσακχαριτών και λιπιδίων από μικροοργανισμούς (Papanikolaou and Aggelis, 2009).

1.5 Σκοπός της μελέτης

Λόγω της αυξημένης ζήτησης πετρελαίου, της σταδιακής μείωσης των αποθεμάτων του και της αύξησης των τιμών του από τις αναπτυσσόμενες χώρες τις τελευταίες δεκαετίες, καθίσταντο αναγκαίο η εξεύρεση εναλλακτικών καυσίμων, όπως το βιοντίζελ. Κύριο παραπροϊόν του είναι η γλυκερόλη, που τα τελευταία χρόνια έχει παρατηρηθεί ραγδαία αύξηση των διαθέσιμων ποσοτήτων της σε παγκόσμιο επίπεδο. Η εμπορική της αξία είναι αρκετά χαμηλή, γι' αυτό και παρουσιάζει ιδιαίτερο οικονομικό ενδιαφέρον.

Ο σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η διερεύνηση της ικανότητας της ζύμης *Yarrowia lipolytica* να αναπτύσσεται σε υπόστρωμα γλυκερόλης, η οποία είναι παραπροϊόν της βιομηχανικής παραγωγής βιοκαυσίμου (biodiesel). Ειδικότερα, η ικανότητα της ζύμης να μεταβολίζει την γλυκερόλη προς παραγωγή βιομάζας και δευτερογενών μεταβολιτών. Απώτερος σκοπός της μελέτης αυτής είναι η αριστοποίηση των συνθηκών καλλιέργειας με στόχο τη μέγιστη παραγωγή μαννιτόλης.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Βιολογικό υλικό

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν ως βιολογικό υλικό τα στελέχη LMBF Y-46 & LMBF Y-47 της ζύμης *Yarrowia lipolytica*. Απομονώθηκαν, αναγνωρίστηκαν και ταυτοποιήθηκαν στο Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών. Προηγούμενες μελέτες έδειξαν τη δυνατότητα παραγωγής μεταβολικών προϊόντων από τους μικροοργανισμούς αυτούς (Antonίου *et al.*, 2015). Οι μικροοργανισμοί ανανεώνονταν σε δοκιμαστικούς σωλήνες (slants) με στερεό θρεπτικό μέσο που περιείχε glucose 10 g L⁻¹, peptone 10 g L⁻¹, yeast 10 g L⁻¹ και agar 20 g L⁻¹ και επωάζονταν σε θερμοκρασία 28°C για 5 μέρες. Η συντήρηση των καλλιιεργειών γινόταν σε θερμοκρασία 4°C. Προκειμένου να διατηρηθεί η ζωτικότητα των στελεχών πραγματοποιούνταν ανανεώσεις ανά τακτά χρονικά διαστήματα (περίπου κάθε 3 βδομάδες), ενώ πριν από κάθε εμβολιασμό του θρεπτικού μέσου τα στελέχη ανανεώνονταν προκειμένου να βρίσκονται κάθε φορά στην ίδια φάση της αύξησης (εκθετική φάση).

2.2 Συνθήκες καλλιέργειας

2.2.1 Παρασκευή υγρού εμβολίου

Η αύξηση του μικροοργανισμού για την παρασκευή του υγρού εμβολίου έγινε σε προκαλλιέργεια, η οποία πραγματοποιήθηκε σε κωνικές φιάλες Erlenmeyer των 250 mL, πληρωμένες κατά το 1/5 του όγκου τους (50±1 mL) με θρεπτικό μέσο YPD (Yeast Peptone D-glucose). Μετά την αποστείρωση σε θερμοκρασία 121°C για 20 min οι φιάλες εμβολιάστηκαν, υπό ασηπτικές συνθήκες με κύτταρα των ζυμών προερχόμενα από καλλιέργειες ηλικίας 3 ημερών. Στη συνέχεια, η προκαλλιέργεια τοποθετήθηκε σε ανακινούμενο επωαστικό θάλαμο (New Brunswick Sc, Usa), προς επώαση σε σταθερές συνθήκες ανάδευσης, στις 180±5 rpm και θερμοκρασία στους 29±1°C. Μετά το πέρας 24 ωρών, η προκαλλιέργεια χρησιμοποιήθηκε για τον εμβολιασμό του θρεπτικού μέσου της κύριας καλλιέργειας. Η συγκεκριμένη διαδικασία επαναλήφθηκε για όλες τις πειραματικές διαδικασίες πριν από κάθε κύρια καλλιέργεια του εκάστοτε στελέχους.

2.2.2 Θρεπτικό μέσο καλλιέργειας

Οι καλλιέργειες πραγματοποιήθηκαν σε θρεπτικό μέσο που περιείχε ως μοναδική πηγή άνθρακα και ενέργειας ακάθαρτη βιομηχανική γλυκερόλη (περιείχε 1-2% μονογλυκερίδια, διγλυκερίδια και ελεύθερα λιπαρά οξέα, 2-4% NaCl, 0.1% μεθανόλη, 6-8% νερό και ήταν καθαρότητας περίπου 85% κατά βάρος). Η καθαρότητα της γλυκερόλης ελήφθη υπόψη για τους υπολογισμούς των αρχικών συγκεντρώσεων υποστρώματος στα πειράματα που έλαβαν χώρα. Όλες

οι ζυμώσεις πραγματοποιήθηκαν σε περιοριστικές συνθήκες ως προς την πηγή αζώτου (Papanikolaou *et al.*, 2001).

Συγκεκριμένα, για την πηγή άνθρακα οι συγκεντρώσεις που επιλέχθηκαν ήταν οι εξής:

1. 40 g L⁻¹ γλυκερόλης
2. 60 g L⁻¹ γλυκερόλης
3. 80 g L⁻¹ γλυκερόλης
4. 120 g L⁻¹ γλυκερόλης

Ως πηγές αζώτου χρησιμοποιήθηκαν:

1. 2 g L⁻¹ πεπτόνης
2. 1 g L⁻¹ yeast extract

Και τέλος για τα άλατα τα ακόλουθα:

1. 0.06 g L⁻¹ MnSO₄ ·H₂O (ένυδρο θειικό μαγγάνιο)
2. 1.5 g L⁻¹ MgSO₄ · 7H₂O (ένυδρο θειικό μαγνήσιο)
3. 0.02 g L⁻¹ ZnSO₄ · 7H₂O (ένυδρος θειικός ψευδάργυρος)
4. 0.15 g L⁻¹ CaCl₂ · 2H₂O (ένυδρο 2-χλωριούχο ασβέστιο)
5. 0.15 g L⁻¹ FeCl₃ · 6H₂O (ένυδρος 3-χλωριούχος σίδηρος)
6. 7 g L⁻¹ KH₂PO₄ (άνυδρο φωσφορικό κάλιο)
7. 2.5 g L⁻¹ Na₂HPO₄ (άνυδρο φωσφορικό δι-νάτριο)

2.2.3 Ανάλυση πειραματικών σταδίων

Η μελέτη αυτή χωρίστηκε σε τρία πειραματικά στάδια. Οι καλλιέργειες διενεργήθηκαν σε υπόστρωμα γλυκερόλης και πραγματοποιήθηκαν σε κωνικές φιάλες Erlenmeyer των 250 mL. Η κάθε ζύμωση ανάλογα με τις εκάστοτε συνθήκες διήρκησε διαφορετικές ώρες.

2.2.3.1 Συγκριτική αξιολόγηση των δυο στελεχών σε κωνικές φιάλες (S₀ 40 g L⁻¹)

Το πρώτο στάδιο έγινε με σκοπό την επιλογή του στελέχους με την βέλτιστη παραγωγή μεταβολικών προϊόντων και την προσαρμογή του στο υπόστρωμα της γλυκερόλης. Ανάμεσα στα δυο στελέχη της ζύμης *Yarrowia lipolytica*, LMBF Y-46 & LMBF Y-47 που εξετάστηκαν υπό τις ίδιες συνθήκες, επιλέχθηκε το στέλεχος LMBF Y-46 ως το καλύτερο για την συνέχιση των υπόλοιπων πειραμάτων. Οι συνθήκες των ζυμώσεων ήταν οι εξής:

Το θρεπτικό μέσο τοποθετούνταν σε κωνικές φιάλες, οι οποίες καλύπτονταν κατά το 1/5 του όγκου τους με αυτό και αποστειρώνονται σε αυτόκλειστο (120°C) για 45 min. Στη συνέχεια,

εμβολιάζονταν με 1 mL προκαλλιέργειας κάτω από ασηπτικές συνθήκες. Οι κωνικές φιάλες της κύριας κλειστής καλλιέργειας μεταφέρονταν σε ανακινούμενη τράπεζα στους $29\pm 1^{\circ}\text{C}$ και στις 180 ± 5 rpm όπου και παρέμειναν καθ' όλη την διάρκεια της ζύμωσης. Τα δύο στελέχη εξετάστηκαν ξεχωριστά το κάθε ένα σε πέντε διαφορετικά pH (3.0, 4.0, 5.0, 6.0 & 7.0) και διορθώνονταν όποτε υπήρχε μεταβολή. Η αρχική συγκέντρωση της γλυκερόλης στο θρεπτικό μέσο ήταν 40 g L^{-1} .

2.2.3.2 Σύγκριση αποτελεσμάτων καθαρής και ακάθαρτης γλυκερόλης ως υπόστρωμα για το στέλεχος LMBF Y-46 της ζύμης *Yarrowia lipolytica*

Επιλέχθηκε το στέλεχος LMBF Y-46 με βάση τα αποτελέσματα του, από το πρώτο πείραμα για να διερευνηθεί περαιτέρω η συμπεριφορά του σε υποστρώματα καθαρής και ακάθαρτης γλυκερόλης, αρχικής συγκέντρωσης 40 g L^{-1} . Οι συνθήκες των ζυμώσεων ήταν οι εξής:

Το θρεπτικό μέσο τοποθετούνταν σε αποστειρωμένες κωνικές φιάλες των 250 mL και η ζύμωση γινόταν όπως προαναφέρθηκε. Το pH ήταν σταθερό στο 3.5 και διορθωνόταν όταν ήταν αναγκαίο.

2.2.3.3 Καλλιέργεια του στελέχους LMBF Y-46 της ζύμης *Yarrowia lipolytica* σε διαφορετικές αρχικές συγκεντρώσεις υποστρώματος (S_0 60 g L^{-1} , 80 g L^{-1} & 120 g L^{-1})

Επιλέχθηκε το στέλεχος LMBF Y-46 με βάση τα αποτελέσματα του, από το πρώτο πείραμα για να διερευνηθεί περαιτέρω σε υψηλότερες συγκεντρώσεις γλυκερόλης, καθώς έδωσε μεγαλύτερη παραγωγή πολυολών σε σύγκριση με το στέλεχος LMBF Y-47. Η διαδικασία των ζυμώσεων ήταν η ίδια με τα προηγούμενα πειράματα και οι συνθήκες ζύμωσης ήταν σε θερμοκρασία $29\pm 1^{\circ}\text{C}$, στις 180 ± 5 rpm και σε pH σταθερό στ 3.5 και διορθωνόταν όποτε ήταν αναγκαίο.

2.2.3.4 Ημισυνεχής τροφοδοτούμενη καλλιέργεια του στελέχους LMBF Y-46 της ζύμης *Yarrowia lipolytica*

Το στέλεχος LMBF Y-46 της ζύμης *Yarrowia lipolytica* επιλέχθηκε και στο τελευταίο στάδιο της πειραματικής διαδικασίας, ώστε να διερευνηθεί σε fed batch καλλιέργεια σε συγκέντρωση γλυκερόλης 40 g L^{-1} . Συγκεκριμένα μετά την κατανάλωση της αρχικής συγκέντρωσης, προστέθηκαν άλλα 40 g L^{-1} συγκέντρωσης γλυκερόλης, για να μελετηθεί η επίδραση τους στην παραγωγή των μεταβολικών προϊόντων. Οι συνθήκες της καλλιέργειας ήταν οι εξής:

Το θρεπτικό μέσο τοποθετούνταν σε αποστειρωμένες κωνικές φιάλες των 250 mL και η ζύμωση γινόταν με τον ίδιο τρόπο όπως έχει αναπτυχθεί και παραπάνω (θερμοκρασία στους $29\pm 1^{\circ}\text{C}$ και στις 180 ± 5 rpm). Το pH ήταν σταθερό στο 3.5 και διορθωνόταν όταν ήταν αναγκαίο.

2.3 Χημικές αναλύσεις

2.3.1 Προσδιορισμός του pH στο μέσο ανάπτυξης των μικροοργανισμών

Η μέτρηση της τιμής του pH της καλλιέργειας γινόταν με πεχάμετρο (pH/mV meter HI 8014-Hanna Instruments). Εφόσον, η μετρηθείσα τιμή ήταν εντός του επιθυμητού εύρους τιμών δεν γινόταν καμία ενέργεια, ενώ σε αντίθετη περίπτωση διορθωνόταν η τιμή του pH, στις υπόλοιπες κωνικές φιάλες της καλλιέργειας, με προσθήκη κατάλληλης ποσότητας αποστειρωμένου διαλύματος υδροχλωρίου (HCL) ή καυστικού νατρίου (NaOH) ανάλογα, συγκέντρωσης 5M (Sarris *et al.*, 2011).

2.3.2 Προσδιορισμός της παραγόμενης βιομάζας

Ο προσδιορισμός της βιομάζας γινόταν με μέτρηση του ξηρού βάρους. Αρχικά οι καλλιέργειες φυγοκεντρώνταν σε φυγόκεντρο στις 9000 στροφές το λεπτό, για 10 λεπτά και σε θερμοκρασία 4°C . Ακολουθούσε έκπλυση με απιονισμένο νερό και τα κύτταρα φυγοκεντρώνταν για δεύτερη φορά, στις ίδιες συνθήκες. Έπειτα η βιομάζα απαλλαγμένη από υπολείμματα θρεπτικού του μέσου μεταφερόταν σε προζυγισμένα φιαλίδια McCartney και στη συνέχεια σε φούρνο προς ξήρανση μέχρι σταθεροποίησης του βάρους, περίπου για 48 ώρες. Το ξηρό υπόλειμμα ζυγιζόταν σε ζυγό ακριβείας τύπου Kern και εκφραζόταν σε g L^{-1} .

2.3.3 Προσδιορισμός ενδοκυτταρικού λίπους

Στο πρώτο στάδιο διενεργήθηκε ποσοτική ανάλυση (εκχύλιση λίπους) στο παραγόμενο ενδοκυτταρικό λίπος. Για τον ποσοτικό προσδιορισμό του ενδοκυτταρικού λίπους ακολούθησε η εξής διαδικασία εκχύλισης:

- Παραλαβή της ξηρής βιομάζας σε φιαλίδιο τύπου McCartney, προσθήκη μίγματος διαλυτών Folch σε ποσότητα τέτοια ώστε να καλύπτεται η ξηρή βιομάζα (Folch *et al.*, 1957; Papanikolaou *et al.*, 2001) και παραμονή του στο σκοτάδι, με σκοπό να αποφευχθεί η οξείδωση των λιπαρών οξέων του λίπους, για τουλάχιστον 72 ώρες αεροστεγώς κλεισμένο.

Το χρησιμοποιούμενο μίγμα διαλυτών προς εκχύλιση είναι μίγμα χλωροφορμίου (CHCl_3) και μεθανόλης (CH_3OH) σε αναλογία 2:1.

- Διήθηση του υγρού βιομάζας και διαλυτών με διπλό διηθητικό χαρτί.
- Εξάτμιση του διηθήματος, με την βοήθεια περιστροφικού εξατμιστήρα (Flash Evaporator – Rotavapor R - 114) υπό κενό, σε θερμοκρασία $50\text{-}55^\circ\text{C}$ έτσι ώστε να απομακρυνθούν οι διαλύτες και να παραμείνει μόνο το μικροβιακό λίπος.
- Ζύγιση του μικροβιακού λίπους σε ζυγό ακριβείας και υπολογισμός του σε g L^{-1} ή σε g g^{-1} ξηράς ουσίας (ξηρής βιομάζας).

2.3.4 Προσδιορισμός ενδοπολυσακχαριτών (IPS)

Στις καλλιέργειες που πραγματοποιήθηκαν, κατά την διάρκεια της παρούσας μελέτης, διενεργήθηκε ποσοτικός προσδιορισμός των παραγόμενων ενδοπολυσακχαριτών (IPS, Intracellular polysaccharides) και ποιοτικός προσδιορισμός των ενδοπολυσακχαριτών σε αντιπροσωπευτικό μέρος δειγμάτων, που προέκυψαν από τις καλλιέργειες.

Η ολική συγκέντρωση των ενδοπολυσακχαριτών μετρήθηκε με την διαδικασία η οποία είναι βασισμένη σε ένα τροποποιημένο πρωτόκολλο μεθόδου, το οποίο εκδόθηκε από τους Liang *et al.* (2009). Εν συντομία, η διαδικασία που ακολούθησε ήταν ότι σε 0.05 g ξηρής βιομάζας γινόταν προσθήκη 10 mL υδροχλωρικού οξέος (HCl , 2M), το διάλυμα που προέκυπτε υδrolυόταν στους 80°C για 30 λεπτά, ακολουθούσε εξουδετέρωση του HCl με προσθήκη 10 mL καυστικού νατρίου (NaOH , 2M) και διήθηση με διπλό διηθητικό χαρτί, ώστε το διήθημα που προκύπτει να είναι διαυγές.

Για την ποσοτική ανάλυση των ενδοπολυσακχαριτών εφαρμόστηκε η μέθοδος για τον προσδιορισμό των αναγόντων σακχάρων σε ισοδύναμα γλυκόζης με χρήση του 3,5-δινιτροσαλικυλικού οξέος (Miller, 1959).

2.3.4.1 Ποσοτικός προσδιορισμός

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

Η συγκέντρωση του εκάστοτε δείγματος σε ανάγοντα σάκχαρα υπολογίστηκε από την πρότυπη καμπύλη αναφοράς και εκφράστηκε σε ισοδύναμη συγκέντρωση γλυκόζης (g L^{-1}). Όλες οι απορροφήσεις μετρήθηκαν σε φασματοφωτόμετρο τύπου Hitachi U-2000 Spectrophotometer.

2.3.4.2 Ποιοτικός προσδιορισμός

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

Η στήλη με την οποία έγινε ο διαχωρισμός των ουσιών διαθέτει ένα συνδυασμό ανιχνευτών UV και RI. Ως κινητή φάση (mobile phase) χρησιμοποιήθηκε διάλυμα θειικού οξέος (H_2SO_4) συγκέντρωσης 5 mM (0.005M), με ρυθμό ροής (flow rate) 0.6 ml min^{-1} , σε θερμοκρασία 65°C και η διάρκεια της ανάλυσης ήταν 24 λεπτά.

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

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

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

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

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

Σε αυτό το κεφάλαιο εξετάζονται οι παραγόμενες ποσότητες σε βιομάζα, μεταβολικά προϊόντα, ενδοπολυσακχαρίτες καθώς και οι αποδόσεις προς το καταναλωθέν υπόστρωμα.

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

- Η παραγωγή βιομάζας
- Η παραγωγή μεταβολικών προϊόντων (μαννιτόλη, αραβιτόλη & ερυθριτόλη)
- Η καταναλισκόμενη πηγή άνθρακα (γλυκερόλη)
- Η παραγωγή ενδοπολυσακχαριτών (IPS)
- Η παραγωγή μικροβιακού λίπους

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

- Συντελεστής απόδοσης των παραγόμενων μεταβολιτών ($Y_{\text{mannitol/Glcl}}$, $Y_{\text{polyols/Glcl}}$) ως προς το καταναλωθέν υπόστρωμα
- Οι παραγόμενοι ενδοπολυσακχαρίτες ($Y_{\text{IPS/X}}$) ως προς την παραχθείσα βιομάζα
- Συντελεστής απόδοσης του μικροβιακού λίπους ($Y_{\text{L/X}}$) ως προς την παραχθείσα βιομάζα

Τα ευρήματα του πρώτου σταδίου της πειραματικής διαδικασίας, που προέκυψαν από τους υπολογισμούς των παραμέτρων της μικροβιακής αύξησης και αποτέλεσαν κριτήρια για την επιλογή του στελέχους που χρησιμοποιήθηκε στα επόμενα στάδια πειραμάτων είναι η μέγιστη παραγωγή βιομάζας και η μέγιστη παραγωγή πολυολών και συγκεκριμένα της μαννιτόλης. Τα πειράματα στο

πρώτα στάδιο είχαν αρχική συγκέντρωση υποστρώματος ακάθαρτης βιομηχανικής γλυκερόλης 40 g L⁻¹.

Η μέγιστη συγκέντρωση της βιομάζας 13.4 g L⁻¹, παρατηρήθηκε στο στέλεχος *Yarrowia lipolytica* LMBF Y – 46 σε υγρές καλλιέργειες με αρχική συγκέντρωση βιομηχανικής γλυκερόλης 40 g L⁻¹ και σε pH 7 στις 120 ώρες καλλιέργειας.

Η μέγιστη συγκέντρωση ενδοπολυσακχαριτών 4.35 g L⁻¹, παρατηρήθηκε από το στέλεχος LMBF Y – 46 σε κλειστές καλλιέργειες αρχικής συγκέντρωσης υποστρώματος 40 g L⁻¹ και σε pH 5.0 στις 72 ώρες καλλιέργειας.

Επίσης, στην παραγωγή πολυολών παρατηρήθηκε αξιοσημείωτη παραγωγή μαννιτόλης και συγκεκριμένα το στέλεχος *Yarrowia lipolytica* LMBF Y – 46 έδωσε την μεγαλύτερη τιμή 19.64 g L⁻¹ για pH 3.0 στις 48 ώρες καλλιέργειας.

Παρατίθενται πίνακες με τις μέγιστες τιμές των στοιχείων των κινητικών που παρατηρήθηκαν και για τα δυο στελέχη στα διάφορα pH.

Πίνακας 3.1: Κινητικά δεδομένα του LMBF Y – 46 στην ακάθαρτη γλυκερόλη αρχικής συγκέντρωσης 40 g L⁻¹, υπό συνθήκες περιοριστικές σε N, για διαφορετικά αρχικά pH.

		t(h)	X (g L ⁻¹)	Glol _{cons} (g L ⁻¹)	MI (g L ⁻¹)	Y _{M/GLOL} (g g ⁻¹)	Y _{L/X} (g g ⁻¹)	Y _{IPS/X} (g g ⁻¹)
pH 3.0 ± 0.3	α	120	10.38	37.70	0,00	0	0.08	0.17
	β, γ	48	6.62	36.33	19.64	0.54	0.11	0.20
	δ	72	7.26	37.70	17.33	0.46	0.09	0.21
pH 4.0 ± 0.3	α	144	11.13	37.70	2.97	0.08	0.06	0.13
	β	48	6.69	34.15	14.89	0.44	0.09	0.19
	γ	96	9.00	37.70	14.20	0.38	0.09	0.17
	δ	72	9.83	37.70	11.46	0.30	0.11	0.29
pH 5.0 ± 0.3	α	120	11.86	37.70	8.45	0.22	0.07	0.19
	β	96	7.22	37.05	13.41	0.36	0.09	0.35
	γ, δ	72	11.70	34.33	8.45	0.25	0.10	0.37
pH 6.0 ± 0.3	α	120	12.99	37.70	4.52	0.20	0.06	0.22
	β	96	4.48	37.70	10.35	0.28	0.09	0.31
	γ, δ	72	10.26	37.70	9.38	0.25	0.11	0.42
pH 7.0 ± 0.3	α	120	13.40	37.70	4.32	0.12	0.08	0.18
	β, γ, δ	96	5.20	37.70	6.67	0.18	0.10	0.35

Όπου:

α: σημείο με την μέγιστη παραγωγή βιομάζας

β: σημείο με την μέγιστη παραγωγή μαννιτόλης

γ: σημείο με τον μέγιστο ποσοστό λίπους επί ξηράς ουσίας (g g⁻¹)

δ: σημείο με τον μέγιστο ποσοστό ενδοπολυσακχαριτών επί ξηράς ουσίας (g g⁻¹)

Πίνακας 3.2: Κινητικά δεδομένα του LMBF Y – 47 στην ακάθαρτη γλυκερόλη αρχικής συγκέντρωσης 40 g L⁻¹, υπό συνθήκες περιοριστικές σε N, για διαφορετικά αρχικά pH.

		t(h)	X (g L ⁻¹)	Glol _{cons} (g L ⁻¹)	MI (g L ⁻¹)	Y _{M/GLOL} (g g ⁻¹)	Y _{L/X} (g g ⁻¹)	Y _{IPS/X} (g g ⁻¹)
pH 3.0 ± 0.3	α,γ,δ	48	10.60	32.75	10.13	0.31	0.12	0.23
	β	96	7.08	36.14	10.52	0.29	0.08	0.13
pH 4.0 ± 0.3	α	144	11.25	36.14	6.32	0.18	0.06	0.13
	β	96	9.13	36.14	16.11	0.45	0.09	0.15
	γ	72	10.00	36.14	12.54	0.35	0.11	0.20
	δ	48	10.80	34.54	9.63	0.28	0.09	0.30
pH 5.0 ± 0.3	α	144	10.43	36.14	9.63	0.27	0.06	0.20
	β	96	9.13	36.14	13.31	0.37	0.09	0.19
	γ	72	9.57	36.14	12.08	0.33	0.10	0.21
	δ	48	8.00	34.99	11.53	0.33	0.08	0.31
pH 6.0 ± 0.3	α,γ	72	11.20	36.14	12.23	0.35	0.11	0.25
	β	96	10.45	36.14	12.26	0.34	0.09	0.17
	δ	48	7.40	30.73	12.19	0.40	0.09	0.34
pH 7.0 ± 0.3	α,γ	72	11.60	36.14	8.32	0.23	0.12	0.29
	β	48	5.00	30.27	8.74	0.29	0.09	0.29
	δ	96	10.87	36.14	8.07	0.22	0.11	0.34

Όπου:

α: σημείο με την μέγιστη παραγωγή βιομάζας

β: σημείο με την μέγιστη παραγωγή μαννιτόλης

γ: σημείο με τον μέγιστο ποσοστό λίπους επί ξηράς ουσίας (g g⁻¹)

δ: σημείο με τον μέγιστο ποσοστό ενδοπολυσακχαριτών επί ξηράς ουσίας (g g⁻¹)

Παρατηρείται πως και στα δυο στελέχη της ζύμης, με την πτώση του pH αυξάνεται η συγκέντρωση των πολυολών και ο συντελεστής απόδοσης της μαννιτόλης ως προς το καταναλωθέν υπόστρωμα.

Στο επόμενο εδάφιο καλλιεργήθηκε το στέλεχος LMBF Y – 46 της ζύμης *Yarrowia lipolytica*, καθώς έδωσε καλύτερα αποτελέσματα στο πρώτο πειραματικό στάδιο και κρίθηκε ενδιαφέρουσα η περαιτέρω μελέτη του. Εξετάστηκε η συμπεριφορά του στελέχους αυτού σε υποστρώματα ακάθαρτης και καθαρής γλυκερόλης σε συνθήκες αρχικής συγκέντρωσης 40 g L⁻¹ και για pH 3.5. Ακολουθεί ο αντίστοιχος πίνακας με τις μετρήσεις που έγιναν.

Πίνακας 3.3: Μέγιστη παραγωγή μεταβολικών προϊόντων και καταναλωθέν υπόστρωμα ακάθαρτης γλυκερόλης καθαρότητας 88% κατά βάρος και καθαρής γλυκερόλης για το στέλεχος LMBF Y – 46 σε αρχική συγκέντρωση υποστρώματος 40 g L⁻¹ και σε συνθήκες pH 3.5.

		t (h)	X (g L ⁻¹)	Glol _{cons} (g L ⁻¹)	Mannitol (g L ⁻¹)	Erythritol (g L ⁻¹)	Arabitol (g L ⁻¹)
Ακάθαρτη γλυκερόλη (88%)	α, β	144	10.50	36.06	15.20	1.00	3.42
Καθαρή γλυκερόλη	α, β	144	11.20	32.82	15.50	1.00	3.23

Όπου:

α: σημείο με την μέγιστη παραγωγή βιομάζας

β: σημείο με την μέγιστη παραγωγή μαννιτόλης

Ακολουθούν διαγράμματα που απεικονίζουν τις μεταβολές του αρχικού υποστρώματος, της βιομάζας και της μαννιτόλης τόσο στην ακάθαρτη όσο και στην καθαρή γλυκερόλη για το στέλεχος LMBF Y – 46.

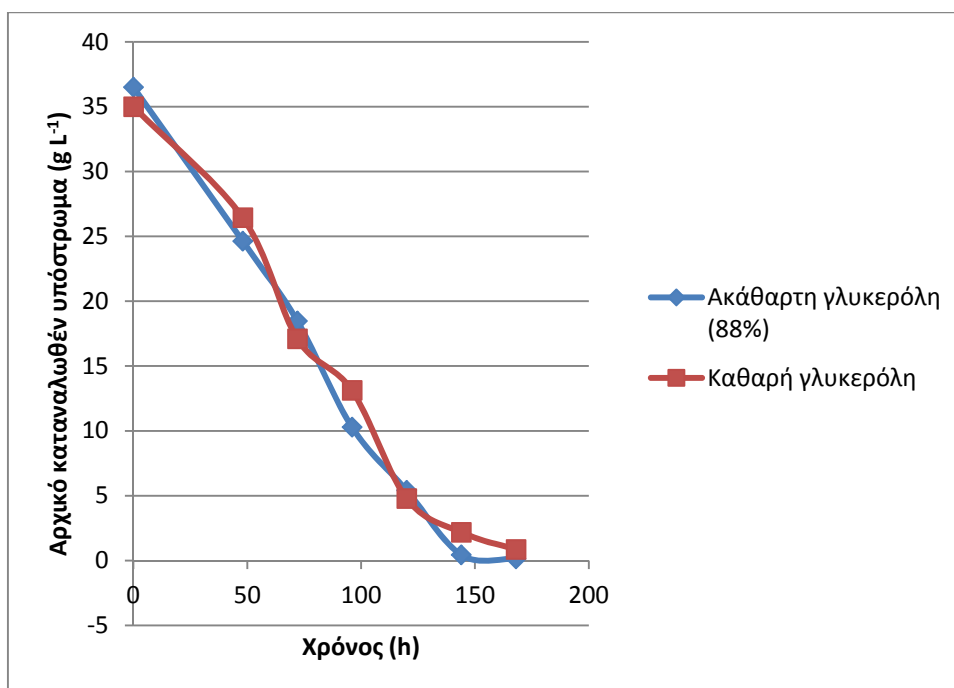


Figure 3.1a: Κινητικά δεδομένα για την μεταβολή του αρχικού υποστρώματος ως προς το χρόνο σε συνθήκες pH 3.5.

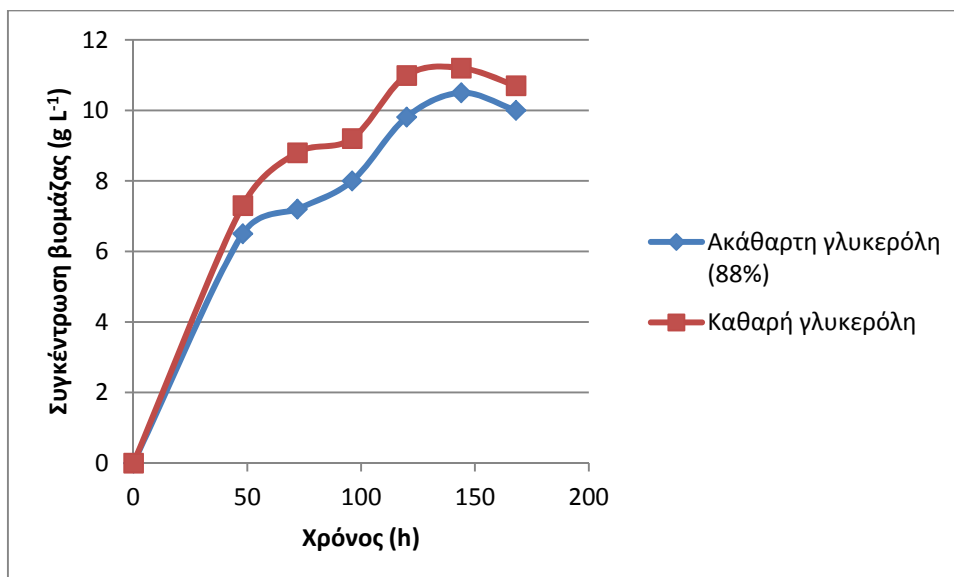


Figure 3.1β: Κινητικά δεδομένα για την μεταβολή της βιομάζας ως προς το χρόνο σε συνθήκες pH 3.5 και αρχική συγκέντρωση υποστρώματος 40 g L⁻¹.

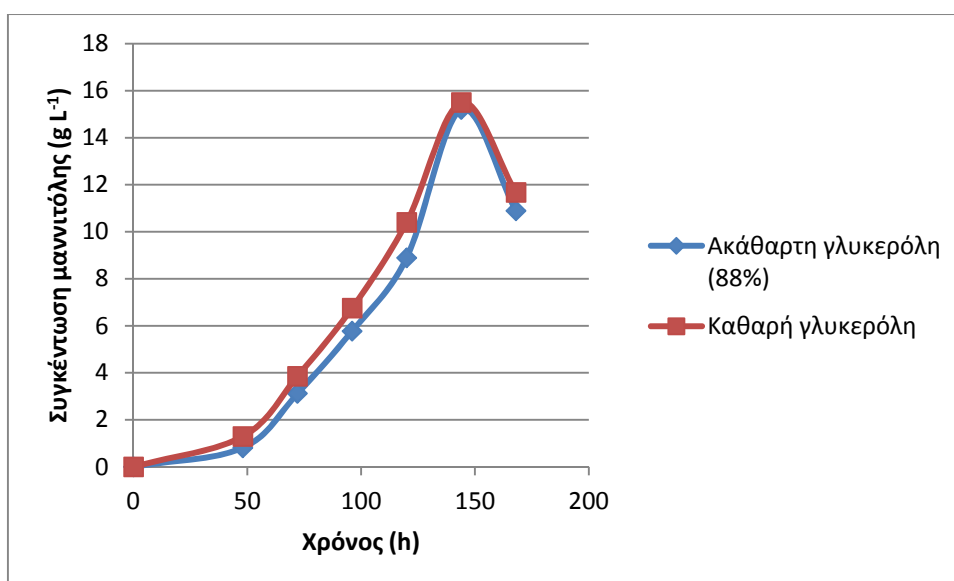


Figure 3.1γ: Κινητικά δεδομένα για την μεταβολή της μαννιτόλης ως προς το χρόνο σε συνθήκες pH 3.5 και αρχική συγκέντρωση υποστρώματος.

Παρατηρείται πως δεν απέχουν ιδιαίτερα οι τιμές των μεταβολικών προϊόντων και της κατανάλωσης του υποστρώματος τόσο στην ακάθαρτη όσο και στην καθαρή γλυκερόλη. Η ζύμη παράγει λίγο μεγαλύτερες ποσότητες μεταβολικών προϊόντων έχοντας ως υπόστρωμα την καθαρή γλυκερόλη, φαινόμενο που ενδεχομένως οφείλεται στο γεγονός πως κάποιες ουσίες που βρίσκονται στην ακάθαρτη γλυκερόλη δεν ευνοούν τόσο την παραγωγή προϊόντων.

Ακολούθησε το τρίτο πειραματικό στάδιο, στο οποίο συνεχίστηκαν οι μελέτες του στελέχους LMBF Y – 46 της ζύμης *Yarrowia lipolytica*, συγκεκριμένα εξετάστηκε η παραγωγή βιομάζας, η παραγωγή των πολυολών και ο συντελεστής απόδοσης τους ως προς το καταναλωθέν υπόστρωμα, σε διαφορετικές τιμές αρχικής συγκέντρωσης υποστρώματος (60 g L^{-1} , 80 g L^{-1} και 120 g L^{-1}) σε pH 3.5.

Παρατηρήθηκε αξιοσημείωτη παραγωγή ερυθριτόλης και αραβιτόλης στα πειράματα με την μεγαλύτερη αρχική συγκέντρωση υποστρώματος (120 g L^{-1}), όταν καταναλώθηκε σχεδόν όλο το αρχικό υπόστρωμα της γλυκερόλης.

Προσδιορίστηκε η ξηρή βιομάζα για τις τρεις διαφορετικές αρχικές συγκεντρώσεις υποστρώματος, παρατηρήθηκε η μεγαλύτερη τιμή (7.58 g L^{-1}) για $S_0 = 60 \text{ g L}^{-1}$ και μικρότερες τιμές για τις υπόλοιπες συγκεντρώσεις.

Υπολογίστηκαν η συγκέντρωση των συνολικών πολυολών και ο συντελεστής απόδοσης τους. Ενδιαφέρον παρουσιάζει πως για χαμηλές συγκεντρώσεις αρχικού υποστρώματος ο συντελεστής απόδοσης της μαννιτόλης αυξάνεται.

Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των μετρήσεων.

Πίνακας 3.4: Παραγωγή πολυολών και βιομάζας για διαφορετικές αρχικές συγκεντρώσεις υποστρώματος γλυκερόλης.

Glol_0 (g L^{-1})	t (h)	X (g L^{-1})	$\text{Glol}_{\text{cons}}$ (g L^{-1})	Mannitol (g L^{-1})	Erythritol (g L^{-1})	Arabitol (g L^{-1})	Σ_{polyols} (g L^{-1})	$Y_{\text{polyols/Glols}}$ (g g^{-1})
60	96	7.58 α	38.62	6.13	4.02	3.21	13.36	0.35
	144	4.12	45.66	11.58	5.90 γ	5.53 δ	23.01	0.50
	264	6.01	55.67	14.34 β	3.79	3.63	21.76	0.39
80	96	7.00 α	37.83	9.17	6.49	4.11	19.77	0.52
	168	3.78	65.62	15.62	15.77 γ	7.19	38.58	0.59
	216	3.05	73.36	16.45	13.07	9.73 δ	39.25	0.54
	240	2.54	76.18	19.14 β	14.59	6.91	40.64	0.53
120	96	6.89 α	40.15	4.82	3.68	2.63	11.13	0.28
	312	4.85	104.27	21.74 β	24.59 γ	10.31 δ	56.64	0.54

Όπου:

α : σημείο με την μέγιστη παραγωγή βιομάζας

β : σημείο με την μέγιστη παραγωγή μαννιτόλης

γ : σημείο με την μέγιστη παραγωγή ερυθριτόλης

δ : σημείο με την μέγιστη παραγωγή αραβιτόλης

Στις μεγάλες συγκεντρώσεις αρχικού υποστρώματος παρατηρείται πτώση της βιομάζας μετά τις 96 ώρες ζύμωσης που επιτυγχάνεται η μέγιστη τιμή, φαινόμενο που καλείται αυτόλυση.

Στα διαγράμματα που ακολουθούν παρουσιάζονται ενδεικτικά τα κινητικά δεδομένα του στελέχους LMBF Y – 46 με αρχική συγκέντρωση υποστρώματος 80 g L^{-1} και συνθήκες $\text{pH } 3.5 \pm 0.3$.

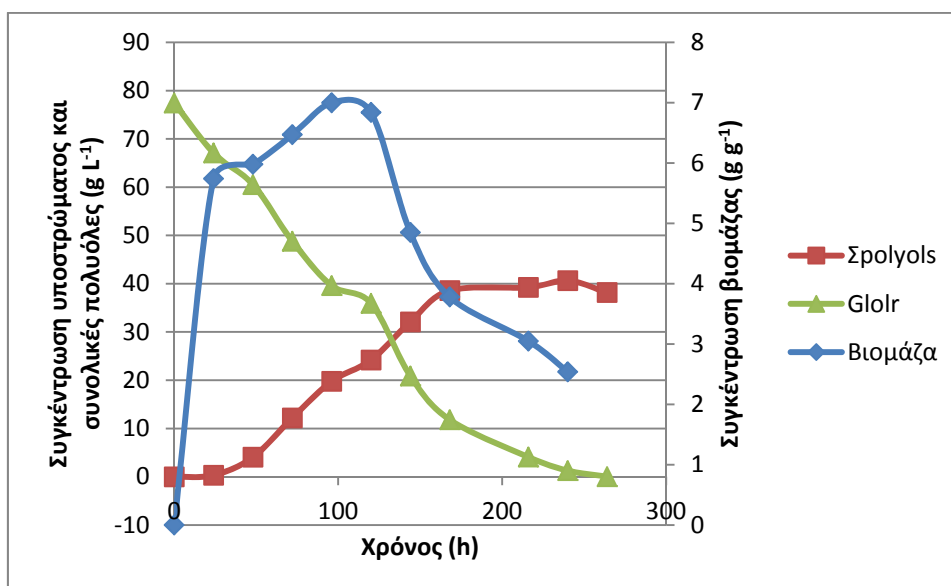


Figure 3.2α: Κινητικές απεικονίσεις της συμπεριφοράς των πολυολών, της βιομάζας και του καταναλωθέντος υποστρώματος (S_0 80 g L^{-1}) σε συνθήκες $\text{pH } 3.5$.

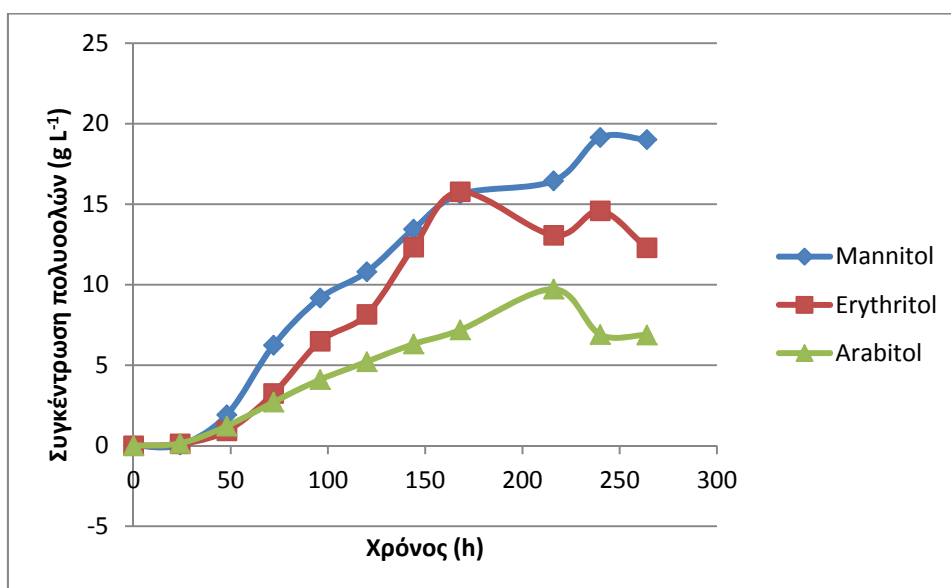


Figure 3.2β: Καμπύλες παραγωγής πολυολών ως προς το χρόνο για S_0 80 g L^{-1} .

Είναι φανερό πως από την αρχή της ζύμωσης αυξάνονται κατακόρυφα οι συγκεντρώσεις των πολυολών για αρχική συγκέντρωση υποστρώματος 80 g L^{-1} , ομοίως και για τις υπόλοιπες αρχικές συγκεντρώσεις. Αντίστοιχα και η συγκέντρωση της βιομάζας αυξάνεται τις πρώτες ώρες ζύμωσης και στη συνέχεια παραμένει σε σταθερά επίπεδα μέχρι το τέλος.

Στο τελευταίο στάδιο της μελέτης, πραγματοποιήθηκαν ζυμώσεις σε ημισυνεχή καλλιέργεια για αρχική συγκέντρωση βιομηχανικής γλυκερόλης 40 g L^{-1} σε pH 3.5 για το στελέχος LMBF Y - 46 της ζύμης *Yarrowia lipolytica*. Όταν καταναλώθηκαν περίπου 32 g L^{-1} του υποστρώματος, προστέθηκαν 40 g L^{-1} στείρου υποστρώματος βιομηχανικής γλυκερόλης για να μελετηθεί η συμπεριφορά του μικροοργανισμού, καθώς και η παραγωγή των πολυολών. Στα διαγράμματα υποδεικνύονται οι τιμές που βρέθηκαν.

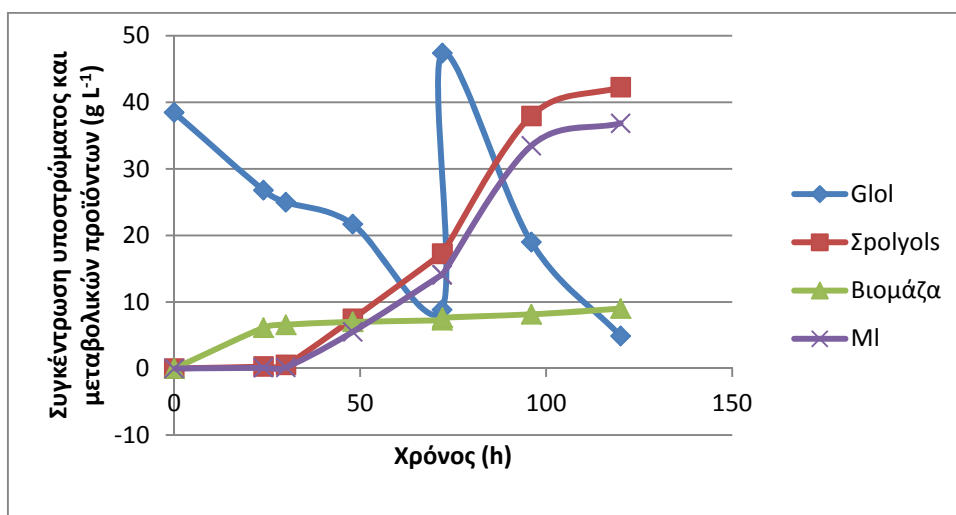


Figure 3.3α: Κινητικά δεδομένα για την συμπεριφορά του στελέχους LMBF Y - 46 σε ημισυνεχή καλλιέργεια αρχικής συγκέντρωσης 40 g L^{-1} και pH 3.5.

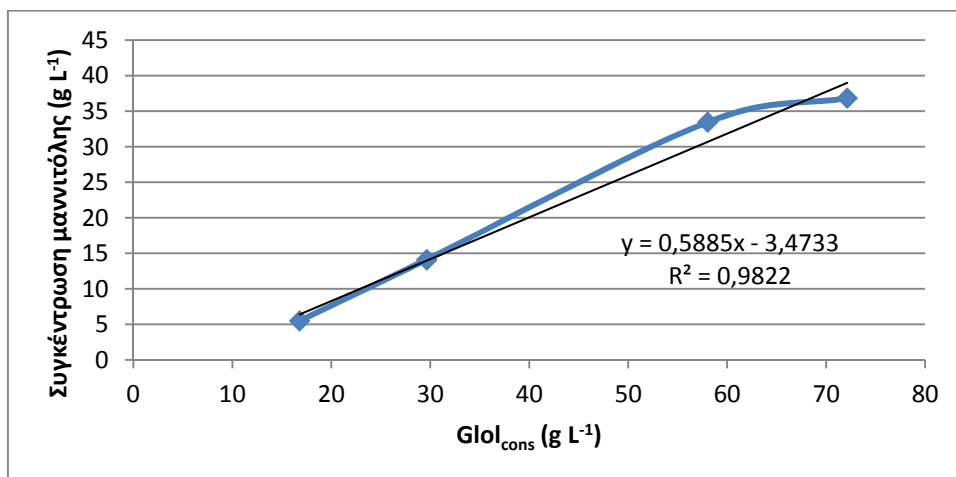


Figure 3.3β: Συγκέντρωση μαννιτόλης σε συνάρτηση με την καταναλισκόμενη γλυκερόλη σε ημισυνεχή καλλιέργεια.

Στα διαγράμματα παρατηρείται σταδιακή αύξηση στην παραγωγή των πολυολών. Συγκεκριμένα, η παραγωγή της μαννιτόλης φτάνει τα 36.84 g L^{-1} με συντελεστή απόδοσης 51% και αντίστοιχος συντελεστής απόδοσης πολυολών να φτάνει 65.4% μέγιστη τιμή. Η παραγωγή βιομάζας έφτασε 9.01 g L^{-1} μέγιστη τιμή μέχρι την ολοκλήρωση της ζύμωσης. Τέλος, η παραγωγή μικροβιακών λιπιδίων και σε αυτό το σετ ζυμώσεων κυμάνθηκε στα ίδια χαμηλά έως και ανύπαρκτα επίπεδα.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η παρούσα μεταπτυχιακή μελέτη είχε ως κύριο σκοπό τη διερεύνηση των δυνατοτήτων του μικροοργανισμού *Yarrowia lipolytica* για τα στελέχη LMBF Y – 46 και LMBF Y – 47 και την ανάπτυξη τους σε υδρόφιλο υπόστρωμα χαμηλού κόστους, προκειμένου να παραχθούν μεταβολικά προϊόντα προστιθέμενης αξίας. Το υδρόφιλο αυτό υπόστρωμα ήταν η γλυκερόλη, κύριο παραπροϊόν της παραγωγής βιοντίζελ. Παρόλο που τα στελέχη του μικροοργανισμού αυτού θεωρούνται ότι είναι ελαιογόνα και το άζωτο αποτελούσε το περιοριστικό στοιχείο της αύξησης δεν παρουσιάστηκε σημαντική συσσώρευση μικροβιακού λίπους, σε κανένα από τα πραγματοποιηθέντα πειράματα.

Ως γενικό συμπέρασμα, αξίζει να τονιστεί ότι τα στελέχη του μικροοργανισμού που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη, βρέθηκαν ικανά να αποικοδομήσουν την γλυκερόλη, ως πηγή άνθρακα και ενέργειας, ανεξαρτήτως των συγκεντρώσεων (40 g L^{-1} , 60 g L^{-1} , 80 g L^{-1} & 120 g L^{-1}) με απώτερο στόχο την παραγωγή πολυολών.

Αναλυτικά, στο πρώτο πειραματικό στάδιο εξετάστηκαν τα δυο στελέχη LMBF Y – 46 και LMBF Y – 47 της ζύμης *Yarrowia lipolytica* σε αρχική συγκέντρωση υποστρώματος 40 g L^{-1} για διαφορετικές τιμές pH (3.0, 4.0, 5.0, 6.0 & 7.0). Τα δύο στελέχη συγκρίθηκαν ως προς την παραγωγή της βιομάζας τους, την παραγωγή τους σε πολυόλες (μαννιτόλη, ερυθριτόλη και αραβιτόλη), τους ενδοπολυσακχαρίτες και την παραγωγή τους σε μικροβιακό λίπος. Από τα αποτελέσματα που πάρθηκαν ήταν φανερό πως το στέλεχος LMBF Y – 46 έδωσε πιο ικανοποιητικές τιμές σε όλα τα μεγέθη σε σχέση με το στέλεχος LMBF Y – 47. Ενδεικτικά, παρουσιάζονται διαγράμματα με τις καμπύλες παραγωγής για το συντελεστή των ενδοπολυσακχαριτών ($Y_{IPS/X}$) και τον αντίστοιχο συντελεστή του παραγόμενου μικροβιακού λίπους ως προς την παραχθείσα βιομάζα ($Y_{L/X}$) σε συνθήκες pH 6.0 και για τα δυο στελέχη της ζύμης. Αντίστοιχα αποτελέσματα εμφανίστηκαν και στα άλλα pH και δεικνύουν ότι στα πρώτα στάδια της αύξησης και παρά τον περιορισμό σε άζωτο, αξιοσημείωτες ποσότητες ενδοπολυσακχαριτών παρατηρήθηκαν. Τούτο είναι αντίθετο προς τις θεωρήσεις της βιβλιογραφίας (Ratpedge, 1988; Papanikolaou & Aggelis, 2011a; 2011b) καθόσον θεωρείται ότι οι πολυσακχαρίτες, όπως και τα λιπίδια συσσωρεύονται κατά τη στάσιμη φάση της αύξησης και η συγκέντρωση του αζώτου έχει κατέλθει ενός κρίσιμου ορίου. Από την άλλη πλευρά όμως, άλλες (ελαιογόνες) ζύμες (π.χ. *Crypt. curvatus*, *Rhodtozuloides*, κλπ) έχει δείξει ότι συσσωρεύουν σε αξιοσημείωτα ποσά ενδοπολυσακχαρίτες στα πρώιμα στάδια αύξησης παρά την παρουσία αζώτου στο μέσο της ζύμωσης. Περαιτέρω η εξέλιξη των λιπιδίων, όπου υπήρξε η τάση σύνθεσης κάποιας ποσότητας λιπιδίων στα πρώιμα στάδια της αύξησης, ακολουθούμενη από πτώση του ποσοστού των λιπιδίων επί της ξηράς ουσίας, συνάδει με αρκετές μελέτες της βιβλιογραφίας για στελέχη του *Yarrowia lipolytica* (Makri et al., 2010; Papanikolaou et al., 2017a).

Τα δυο στελέχη της ζύμης *Yarrowia lipolytica* δίνουν μέγιστη τιμή ενδοπολυσακχαριτών στις 72 ώρες ζύμωσης και μετά ακολουθεί πτώση. Το στέλεχος LMBF Y – 46 παρήγαγε 4.35 g L^{-1} ενδοπολυσακχαριτών, σε αντίθεση με το στέλεχος LMBF Y – 47 που στις ίδιες ώρες ζύμωσης είχε παράξει 2.79 g L^{-1} σε συνθήκες pH 6 και σε αρχική συγκέντρωση υποστρώματος 40 g L^{-1} .

Επιπλέον τα δυο στελέχη μελετήθηκαν και ως προς την παραγωγή τους σε μικροβιακό λίπος. Υπολογίστηκε ο συντελεστής λίπους ως προς την παραχθείσα βιομάζα σε συνάρτηση με τον χρόνο. Παρατηρήθηκε ταύτιση της μέγιστης παραγωγής μικροβιακού λίπους της τάξεως του 10% και στα δυο στελέχη. Συγκεκριμένα, κατά την διάρκεια της ζύμωσης και μεταξύ 48-144 ωρών παράγεται μικροβιακό λίπος σε ελάχιστα ποσοστά (4-10%) και στην συνέχεια μηδενίζεται.

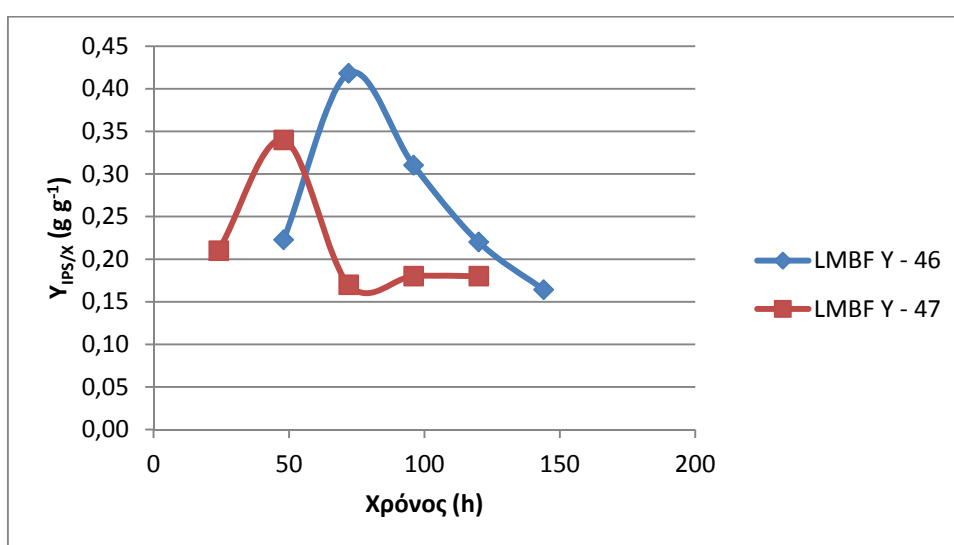


Figure 4.1α: Παραγωγική καμπύλη του συντελεστή ενδοπολυσακχαριτών ως προς την παραχθείσα βιομάζα σε συνάρτηση με το χρόνο, σε συνθήκες περιοριστικές σε N και για τα δυο στελέχη.

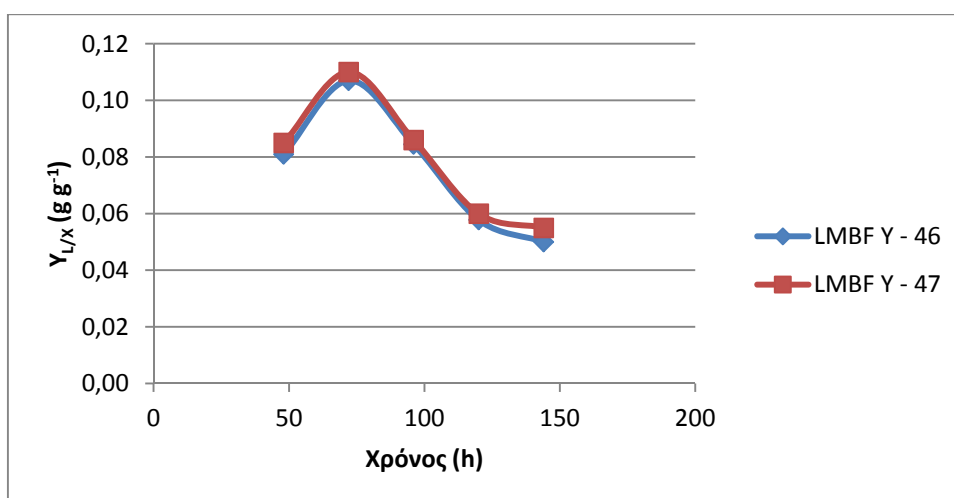


Figure 4.1β: Καμπύλη των συντελεστών μικροβιακού λίπους ως προς την παραχθείσα βιομάζα σε συνάρτηση με τον χρόνο και για τα δυο στελέχη.

Αξιοσημείωτη είναι η παραγωγή πολυολών και ειδικά της μαννιτόλης που έφτασε τα 19.64 g L^{-1} σε pH 3 για το στέλεχος LMBF Y – 46 μέσα στις πρώτες 48 ώρες της ζύμωσης, σε αντίθεση με το στέλεχος LMBF Y – 47 που στις ίδιες ώρες ζύμωσης είχε παράξει 10.13 g L^{-1} μαννιτόλης.

Συμπεραίνεται από το πρώτο πείραμα πως τα στελέχη:

- Αντέδρασαν ικανοποιητικά στην κατανάλωση του υποστρώματος βιομηχανικής γλυκερόλης.
- Δεν παρήγαγαν ικανοποιητικές ποσότητες μικροβιακού λίπους, σε αντίθεση με τις ποσότητες των ενδοπολυσακχαριτών που ήταν μεγαλύτερες.
- Παρήχθησαν ικανοποιητικές ποσότητες ξηρής βιομάζας.
- Καταναλώθηκε πλήρως το υπόστρωμα και παρήχθησαν πολυόλες σε υψηλές συγκεντρώσεις (κυρίως μαννιτόλη).
- Για τις τιμές του pH 3.0 και 4.0 είχαμε υψηλότερα αποτελέσματα σε σχέση με την παραγωγή πολυολών, σε αντίθεση με τα μεγαλύτερα pH, το οποίο συνάδει με την βιβλιογραφία (Rymowicz *et al.*, 2009).
- Η μείωση του pH είχε ως απόρροια ο συντελεστής απόδοσης της μαννιτόλης προς την αναλωθείσα γλυκερόλη να φτάσει περίπου 0.55, τιμή που θεωρείται υψηλή.

Εν κατακλείδι, με βάση τα αποτελέσματα αυτά επιλέχθηκε το στέλεχος LMBF Y – 46 για περαιτέρω διερεύνηση στα επόμενα πειραματικά στάδια, καθώς παρουσίασε υψηλότερες τιμές συγκέντρωσης μαννιτόλης για pH 3.0.

Στο επόμενο εδάφιο και έχοντας επιλέξει στέλεχος, πραγματοποιήθηκαν ζυμώσεις σε διαφορετικό υπόστρωμα με ίδιες όμως συνθήκες καλλιέργειας. Σε υγρές κλειστές καλλιέργειες, αρχικής συγκέντρωσης υποστρώματος 40 g L^{-1} σε pH 3.5, μελετήθηκε η συμπεριφορά της ζύμης σε υπόστρωμα ακάθαρτης και καθαρής γλυκερόλης χωριστά.

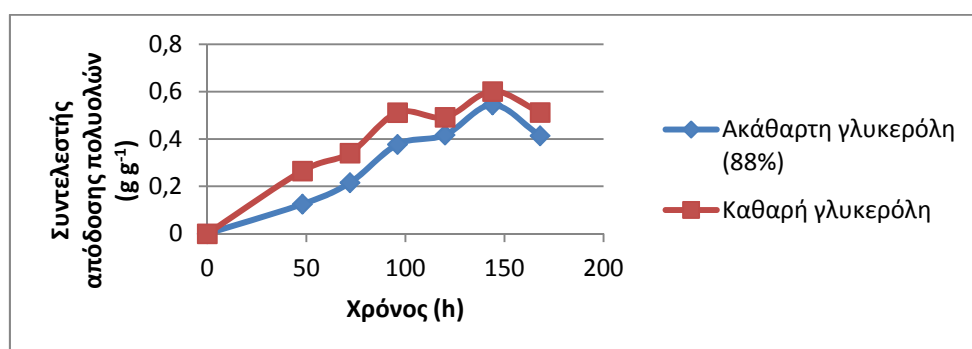


Figure 4.2: Συντελεστές απόδοσης πολυολών ως προς το αναλωθέν υπόστρωμα σε συνάρτηση με τον χρόνο.

Όπως παρατηρείται και από το διάγραμμα παραπάνω, το ίδιο στέλεχος της ζύμης *Yarrowia lipolytica* σε διαφορετική καθαρότητα του ιδίου υποστρώματος δίνει διαφορετικές τιμές παραγωγής μεταβολικών προϊόντων. Συγκεκριμένα, σε υπόστρωμα ακάθαρτης γλυκερόλης (88% κ.β.) παράγει 19.62 g L^{-1} πολυόλες στις 144 ώρες ζύμωσης, με το συντελεστή απόδοσης τους να φτάνει το 54% περίπου. Από την άλλη μεριά, ο ίδιος μικροοργανισμός καλλιεργήθηκε σε υπόστρωμα καθαρής γλυκερόλης και έδωσε 19.73 g L^{-1} πολυόλες στις 144 ώρες ζύμωσης, με συντελεστή απόδοσης πολυολών ως προς το αναλωθέν υπόστρωμα να είναι περίπου 60%.

Συμπεραίνεται λοιπόν πως το στέλεχος LMBF Y – 46 της ζύμης *Yarrowia lipolytica*:

- Σε καθαρά υποστρώματα γλυκερόλης δίνει υψηλότερες αποδόσεις μεταβολικών προϊόντων, γεγονός που μπορεί να οφείλεται σε ουσίες που εμπεριέχονται στην ακάθαρτη γλυκερόλη, οι οποίες δεν ευνοούν τόσο την υψηλότερη παραγωγή μεταβολικών προϊόντων.

Με αφορμή τα νέα αποτελέσματα σχετικά με την καθαρότητα της γλυκερόλης ως πηγή άνθρακα, συνεχίστηκαν οι πειραματικές διαδικασίες για περαιτέρω μελέτη της συμπεριφοράς του μικροοργανισμού. Στην τρίτη φάση του πειράματος, έγινε χρήση του στελέχους LMBF Y – 46 σε υγρές κλειστές καλλιέργειες με pH σταθερό στο 3.5 και διαφορετικές αρχικές συγκεντρώσεις καθαρής γλυκερόλης (60 g L^{-1} , 80 g L^{-1} & 120 g L^{-1}). Μελετήθηκαν οι συντελεστές απόδοσης, ενδεικτικά παρατίθεται η κινητική του συντελεστή απόδοσης πολυολών για αρχική συγκέντρωση υποστρώματος 80 g L^{-1} , ομοίως και για τις υπόλοιπες αρχικές συγκεντρώσεις.

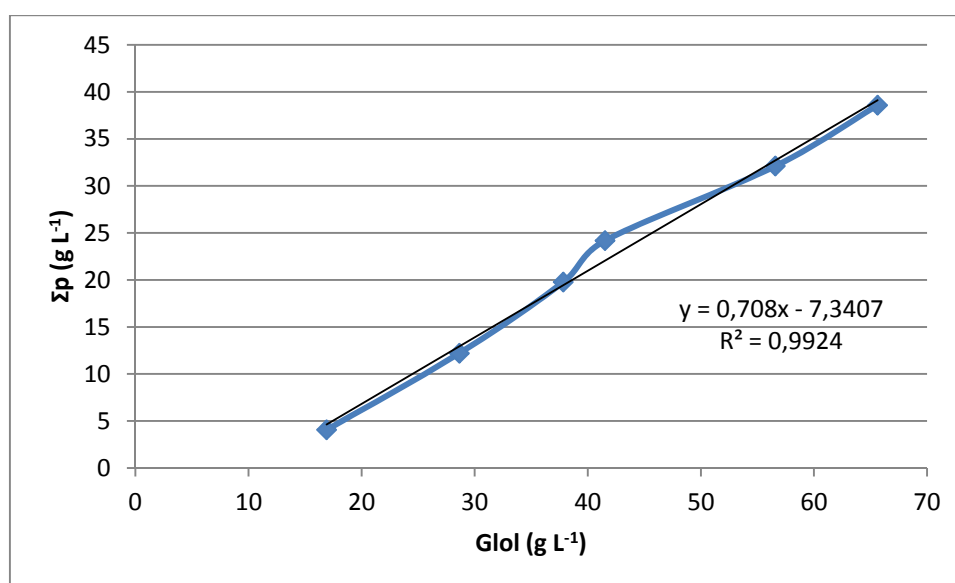


Figure 4.3: Κινητικά δεδομένα του συντελεστή απόδοσης πολυολών σε συνάρτηση με το καταναλωθέν υπόστρωμα αρχικής συγκέντρωσης 80 g L^{-1} .

Διαπιστώνεται πως σε μικρότερες συγκεντρώσεις υποστρώματος (60 g L^{-1}), ο συντελεστής απόδοσης πολυολών αυξάνεται κατακόρυφα από τις πρώτες ώρες της ζύμωσης, φτάνει το μέγιστο ποσοστό 89% στις 48 ώρες και στη συνέχεια αρχίζει να μειώνεται έντονα με μικρές διακυμάνσεις μέχρις ότου ολοκληρωθεί η ζύμωση. Όσο αυξάνεται η συγκέντρωση της γλυκερόλης στα 80 g L^{-1} και στα 120 g L^{-1} , το ποσοστό του συντελεστή απόδοσης φτάνει το μέγιστο 58% και 55% αντίστοιχα, ενώ χρειάζονται περισσότερες από 48 ώρες ζύμωσης για να επιτευχθούν.

Στο επόμενο διάγραμμα δίνονται οι μέγιστες τιμές των πολυολών στις διαφορετικές συγκεντρώσεις.

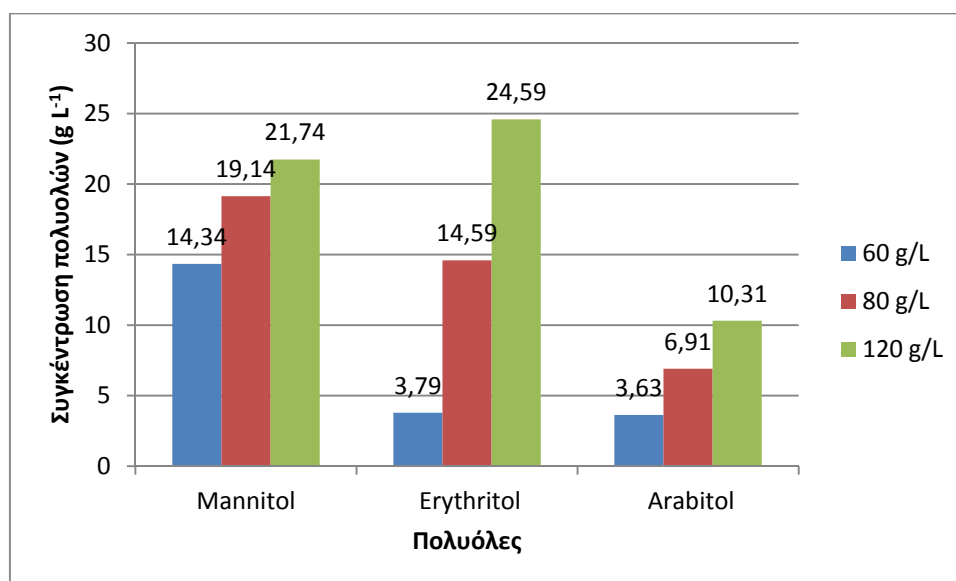


Figure 4.4: Μέγιστες τιμές πολυολών για τις διαφορετικές αρχικές συγκεντρώσεις κάτω από τις ίδιες συνθήκες καλλιέργειας.

Χαρακτηριστικό είναι το γεγονός πως όσο αυξάνονται οι αρχικές συγκεντρώσεις γλυκερόλης που έχουν χρησιμοποιηθεί ως πηγή άνθρακα και ενέργειας, διακρίνεται αύξηση και στις τιμές των πολυολών ξεχωριστά για την κάθε μια.

Η μαννιτόλη φτάνει την μέγιστη τιμή 14.34 g L^{-1} για $S_0 60 \text{ g L}^{-1}$ μέσα σε 264 ώρες ζύμωσης, ακολουθούν τα 19.14 g L^{-1} για $S_0 80 \text{ g L}^{-1}$ μέσα σε 240 ώρες ζύμωσης και τέλος στη μέγιστη αρχική συγκέντρωση υποστρώματος ($S_0 120 \text{ g L}^{-1}$) φτάνει τα 21.74 g L^{-1} μέσα σε 312 ώρες ζύμωσης.

Η ερυθριτόλη ακολουθεί την ίδια αυξητική πορεία ανάλογα με την αρχική συγκέντρωση του υποστρώματος και φτάνει 24.59 g L^{-1} για $S_0 120 \text{ g L}^{-1}$ στις 312 ώρες ζύμωσης.

Η μέγιστη αραβιτόλη που παράγεται σε $S_0 60 \text{ g L}^{-1}$ είναι 3.63 g L^{-1} και σε $S_0 120 \text{ g L}^{-1}$ φτάνει 10.31 g L^{-1} .

Παρόλη την αυξητική τάση της συγκέντρωσης, στο άθροισμα των πολυολών αλλά και στην κάθε μια χωριστά, όταν εξετάστηκε ο συντελεστής απόδοσης της μαννιτόλης ως προς την

αναλωθείσα πηγή ενέργειας, παρουσιάστηκε πτώση της τιμής του στα 80 g L^{-1} και στα 120 g L^{-1} γλυκερόλης. Συγκεκριμένα για S_0 60 g L^{-1} ο μέγιστος συντελεστής απόδοσης που έχει επιτευχθεί είναι 0.40 στις 48 ώρες ζύμωσης, ενώ για S_0 80 g L^{-1} και για S_0 120 g L^{-1} ο μέγιστος συντελεστής φτάνει 0.26 και 0.22 αντίστοιχα. Αντίθετα, αυξανόμενης της συγκέντρωσης γλυκερόλης αυξάνει η μέγιστη απόλυτη τιμή και ο συντελεστής για την ερυθριτόλη και την αραβιτόλη.

Συμπερασματικά για το τρίτο στάδιο των πειραματικών διαδικασιών προέκυψε ότι:

- Για μικρές αρχικές συγκεντρώσεις υποστρώματος αυξάνεται ο συντελεστής πολυολών.
- Αυξάνονται οι συγκεντρώσεις των πολυολών ξεχωριστά, όσο μεγαλύτερες αρχικές συγκεντρώσεις υπάρχουν.
- Αυξάνεται το άθροισμα της συγκέντρωσης ερυθριτόλης και της αραβιτόλης όταν μειώνεται η συγκέντρωση της μαννιτόλης.
- Ο συντελεστής απόδοσης της μαννιτόλης ως προς το καταναλωθέν υπόστρωμα μικραίνει όσο αυξάνεται η αρχική συγκέντρωση υποστρώματος.

Ολοκληρώνοντας την μελέτη, επιλέχθηκε για το τελευταίο στάδιο των πειραμάτων να εξεταστεί το στέλεχος LMBF Y – 46 σε υγρή ημισυνεχή καλλιέργεια αρχικής συγκέντρωσης υποστρώματος γλυκερόλης 40 g L^{-1} και σε pH 3.5. Όταν καταναλώθηκε το μεγαλύτερο μέρος του υποστρώματος (29.84 g L^{-1}), προστέθηκαν στην υπάρχουσα καλλιέργεια αλλά 40 g L^{-1} καθαρής γλυκερόλης για να μελετηθεί η συμπεριφορά της ζύμης με αυτή την παρέμβαση. Στον παρακάτω πίνακα έγινε σύγκριση των παραγόμενων πολυολών της ζύμης *Yarrowia lipolytica* αυτής της μελέτης με δημοσιευμένα αποτελέσματα άλλων μελετών.

Πίνακας 4.1: Σύγκριση αποτελεσμάτων με άλλες μελέτες.

Στέλεχος	MI (g L^{-1})	Ery (g L^{-1})	Ara (g L^{-1})	Σp (g L^{-1})	Y _{Σp} (g g^{-1})	Τύπος ζύμωσης	Αναφορές
<i>Yarrowia lipolytica</i> Wratislavia K1	6.8	11.3	0.9	19.0	0.20	flasks	Rakicka <i>et al.</i> , 2017
<i>Yarrowia lipolytica</i> AIB	11.7	11.7	2.9	26.3	0.26	flasks	Rakicka <i>et al.</i> , 2017
<i>Yarrowia lipolytica</i> AIB UTGUT1/1	13.8	16.2	5.5	35.5	0.36	flasks	Rakicka <i>et al.</i> , 2017
<i>Yarrowia lipolytica</i> AIB UTGUT1/2	16.7	6.7	7.5	30.9	0.31	flasks	Rakicka <i>et al.</i> , 2017

<i>Yarrowia lipolytica</i> AIB UTGUT1/3	7.6	14.6	7.0	29.2	0.29	flasks	Rakicka <i>et al.</i> , 2017
<i>Yarrowia lipolytica</i> Wratlavia K1	3.90	135.5	0.1	139.5	0.58	flasks	Mironczuk <i>et al.</i> 2014
<i>Yarrowia lipolytica</i> CCY – 29- 26-3	2.63	22.97	2.33	27.93	0.40	flasks	Tomaszewska <i>et al.</i> 2012
<i>Yarrowia lipolytica</i> A - 15	1.07	35.53	1.72	38.32	0.45	flasks	Tomaszewska <i>et al.</i> 2012
<i>Yarrowia lipolytica</i> LMBF Y - 46	36.84	2.41	3.02	42.27	0.59	Fed - batch	Παρούσα μελέτη
<i>Yarrowia lipolytica</i> LMBF Y - 46	19.64	0	0	19.64	0.54	flasks	Παρούσα μελέτη
<i>Yarrowia lipolytica</i> LMBF Y - 47	10.13	0.19	1.52	11.84	0.36	flasks	Παρούσα μελέτη

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης έδειξαν πως μετά την εκ νέου προσθήκη του στείρου υποστρώματος συνεχίστηκε η αυξητική πορεία της παραγωγής των πολυολών.

Συγκεκριμένα η παραγωγή της μαννιτόλης αυξήθηκε κατακόρυφα και έφτασε να παραχθούν ως και 36.84 g L⁻¹ με μέγιστο συντελεστή απόδοσης περίπου 55% μέσα σε 120 ώρες ζύμωσης. Η ερυθριτόλη και η αραβιτόλη παρουσίασαν αύξηση των τιμών τους, αλλά όχι σε τρομερά επίπεδα, ενδεικτικά παρήχθησαν 2.41 g L⁻¹ και 3.02 g L⁻¹ αντίστοιχα.

Τα αποτελέσματα της παρούσας μεταπτυχιακής μελέτης δεικνύουν ότι:

- Τα στελέχη της ζύμης *Yarrowia lipolytica* κατά την καλλιέργεια τους σε υποστρώματα γλυκερόλης δύναται να αναπτυχθούν κανονικά και να δώσουν σημαντικές ποσότητες πολυολών.
- Η απόδοση των παραγόμενων προϊόντων επηρεάζεται σημαντικά από την πηγή άνθρακα που χρησιμοποιείται.
- Η γλυκερόλη είναι διαθέσιμη πηγή άνθρακα μηδενικής ή ελάχιστης αξίας, καθώς προέρχεται από το βιοντίζελ και είναι φιλική προς το περιβάλλον.
- Σε όλα τα παραπάνω πειράματα τα στελέχη της ζύμης δεν απεδείχθησαν ικανά να συσσωρεύσουν μικροβιακό λίπος σε ικανοποιητικές ποσότητες.
- Οι ενδοπολυσακχαρίτες στα πρώτα στάδια αύξησης παρουσίασαν αξιοσημείωτες ποσότητες παρά τον περιορισμό σε άζωτο, συμπεριφορά που καθίσταται ενδιαφέρουσα.

Συμπερασματικά, η παραγωγή πολυολών από την αξιοποίηση βιομηχανικών παραπροϊόντων αποτελεί σημαντικό επίτευγμα για την βιοτεχνολογία των τροφίμων και οδηγεί στην αναβάθμιση του περιβάλλοντος και της οικονομίας. Η καθαρότητα της γλυκερόλης, το είδος του μικροοργανισμού και οι συνθήκες καλλιέργειας είναι σημαντικοί παράγοντες που επηρεάζουν τις βιοτεχνολογικές διεργασίες.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Aggelis G., Sourdis J., Prediction of lipid accumulation-degradation in oleaginous micro-organisms growing on vegetable oils. *Antonie van Leeuwenhoek* 1997, 72, 159-165.

Amaral PFF, Ferreira TF, Fontes GC, Coelho MAZ, Glycerol valorization: New biotechnological routes. *Food and Bioproducts Processing* 2009, 87, 179-186.

Arzumanov TE, Shishkanova NV, & Finogenova, TV, Biosynthesis of citric acid by *Yarrowia lipolytica* repeated-batch culture on ethanol. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2000, 53, 525–529.

Bankar AV, Kumar AR, & Zinjarde, SS, Environmental and industrial applications of *Yarrowia lipolytica*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2009, 84, 847–865.

Barnett JA, Payne RW, & Yarrow, D. (Eds). *The Yeasts: Characteristics and Identification*. Cambridge UK University Press, Cambridge, 1990.

Barnett JA, Beginnings of microbiology and biochemistry: the contribution of yeast research. *Microbiology (Reading, Engl.)*, 2003, 149 (3), 557 – 567.

Barth G., & Gaillardin, C., *Yarrowia lipolytica* in: Wolf, K. (Ed), *Non Conventional Yeasts in Biotechnology*, Springer, New York, NY, USA, 1996.

Barth G., & Gaillardin, C., Physiology and genetics of the dimorphic fungus *Yarrowia lipolytica*. *FEMS Microbiology Reviews*, 1997, 19, 219–237.

Behr A., Eilting J., Irawardi K., Leschinski J., Lindner F., Improved utilization of renewable resources: New important derivatives of glycerol. In: RSC Publishing. *Green Chemistry*, 2008, 10(1), 1-140.

Berndes G., Hansson J., Egeskog A., Johnsson F., Advanced biofuels: Future perspectives from an expert elicitation survey. *Biomass and Bioenergy*, 2010, 34, 227-236.

Casaregola S., Neuveglise C., Lepingle A., Bon E, Feynerol C., Artiguenave F., Wincker P., Gaillardin C., Genomic Exploration of the Hemiascomycetous Yeasts: 17. *Yarrowia lipolytica*. FEMS Lett 2000, 487, 95-100.

Claude S., Research of new outlets for glycerol-recent developments in France. Fett/Lipid, 1999, 101, 101–104.

Costa JAV, de Morais MG., The role of biochemical engineering in the production of biofuels from microalgae. Bioresource Technology, 2011, 102,2-9.

Damartzis T., Zabaniotou A., Thermochemical conversion of biomass to second generation biofuels through integrated process design – A review. Renewable and Sustainable energy Reviews, 2011, 15, 366-378.

Darvishi F., Nahvi I., Zarkesh–Esfahani H., Momenbeik, F., Effect of plant oils upon lipase and citric acid production in *Yarrowia lipolytica* yeast. Journal of Biomedicine and Biotechnology, 2009, 562943.

da Silva GP, Mack M., Contiero J., Glycerol: A promising and abundant carbon source for industrial microbiology. Biotechnol Adv, 2008, 27, 30-39.

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

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

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

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

Fickers P., Benetti, P.H., Wache Y., Marty A., Mauersberger S., Smit M, Nicaud J-M., :Hydrophobic substrate utilization by the yeast *Yarrowia lipolytica*, and its potential applications. FEMS Yeast Res 2005, 5, 527-543.

Fiorese G., Catenacci M., Verdolini E., Bosetti V., Advanced biofuels: Future perspectives from an expert elicitation survey. Energy Policy in Press DOL, 2013, org/10.1016/j.enpol.2012.12.061.

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

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

Gupta M., Kumar N., Scope and opportunities of using glycerol as an energy source. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 2012, 16, 4551-4556.

Holzschu DL., Chandler FW., Ajello L. & Ahearn, DG., Evaluation of industrial yeasts for pathogenicity. Sabouraudia, 1979, 17, 71–78.

Johnson DT & Taconi KA., The Glycerin Glut: Options for the value added conversion of crude glycerol resulting from biodiesel production. Environmental Progress, 2007, 26(4), 338-348.

Kreger–van Rij, NJW. (Ed), The Yeast, a Taxonomic Study. Elsevier, Amsterdam, 1984.

Lam MK., Lee KT., Microalgae biofuels: A critical review of issues, problems and the way forward. Biotechnology Advances, 2012, 30, 673-690.

Leoneti AB., Aragao-Leoneti V., de Oliveira SVB., Glycerol as a by-product of biodiesel production in Brazil: Alternatives for the use of unrefined glycerol. Renewable energy, 2012, 45, 138-145.

Maitland, Jr Jones, Organic Chemistry. W W Norton & Co Inc (Np), 1998, p.139.

McCoy M., An unlikely impact. Chemical and Engineering News, 2006, 83, 24-26.

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

Moeller L., Grünberg M., Zehnsdorf A., Aurich A., Bley T., & Strehlitz B., Repeated fed-batch fermentation using biosensor online control for citric acid production by *Yarrowia lipolytica*. *Journal of Biotechnology*, 2011, 153, 133–137.

Naik SN, Goud VV, Rout PK, Dalai AK., Production on first and second generation biofuels: A comprehensive review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2010, 14, 578-597.

Najjar S., Pearlman D., Najjar A., Ghiasian V., Zagzag D., Devinsky O., Extralimbic autoimmune encephalitis associated with glutamic acid decarboxylase antibodies: an underdiagnosed entity. *Epilepsy Behav.*, 2011, 21, 306-313.

Nicaud J. M., *Yarrowia lipolytica* Yeast, 2012, 29, 409-418.

Pagliaro M., Ciriminna R., Kimura H., Rossi M., Della Pina C., From Glycerol to Value-added Products. *Angewandte Chemie International Edition*, 2007, 46, 4434-4440.

Pagliaro M., Rossi M., The Future of glycerol: New Uses of a Versatile Raw Material. In: *RSC Green Chemistry Book Series Chapters: 1-2*, 2008 p:1-35.

Papanikolaou S., Fakas S., Fick M., Chevalot I., Galiotou–Panayotou M., Komaitis M., Marc I., Aggelis, G., Biotechnological valorisation of raw glycerol discharged after bio–diesel (fatty acid methyl–esters) manufacturing process: production of 1,3–propanediol, citric acid and single cell oil. *Biomass and Bioenergy*, 2008, 32, 60–71.

Papanikolaou S., Microbial Conversion of Glycerol into 1,3-propanediol: Glycerol Assimilation, Biochemical Events Related with 1,3-propanediol Biosynthesis and Biochemical engineering of the process. In: Aggelis G (Editor) *Microbial Conversions of Raw Glycerol*, Nova Science Publishers Inc, 2009, 137-168.

Papanikolaou S., Aggelis G., Biotechnological valorization of biodiesel derived glycerol waste through production of single cell oil and citric acid by *Yarrowia lipolytica*. *Lipid Technology*, 2009, 21(4), 83-87.

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

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

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

Pembroke, JT. (Ed), Yeast *Yarrowia lipolytica* as a model for obesity. National Institute of Health Sciences Research Bulletin Camillus Hospital, Shelbourne Road, Limerick, Ireland, 2006.

Peters D., Raw Materials Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology, 2007, 105, 1 – 30.

Philippoussis A., Diamantopoulou P., Agro-food industry wastes and agricultural residues conversation into high value products by mushroom cultivation. Proceedings of the 7th Int. Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products (ICMBMP7), 2011, pp. 344-356.

Rahmat N., Abdullah AZ, Mohamed AR, Recent progress on innovative and potential technologies for glycerol transformation into fuel additives: A critical review. Renew Sust Energ Rev., 2010, 14(3), 987-1000.

Rane K., & Sims, K., Production of citric acid by *Candida lipolytica* Y 1095: Effect of glucose concentration on yield and productivity. Enzyme and Microbial Technology, 1993, 15, 646–651.

Ratlledge, C., Biotechnology group meeting extremophiles, 1988, 42, 298-322.

Ratlledge, C., Yeasts, moulds, algae and bacteria as sources of lipids. In technological Advances in Improved and Alternatives Sources of Lipids ed., 1994.

Ratlledge C., Fatty acid biosynthesis in microorganisms being used for Single Cell Oil production. Biochimie, 2004, 86, 807-815.

Rehm H., Microbial production of glycerol and other polyols. In Biotechnology. Weinheim: VCH, 1996, p. 205-27.

Roostita R., Fleet G., The occurrence and growth of yeasts in Camembert and blue-veined cheeses. *Int. J Food Microbiol* 1996, 28, 393-404.

Rymowicz W., Rywińska A., Marcinkiewicz M., High-yield production of erythritol from raw glycerol in fed-batch cultures of *Yarrowia lipolytica*. *Biotechnol Lett.*, 2009, 31, 377–380.

Sarris D., Galiotou – Panayotou M., Koutinas A.A., Komaitis M., Papanikolaou S., Citric acid, biomass and cellular lipid production by *Yarrowia lipolytica* strains cultivated on olive mill wastewater-based media. *J. Chem Technol Biotechnol*, 2011, 86, 1439-1448.

Sims REH, Mabee W, Saddler JN, Taylor M., An overview of second generation biofuel technologies. *Bioresource Technology*, 2010, 101, 1570-1580.

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

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

Taherzadeh M., Adler L., Liden G., Strategies for enhancing fermentative production of glycerol-a review. *Enzyme and Microbial Technology*, 2002, 31, 53-66.

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

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

Tsugawa R., Nakase T., Koyabashi T., Yamashita K., & Okumura, S., Fermentation of n-paraffins by yeast. Part III. K–Ketoglutarate productivity of various yeast. *Agricultural & Biological Chemistry*, 1969, 33, 929–938.

Van der Walt JP, & Van Arx, JA., The yeast genus *Yarrowia* gen. nov. *Antonie van Leeuwenhoek*, 1980, 46, 517–521.

Van Gerpen J., Shanks B, Pruszko R., Clements D., Knothe G., Biodiesel production technology. National Renewable Energy Laboratory, 2004, 510-36244.

Verdugo C., Luna D., Posadillo A., Sancho ED, Rodriguez S., Bautista F., Luque R., Marinas JM., Romero AA., Production of a new second generation biodiesel with a low cost lipase derived from *Thermomyces lanuginosus*: Optimization by response surface methodology. *Catalysis Today*, 2012, 167, 107-112.

Vijaikishore P., Karanth N., Glycerol production by fermentation – a review. *Process Biochemistry*, 1986, 21, 54-57.

Vlysidis A., Binns M., Webb C., Theodoropoulos C., A techno-economic analysis of biodiesel biorefineries: Assessment of intergraded designs for the co-production of fuels and chemicals. *Energy*, 2011a, 36, 4671-4683.

Wang ZX., Zhugea J., Fanga H., Prior BA., Glycerol production by fermentation: A review. *Biotechnology Advances*, 2001, 19, 201-223.

Wickerham LJ., Kurtzman CP., & Herman AI., 1970: Sexual reproduction in *Candida lipolytica*. *Science*, 1970, 167, 1141.

Wojtatowicz M., Rymowicz W., & Kautola H., Comparison of different strains of the yeast *Yarrowia lipolytica* for citric acid production from glucose hydrol. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 1991, 31, 165–174.

Wolfson A., Litvak G., Dlugy C., TavorD., Employing crude glycerol from biodiesel production as an alternative green reaction medium. *Industrial Crops Products*, 2009, 30, 78-81.

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

Yarrow D., Four new combinations in yeasts. *Antonie van Leeuwenhoek*, 1972, 38, 357–360.

Yazdani SS., Gonzalez R., Anaerobic fermentation of glycerol: a path to economic viability for the biofuels industry. *Current Opinion in Biotechnology*, 2007, 18, 213-219.

Yueste AJ & Dorado MP., A neural network approach to simulate biodiesel production from waste olive oil. Energy and Fuels, 2006, 20, 399-402.