

*«Μελέτη της φυσιολογικής συμπεριφοράς του μικροοργανισμού *Debaryomyces hansenii* Υ-41 κατά την αύξηση του σε υδρόφιλα υποστρώματα χαμηλού κόστους»*

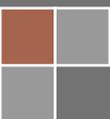
**Μεταπτυχιακή μελέτη**

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ  
ΠΜΣ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ –  
ΒΙΟΔΙΕΡΓΑΣΙΕΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΒΙΟΔΙΥΛΙΣΤΗΡΙΑ

Φιλιππή Ν. Αικατερίνη

Επιβλέπων καθηγητής:

Σεραφείμ Παπανικολάου



# **ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ**

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ  
ΠΜΣ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ –  
ΒΙΟΔΙΕΡΓΑΣΙΕΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΒΙΟΔΙΥΛΙΣΤΗΡΙΑ

## **ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ**

«Μελέτη της φυσιολογικής συμπεριφοράς του  
μικροοργανισμού *Debaryomyces hansenii* Υ-41 κατά την αύξηση του  
σε υδρόφιλα υποστρώματα χαμηλού κόστους»

**Αικατερίνη Ν. Φιλιππή**

**Επιβλέπων** : Σεραφείμ Παπανικολάου, Αναπληρωτής Καθηγητής

**Αθήνα, 2017**

# **ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ**

«Μελέτη της φυσιολογικής συμπεριφοράς του μικροοργανισμού *Debaryomyces hansenii* Y-41 κατά την αύξηση του σε υδρόφιλα υποστρώματα χαμηλού κόστους»

**Αικατερίνη Ν. Φιλιππή**

**Επιβλέπων Καθηγητής:**

Παπανικολάου Σεραφείμ, Αναπληρωτής Καθηγητής Γ.Π.Α.

**Εξεταστική Επιτροπή:**

Σεραφείμ Παπανικολάου, Αναπληρωτής Καθηγητής Γ.Π.Α.

(Επιβλέπων καθηγητής)

Απόστολος Κουτίνας, Επίκουρος Καθηγητής Γ.Π.Α.

Νικόλαος Στοφόρος, Καθηγητής Γ.Π.Α

**Αθήνα, 2017**

## *Ευχαριστίες*

Η παρούσα ερευνητική μελέτη εκπονήθηκε στο εργαστήριο Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, στα πλαίσια του Π.Μ.Σ. «Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου». Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον αναπληρωτή καθηγητή και επιβλέποντα μου, Δρ. Σεραφείμ Παπανικολάου, για την εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπό μου, καθώς και για την καθοδήγηση και τη συνεργασία μας κατά τη διάρκεια της μελέτης αυτής. Επιπλέον, θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες στους υποψήφιους διδάκτορα Ροζανίνα Φιλιπούση, Ερμίντα Τσούκο και Δημήτρη Λαδάκη για την πολύτιμη βοήθειά τους και τις χρήσιμες συμβουλές τους κατά τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας και της συγγραφής της παρούσας μελέτης. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Επίκουρο Καθηγητή Δρ. Απόστολο Κουτίνα και τον Καθηγητή Δρ. Νικόλαο Στοφόρο για την πρόθυμη βοήθειά τους και τη συμμετοχή τους στην τριμελή εξεταστική επιτροπή. Τέλος, ευχαριστώ την οικογένεια μου και τους ανθρώπους μου που με στήριξαν καθ' όλη τη διάρκεια της διεξαγωγής της μεταπτυχιακής αυτής μελέτης

## Περίληψη

Η αραβιτόλη, επίσης γνωστή ως αραβινιτόλη ή λυξιτόλη, ανήκει στην οικογένεια της πεντιτόλης και χρησιμοποιείται στη βιομηχανία τροφίμων και στην βιομηχανία παραγωγής θεραπευτικών προϊόντων. Η συγκεκριμένη πολυόλη, μπορεί να παραχθεί από ζύμες σε διαδικασίες βιομετατροπής των αποβλήτων από τη γεωργία και τη βιομηχανία βιοντίζελ.

Η παρούσα έρευνα ασχολείται με την ικανότητα της ζύμης *Debaryomyces hansenii* Y-41 να παράγει αποτελεσματικά την D-αραβιτόλη από διαφορετικά υποστρώματα και την βελτιστοποίηση των συνθηκών ανάπτυξης για μέγιστη παραγωγή αυτής.

Η ζύμη που μελετήθηκε, παρήγαγε αραβιτόλη ως τη μόνη ανιχνεύσιμη πολυόλη με χρήση υποστρώματος φρουκτόζης, γλυκόζης και γλυκερόλης. Στη συγκεκριμένη μελέτη, αξιολογήθηκε η επίδραση του pH, της θερμοκρασίας και του λόγου άνθρακα προς άζωτο (C/N) για τις επιδράσεις στην παραγωγικότητα της αραβιτόλης και στη μέγιστη συγκέντρωση αραβιτόλης και βιομάζας. Μεταξύ αυτών που αξιολογήθηκαν, με τη γλυκόζη ως υπόστρωμα σε ζύμωση ημισυνεχούς λειτουργίας σε βιοαντιδραστήρα, το μέσο με pH = 6,5, C/N = 120 mol mol<sup>-1</sup> και θερμοκρασία 30 °C απέδωσε την υψηλότερη παραγωγή αραβιτόλης. Υπό αυτές τις βέλτιστες συνθήκες, η παραγωγή αραβιτόλης 75,10 g L<sup>-1</sup> και παραγωγή βιομάζας 16,78 g L<sup>-1</sup> επιτεύχθηκε σε 349 ώρες. Η υψηλότερη απόδοση 0,54 g g<sup>-1</sup> επιτεύχθηκε σε 274 ώρες ζύμωσης, ενώ την ίδια χρονική στιγμή η συγκέντρωση αραβιτόλης ήταν 61,69 g L<sup>-1</sup>. Όσον αφορά την ζύμωση διαλείποντος έργου με φρουκτόζη ως υπόστρωμα, η μέγιστη παραγωγή αραβιτόλης παρουσιάστηκε όταν το μέσο είχε pH = 5,5, λόγο C/N 60 mol mol<sup>-1</sup> και 30 °C. Κάτω από αυτές τις βέλτιστες συνθήκες, η παραγωγή αραβιτόλης 54,81 g L<sup>-1</sup> και παραγωγή βιομάζας 18,27 g L<sup>-1</sup> επιτεύχθηκε σε 312 ώρες με την απόδοση της αραβιτόλης στο 52 g g<sup>-1</sup>.

Τα αποτελέσματα αυτής της έρευνας δείχνουν ότι η αραβιτόλη είναι ένα πολλά υποσχόμενο προϊόν προστιθέμενης αξίας το οποίο μπορεί να παραχθεί από γλυκόζη και φρουκτόζη χρησιμοποιώντας τη για την παραγωγή της τη ζύμη *D. hansenii* Y-41.

Λέξεις κλειδιά: *Debaryomyces hansenii* Y-41, αραβιτόλη, πολυόλη, γλυκόζη, φρουκτόζη, δομικά χημικά υλικά, βιοτεχνολογία.

## ***Abstract***

Arabitol also known as arabinitol or lyxitol belongs to the pentitol family and has found various applications in the food industry and the production of therapeutics for human usage. This polyol could be efficiently produced by yeasts via the bioconversion or biotransformation of waste streams deriving from agriculture and biodiesel industry.

The present study focuses on the ability of the yeast *Debaryomyces hansenii* Y-41 to efficiently produce D-arabitol from various substrates and the optimization of the fermentation conditions in order to achieve maximum arabitol titers, yield and productivity.

The yeast strain that was used in this work, produced arabitol as the only detectable polyol utilizing commercial glucose, fructose and glycerol. Arabitol production was optimized evaluating factors namely pH, temperature and carbon-to-nitrogen (C/N) ratio. The highest arabitol concentration was achieved during fed batch bioreactor experiment of *Debaryomyces hansenii* with glucose as a fermentation substrate, pH equal to 6.5, C/N ratio of 120 mol mol<sup>-1</sup> and temperature of 30 °C. Under these optimal conditions, arabitol production reached the value of 75.10 g L<sup>-1</sup> with a respective yeast biomass of 16.78 g L<sup>-1</sup> after 349 h of fermentation. The highest yield of 0.54 g g<sup>-1</sup> was achieved after 274 h of fermentation while in the same time arabitol concentration was 61.69 g L<sup>-1</sup>. Regarding the batch cultures with fructose as medium, the maximum production of arabitol was achieved when the pH of the medium was set to 5.5, C/N ratio was 60 mol mol<sup>-1</sup> and temperature was 30 °C. The respective concentrations of arabitol and biomass achieved, were 54.81 g L<sup>-1</sup> and 18.27 g L<sup>-1</sup> after 312 h with a yield of 0.52 g g<sup>-1</sup>.

This work demonstrated that *D. hansenii* Y-41 could produce arabitol in high concentrations utilizing glucose and fructose as carbon sources.

Keywords: *Debaryomyces hansenii* Y-41, arabitol, polyol, glucose, fructose, building block chemicals, biotechnology

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ</b> .....	<b>4</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>5</b>
<b>1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b> .....	<b>13</b>
<b>1.1 Βιομηχανικά παραπροϊόντα και απόβλητα και χρήση αυτών στα βιοδυλιστήρια</b> .....	<b>13</b>
<b>1.2 Βιοτεχνολογικό ενδιαφέρον για την αραβιτόλη</b> .....	<b>17</b>
1.2.1 Τα 12 κύρια δομικά στοιχεία .....	17
1.2.2 Βιοτεχνολογικό ενδιαφέρον πολυολών .....	19
<b>1.3 Ανανεώσιμες πρώτες ύλες ως θρεπτικά υποστρώματα για την παραγωγή αραβιτόλης</b> .....	<b>20</b>
<b>1.4 Μικροοργανισμοί που παράγουν αραβιτόλη</b> .....	<b>21</b>
<b>1.5 Βιοχημεία σύνθεσης της D-αραβιτόλης</b> .....	<b>23</b>
1.5.1 Βιοχημικό μονοπάτι παραγωγής αραβιτόλης .....	23
1.5.2 Παράγοντες που επηρεάζουν την παραγωγή αραβιτόλης .....	24
<b>1.6 Ιδιότητες και εφαρμογές αραβιτόλης</b> .....	<b>25</b>
1.6.1 Σύγκριση αραβιτόλης με ξυλιτόλη και άλλες πολυόλες .....	27
<b>1.7 Μέθοδοι ανάκτησης - Παρούσα κατάσταση στην αγορά</b> .....	<b>28</b>
1.7.1 Μέθοδοι ανάκτησης .....	28
1.7.2 Παρούσα κατάσταση σχετικά με την παραγωγή αραβιτόλης .....	30
<b>1.8 Ενδοπολυσακχαρίτες (Intracellular Polysaccharides, IPs)</b> .....	<b>31</b>
<b>1.9 Σκοπός και αντικείμενο μελέτης</b> .....	<b>32</b>
<b>2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ</b> .....	<b>33</b>
<b>2.1 Βιολογικό υλικό</b> .....	<b>33</b>
<b>2.2 Παρασκευή Υγρού Εμβολίου</b> .....	<b>33</b>
<b>2.3 Θρεπτικό μέσο καλλιέργειας</b> .....	<b>34</b>
<b>ΠΙΝΑΚΑΣ 2.4 ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΙΣ ΟΡΓΑΝΙΚΩΝ ΠΗΓΩΝ ΑΖΩΤΟΥ</b> .....	<b>35</b>
<b>2.4 Συνθήκες ανάπτυξης</b> .....	<b>35</b>
2.4.1 Ασυνεχείς υγρές ζυμώσεις διαλείποντος έργου .....	35
2.4.2 Ημισυνεχείς υγρές ζυμώσεις σε βιοαντιδραστήρα .....	36
<b>2.5 Μέθοδοι Ανάλυσης</b> .....	<b>37</b>
2.5.1 Προσδιορισμός pH .....	37
2.5.2 Προσδιορισμός ξηρής μάζας .....	37

2.5.3 Προσδιορισμός σακχάρων .....	38
2.5.4 Προσδιορισμός ενδοπολυσακχαριτών.....	38
2.5.5 Προσδιορισμός Αζώτου των Ελεύθερων Αμινομάδων (FAN analysis).....	41
2.5.6 Ποσοτικός προσδιορισμός ενδοκυτταρικού λίπους .....	42
<b>3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....</b>	<b>44</b>
<b>3.1 Γενική Παρουσίαση.....</b>	<b>44</b>
3.1.1 Μελέτη των πηγών άνθρακα ως προς την παραγωγή αραβιτόλης .....	44
3.1.2 Μελέτη της επίδρασης των θερμοκρασιών ως προς την παραγωγή αραβιτόλης.....	48
3.1.3 Μελέτη της επίδρασης διαφορετικών τιμών pH ως προς τη παραγωγή αραβιτόλης.....	51
3.1.4 Μελέτη της επίδρασης των λόγων άνθρακα προς άζωτο ως προς την παραγωγή αραβιτόλης .....	56
3.1.5 Παραγωγή ενδοπολυσακχαριτών .....	62
3.1.6 Παραγωγή αραβιτόλης σε ημισυνεχής ζυμώση σε βιοαντιδραστήρα με υπόστρωμα γλυκόζης .....	65
<b>4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ .....</b>	<b>69</b>
<b>5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....</b>	<b>75</b>
<b>6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....</b>	<b>76</b>



## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ

**Διάγραμμα 2.1** Πρότυπη καμπύλη γλυκόζης με τη μέθοδο DNS 40

**Διάγραμμα 2.2** Καμπύλη αναφοράς της γλυκίνης με τη μέθοδο FAN 42

**Διάγραμμα 3.1** Παραγωγή αραβιτόλης (◆) και βιομάζας (▲) και κατανάλωση γλυκόζης (○) και FAN (□) κατά την καλλιέργεια του στελέχους *Debaryomyces hansenii* Y-41 σε υπόστρωμα συνθετικής γλυκόζης στους 30 °C, pH 5,5±0,3 και με λόγο C/N 120 mol mol<sup>-1</sup>. 45

**Διάγραμμα 3.2** Παραγωγή αραβιτόλης (◆) και βιομάζας (▲) και κατανάλωση φρουκτόζης (○) και FAN (□) κατά την καλλιέργεια του στελέχους *Debaryomyces hansenii* Y-41 σε υπόστρωμα συνθετικής φρουκτόζης στους 30 °C, pH 5,5±0,3 και με λόγο C/N 120 mol mol<sup>-1</sup>. 46

**Διάγραμμα 3.3** Παραγωγή αραβιτόλης (◆) και βιομάζας (▲) και κατανάλωση γλυκερόλης (○) και FAN (□) κατά την καλλιέργεια του στελέχους *Debaryomyces hansenii* Y-41 σε υπόστρωμα βιομηχανικής γλυκερόλης στους 30 °C, pH 5,5±0,3 και με λόγο C/N 120 mol mol<sup>-1</sup>. 47

**Διάγραμμα 3.4** Παραγωγή αραβιτόλης (◆) και βιομάζας (▲) και κατανάλωση γλυκόζης (○) και FAN (□) κατά την καλλιέργεια του στελέχους *Debaryomyces hansenii* Y-41 σε υπόστρωμα συνθετικής γλυκόζης στους 25 °C, pH 5,5±0,3 και με λόγο C/N 120 mol mol<sup>-1</sup>. 49

**Διάγραμμα 3.5** Παραγωγή αραβιτόλης (◆) και βιομάζας (▲) και κατανάλωση γλυκόζης (○) και FAN (□) κατά την καλλιέργεια του στελέχους *Debaryomyces hansenii* Y-41 σε υπόστρωμα συνθετικής γλυκόζης στους 32 °C, pH 5,5±0,3 και με λόγο C/N 120 mol mol<sup>-1</sup>. 50

**Διάγραμμα 3.6** Παραγωγή αραβιτόλης (◆) και βιομάζας (▲) και κατανάλωση γλυκόζης (○) και FAN (□) κατά την καλλιέργεια του στελέχους *Debaryomyces hansenii* Y-41 σε υπόστρωμα συνθετικής γλυκόζης στους 30 °C, pH 3,5±0,3 και με λόγο C/N 120 mol mol<sup>-1</sup>. 52

**Διάγραμμα 3.7** Παραγωγή αραβιτόλης (◆) και βιομάζας (▲) και κατανάλωση γλυκόζης (○) και FAN (□) κατά την καλλιέργεια του στελέχους *Debaryomyces hansenii* Y-41 σε υπόστρωμα συνθετικής γλυκόζης στους 30 °C, pH 6,5±0,3 και με λόγο C/N 120 mol mol<sup>-1</sup>. 53

**Διάγραμμα 3.8** Παραγωγή αραβιτόλης (◆) και βιομάζας (▲) και κατανάλωση φρουκτόζης (○) και FAN (□) κατά την καλλιέργεια του στελέχους *Debaryomyces*

*hansenii* Y-41 σε υπόστρωμα συνθετικής φρουκτόζης στους 30 °C, pH 3,5±0,3 και με λόγο C/N 120 mol mol<sup>-1</sup>. 54

**Διάγραμμα 3.9** Παραγωγή αραβιτόλης (♦) και βιομάζας (▲) και κατανάλωση φρουκτόζης (○) και FAN (□) κατά την καλλιέργεια του στελέχους *Debaryomyces hansenii* Y-41 σε υπόστρωμα συνθετικής φρουκτόζης στους 30 °C, pH 6,5±0,3 και με λόγο C/N 120 mol mol<sup>-1</sup>. 55

**Διάγραμμα 3.10** Παραγωγή αραβιτόλης (♦) και βιομάζας (▲) και κατανάλωση γλυκόζης (○) και FAN (□) κατά την καλλιέργεια του στελέχους *Debaryomyces hansenii* Y-41 σε υπόστρωμα συνθετικής γλυκόζης στους 30 °C, pH 6,5±0,3 και με λόγο C/N 60 mol mol<sup>-1</sup>. 57

**Διάγραμμα 3.11** Παραγωγή αραβιτόλης (♦) και βιομάζας (▲) και κατανάλωση γλυκόζης (○) και FAN (□) κατά την καλλιέργεια του στελέχους *Debaryomyces hansenii* Y-41 σε υπόστρωμα συνθετικής γλυκόζης στους 30 °C, pH 6,5±0,3 και με λόγο C/N 180 mol mol<sup>-1</sup>. 58

**Διάγραμμα 3.12** Παραγωγή αραβιτόλης (♦) και βιομάζας (▲) και κατανάλωση γλυκόζης (○) και FAN (□) κατά την καλλιέργεια του στελέχους *Debaryomyces hansenii* Y-41 σε υπόστρωμα συνθετικής γλυκόζης στους 30 °C, pH 5,5±0,3 και με λόγο C/N 60 mol mol<sup>-1</sup>. 59

**Διάγραμμα 3.13** Παραγωγή αραβιτόλης (♦) και βιομάζας (▲) και κατανάλωση γλυκόζης (○) και FAN (□) κατά την καλλιέργεια του στελέχους *Debaryomyces hansenii* Y-41 σε υπόστρωμα συνθετικής γλυκόζης στους 30 °C, pH 5,5±0,3 και με λόγο C/N 180 mol mol<sup>-1</sup>. 60

**Διάγραμμα 3.14** Παραγωγή αραβιτόλης (♦) και βιομάζας (▲) και κατανάλωση φρουκτόζης (○) και FAN (□) κατά την καλλιέργεια του στελέχους *Debaryomyces hansenii* Y-41 σε υπόστρωμα συνθετικής φρουκτόζης στους 30 °C, pH 5,5±0,3 και με λόγο C/N 60 mol mol<sup>-1</sup>. 61

**Διάγραμμα 3.15** Παραγωγή αραβιτόλης (♦) και βιομάζας (▲) και κατανάλωση φρουκτόζης (○) και FAN (□) κατά την καλλιέργεια του στελέχους *Debaryomyces hansenii* Y-41 σε υπόστρωμα συνθετικής φρουκτόζης στους 30 °C, pH 5,5±0,3 και με λόγο C/N 180 mol mol<sup>-1</sup>. 62

**Διάγραμμα 3.16** Συγκέντρωση των ενδοπολυσακχαριτών (IPs g L<sup>-1</sup>) εκφρασμένη % ως προς τη βιομάζα (g L<sup>-1</sup>) σε συνάρτηση με το χρόνο με χρήση των υποστρωμάτων (○) Γλυκόζη (g L<sup>-1</sup>), (♦) Φρουκτόζη (g L<sup>-1</sup>), και (▲) Γλυκερόλη (g

L<sup>-1</sup>) και με συνθήκες 30 °C, pH 5,5±0,3 και λόγο άνθρακα προς άζωτο 120 mol mol<sup>-1</sup>.

63

**Διάγραμμα 3.17** Συγκέντρωση των ενδοπολυσακχαριτών (IPs g L<sup>-1</sup>) εκφρασμένη % ως προς τη βιομάζα (g L<sup>-1</sup>) σε συνάρτηση με το χρόνο με χρήση υποστρώματος γλυκόζης και σε θερμοκρασίες (○) 30 °C, (◆) 32 °C, και (▲) 25 °C.

63

**Διάγραμμα 3.18** Συγκέντρωση των ενδοπολυσακχαριτών (IPs g L<sup>-1</sup>) εκφρασμένη % ως προς τη βιομάζα (g L<sup>-1</sup>) σε συνάρτηση με το χρόνο με χρήση υποστρώματος γλυκόζης σε θερμοκρασία 30 °C και σε συνθήκες pH (○) 5.5 ± 0.3, (◆) 3.5 ± 0.3 και (▲) 6.5 ± 0.3. 64

**Διάγραμμα 3.19** Συγκέντρωση των ενδοπολυσακχαριτών (IPs g L<sup>-1</sup>) εκφρασμένη % ως προς τη βιομάζα (g L<sup>-1</sup>) σε συνάρτηση με το χρόνο με χρήση υποστρώματος γλυκόζης σε θερμοκρασία 30 °C και σε συνθήκες (○) pH 6.5 ± 0.3 και C/N 60, (◆) pH 5.5 ± 0.3 και C/N 180, (▲) pH 6.5 ± 0.3 και C/N 180 και (□) pH 5.5 ± 0.3 και C/N 60. 64

**Διάγραμμα 3.20** Συγκέντρωση των ενδοπολυσακχαριτών (IPs g L<sup>-1</sup>) εκφρασμένη % ως προς τη βιομάζα (g L<sup>-1</sup>) σε συνάρτηση με το χρόνο με χρήση υποστρώματος φρουκτόζης σε θερμοκρασία 30 °C και σε συνθήκες pH (○) 3.5 ± 0.3, (◆) 6.5 ± 0.3 και (▲) 5.5 ± 0.3. 65

**Διάγραμμα 3.21** Παραγωγή αραβιτόλης (◆) και βιομάζας (▲) και κατανάλωση γλυκόζης (○) και FAN (□) κατά την καλλιέργεια του στελέχους *Debaryomyces hansenii* Y-41 σε σύστημα ημισυνεχούς λειτουργίας σε βιοαντιδραστήρα, σε υπόστρωμα συνθετικής γλυκόζης σε θερμοκρασίας 30 °C, pH 6,5±0,3 και με λόγο C/N 120 mol mol<sup>-1</sup>. 66

**Διάγραμμα 3.22** Παραγωγή αραβιτόλης (◆) σε συνάρτηση με την κατανάλωση της γλυκόζης κατά την καλλιέργεια του στελέχους *Debaryomyces hansenii* Y-41 σε σύστημα ημισυνεχούς λειτουργίας σε βιοαντιδραστήρα, σε υπόστρωμα συνθετικής γλυκόζης σε θερμοκρασίας 30 °C, pH 6,5±0,3 και με λόγο C/N 120 mol mol<sup>-1</sup>. 67

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

<b>Εικόνα 1.1</b> Επισκόπηση των υποστρωμάτων χαμηλού κόστους (Qin et al., 2017).....	14
<b>Εικόνα 1.2</b> Σχηματισθέντες κρύσταλλοι λευκής αραβιτόλης (Loman et al., 2014).....	30
<b>Εικόνα 2.1</b> Ανακινούμενος θάλαμος επώασης που χρησιμοποιήθηκε για τις ζυμώσεις διαλείποντος έργου (Zhicheng rocking Incubator, ZHWY-211B).....	36
<b>Εικόνα 2.2</b> Ζύμωση πραγματοποιούμενη σε βιοαντιδραστήρα ημισυνεχούς λειτουργίας κατά τη μελέτη παραγωγής αραβιτόλης με χρήση της ζύμης <i>Debaryomyces hansenii</i> και υπόστρωμα συνθετική γλυκόζη.....	37
<b>Εικόνα 2.3</b> Η αντίδραση που πραγματοποιείται κατά τη μέθοδο προσδιορισμού των αναγωγικών σακχάρων.....	39
<b>Εικόνα 2.4</b> Διαλύματα που προέκυψαν κατά την εφαρμογή της μεθόδου DNS για το σχηματισμό πρότυπης καμπύλης αναφοράς.....	40
<b>Εικόνα 2.5</b> Η αντίδραση που πραγματοποιείται κατά τη μέθοδο προσδιορισμού FAN.....	41
<b>Εικόνα 2.6</b> <i>Debaryomyces Hansenii</i> EMBT Y-41.....	43

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

<b>Σχήμα 1.1</b> Βιολογικά και χημικά μονοπάτια για την παραγωγή των 12 κορυφαίων χημικών ουσιών σύμφωνα με το DOE's 2004 καθώς και των αναθεωρημένων 10 χημικών ουσιών προερχόμενα από βιομάζα για το 2010 (Choi et al, 2015). .....	19
<b>Σχήμα 1.2</b> Μεταβολικό μονοπάτι παραγωγής D-αραβιτόλης από γλυκόζη, φρουκτόζη, γλυκερόλη, ξυλόζη και αραβινόζη ως θρεπτικά υποστρώματα. (Koganti et al., 2011, Kumdam et al., 2014, Kordowska and Wiater, 2015 ).....	24

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

<b>Πίνακας 1.1</b> Ποσοστά των υποπροϊόντων που προκύπτουν από τη βιομηχανία μεταποίησης φρούτων και λαχανικών (Goni and Hervert-Hernandez, 2011).....	15
<b>Πίνακας 1.2</b> Δώδεκα δομικά στοιχεία με βάση τη ζάχαρη που πρότειναν οι Werpy και Petersen (2004). .....	18
<b>Πίνακας 1.3</b> Φυσικοχημικές ιδιότητες και δομή αραβιτόλης.....	26

<b>Πίνακας 1.4</b> Θερμιδική αξία της σακχαρόζης και ορισμένων πολυολών (Food and Drug Administration, FDA) .....	28
<b>Πίνακας 2.1</b> Χαρακτηριστικά ζύμης <i>Debaryomyces hansenii</i> .....	33
<b>Πίνακας 2.2</b> Συγκεντρώσεις σακχάρων στο θρεπτικό μέσο της καλλιέργειας μετρούμενες με την μέθοδο της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC) καθώς και η προέλευση αυτών. ....	34
<b>Πίνακας 2.3</b> Συγκεντρώσεις αλάτων στο θρεπτικό μέσο (Papanikolaou et al., 2001) και η προέλευση αυτών .....	35
<b>Πίνακας 2.4</b> Συγκεντρώσεις οργανικών πηγών αζώτου. ....	35
<b>Πίνακας 2.5</b> Σύσταση αντιδραστηρίων για την μέτρηση FAN .....	42
<b>Πίνακας 3.1</b> Παραγωγή λιπιδίων των μικροβιακών ζυμώσεων με υπόστρωμα γλυκόζη φρουκτόζη και γλυκερόλη από τον μικροοργανισμό <i>Debaryomyces hansenii</i> . ....	48
<b>Πίνακας 3.2</b> Συγκεντρωτικός πίνακας παρουσίασης των μέγιστων τιμών της συγκέντρωσης της βιομάζας (DW), της αραβιτόλης (Ara) και των ενδοπολυσακχαριτών (IPs) για όλες τις ζυμώσεις που διενεργήθηκαν. ....	67
<b>Πίνακας 4.1</b> Ερευνητικά αποτελέσματα διαφόρων ζυμών ικανών να μεταβολίσουν υποστρώματα προς παραγωγή αραβιτόλης και συνθήκες ανάπτυξης αυτών. ....	71

## 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

### 1.1 Βιομηχανικά παραπροϊόντα και απόβλητα και χρήση αυτών στα βιοδιυλιστήρια

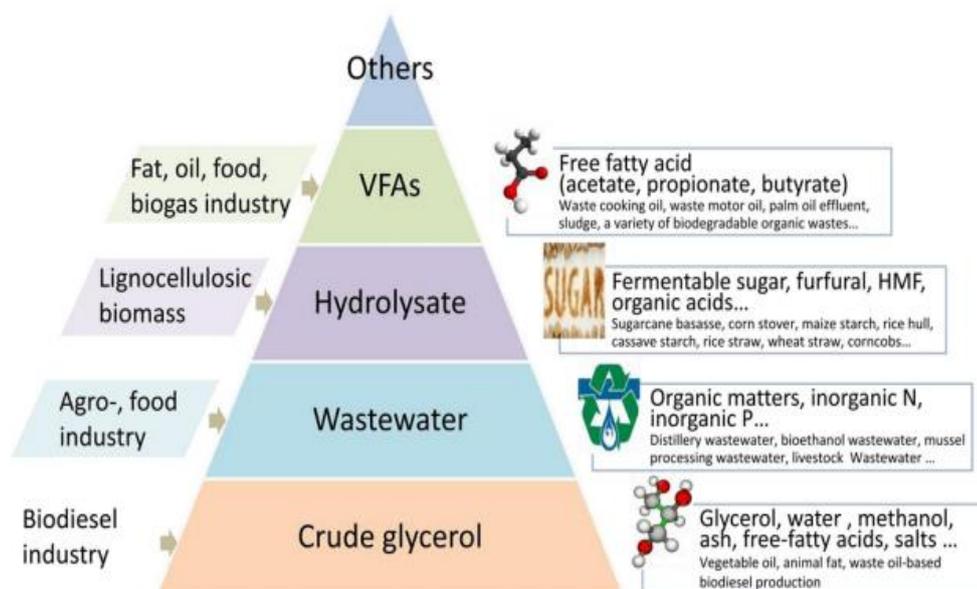
Η βιώσιμη οικονομική ανάπτυξη απαιτεί επαρκείς πόρους πρώτων υλών για την επίτευξη παραγωγής προϊόντων βιομηχανικής κλίμακας. Η αξιοποίηση του πετρελαίου ως πρώτη ύλη, δεν είναι βιώσιμη λόγω της περιορισμένης και μη φιλικής φύσης του προς το περιβάλλον. Τις τελευταίες δεκαετίες, το αυξανόμενο κόστος των ορυκτών πόρων και των πετροχημικών σε συνδυασμό με την ανάγκη να μειωθούν οι περιβαλλοντικές επιπτώσεις των χημικών προϊόντων και διεργασιών, επιταχύνουν την προσπάθεια για περιβαλλοντικά συμβατή και βιώσιμη ενέργεια, που προκύπτει από την μετατροπή ευρέως διαθέσιμης ανανεώσιμης πρώτης ύλης.

Η παρούσα κατάσταση επιτάσσει την εισαγωγή του βιοδιυλιστηρίου προς εύρεση ανανεώσιμων πηγών άνθρακα για την επίτευξη περιβαλλοντικών, κοινωνικών και οικονομικών στόχων που θα οδηγήσουν μακροπρόθεσμα σε βιώσιμη ανάπτυξη. Παράλληλα με τις ραγδαίες εξελίξεις της έρευνας και της ανάπτυξης στον τομέα των βιοδιυλιστηρίων στην Ευρώπη, σημαντικές βιομηχανικές εξελίξεις παρουσιάζονται στις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής όπου αναμένεται ότι έως το 2020 τουλάχιστον το 25 % των χημικών βιομηχανικών πρώτων υλών με βάση τον οργανικό άνθρακα όπως και το 10 % των υγρών καυσίμων θα προέρχονται από τη βιομηχανία βιοαποικοδομήσιμων προϊόντων (Kamm et al., 2016).

Ο τομέας των γεωργικών προϊόντων δημιουργεί υψηλό φορτίο υποπροϊόντων και αποβλήτων, ως αποτέλεσμα των διεργασιών επεξεργασίας και μεταποίησης προς παραλαβή του τελικού προϊόντος. Αυτά τα απόβλητα αποτελούνται κυρίως από απορριφθέντες ιστούς φυτών, συμπεριλαμβανομένων των φλοιών, των σπόρων, του πολτού κλπ., ενώ μπορεί να προκαλέσουν σοβαρά περιβαλλοντικά προβλήματα, εάν δεν αντιμετωπιστούν σωστά. Οι όλο και πιο αυστηροί κανονισμοί σχετικά με τη διαχείριση των οργανικών αποβλήτων, καθώς και η ζήτηση για βιώσιμες διαδικασίες επεξεργασίας τροφίμων, έχουν μετατοπίσει τη βιομηχανία γεωργικών ειδών διατροφής σε φιλικές προς το περιβάλλον στρατηγικές για τη βελτίωση της σχέσης κόστους-αποτελεσματικότητας (Philippi et al., 2016).

Τα τελευταία πέντε χρόνια, οι έρευνες έχουν επικεντρωθεί σε υποστρώματα χαμηλού κόστους κυρίως σε υδρόφιλα υλικά όπως είναι η ακατέργαστη γλυκερόλη,

τα λύματα και μερικά υδρόφοβα υποστρώματα που περιλαμβάνουν πηγές πτητικών λιπαρών οξέων προερχόμενα από υποπροϊόντα ή απόβλητα της αγροτικής βιομηχανίας (Εικόνα 1.1) . Πολλά στελέχη ζυμών έχουν διερευνηθεί για να αξιολογηθεί το δυναμικό της βιώσιμης παραγωγής βιοκαυσίμων και της προσφοράς θρεπτικών ουσιών από υποστρώματα χαμηλού κόστους (Qin et al., 2017).



**Εικόνα 1.1** Επισκόπηση των υποστρωμάτων χαμηλού κόστους (Qin et al., 2017)

Όπως μπορεί να γίνει αντιληπτό, τα στερεά απόβλητα δημιουργούν σημαντικές περιβαλλοντικές ανησυχίες κατά τη διάρκεια της παραγωγικής διαδικασίας σε συνδυασμό με τη χρήση υπερβολικών ποσοτήτων νερού και ενέργειας. Συνεπώς, για να ξεπεραστούν τα προβλήματα που προκύπτουν, απαιτούνται αποδοτικά αειφόρα συστήματα επίλυσης για τη διαχείριση αυτών των ροών, με εστίαση στις ολοκληρωμένες έννοιες βιοτεχνολογίας για ενσωμάτωση σε υφιστάμενες μονάδες παραγωγής (Tsouko et al., 2017). Οι συμβατικές χρήσεις των στερεών υποπροϊόντων μέχρι στιγμής περιλαμβάνουν την αποτέφρωση, τη διάθεση σε χερσαία μέρη και σε μικρότερο βαθμό την παραγωγή ατμού και ηλεκτρισμού (Prasertsan et al., 1996), εφαρμογές ως ζωοτροφές ή εφαρμογές ως υποστρώματα καλλιέργειας μυκήτων (Tsouko et al., 2017).

Τα υπολείμματα φρούτων και λαχανικών που προέρχονται από κουζίνες νοικοκυριών, ξενοδοχείων και κάδους απορριμμάτων εστιατορίων δυσχεραίνουν την κατάσταση που δημιουργείται λόγω της αδυναμίας της σωστής εναπόθεσης των αστικών στερεών αποβλήτων. Η διάθεση των υπολειμμάτων σε ανοιχτούς χώρους

οδηγεί σε προβλήματα ρύπανσης του περιβάλλοντος (Babbar et al., 2015). Η αξιοποίηση των αποβλήτων αυτών προς παραγωγή προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας όπως πρόσθετα τροφίμων, διατροφικά συμπληρώματα, καλλυντικά και φαρμακευτικά προϊόντα, έχει κερδίσει μεγάλη προσοχή τα τελευταία χρόνια ως πιθανή εναλλακτική λύση έναντι της διάθεσης των υπολειμμάτων στους χώρους υγειονομικής ταφής. Η αξιοποίηση των καταλοίπων επεξεργασίας τροφίμων αποτελεί μια ενδιαφέρουσα ιδέα, που βασίζεται στην αναγνώριση ότι αυτή η βιομάζα είναι στην πραγματικότητα μια φθηνή και άφθονη πηγή πλούσια, σε βιοενεργές φυτοχημικές ουσίες, σάκχαρα και πρωτεΐνες (Galanakis, 2012).

**Πίνακας 1.1** Ποσοστά των υποπροϊόντων που προκύπτουν από τη βιομηχανία μεταποίησης φρούτων και λαχανικών (Goni and Hervert-Hernandez, 2011).

	<b>Byproducts</b>	<b>Edible part</b>	<b>Reference</b>
<b>Ανανάς</b>	Πυρήνας, φλοιός και πούλπα	48 %	Ayala – Zavala et al., 2010
<b>Γκουάβα</b>	Φλοιός και σπόροι	85 – 90 %	Schieber et al., 2001
<b>Καρότο</b>	Πυρήνας	60 – 70 %	Schieber et al., 2001
<b>Μάνγκο</b>	Σπόροι, φλοιός, μη χρησιμοποιούμενη πούλπα	58 %	Ayala – Zavala et al., 2010
<b>Μανταρίνι</b>	Φλοιός	84 %	Ayala – Zavala et al., 2010
<b>Μήλο</b>	Πούλπα και σπόρος	89 %	Ayala – Zavala et al., 2010
<b>Μπανάνα</b>	Φλοιός	70 %	Schieber et al., 2001
<b>Πατάτα</b>	Φλοιός	60 – 85 %	Schieber et al., 2001
<b>Παπάγια</b>	Σπόροι, φλοιός, μη χρησιμοποιούμενη πούλπα	53 %	Ayala – Zavala et al., 2010
<b>Πορτοκάλι</b>	Φλοιός	44 %	Li et al., 2006
<b>Σπαράγγια</b>	Μίσχος	50 – 60 %	Rodriquez et al., 2006
<b>Τομάτα</b>	Φλοιός και σπόροι	93 – 97 %	Schieber et al., 2001
<b>Φρούτα του πάθους</b>	Φλοιός και σπόροι	25 %	Schieber et al., 2001

Τα στερεά απόβλητα δύναται να είναι απόβλητα τύπου «ληγμένων» εδώδιμων προϊόντων που είναι πλούσια σε περιεκτικότητα σακχάρων όπως τα προερχόμενα από



ληγμένα προϊόντα (παιδικές τροφές, απορριφθέντα προϊόντα κατά την παραγωγική διαδικασία, απόβλητα ζάχαρης κ.α.). Για τον συγκεκριμένο τύπο αποβλήτων, η βιομηχανία πληρώνει από 0,1-0,5 ευρώ ανά κιλό αποβλήτου για να τη μεταφορά αυτών σε άλλον φορέα, όπου συνήθως σε επόμενο στάδιο υφίστανται διεργασία κομποστοποίησης (Papanikolaou & Aggelis, 2010).

Όσον αφορά την Ευρωπαϊκή Ένωση, περίπου 88 εκατομμύρια τόνοι τροφίμων χάνονται κάθε χρόνο με το σχετικό κόστος να υπολογίζεται στα 143 δις ευρώ (Fusions, 2016). Από την άλλη για τα στερεά (ή ημιστερεά) οργανικά αγροτοβιομηχανικά υποπροϊόντα του Ελλαδικού χώρου, σημαντικό ενδιαφέρον -από πλευράς ποσοτήτων- παρουσιάζουν τα κατάλοιπα επεξεργασίας δημητριακών, αραβόσιτου και βάμβακος, τα υποπροϊόντα ελαιουργείων (κατσίγαρος, ελαιοκλαδέματα, πυρήνες κλπ) τα υπολείμματα βιομηχανιών παραγωγής χυμών (κυρίως εσπεριδοειδών) και τα υποπροϊόντα οινοποιίας (στέμφυλα, γίγαρτα, βόστρυχοι κλπ) (Apostolou, 2011).

Τα απόβλητα των τροφίμων, αποτελούν ένα σημαντικό ζήτημα για την παγκόσμια ασφάλεια των τροφίμων και την καλή περιβαλλοντική διακυβέρνηση, που συνδέονται άμεσα με τις περιβαλλοντικές (π.χ. ενέργεια, κλιματικές αλλαγές, διαθεσιμότητα των πόρων), τις οικονομικές (π.χ. αποδοτικότητα των πόρων, αστάθεια των τιμών, αύξηση του κόστους κατανάλωσης, διαχείριση των αποβλήτων, αγορές βασικών προϊόντων) και τις κοινωνικές (π.χ. υγεία, ισότητα) επιπτώσεις. Διάφορες μελέτες έχουν δείξει ότι μεταξύ του 1/3 και του 1/2 της παγκόσμιας παραγωγής τροφίμων δεν καταναλώνεται (Gustavsson et al., 2011; Bio Intelligence Service, 2010).

Συνοψίζοντας επομένως όλα τα παραπάνω, τα βιομηχανικά απόβλητα και παραπροϊόντα θα πρέπει να θεωρούνται περισσότερο υπολείμματα στα οποία αν εφαρμοστεί περαιτέρω διεργασία μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως πηγές άνθρακα με αρκετές βιοτεχνολογικές και χημικές εφαρμογές. Το κέρδος για τη βιομηχανία, με την επίτευξη αυτού του στόχου, θα είναι τεράστιο ενώ θα συμβάλει στην διατήρηση της ασφάλειας του περιβάλλοντος.

## 1.2 Βιοτεχνολογικό ενδιαφέρον για την αραβιδόλη

### 1.2.1 Τα 12 κύρια δομικά στοιχεία

Τα τελευταία 80-90 χρόνια το πετρέλαιο και το φυσικό αέριο χρησίμευσαν ως πρώτη ύλη για την πλειοψηφία των τελικών προϊόντων της καθημερινότητάς μας. Μετά τον Β' Παγκόσμιο Πόλεμο, αυτές οι πρώτες ύλες αντικατέστησαν αποφασιστικά τον άνθρακα και αποτέλεσαν το θεμέλιο μιας τεράστιας αύξησης του υλικού πλούτου και της ευημερίας σε ολόκληρο τον κόσμο.

Ωστόσο, στο μέλλον η χρήση του πετρελαίου και του φυσικού αερίου στη θέρμανση αλλά και στην παραγωγή ηλεκτρικής ενέργειας θα πρέπει να μειωθεί δραστικά. Ο τομέας των μεταφορών θα πρέπει να βρει λύσεις όπου η βενζίνη θα αντικαθίσταται. Αυτή είναι η πρόκληση για όλες τις σύγχρονες κοινωνίες και ταυτόχρονα είναι πιθανότατα η πιο λαμπρή ευκαιρία για την επιστήμη στον 21<sup>ο</sup> αιώνα.

Εντούτοις, στα μετέπειτα χρόνια, ένα ορισμένο κλάσμα των πρωτογενών προϊόντων από τη γεωργία, όπως η ζάχαρη από τεύτλα ή ζαχαροκάλαμο και το άμυλο από δημητριακά, πατάτες και άλλα φυτά, θα μεταποιηθούν σε χημικά προϊόντα και σε καύσιμα μεταφοράς - ένα εντυπωσιακό παράδειγμα αποτελεί η μετατροπή σχεδόν του 40% της τεράστιας παραγωγής ζάχαρης, από ζαχαροκάλαμο της Βραζιλίας, σε βιοαιθανόλη. Ως κύριος μοχλός αυτής της ανάπτυξης υπήρξε η προηγούμενη πλεονασματική παραγωγή πρωτογενών γεωργικών προϊόντων στην Αμερική και στην Ευρώπη. Όσο σε ορισμένες περιοχές του κόσμου η παραγωγική ικανότητα των πρωτογενών γεωργικών προϊόντων παραμένει πολύ μεγαλύτερη από ό, τι μπορεί να απορροφήσει η αγορά, η χρησιμοποίηση των τροφίμων, για βιοκαύσιμα, θα έχει σημαντικό και θετικό κοινωνικοοικονομικό όφελος. Ωστόσο, με τη χρήση της αρόσιμης γης για την παραγωγή καυσίμων, προκύπτει σαν αποτέλεσμα η αύξηση της τιμής των τροφίμων.

Το 2004, μια ομάδα ερευνητών στο Εθνικό Εργαστήριο Βορειοδυτικού Ειρηνικού (PNNL) και το Εθνικό Εργαστήριο Ανανεώσιμων Πηγών Ενέργειας (NREL) στις ΗΠΑ, πραγματοποίησαν λεπτομερή έλεγχο των σακχάρων ως πιθανών υποψηφίων για δομικά στοιχεία «Building Blocks», δευτερογενή χημικά προϊόντα και ενδιάμεσα προϊόντα για την παραγωγή τελικών καταναλωτικών αγαθών στους τομείς της βιομηχανίας που παραδοσιακά εξυπηρετούνται από τη βιομηχανία πετρελαίου (Nielsen, 2014).

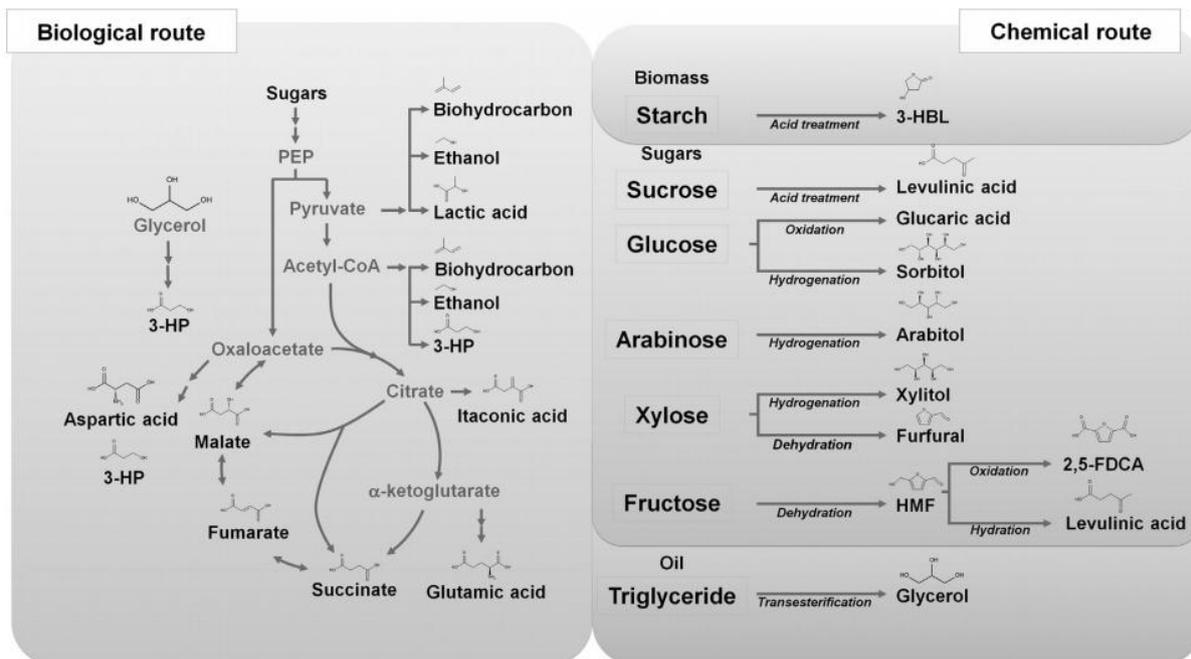
Αρχικά, ο κατάλογος με τα δομικά στοιχεία απαρτιζόταν από πάνω από 300 υποψήφια συστατικά. Ο μικρότερος κατάλογος των 30 υποψηφίων επιλέχθηκε μετά από επαναληπτική διαδικασία αναθεώρησης βασισμένη στο πετροχημικό μοντέλο, όσον αφορά τα δομικά και χημικά στοιχεία, τα δεδομένα της αγοράς, ιδιότητες και απόδοση των πιθανών υποψηφίων καθώς και με βάση την προηγούμενη εμπειρία της ομάδας PNNL και NREL. Αυτός ο κατάλογος των 30 μειώθηκε τελικά σε 12 εξετάζοντας τις πιθανές αγορές για τα δομικά στοιχεία και τα παράγωγά τους και την τεχνική πολυπλοκότητα των οδών σύνθεσης (μεταβολικά μονοπάτια). Μια δευτερεύουσα ομάδα δομικών στοιχείων αναγνωρίστηκε επίσης ως βιώσιμοι υποψήφιοι. Αυτά περιλαμβάνουν το γλυκονικό οξύ, το γαλακτικό οξύ, το μηλονικό οξύ, το προπιονικό οξύ, το κιτρικό και το ακονιτικό οξύ, το ξυλονικό οξύ, την ακετοΐνη, τη φουρφουράλη, τη λεβογλουκοζάνη, τη λυσίνη, τη σερίνη και τη θρεονίνη (Werpy and Peterson, 2004). Όπως υποστήριζαν οι Werpy και Petersen (2004), τα 12 δομικά στοιχεία έχουν μεγάλες δυνατότητες αντικατάστασης των δομικών στοιχείων που προέρχονται από το πετρέλαιο και το φυσικό αέριο.

**Πίνακας 1.2** Δώδεκα δομικά στοιχεία με βάση τη ζάχαρη που πρότειναν οι Werpy και Petersen (2004).

---

❖ Γλουκαρικό οξύ
❖ 2,5 Φούρανο-Δικαρβοξυλικό οξύ
❖ Λεβουλινικό οξύ
❖ Ιτακονικό οξύ
❖ 1,4 Διοξέα (ηλεκτρικό, φουμαρικό, μηλικό οξύ)
❖ 3 Ύδροξυ-προπιονικό οξύ
❖ Γλυκερόλη
❖ 3- Ύδροξυ-βουτυρολακτόνη
❖ Ξυλιτόλη και Αραβιτόλη
❖ Σορβιτόλη
❖ Ασπαρτικό οξύ
❖ Γλουταμινικό οξύ

---



**Σχήμα 1.1** Βιολογικά και χημικά μονοπάτια για την παραγωγή των 12 κορυφαίων χημικών ουσιών σύμφωνα με το DOE's 2004 καθώς και των αναθεωρημένων 10 χημικών ουσιών προερχόμενα από βιομάζα για το 2010 (Choi et al, 2015).

### 1.2.2 Βιοτεχνολογικό ενδιαφέρον πολυολών

Όπως παρατηρείται ανάμεσα στα δώδεκα δομικά στοιχεία είναι η ξυλιτόλη και η αραβιτόλη, ενώσεις που ανήκουν στην κατηγορία των πολυολών. Οι πολυόλες, είναι συστατικά που χρησιμοποιούνται ως γλυκαντικά και παράγοντες διογκώσεως σε τρόφιμα. Ως υποκατάστατο ζάχαρης, παρέχουν λιγότερες θερμίδες και απαιτούν ελάχιστη ή καθόλου ινσουλίνη από τον οργανισμό για να μεταβολιστούν. Το γεγονός αυτό, τα καθιστά δημοφιλείς ενώσεις σε άτομα με διαβήτη. Ως πολυόλες πέντε ανθράκων, η D-αραβιτόλη και η ξυλιτόλη, έχουν προσελκύσει μεγάλη προσοχή για την ευρεία εφαρμογή τους ως γλυκαντικά τροφίμων, οδοντικά αναλγητικά και υποκατάστατα ζάχαρης για διαβητικούς (Erickson et al., 2012). Επιπλέον, έχουν χρησιμοποιηθεί ως πρώτες ύλες για τη χημική σύνθεση εναντιομερών ενώσεων, ανοσοκατασταλτικών, γλυκολιπιδίων, ζιζανιοκτόνων, καθώς και αντιπαθογόνων φαρμάκων (Levin, 2002). Ως εκ τούτου, η D-αραβιτόλη και η ξυλιτόλη είχαν επιλεγεί ως ομάδα ενός από τους 12 τύπους χημικών δομικών μονάδων με προστιθέμενη βιοτεχνολογική αξία.

Αν και η φυσιολογία της σύνθεσης πολυολών από ζύμες δεν έχει ακόμη κατανοηθεί πλήρως, φαίνεται ότι αυτή σχετίζεται με το στέλεχος ζύμης, την πηγή

άνθρακα τη συγκέντρωση του αζώτου και τη διαθεσιμότητα οξυγόνου (Ligthelm et al., 1988).

### **1.3 Ανανεώσιμες πρώτες ύλες ως θρεπτικά υποστρώματα για την παραγωγή αραβιτόλης**

Η ζύμωση των φυσικών υποστρωμάτων όπως τα λιγνινοκυτταρινούχα υλικά, οι ημικυτταρίνες κλπ. με τη χρήση ωσμοανθεκτικών οργανισμών όπως είναι οι ζύμες, οδήγησαν σε πιο υψηλή απόδοση και ποιότητα από τη χημική σύνθεση. Οι ωσμόφιλες ζύμες συχνά συσσωρεύουν πολυόλες όταν εκτίθενται σε συνθήκες στρες και η αραβιτόλη είναι μια από αυτές τις πολυόλες που παράγονται (Kumdam et al., 2014).

Υπάρχουν μερικά υποστρώματα αποβλήτων που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την παραγωγή αραβιτόλης από μικροοργανισμούς. Τα κύρια υποστρώματα για την παραγωγή L-αραβιτόλης είναι οι ημικυτταρίνες που λαμβάνονται από ανανεώσιμες λιγνινοκυτταρινούχες πρώτες ύλες. Οι ημικυτταρίνες είναι ιδιαίτερα πολύτιμες λόγω της πολύπλοκης δομής τους που περιέχει εξόζες (γλυκόζη, μαννόζη) και πεντόζες (ξυλόζη, αραβινόζη). Η σχετική αναλογία των σακχάρων εξαρτάται από την πρώτη ύλη που χρησιμοποιείται. Για παράδειγμα, τα σκληρά ξύλα και τα γεωργικά υλικά είναι πλούσια σε πεντόζες, τα οποία μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως υποστρώματα στη βιοτεχνολογική παραγωγή πολυολών με ζύμες που τις αφομοιώνουν (Hagerdal et al., 2007).

Το καλύτερο υλικό εκκινήσεως για την παραγωγή D-αραβιτόλης είναι η γλυκόζη, ένας μονοσακχαρίτης που μπορεί να αποκτηθεί φθηνά λόγω της αφθονίας του στη φύση. Η γλυκόζη είναι μια πλούσια πηγή άνθρακα που παράγεται ενζυμικά από άμυλο, σακχαρόζη, κυτταρίνη και ημικυτταρίνες. Υπάρχουν μερικές φυσικές ζύμες ικανές να μετατρέψουν τη γλυκόζη σε D-αραβιτόλη (Zakaria 2001, Saha et al. 2007, Zhu et al. 2010).

Σύμφωνα με μελέτες, ο μικροοργανισμός *Debaryomyces hansenii* με χρήση υποστρώματος γλυκόζης παράγει μόνο αιθανόλη και βιομάζα, με υπόστρωμα αραβινόζη παράγει αραβιτόλη και βιομάζα και με υπόστρωμα ξυλόζη παράγει ξυλιτόλη και βιομάζα. Σε σχετική έρευνα βρέθηκε ότι με κατανάλωση αραβινόζης ως μοναδικής πηγής υποστρώματος η απόδοση είναι 1,05g που είναι ισοδύναμο με τον

μέγιστο θεωρητικό συντελεστή ο οποίος είναι 1,01 g παραχθέντας αραβιτόλης ανά g αραβινόζης που καταναλώθηκε (Girio et al., 2000).

Ένα άλλο υπόστρωμα, χαμηλού κόστους, που έχει προταθεί για την παραγωγή αραβιτόλης είναι η γλυκερόλη. Τα υψηλά παγκόσμια αποθέματα γλυκερόλης είναι αποτέλεσμα των μεγάλων ποσοτήτων ακατέργαστης γλυκερίνης που παράγονται στην παραγωγή σαπουνιού, βιοντίζελ καθώς και σε άλλες ελαιοχημικές βιομηχανίες. Ειδικά, αφού οι τιμές αυτής της ένωσης κατέρρευσαν ως συνέπεια της πρόσφατης ταχείας ανάπτυξης της βιομηχανίας ντίζελ, η γλυκερόλη αποτελεί ένα φθηνό υπόστρωμα που θα μπορούσε να μειώσει το κόστος παραγωγής της αραβιτόλης. Η βιοτεχνολογική εφαρμογή της γλυκερόλης φαίνεται να είναι μια ενδιαφέρουσα επιλογή. Υπάρχουν μερικές αναφορές για τη βιομετατροπή της γλυκερόλης στη D-αραβιτόλη από επιλεγμένες ζύμες (Koganti & Ju 2013, Yoshikawa et al., 2014).

Τέλος, μελέτες έδειξαν ότι η υδρόλυση υδατανθράκων σόγιας από αλεύρι σόγιας μπορεί να αποτελέσει καλή πηγή εναλλακτικής / συμπληρωματικής πηγής άνθρακα. Η χρήση γλυκερόλης ή / και υδατανθράκων σόγιας για την παραγωγή αραβιτόλης μπορεί να αποφέρει οικονομικά οφέλη στη βιομηχανία σόγιας και βιοντίζελ (Loman and Ju, 2014).

#### **1.4 Μικροοργανισμοί που παράγουν αραβιτόλη**

Πολλά ωσμόφιλα είδη ζυμών έχουν τη δυνατότητα να παράγουν αραβιτόλη όταν αναπτύσσονται σε υπόστρωμα D-γλυκόζης. Μερικά από αυτά ανήκουν τα γένη των ζυμών *Zygosaccharomyces*, *Saccharomyces*, *Debaryomyces*, *Metschnikowia*, *Candida*, *Pichia*, *Hansenula*, *Endomycopsis*, *Wickerhamomyces* (Kumdam et al., 2014; Koganti et al., 2011).

Οι Saha et al. (2007) ανέφεραν σε ερευνά τους, ότι τα στελέχη των ειδών *Debaryomyces hansenii*, *Candida albicans*, *Candida pelliculosa*, *Candida famata* και *Pichia miso* έχουν τη δυνατότητα να παράγουν D-αραβιτόλη από γλυκόζη, αλλά συνήθως ο χρόνος επώασης είναι πολύ μεγάλος και η απόδοση πολύ μικρή ώστε να είναι βιομηχανικά αποδεκτές. Επίσης απομόνωσαν ζύμες από κυψέλες μελισσών και επέλεξαν ένα στέλεχος που αναγνωρίστηκε ως *Zygosaccharomyces rouxii*, το οποίο παρήγαγε ικανοποιητική ποσότητα αραβιτόλης από γλυκόζη αλλά και από ποικιλία μονοσακχαριτών όπως φρουκτόζη, γαλακτόζη, μαννόζη και ξυλόζη. Άλλο ένα

στέλεχος που απομονώθηκε από κυψέλη μελισσών το οποίο παρήγαγε μεγάλες ποσότητες αραβιτόλης από γλυκόζη είναι ο μικροοργανισμός *Kodamaea ohmeri* NH-9 (Zhu et al., 2010).

Ο Zakaria (2001) ανέφερε ότι το στέλεχος *Candida famata* R28 αναπτύχθηκε πολύ καλά σε μέσο που περιείχε D-γλυκόζη ως μοναδική πηγή άνθρακα και ήταν σε θέση να παράγει D-αραβιτόλη ως μοναδικό προϊόν του μεταβολισμού. Μια άλλη ζύμη που είναι δυνητικά ικανή να παράγει D-αραβιτόλη είναι η *Metschnikowia reukaufii* (Nozaki et al., 2003).

Οι Koganti et al. (2011) εξέτασαν 214 στελέχη ζυμομύκητα, κυρίως από τα γένη *Debaryomyces*, *Geotrichum*, *Metschnikowia*, *Candida* και *Dipodascus*, μεταξύ των οποίων βρέθηκε ότι οι μικροοργανισμοί *Debaryomyces* και *Metschnikowia* έχουν τον μεγαλύτερο αριθμό στελεχών που παρήγαγαν αξιοσημείωτες ποσότητες αραβιτόλης και πολύ μικρές ποσότητες άλλων πολυολών από γλυκερόλη μετά από 3 ημέρες ασυνεχούς καλλιέργειας. Το πιο πολύτιμο στέλεχος ήταν το *Debaryomyces hansenii* NRRL Y-7483, το οποίο παρήγαγε αραβιτόλη, με υπόστρωμα γλυκερόλη, με απόδοση  $0,55 \text{ g g}^{-1}$  και συγκέντρωση  $40 \text{ g L}^{-1}$  (Koganti et al., 2011). Άλλο ένα στέλεχος του γένους *Debaryomyces* το στέλεχος *D. nepalensis* NCYC 3413 είναι ικανό να χρησιμοποιεί τόσο εξόζες όσο και πεντόζες ως θρεπτικά υποστρώματα με αποτέλεσμα την παραγωγή εμπορικά πολύτιμων προϊόντων όπως η αραβιτόλη, η ξυλιτόλη και η αιθανόλη με μικρές, ωστόσο, συγκεντρώσεις. Συγκεκριμένα, με χρήση υποστρώματος γλυκόζης η μέγιστη συγκέντρωση αραβιτόλης ήταν  $14 \text{ g L}^{-1}$  με απόδοση  $0,1 \text{ g g}^{-1}$  ενώ η μεγαλύτερη συγκέντρωση αραβιτόλης επιτεύχθηκε με χρήση υποστρώματος αραβινόζης όπου η συγκέντρωση της αραβιτόλης ήταν  $24,6 \text{ g L}^{-1}$  με απόδοση  $0,32 \text{ g g}^{-1}$  (Kumdam et al., 2013).

Άλλα στελέχη που βρέθηκαν ότι παράγουν αραβιτόλη με υπόστρωμα γλυκερόλης είναι τα *Candida quercitrusa* NBRC 1022 με συγκέντρωση αραβιτόλης  $67,1 \text{ g L}^{-1}$  και απόδοση  $0,41 \text{ g g}^{-1}$ , *Candida quercitrusa* 17-2A με συγκέντρωση αραβιτόλης  $40,7 \text{ g L}^{-1}$ , *Debaryomyces hansenii* var. *fabryi* NBRC 0015 με συγκέντρωση αραβιτόλης  $9,75 \text{ g L}^{-1}$ , *D. hansenii* var. *hansenii* NBRC 0083 με συγκέντρωση αραβιτόλης  $26,5 \text{ g L}^{-1}$ , και *Hansenula anomala* NBRC 10213 με συγκέντρωση αραβιτόλης  $15,6 \text{ g L}^{-1}$  (Yoshikawa et al., 2014).

Τέλος ορισμένα βακτήρια, όπως το *Aerobacter aerogenes*, έχουν τη δυνατότητα να χρησιμοποιούν τη D-αραβιτόλη ως μοναδική πηγή άνθρακα (Kumdam et al., 2014).

## 1.5 Βιοχημεία σύνθεσης της D-αραβιτόλης

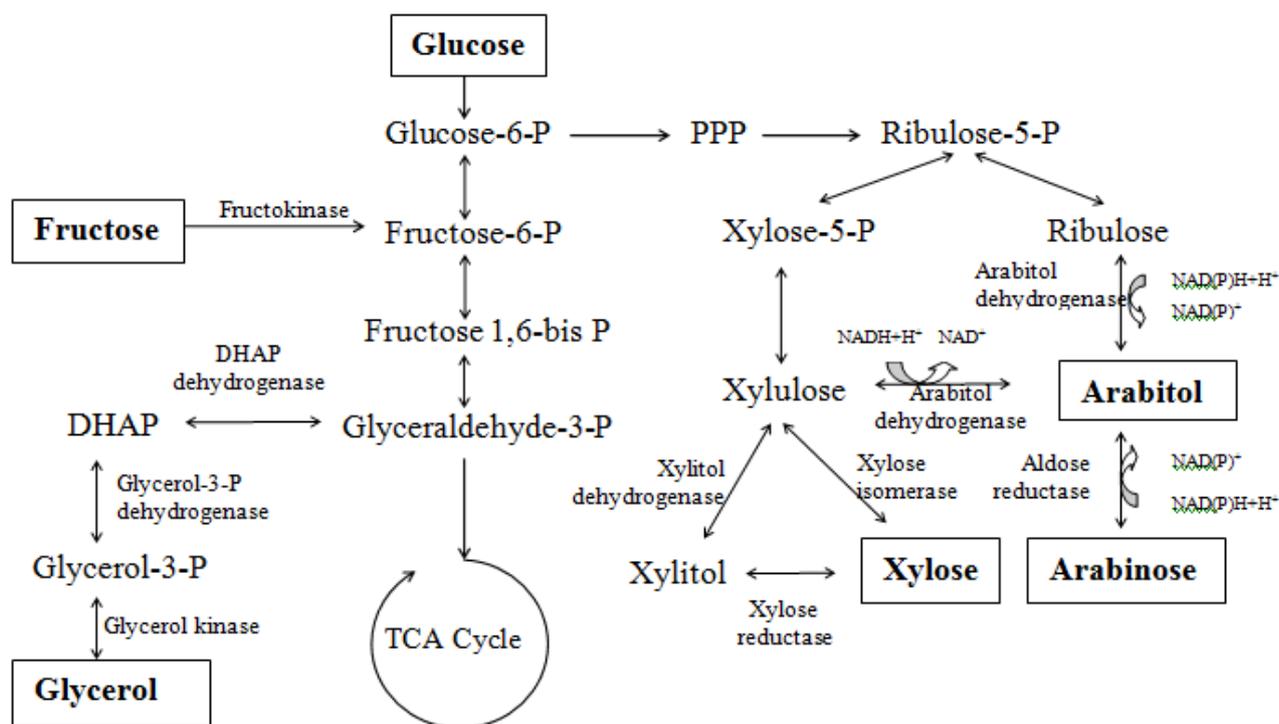
### 1.5.1 Βιοχημικό μονοπάτι παραγωγής αραβιτόλης

Η βιοχημεία σύνθεσης της D-αραβιτόλης έχει διασαφηνιστεί ως ένα βαθμό σε διάφορους οργανισμούς. Το Σχήμα 1.2 δείχνει τις πιθανές οδούς για σύνθεση αραβιτόλης από γλυκόζη, αραβινόζη, ξυλόζη, φρουκτόζη και γλυκερόλη. Η μεταβολική οδός της D-αραβιτόλης από τον μικροοργανισμό *D. hansenii* προσδιορίστηκε από τους Adler et al. χρησιμοποιώντας  $^{13}\text{C}$  NMR υψηλής ανάλυσης (Jovall, 1990). Η οδός των φωσφορικών πεντοζών βρέθηκε ότι παίζει σημαντικό ρόλο στο σχηματισμό της αραβιτόλης με την 5-φωσφορική ριβουλόζη να αποτελεί πρόδρομη ουσία (Kordowska and Wiater, 2015).

Η βιοσύνθεση της αραβιτόλης δεν έχει μελετηθεί εκτενώς. Πολλές απόψεις σχετικά με τα ένζυμα που εμπλέκονται στο μεταβολικό μονοπάτι για τη βιοσύνθεση αυτής εξακολουθούν να είναι ασαφείς ενώ απαιτείται διεξοδική έρευνα ως προς αυτό. Μια πιθανή οδός που προτείνεται από τους Wong et al (1995) περιλαμβάνει την αναγωγή της 5-φωσφορικής ριβουλόζης σε 5-φωσφορική αραβιτόλη με χρήση αναγωγάσης και μετέπειτα την αποφωσφορυλίωση της 5-φωσφορικής αραβιτόλης. Η αφυδρογονάση της αραβιτόλης χρησιμοποιήθηκε ως διαγνωστικός δείκτης.

Σύμφωνα με αναφορές οι ωσμόφιλες ζύμες μπορούν να παράγουν D-αραβιτόλη από γλυκόζη από δύο εναλλακτικές οδούς. Μπορούν να μετατρέψουν τη γλυκόζη σε 5 φώσφορο-ριβουλόζη με αποφωσφορυλίωση, και στη συνέχεια να ανάγουν την D-ριβουλόζη σε D-αραβιτόλη με χρήση της NADP-εξαρτώμενης αφυδρογονάσης. Ένα άλλο στέλεχος του *S. rouxii* μετατρέπει τη γλυκόζη με αποφωσφορυλίωση σε 5-φωσφορο-ξυλουλόζη και στη συνέχεια ανάγει την D-ξυλουλόζη σε D-αραβιτόλη με την NADP-εξαρτώμενη αφυδρογονάση της D-αραβιτόλης (Koganti et al., 2011).





**Σχήμα 1.2** Μεταβολικό μονοπάτι παραγωγής D-αραβιτόλης από γλυκόζη, φρουκτόζη, γλυκερόλη, ξυλόζη και αραβινόζη ως θρεπτικά υποστρώματα. (Koganti et al., 2011, Kumdam et al., 2014, Kordowska and Wiater, 2015 ).

### 1.5.2 Παράγοντες που επηρεάζουν την παραγωγή αραβιτόλης

Οι Koganti και Kwang (2013) μελέτησαν την επίδραση του pH, της συγκέντρωσης του διαλυτού οξυγόνου σε ποσοστό % (DO), το μέγεθος του εμβολίου, της συγκέντρωσης του μαγνησίου και τον λόγο αζώτου προς φώσφορο (N/P) και εκτιμήθηκε η επιρροή αυτών στην ανάπτυξη των κυττάρων και στην παραγωγικότητα της αραβιτόλης. Για τα πειράματα τους χρησιμοποιήθηκε η ζύμη *Debaryomyces hansenii* NRRL Y-7483 και ως υπόστρωμα η γλυκερόλη.

Όπως παρατηρήθηκε σε πειράματα με διαφορετικούς λόγους αζώτου - φωσφόρου, σε πολύ μεγάλη ή πολύ μικρή μείωση της τιμής του φωσφόρου η ζύμη αδυνατούσε να παράγει αραβιτόλη. Όσον αφορά τη συγκέντρωση του διαλυτού οξυγόνου (DO) έγιναν πειράματα με DO 5%, 10% και 20%. Παρατηρήθηκε ότι η υψηλή συγκέντρωση διαλυτού οξυγόνου DO (20%) είχε σαν αποτέλεσμα γρήγορη παραγωγή αραβιτόλης ενώ η χαμηλή τιμή DO (5%) παρουσίασε μεγαλύτερη απόδοση παραχθέντος προϊόντος. Στις ζυμώσεις που έγιναν για προσδιορισμού του κατάλληλου pH πραγματοποιήθηκαν δοκιμές σε διαφορετικές τιμές pH (3, 3,5, 4, 5

και 6) όπου οι τιμές pH από 4 και πάνω ήταν λιγότερο ιδανικές ενώ την μέγιστη παραγωγικότητα αραβιτόλης παρουσίασε το pH 3,5. Στην τιμή αυτή του pH η αραβιτόλη είχε συγκέντρωση  $40 \text{ g L}^{-1}$ , απόδοση  $0,55 \text{ g g}^{-1}$  και παραγωγικότητα  $0,33 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ . Τέλος αναφορικά με το μέγεθος του εμβολίου παρόλο που διενεργήθηκαν πειράματα με εμβόλιο μεγέθους 5%, 10%, 15%, 20% και 25% τα πειράματα έδειξαν ότι δεν υπήρχε μεγάλη διαφορά στο ρυθμό κυτταρικής ανάπτυξης (Koganti and Kwang, 2013).

Οι Saha et al. (2007) διενέργησαν έρευνες με τον μικροοργανισμό *Z. rouxii*, ο οποίος παρήγαγε ικανοποιητική ποσότητα αραβιτόλης από γλυκόζη και βρήκαν ότι η βέλτιστη θερμοκρασία ήταν  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ , το pH ίσο με 5 και η βέλτιστη ταχύτητα ανάδευσης μεταξύ των τιμών 300-450 rpm. Υπό αυτές τις συνθήκες παρήχθησαν  $83,4 \text{ g L}^{-1}$  αραβιτόλη με απόδοση  $0,48 \text{ g g}^{-1}$  ενώ τα πειράματα διεξήχθησαν σε κωνικές φιάλες (Kordowska and Wiater, 2015).

## 1.6 Ιδιότητες και εφαρμογές αραβιτόλης

Η αραβιτόλη που ονομάζεται επίσης αραβινιτόλη ή λυξιτόλη είναι μια πεντιτόλη. Αποτελείται από πέντε άτομα άνθρακα, με μια ομάδα υδροξυλίου σε κάθε άνθρακα, και παρουσιάζεται σε δύο μορφές, την D-αραβιτόλη και L-αραβιτόλη. Αμφότερες οι δύο μορφές της έχουν μοριακό βάρος 152 ενώ ανήκουν στην οικογένεια των πεντιτολών μαζί με την ξυλιτόλη και τη ριβιτόλη (Kumdam et al., 2013).

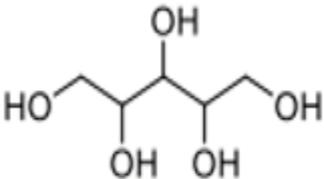
Από πλευράς ιδιοτήτων η αραβιτόλη είναι γλυκιά, άχρωμη, κρυσταλλική και διαλυτή στο νερό. Όπως και οι υπόλοιπες πεντιτόλες μπορεί να χρησιμοποιηθεί στη βιομηχανία τροφίμων καθώς και στη βιομηχανία παραγωγής θεραπευτικών προϊόντων (Koganti, 2012). Έχοντας γλυκύτητα παρόμοια με της σακχαρόζης και πολύ χαμηλότερη περιεκτικότητα σε θερμίδες (λόγω της βραδείας απορρόφησης ή της έλλειψης απορρόφησης από τον ανθρώπινο πεπτικό σωλήνα), οι σακχαρούχες αλκοόλες μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως γλυκαντικές ουσίες χαμηλής θερμιδικής αξίας. Συγκεκριμένα η αραβιτόλη έχει εξαιρετικά χαμηλή περιεκτικότητα σε θερμίδες  $0,2 \text{ kcal g}^{-1}$ , σε σύγκριση με  $2,4 \text{ kcal g}^{-1}$  που έχει η ξυλιτόλη και  $4 \text{ kcal g}^{-1}$  που έχει η σακχαρόζη (Koganti and Kwang, 2013).

Ο Koganti (2012) ανέφερε ότι η αραβιτόλη χρησιμοποιείται για τη σύνθεση ενώσεων που έχουν ιατρικές ιδιότητες κατάλληλες να χρησιμοποιηθούν ως ανοσοκατασταλτικά γλυκολιπίδια και ζιζανιοκτόνα (Koganti 2012). Η αραβιτόλη διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ενεργειακά ελεγχόμενη διατροφή, καθώς απορροφάται αργά από το πεπτικό σύστημα. Επιπροσθέτως, πλεονεκτεί σε σύγκριση με τα υπόλοιπα σάκχαρα στο ότι δεν διατηρεί την ανάπτυξη των βακτηρίων της στοματικής κοιλότητας καθώς δεν μπορεί να τα μεταβολίσει, γεγονός που αποδεικνύει ότι η κατανάλωση της, σε αντίθεση με αυτή των σακχάρων, δεν οδηγεί σε οδοντικά προβλήματα. Ως εκ τούτου έχει επίσης χρησιμοποιηθεί ως ένα συνηθισμένο συστατικό σε τσίγλες (Kumdam et al., 2013). Η αραβιτόλη τήκεται στους 103 ° C (Talja and Roos, 2001) ενώ το φυσικό περιβάλλον της είναι τα μανιτάρια και οι λειχήνες (Lindberg, 1952).

Πρόσφατα η ζήτηση για εναλλακτικά σάκχαρα αυξήθηκε λόγω των ευεργετικών ιδιοτήτων τους. Ακολουθούν οι ιδιότητες που πρέπει να διαθέτουν τα εναλλακτικά σάκχαρα:

- ✓ Χαμηλή θερμιδική περιεκτικότητα
- ✓ Διαβητικοί αναστολείς
- ✓ Ρύθμιση της τερηδόνας των δοντιών
- ✓ Γλυκύτητα παρόμοια με τη σακχαρόζη
- ✓ Άχρωμα
- ✓ Άοσμη
- ✓ Θα πρέπει να μεταβολίζονται κανονικά (Gaydos, 1981, Fabre et al., 2002).

**Πίνακας 1.3** Φυτικοχημικές ιδιότητες και δομή αραβιτόλης

		Συντακτικός Τύπος
Συστηματική ονομασία (IUPAC)	(2 <i>R</i> ,4 <i>R</i> )-Pentane-1,2,3,4,5-	
Μοριακός Τύπος	C <sub>5</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>	
Μοριακή Μάζα	152,15 g·mol <sup>-1</sup>	
Σημείο τήξης	103 °C	
Φυσικό περιβάλλον	Μανιτάρια & λειχήνες	

### 1.6.1 Σύγκριση αραβιτόλης με ξυλιτόλη και άλλες πολυόλες

Η ξυλιτόλη έχει προταθεί ως ιδανική πρώτη ύλη για την παρασκευή πολυμερών για βιοϊατρικές εφαρμογές. Πρόσφατα αναπτύχθηκαν βιοαποικοδομήσιμα ελαστομερή με βάση την αντίδραση πολυσυμπύκνωσης πολυόλης με σεβακικό οξύ και κιτρικό οξύ. Αυτά τα πολυμερή έχει αποδειχθεί ότι ξεπερνούν αρκετά μειονεκτήματα που σχετίζονται με τα διαθέσιμα σήμερα βιοαποικοδομήσιμα θερμοπλαστικά υλικά που χρησιμοποιούνται για βιοϊατρικές εφαρμογές. Τα μειονεκτήματα αυτά περιλαμβάνουν αποδόμηση, σχηματισμό προϊόντων όξινης αποικοδόμησης και απώλεια σταθερότητας στη μορφή (Al Loman and Ju, 2014).

Αυτά τα ελαστομερή με βάση τη ξυλιτόλη καθώς και άλλες πολυόλες θεωρήθηκαν πολλά υποσχόμενα σε ιατρικές εφαρμογές, ιδιαίτερα σε εφαρμογές μαλακών μορίων, χειρουργικές κόλλες, εφαρμογές μηχανικής καρδιοαγγειακών ιστών και νευρικά μοσχεύματα. Ως εκ τούτου κάποια από αυτά έχουν αναγνωριστεί ως πολύ ελπιδοφόρα για την βιομηχανική ανάπτυξη ιστών και οργάνων. Όσον αφορά την αραβιτόλη θεωρείται ότι θα έχει παρόμοια καταλληλότητα για την παρασκευή των ανωτέρω βιοαποικοδομήσιμων, βιοσυμβατών πολυμερών (Al Loman and Ju, 2013).

Η ξυλιτόλη παράγεται επί του παρόντος με χημική ή βιολογική αναγωγή της ξυλόζης που προέρχεται από υδρόλυμα ξύλου. Ωστόσο ο διαχωρισμός και ο καθαρισμός της ξυλόζης και η απαιτούμενη υψηλή πίεση, θερμοκρασία και ο ακριβός καταλύτης, για χημική αναγωγή, καθιστούν αυτές τις διαδικασίες λιγότερο οικονομικές. Η ανάπτυξη μιας βιολογικής διαδικασίας για την παραγωγή αραβιτόλης από λιγότερο δαπανηρά ή λιγότερο καθαρά υποστρώματα μπορεί να βοηθήσει σημαντικά στην αξιοποίηση της αραβιτόλης ως πολύτιμου χημικού προϊόντος (Al Loman and Ju, 2014).

Άλλη μια πολυόλη υψηλής προστιθέμενης αξίας είναι η μαννιτόλη. Η μαννιτόλη είναι μια πολυσθενής αλκοόλη αποτελούμενη από 6 άτομα άνθρακα ενώ έχει πολλές εφαρμογές στη βιομηχανία τροφίμων, φαρμάκων και στις ιατρικές επιστήμες (Rywinska et al., 2013). 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 (Philippousis, 2009). Όπως και η σορβιτόλη, έτσι και η μαννιτόλη,

έχει χαμηλό γλυκαιμικό δείκτη, είναι ασφαλής για τα δόντια, έχει χαμηλές θερμίδες και επιτρέπεται η χρήση της σε τρόφιμα στις περισσότερες χώρες (Deis et al., 2016).

**Πίνακας 1.4** Θερμιδική αξία της σακχαρόζης και ορισμένων πολυολών (Food and Drug Administration, FDA)

Γλυκαντική Ένωση	Θερμιδική αξία (kcal g <sup>-1</sup> )
Σακχαρόζη	4,0
Σορβιτόλη	2,6
Ξυλιτόλη	2,4
Μαλτιτόλη	2,1
Λακτιτόλη	2,0
Μαννιτόλη	1,6
Ερυθριτόλη	0,2
Αραβιτόλη	0,2

## 1.7 Μέθοδοι ανάκτησης - Παρούσα κατάσταση στην αγορά

### 1.7.1 Μέθοδοι ανάκτησης

Σύμφωνα με έρευνα που διενεργήθηκε το 1958 από Podmore et al. υπήρξε μεγάλη δυσκολία να ανακτηθεί η D-αραβιτόλη από μέσω ζύμωσης σε καθαρή μορφή, ιδιαίτερα όταν χρησιμοποιείται μια ακάθαρτη και πολύ χρωματισμένη πηγή υδατανθράκων, όπως η μελάσα, σαν θρεπτικό μέσο. Κατά την μελέτη αυτή, οι επιστήμονες βρήκαν μια μέθοδο για την ανάκτηση της D-αραβιτόλης από το μέσο της ζύμωσης που την περιείχε, μειώνοντας τον όγκο του μέσου της ζύμωσης με αφαίρεση του νερού από αυτό. Στη συνέχεια, ακολούθησε εκχύλιση του συμπυκνωμένου διαλύματος που σχηματίστηκε με κανονική ή ισοβουτυλική αλκοόλη με σκοπό την ανάκτηση της D-αραβιτόλης από το αλκοολικό εκχύλισμα (Podmore et al., 1958).

Ο όγκος του υγρού της ζύμωσης μπορεί να μειωθεί με οποιαδήποτε γνωστή μέθοδο με προσοχή όμως να μην καταστραφεί ποσότητα του προϊόντος. Για παράδειγμα, το υγρό της ζύμωσης μπορεί να εξατμιστεί σε χαμηλές θερμοκρασίες υπό μειωμένη πίεση. Προτιμάται, ωστόσο, η απομάκρυνση του νερού να επιτευχθεί με αζεοτροπική απόσταξη (με χρήση στήλης αποστάξεως) παρουσία βουτυλικής αλκοόλης η οποία σχηματίζει αζεοτροπικό διάλυμα με νερό, στην κορυφή της

στήλης, και στη συνέχεια το νερό μπορεί να απομακρυνθεί ως αζεοτροπικό διάλυμα νερού / αλκοόλης. Όταν αφαιρεθεί η επιθυμητή ποσότητα νερού, για παράδειγμα, όταν ο όγκος του μέσου έχει μειωθεί περίπου κατά ένα τρίτο του αρχικού του όγκου ή όταν έχει απομακρυνθεί όλη η ποσότητα του νερού, η απόσταξη μπορεί να σταματήσει. Το μίγμα στη συνέχεια αφήνεται να διαχωριστεί και η αλκοολική στρώση απομακρύνεται. Το υπόλειμμα μπορεί στη συνέχεια να εκχυλιστεί με περαιτέρω προσθήκη αλκοόλης εάν είναι επιθυμητό. Κατά την ψύξη η D-αραβιτόλη κρυσταλλώνεται με καλή απόδοση και σε σχετικά υψηλή καθαρότητα. Βρέθηκε επίσης ότι είναι επιθυμητό να ολοκληρωθεί η εκχύλιση σε θερμοκρασίες άνω των 103 °C αφού αυτή είναι η θερμοκρασία τήξης της D-αραβιτόλης και η εκχύλιση επιτυγχάνεται ταχύτερα (Podmore et al., 1958).

Κατά τη διαδικασία εκχύλισης της αραβιτόλης σε βουτανόλη, για να διευκολυνθεί ο σχηματισμός κρυστάλλων, προστίθεται 1 g L<sup>-1</sup> κρύσταλλο αραβιτόλης στο εκχύλισμα βουτανόλης μετά από ψύξη σε θερμοκρασία δωματίου. Μια εικόνα των σχηματισθέντων κρυστάλλων λευκής αραβιτόλης παρουσιάζεται στην Εικόνα 1.2 (Loman et al., 2014). Η καθαρότητα των κρυστάλλων αραβιτόλης που συλλέγονται με αυτή τη μέθοδο προσδιορίζεται ότι είναι τουλάχιστον 95% ενώ η συνολική απόδοση κρυστάλλων αραβιτόλης 66%. Απώλεια αραβιτόλης είναι πιθανό να προκύψει κατά κύριο λόγο, σε μέσο το οποίο περιέχει ποσότητα γλυκερόλης, κατά την διαδικασία απομάκρυνση αυτής (Loman et al., 2013). Για το σκοπό αυτό, πρέπει να συμπεριληφθεί μια διαδικασία εκχύλισης για απομάκρυνση/διαχωρισμό της γλυκερόλης από αραβιτόλη στο μέσω της ζύμωσης γεγονός που αυξάνει το συνολικό κόστος του όλου εγχειρήματος. Τέλος, η βουτανόλη θα ανακυκλωθεί για επαναχρησιμοποίηση σε εκχύλιση και κρυστάλλωση, έτσι ώστε η απώλεια που σχετίζεται με αυτά τα στάδια ως μη συλλεγμένη αραβιτόλη σε βουτανόλη (λόγω διαλυτότητας) μπορεί να ελαχιστοποιηθεί (Loman et al., 2014).

Έχουν αναφερθεί αρκετές άλλες μέθοδοι για τον διαχωρισμό των πολυολών από το μέσο της ζύμωσης. Για παράδειγμα, ρητίνες ιοντοανταλλαγής χρησιμοποιήθηκαν για τον καθαρισμό της ξυλιτόλης από διάφορους ερευνητές, αλλά αυτή η διαδικασία προκάλεσε 40-55% απώλεια ξυλιτόλης λόγω προσκόλλησης της ξυλιτόλης στην επιφάνεια των ρητινών (Loman et al., 2014).

Η κρυστάλλωση είναι μια πολύ χρήσιμη τεχνική για την παραγωγή καθαρής αραβιτόλης σε μεγάλη κλίμακα. Για εμπορικούς σκοπούς, η διαδικασία της κρυστάλλωσης συχνά καθορίζει τα χαρακτηριστικά των προϊόντων όπως είναι το

μέγεθος των σωματιδίων και το σημαντικότερο, την καθαρότητα του προϊόντος. Η παρουσία σύνθετων οργανικών ουσιών είναι γνωστό ότι επηρεάζει τη διαδικασία καθαρισμού ιδιαίτερα κατά την διάρκεια της κρυστάλλωσης των επιθυμητών προϊόντων. (Loman et al., 2013).



**Εικόνα 1.2** Σχηματισθέντες κρύσταλλοι λευκής αραβιτόλης (Loman et al., 2014)

### **1.7.2 Παρούσα κατάσταση σχετικά με την παραγωγή αραβιτόλης**

Οι Kumdam et al. (2013) σε έρευνα τους κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι επί του παρόντος, η αραβιτόλη παράγεται σε βιομηχανική κλίμακα με χημική αναγωγή λακτονών του αραβινικού ή του λυξονικού οξέος, μια αντίδραση που απαιτεί ακριβό καταλύτη και σταθερή θερμοκρασία 100 °C. Επιπλέον, πρέπει να ακολουθηθούν εκτεταμένα στάδια διαχωρισμού σε αυτή τη διαδικασία για την απομάκρυνση των παραπροϊόντων της αντίδρασης.

Αντί για χημική παραγωγή, ωστόσο, η αραβιτόλη μπορεί να συντεθεί χρησιμοποιώντας μια βιοτεχνολογική μέθοδο γνωστή ως βιομετατροπή, η οποία πιστεύεται ότι είναι φιλική προς το περιβάλλον και πιο οικονομική, καθώς δεν απαιτεί τη χρήση υποστρωμάτων καθαρού σακχάρου και χημικούς καταλύτες. Η βιομετατροπή περιλαμβάνει την εφαρμογή ζωντανών μικροβιακών κυττάρων, τα οποία διεξάγουν πολλαπλές αντιδράσεις καταλυόμενες από ένζυμα. Τα προϊόντα που παράγονται από τέτοιες αντιδράσεις συνήθως απομονώνονται πιο εύκολα (Zhang et al., 2014).

Εάν είναι επιθυμητό, η αραβιτόλη μπορεί επίσης να μετατραπεί σε ξυλιτόλη, για παράδειγμα, χρησιμοποιώντας το στέλεχος του βακτηρίου *Glucanobacter oxydans* (Suzuki et al., 2002). Αυτό το βακτήριο ήταν ικανό να οξειδώσει τη D-αραβιτόλη σε

D-ξυλουλόζη χρησιμοποιώντας την αφυδρογονάση της D-αραβιτόλης και στη συνέχεια να μετατρέψει τη D-ξυλουλόζη σε D-ξυλιτόλη χρησιμοποιώντας την αφυδρογονάση της D-ξυλιτόλης (Koganti et al., 2011).

Υπάρχουν μερικά φυσικά στελέχη ζυμών που έχουν την ικανότητα να βιομετατρέπουν την L-αραβινόζη σε L-αραβιτόλη, καθώς και γενετικά τροποποιημένα στελέχη του μικροοργανισμού *Saccharomyces cerevisiae* που διαθέτουν ένα νέο ευνοϊκό χαρακτηριστικό που τους επιτρέπει να αφομοιώνουν την L-αραβινόζη. Εντούτοις, η μικροβιακή παραγωγή της L-αραβιτόλης από ένα μίγμα ημικυτταρινούχων σακχάρων συνεπάγεται υψηλό κόστος προετοιμασίας των μέσων καλλιέργειας (π.χ. προεπεξεργασία των λιγνινοκυτταρινούχων υλικών, υδρόλυση) και καθαρισμό του τελικού προϊόντος από το μίγμα των πολυολών (Kordowska and Wiater, 2015).

### **1.8 Ενδοπολυσακχαρίτες (Intracellular Polysaccharides, IPs)**

Οι πολυσακχαρίτες είναι πολυμερή αποτελούμενα από μονοσακχαρίτες με γενικό χημικό τύπο  $(C_6H_{10}O_5)_n$  όπου  $n$  συνήθως μεγαλύτερο του 100. Προκύπτουν από την ένωση περισσότερων από 10 μονοσακχαριτών με γλυκοσιδικό δεσμό, ο οποίος αναπτύσσεται μεταξύ του υδροξυλίου του C1 του πρώτου σακχάρου και το υδροξύλιο ενός εκ των C2, C3, C4 ή C6 του επόμενου. Ο αριθμός των μονάδων μονοσακχαρίτη σε έναν πολυσακχαρίτη ονομάζεται βαθμός πολυμερισμού (ΒΠ), και ποικίλλει από μόριο σε μόριο. Λίγοι είναι οι πολυσακχαρίτες που έχουν ΒΠ μικρότερο του 100. Οι περισσότεροι έχουν ΒΠ εντός του εύρους 200-3000. Οι μεγαλύτεροι από αυτούς, (π.χ. η κυτταρίνη) έχουν ΒΠ 7000-15000. Οι πολυσακχαρίτες χρησιμεύουν ως αποταμιευτικές και δομικές ύλες σε ζωικούς και φυτικούς οργανισμούς. Εκτιμάται ότι περισσότερο από το 90% της σημαντικής μάζας υδατάνθρακα στη φύση είναι στη μορφή των πολυσακχαριτών. Οι πολυσακχαρίτες μπορούν να είναι είτε γραμμικά ή διακλαδισμένα μόρια. Ο γενικός επιστημονικός όρος για τους πολυσακχαρίτες είναι ο όρος γλυκάνες (Belitz et al., 2009).

Πολλοί πολυσακχαρίτες, συμπεριλαμβανομένων του αμύλου, της κυτταρίνης και των πηκτινών, χρησιμοποιούνται ευρέως στις φαρμακευτικές βιομηχανίες αλλά και στις βιομηχανίες τροφίμων, καθώς και σε διάφορες ιατρικές εφαρμογές (Stacey et al., 1967). Οι μύκητες έχουν ευρέως μελετηθεί για την παραγωγή πολυσακχαριτών (έξω και ένδο πολυσακχαρίτες) και σε πολλές περιπτώσεις παρουσιάζουν



φαρμακευτικές και θεραπευτικές δράσεις με αντικαρκινικές και ανοσολογικές ιδιότητες. Οι πολυσακχαρίτες που έχουν τις παραπάνω ιδιότητες ανήκουν στις έτερο-β-γλυκάνες (π.χ. λεντινάνη) (Tang and Zhong, 2002). Αυτές οι β γλυκάνες αποτελούνται από μόρια γλυκόζης ενωμένα με β-(1,3) γλυκοσιδικούς δεσμούς στα οποία συνδέονται με διακλαδώσεις μόρια γλυκόζης με γλυκοζιδικό δεσμό β-(1,6) (Seviour et al., 1992; Fazena et al., 2008).

Διάφορες μελέτες έχουν δείξει ότι η παραγωγή των ενδοπολυσακχαριτών επηρεάζεται θετικά από πηγές άνθρακα όπως η γλυκόζη, αλλά και από διάφορες οργανικές πηγές αζώτου (Tchakouteu et al., 2015; Tang and Zhong, 2002). Επιπλέον παράγοντες όπως το pH, η θερμοκρασία της ζύμωσης αλλά και ο αερισμός παίζουν σημαντικό ρόλο στη βιοσύνθεση των ενδοπολυσακχαριτών. Παρόλαυτα, οι συνθήκες που ευνοούν την παραγωγή βιομάζας μπορεί να ευνοούν την συσσώρευση των πολυσακχαριτών (κυρίως των εξωπολυσακχαριτών) και αντιστρόφως (Tang and Zhong, 2002; Diamantopoulou et al., 2012a; 2012b)

## 1.9 Σκοπός και αντικείμενο μελέτης

Ο σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η αξιολόγηση της ικανότητας της ζύμης *Debaryomyces hansenii* EMBT Y-41 να αναπτύσσεται σε υδρόφιλα εμπορικά υποστρώματα με σκοπό την μικροβιακή παραγωγή αραβιτόλης. Τα υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι χαμηλού κόστους, εμπορική γλυκόζη και φρουκτόζη, η βιομηχανική γλυκερόλη καθώς και η αραβινόζη και η ξυλόζη.

Εν συνεχεία, επιλέχθηκαν τα αποδοτικότερα θρεπτικά υποστρώματα (γλυκόζη και φρουκτόζη) ως προς την τελική συγκέντρωση, την απόδοση και την παραγωγικότητα του τελικού προϊόντος και ακολούθησε βελτιστοποίηση των συνθηκών της ζύμωσης με στόχο τη μέγιστη παραγωγή αραβιτόλης. Στο τέλος της μελέτης διεξήχθη ζύμωση ημισυνεχούς λειτουργίας σε βιοαντιδραστήρα αξιοποιώντας τις βελτιστοποιημένες συνθήκες του προηγούμενου σταδίου.

## 2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 2.1 Βιολογικό υλικό

Στην παρούσα πτυχιακή μελέτη έγινε χρήση του στελέχους *Debaryomyces hanseni* EMBT Y-41. Ο μικροοργανισμός ανήκει στην κατηγορία των ζυμών και βρίσκεται στην τράπεζα του Εργαστηρίου Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών.

Η ανανέωση του μικροοργανισμού γινόταν σε δοκιμαστικούς σωλήνες πληρωμένους με στερεό θρεπτικό μέσο YPD (Yeast 10 g L<sup>-1</sup>, Peptone 10 g L<sup>-1</sup>, Dextrose Agar 10 g L<sup>-1</sup>) και ακολουθούσε επώαση σε θερμοκρασία 30 °C για 5 ημέρες. Στην συνέχεια, οι δοκιμαστικοί σωλήνες με την ανεπτυγμένη ζύμη διατηρούνταν στους 4 °C. Προκειμένου να διατηρηθεί η ζωτικότητα του στελέχους η ανανέωση του λάμβανε χώρα ανά τακτά χρονικά διαστήματα.

**Πίνακας 2.1** Χαρακτηριστικά ζύμης *Debaryomyces hanseni*

Συστηματική Ταξινόμηση	Βασίλειο: <i>Fungi</i> ; Φύλο: <i>Ascomycota</i> ; Κλάση: <i>Saccharomycetes</i> ; Τάξη: <i>Saccharomycetales</i> ; Οικογένεια: <i>Saccharomycetaceae</i> ; Γένος: <i>Debaryomyces</i> ; Είδος: <i>Debaryomyces hanseni</i>
Συνώνυμα (προηγούμενες ονομασίες) του είδους	<i>Saccharomyces hanseni</i> Zopf (1889)
Γεωγραφική προέλευση	Atlantic coast of Namibia, Great Salt Lake of Utah
Χαρακτηρισμός στελέχους	Ωσμιοανθεκτική ξηροτοξική και μη παθογόνος ζύμη

### 2.2 Παρασκευή Υγρού Εμβολίου

Πριν από την πραγματοποίηση κάθε ζύμωσης, δημιουργούνταν προκαλλιέργειες με στόχο την παρασκευή εμβολίου το οποίο περιείχε κύτταρα του ίδιου φυσιολογικού σταδίου. Τα κύτταρα της προκαλλιέργειας αναπτύχθηκαν σε κωνικές φιάλες Erlenmeyer των 250 mL, πληρωμένες κατά το 1/5 του όγκου τους. Συγκεκριμένα περιείχαν 50mL θρεπτικού μέσου Yeast Peptone Dextrose (YPD) με σύσταση 10 g L<sup>-1</sup> εκχύλισμα ζύμης, 10 g L<sup>-1</sup> πεπτόνη και 10 g L<sup>-1</sup> γλυκόζη. Μετά την αποστείρωση του θρεπτικού μέσου σε αυτόκαυστο στους 121 °C, 2 Atm, για 20 min ακολούθησε εμβολιασμός με το στέλεχος της ζύμης και στη συνέχεια επώαση αυτού

σε ανακινούμενο επωαστικό θάλαμο υπό συνεχή ανάδευση 180 rpm σε θερμοκρασία 30 °C για 24 ώρες.

### 2.3 Θρεπτικό μέσο καλλιέργειας

Κατά τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας πραγματοποιήθηκαν ζυμώσεις βυθού κλειστού τύπου σε κωνικές φιάλες Erlenmeyer όγκου 250mL πληρωμένες κατά το 1/5 του όγκου τους με το αντίστοιχο θρεπτικό μέσο κάθε φορά. Για την επίτευξη της βελτιστοποίησης της διεργασίας παραγωγής αραβιτόλης διεξήχθη μια σειρά ζυμώσεων με σκοπό την αξιολόγηση διαφόρων πηγών άνθρακα προς παραγωγή αραβιτόλης. Οι πηγές άνθρακα που χρησιμοποιήθηκαν για τη διεξαγωγή των πειραμάτων, η σύστασή τους όπως και η προέλευσή τους παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.2.

**Πίνακας 2.2** Συγκεντρώσεις σακχάρων στο θρεπτικό μέσο της καλλιέργειας μετρούμενες με την μέθοδο της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC) καθώς και η προέλευση αυτών.

Πηγές άνθρακα	Συγκεντρώσεις (g L <sup>-1</sup> )	Προέλευση
Γλυκόζη	120 ± 5	Commercial
Φρουκτόζη	112 ± 5	Commercial
Αραβινόζη	120 ± 5	Sigma – Aldrich, 99%
Ξυλόζη	120 ± 5	Sigma – Aldrich, 99%
Γλυκερόλη	120 ± 5	Πέττας ΑΕ

Η γλυκόζη και η φρουκτόζη που χρησιμοποιήθηκαν ήταν εμπορικής προελεύσεως ενώ χρησιμοποιούνται από διάφορες βιομηχανίες προς παραγωγή σκευασμάτων τροφίμων. Όσον αφορά τη γλυκερόλη, ήταν βιομηχανική και περιείχε 1-2% μονογλυκερίδια, διγλυκερίδια και ελεύθερα λιπαρά οξέα, 2-4% NaCl, 0,1% μεθανόλη και 2-4% νερό (Kachrimanidou et al., 2013). Για τον καθαρισμό της γλυκερόλης έγινε χρήση χοάνης διαχωρισμού ενώ στη συνέχεια βρέθηκε η καθαρότητα αυτής, ίση με 88,5%, με τη χρήση HPLC. Μαζί με την εκάστοτε πηγή άνθρακα προσθέτονταν στο μέσο της καλλιέργειας μίγμα αλάτων, η σύσταση του οποίου παρουσιάζεται στον Πίνακα 2.3.

**Πίνακας 2.3** Συγκεντρώσεις αλάτων στο θρεπτικό μέσο (Paranikolaou et al., 2001) και η προέλευση αυτών.

<b>Συστατικά</b>	<b>Συγκέντρωση (g L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Προέλευση</b>
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	7	PENTA
<b>Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b>	2,5	CARLO ERBA Reagents
<b>MgSO<sub>4</sub> * 7H<sub>2</sub>O</b>	1,5	Fluka
<b>FeCl<sub>3</sub> * 6H<sub>2</sub>O</b>	0,15	Fluka
<b>CaCl<sub>2</sub> * 2H<sub>2</sub>O</b>	0,15	Fluka
<b>ZnSO<sub>4</sub> * 7H<sub>2</sub>O</b>	0,02	Mallinckrodt
<b>MnSO<sub>4</sub> * H<sub>2</sub>O</b>	0,06	MERCK

Επιπροσθέτως, χρησιμοποιήθηκαν εκχύλισμα ζύμης (Yeast Extract, LAB) και πεπτόνη (Bacteriological Peptone, CONDA) ως οργανικές πηγές αζώτου ενώ οι συγκεντρώσεις αυτών διαφοροποιήθηκαν κατά την πραγματοποίηση της μελέτης της επίδρασης του λόγου άνθρακα προς άζωτο στην παραγωγή του τελικού προϊόντος της καλλιέργειας. Οι συγκεντρώσεις των οργανικών πηγών αζώτου ανάλογα με το λόγο άνθρακα προς άζωτο παρατίθενται στον Πίνακα 2.4. Για τον υπολογισμό των λόγων λήφθηκαν υπ όψιν το ποσοστό επί της εκατό του άνθρακα του εκάστοτε υποστρώματος (~40%) καθώς και το ποσοστό επί της εκατό του αζώτου που περιείχε το εκχύλισμα ζύμης (11,1%) και η πεπτόνη (14,1%).

**Πίνακας 2.4** Συγκεντρώσεις οργανικών πηγών αζώτου.

<b>Λόγος C/N</b>	<b>Πεπτόνη (g L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Εκχύλισμα ζύμης (g L<sup>-1</sup>)</b>
<b>60</b>	4	2
<b>120</b>	2	1
<b>180</b>	1	1

## 2.4 Συνθήκες ανάπτυξης

### 2.4.1 Ασυνεχείς υγρές ζυμώσεις διαλείποντος έργου

Οι ζυμώσεις έλαβαν χώρο υπό αερόβιες συνθήκες σε κωνικές φιάλες των 250 mL κάθε μια εκ των οποίων περιείχε 50±1 mL θρεπτικού μέσου (ενεργός όγκος) ενώ ο όγκος του εμβολίου ήταν 1mL. Όλα τα υλικά, σκεύη και διαλύματα που

χρησιμοποιήθηκαν, αποστειρώθηκαν προηγουμένως σε αυτόκαυστο στους 121°C για 20 min. Επίσης όλοι οι χειρισμοί πραγματοποιήθηκαν υπό ασηπτικές συνθήκες σε θάλαμο κάθετης νηματικής ροής.



**Εικόνα 2.1** Ανακινούμενος θάλαμος επώασης που χρησιμοποιήθηκε για τις ζυμώσεις διαλείποντος έργου (Zhicheng rocking Incubator, ZHWY-211B).

#### **2.4.2 Ημισυνεχείς υγρές ζυμώσεις σε βιοαντιδραστήρα**

Σε τελικό στάδιο, μετά την επιλογή ενός από τα δύο καλύτερα υποστρώματα και στις καλύτερες συνθήκες όπου παρατηρήθηκε η βέλτιστη παραγωγή αραβιτόλης, πραγματοποιήθηκε ζύμωση σε βιοαντιδραστήρα (Infors HT, Labfors 4) με αρχική συγκέντρωση υποστρώματος  $62,5 \text{ g L}^{-1}$  και ενεργό όγκο 1000 mL. Για τη διεξαγωγή του πειράματος χρησιμοποιήθηκε ως υπόστρωμα η γλυκόζη και εμβόλιο (10% v/v) όπως αναλύθηκε στην Παράγραφο 2.2. Το pH του μέσου παρέμενε σταθερό στο  $6,5 \pm 0,3$  κατά τη διάρκεια της ζύμωσης με αυτόματη προσθήκη NaOH 10M. Ο ρυθμός ανάδευσης ρυθμίστηκε στα 150-400 rpm έτσι ώστε το ποσοστό του διαλυμένου οξυγόνου (Dissolved Oxygen, DO) να διατηρείται στο 20%. Η θερμοκρασία ρυθμίστηκε στους 30 °C ενώ η παροχή αέρα ρυθμίστηκε στο 1 vvm. Για να αποφευχθεί η εξάτμιση του διαλύματος εφαρμόστηκε σύστημα όπου ο αέρας, πριν την εισαγωγή του στο βιοαντιδραστήρα, διαπερνούσε από φίλτρο 0,22 μm και στη συνέχεια από Duran η οποία περιείχε αποστειρωμένο απιονισμένο νερό σε θερμοκρασία δωματίου, με σκοπό ο εισερχόμενος στο βιοαντιδραστήρα αέρας να είναι κορεσμένος σε υγρασία και να αποφευχθεί η εξάτμιση του ενεργού όγκου του διαλύματος.

Η τροφοδότηση της ζύμωσης ξεκινούσε όταν η συγκέντρωση της γλυκόζης έφτανε τα  $15 \text{ g L}^{-1}$  περίπου, με προσθήκη διαλύματος γλυκόζης με αρχική συγκέντρωση σακχάρων  $\sim 450 \text{ g L}^{-1}$ .



**Εικόνα 2.2** Ζύμωση πραγματοποιούμενη σε βιοαντιδραστήρα ημισυνεχούς λειτουργίας κατά τη μελέτη παραγωγής αραβιτόλης με χρήση της ζύμης *Debaryomyces hansenii* και υπόστρωμα συνθετική γλυκόζη.

## 2.5 Μέθοδοι Ανάλυσης

### 2.5.1 Προσδιορισμός pH

Το pH της εκάστοτε καλλιέργειας μετρήθηκε με pH-μετρο τύπου HI 2211 pH meter. Κατά τη μέτρηση του εκάστοτε σημείου της κινητικής πραγματοποιείται διόρθωση του pH στο θρεπτικό μέσο της καλλιέργειας, όπου ήταν αναγκαίο, έτσι ώστε η τιμή του pH να επιστρέψει στην επιθυμητή. Στις αρχικές ζυμώσεις το pH διατηρούνταν σε τιμή  $5,5 \pm 0,3$  ενώ στη συνέχεια αφού επιλέχθηκαν τα καλύτερα υποστρώματα για την βέλτιστη παραγωγή αραβιτόλης πραγματοποιήθηκαν ζυμώσεις όπου το pH διατηρούνταν σε τιμή  $3,5 \pm 0,3$  ή σε τιμή  $6,5 \pm 0,3$  ανάλογα με τη ζύμωση. Η ρύθμιση αυτού πραγματοποιούνταν με 5M NaOH και 5M HCl υπό ασηπτικές συνθήκες

### 2.5.2 Προσδιορισμός ξηρής μάζας

Αρχικά η βιομάζα διαχωρίστηκε μετά από φυγοκέντρηση του δείγματος στα 9000 rpm για 10 min και σε θερμοκρασία 4 °C. Μετά το πέρας της πρώτης φυγοκέντρησης το υπερκείμενο συλλέχθηκε σε Eppendorf των 2 mL για περαιτέρω αναλύσεις. Ακολούθησαν διαδοχικές φυγοκεντρήσεις, υπό τις ίδιες συνθήκες, με χρήση απιονισμένου νερού με σκοπό την έκπλυση της βιομάζας από υπολείμματα του θρεπτικού μέσου της καλλιέργειας. Στη συνέχεια, η βιομάζα μεταφέρθηκε σε προζυγισμένα φιαλίδια τύπου McCartney και τοποθετήθηκε στο φούρνο προς ξήρανση ( $80 \pm 5$  °C) μέχρι σταθερού βάρους.

Ο προσδιορισμός της παραγόμενης βιομάζας στις κωνικές φιάλες καλλιέργειας πραγματοποιούνταν με μέτρηση του ξηρού βάρους. Το ξηρό υπόλειμμα ζυγίστηκε σε ζυγό ακριβείας.

### 2.5.3 Προσδιορισμός σακχάρων

Οι συγκεντρώσεις των σακχάρων σε κάθε περίπτωση προσδιορίστηκαν με χρήση υγρής χρωματογραφίας υψηλής πίεσης (High Performance Liquid Chromatography - HPLC) σε σύστημα Waters 600E. Για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης κάθε ουσίας δημιουργήθηκαν καμπύλες αναφοράς πρότυπων ουσιών ενώ η ταυτοποίηση των σακχάρων βασίστηκε στο χρόνο κατακράτησης καθεμιάς από αυτές τις ουσίες. Όλα τα υπερκείμενα των δειγμάτων που συλλέχθηκαν, αρχικά αραιώθηκαν λαμβάνοντας υπ όψιν τη συγκέντρωση σακχάρων που θεωρητικά είχαν και το εύρος των συγκεντρώσεων που είχε την δυνατότητα να ανιχνεύσει η HPLC σύμφωνα με τις πρότυπες που είχαν περαστεί. Ακολούθησε φιλτράρισμα αυτών με χρήση φίλτρων whatman που διέθεταν μεμβράνη με διάμετρο σπών 0,2 μm.

Ως κινητή φάση για τη στήλη διαχωρισμού χρησιμοποιήθηκε υδατικό διάλυμα H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (5mM) σε απιονισμένο - απεσταγμένο νερό το οποίο υπέστη φιλτράρισμα πριν την χρήση. Η ροή του διαλύτη ήταν ρυθμισμένη στα 0,6 mL min<sup>-1</sup>. Η στήλη με την οποία έγινε ο διαχωρισμός ήταν τύπου Aminex HPX-87H (Biorad, Richmond, USA) σε θερμοκρασία 57 °C. Από τη στήλη περνούσε δείγμα 20 μL και η διάρκεια ανάλυσης ήταν 24 min. Τέλος για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης των σακχάρων λήφθηκε υπ όψιν το εμβαδό της κορυφής καθώς και η εξίσωση της εκάστοτε πρότυπης, συνυπολογίζοντας την αραιώση του δείγματος.

### 2.5.4 Προσδιορισμός ενδοπολυσακχαριτών

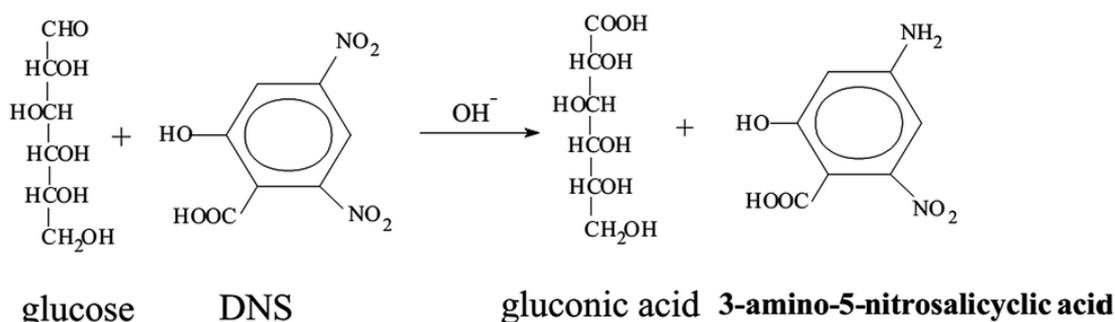
Κατά τη διάρκεια της παρούσας μελέτης, διενεργήθηκε ποσοτικός προσδιορισμός των παραγόμενων ενδοπολυσακχαριτών (Intra-cellular polysaccharides, IPs) σε όλα τα δείγματα κάθε καλλιέργειας. Η συγκέντρωση των ενδοπολυσακχαριτών υπολογίστηκε με διαδικασία η οποία είναι βασισμένη σε τροποποιημένο πρωτόκολλο μεθόδου το οποίο εκδόθηκε από τους Liang et al., (2009).

Από την ποσότητα ξηρής βιομάζας που απομονώθηκε, ζυγίζονταν σε ζυγό ακριβείας (τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων, Kern ABJ & Sohn GmbH) 0,05g ξηρής

βιομάζας τοποθετούνταν σε δοκιμαστικό σωλήνα και αναμιγνύονταν με 10mL υδροχλωρικού οξέος (HCl, 2M). Ακολούθησε υδρόλυση των διαλυμάτων σε υδατόλουτρο (Water bath, Grant) στους 80°C για 30 λεπτά. Στη συνέχεια τα διαλύματα εξουδετερώνονταν με προσθήκη 10 mL καυστικού νατρίου (NaOH, 2M) και διηθούνταν με διπλό διηθητικό χαρτί σε νέους δοκιμαστικούς σωλήνες. Για την ποσοτική ανάλυση των ενδοπολυσακχαριτών, έγινε χρήση της μεθόδου του δινιτροσαλικυλικού οξέος DNS.

#### 2.5.4.1 Προσδιορισμός αναγωγικών σακχάρων με DNS

Η μέθοδος για τον προσδιορισμό των αναγωγικών σακχάρων στηρίζεται στην αναγωγή του 3,5-δινιτροσαλικυλικού οξέος προς 3-αμινο-5-νιτροσαλικυλικό οξύ, παρουσία NaOH και την ταυτόχρονη οξείδωση της γλυκόζης προς γλυκονικό οξύ όπως παρουσιάζεται στην παρακάτω αντίδραση (Miller, 1959).



**Εικόνα 2.3** Η αντίδραση που πραγματοποιείται κατά τη μέθοδο προσδιορισμού των αναγωγικών σακχάρων.

Για την παρασκευή του αντιδραστήριου θερμαίνονται ήπια 400 περίπου mL και προστίθεται 8 g NaOH. Στη συνέχεια προστίθενται 5 g 3,5-δινιτροσαλικυλικό οξύ και μετά 150 g τρυγικό καλιονάτριο. Ο όγκος συμπληρώνεται στα 500 mL. Μετά την παρασκευή του το αντιδραστήριο διατηρείται σε σκούρο μπουκάλι σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.

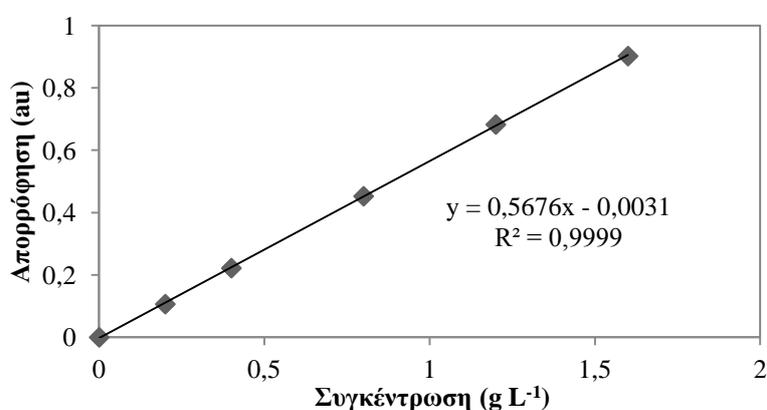
#### Εφαρμογή μεθόδου

Σε γυάλινους δοκιμαστικούς σωλήνες προστέθηκαν 0,5 mL δείγματος και 0,5 mL αντιδραστήριου DNS. Τα δείγματα αναδεύτηκαν και ακολούθησε βρασμός στους



100 °C για 5 λεπτά και αμέσως μετά ψύξη αυτών με νερό (περίπου 5 λεπτά). Έπειτα προστίθενται 5 mL απιονισμένο νερό στα δείγματα και μετά από ανάδευση πραγματοποιείται μέτρηση της απορρόφησης στα 540 nm σε φασματοφωτόμετρο τύπου (Hitachi U-2000 Spectrophotometer). Το τυφλό δείγμα για το μηδενισμό του φασματοφωτόμετρου, περιείχε 0,5 mL απιονισμένο νερό και 0,5 mL αντιδραστηρίου DNS. Η συγκέντρωση του κάθε δείγματος σε ανάγοντα σάκχαρα υπολογίστηκε με βάση την ακόλουθη καμπύλη αναφοράς (Διάγραμμα 2.1) συνυπολογίζοντας την αραιώση ενώ τα αποτελέσματα εκφράστηκαν σε ισοδύναμα γλυκόζης ( $\text{g L}^{-1}$ ).

Για την πρότυπη καμπύλη αναφοράς ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία, χρησιμοποιώντας διαφορετικές αραιώσεις πρότυπου διαλύματος γλυκόζης.



**Διάγραμμα 2.1** Πρότυπη καμπύλη γλυκόζης με τη μέθοδο DNS

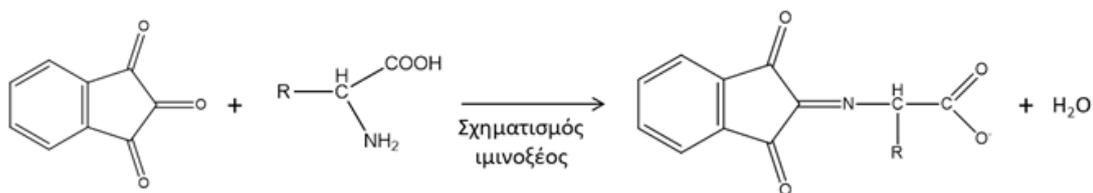


**Εικόνα 2.4** Διαλύματα που προέκυψαν κατά την εφαρμογή της μεθόδου DNS για το σχηματισμό πρότυπης καμπύλης αναφοράς

### 2.5.5 Προσδιορισμός Αζώτου των Ελεύθερων Αμινομάδων (FAN analysis)

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό του αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων (Free Amino Nitrogen, FAN) χρησιμοποιήθηκε η φωτομετρική μέθοδος της νινυδρίνης (Lie, 1973).

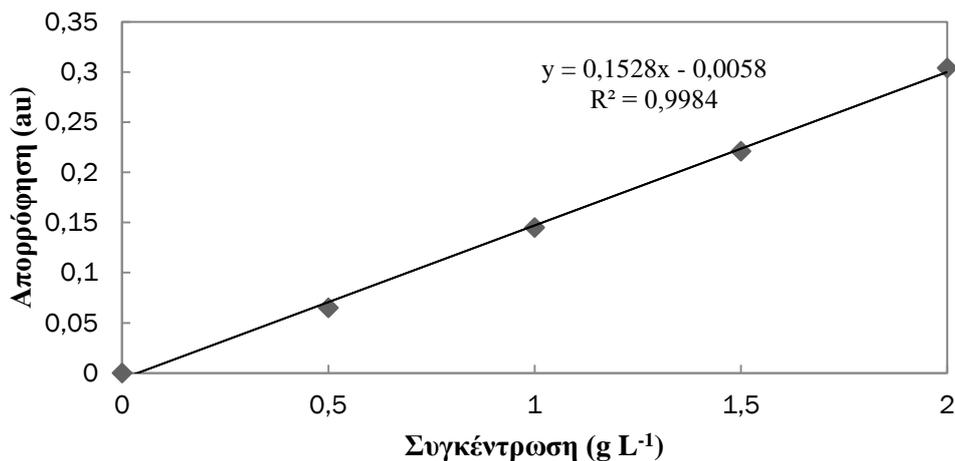
Η νινυδρίνη έχει τη δυνατότητα να αντιδρά με τα αμινοξέα και να παράγει μωβ χρώμα, το οποίο και ανιχνεύεται σε μήκος κύματος 570 nm με τη μέθοδο που αναλύεται στη συνέχεια. Η ένταση του χρώματος που παράγεται είναι ανάλογη της συγκέντρωσης των αμινοξέων που εμπεριέχονται στο δείγμα. Η τελική αντίδραση της νινυδρίνης περιγράφεται ως εξής:



**Εικόνα 2.5** Η αντίδραση που πραγματοποιείται κατά τη μέθοδο προσδιορισμού FAN

#### Εφαρμογή μεθόδου

Σε δοκιμαστικό σωλήνα προστέθηκε 1 mL κατάλληλα αραιωμένου δείγματος και 0,5 mL αντιδραστηρίου χρώσης (color reagent). Οι δοκιμαστικοί σωλήνες πωματίστηκαν και μεταφέρθηκαν σε υδατόλουτρο στους 100°C για 16 λεπτά. Ακολούθησε ψύξη των δειγμάτων σε νερό στους 20 °C για 20 λεπτά. Έπειτα, προστέθηκαν 2,5 mL αντιδραστηρίου αραιώσης (dilution reagent) και αναδεύτηκαν μέχρι αλλαγή χρώματος για 20 δευτερόλεπτα. Τέλος, μετρήθηκε η απορρόφηση σε φασματοφωτόμετρο (Hitachi U-2000 Spectrophotometer) στα 570 nm. Το τυφλό δείγμα για το μηδενισμό του φασματοφωτόμετρου, περιείχε 1 mL απιονισμένο νερό και 0,5 mL αντιδραστηρίου χρώσης. Η συγκέντρωση του δείγματος σε FAN υπολογίστηκε από την πρότυπη καμπύλη αναφοράς εκφρασμένη σε mg L<sup>-1</sup> (Διάγραμμα 2.2). Για την πρότυπη καμπύλη αναφοράς ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία, χρησιμοποιώντας διαφορετικές αραιώσεις πρότυπου διαλύματος γλυκίνης. Η σύσταση των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκε για την μέθοδο FAN περιγράφεται στον Πίνακα 2.5.



Διάγραμμα 2.2 Καμπύλη αναφοράς της γλυκίνης με τη μέθοδο FAN

Πίνακας 2.5 Σύσταση αντιδραστηρίων για την μέτρηση FAN

Αντιδραστήρια για την μέτρηση FAN	Σύσταση
<b>Colour reagent</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 49,71 g όξινο φωσφορικό δινάτριο (<math>\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}</math>), 5 g νινυδρίνη, 3 g φρουκτόζη και περίπου 60 g όξινο διφωσφορικό κάλιο (<math>\text{KH}_2\text{PO}_4</math>) διαλυμένα σε 1 L απεσταγμένο νερό.</li> <li>• pH: 6,6-6,8</li> <li>• Αποθήκευση: 4 °C</li> </ul>
<b>Dilution reagent</b>	2 g ιωδιούχου καλίου ( $\text{KIO}_3$ ) σε 616 mL απεσταγμένο νερό και προσθήκη 384 mL αιθανόλης (καθαρότητας 100%).
<b>Αποθεματικό διάλυμα γλυκίνης (Glycine stock solution)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 0,1072 g γλυκίνης σε 100 mL απεσταγμένο νερό</li> <li>• Αποθήκευση: 4 °C</li> </ul>
<b>Πρότυπο διάλυμα γλυκίνης (Glycine standard solution)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 1 mL διαλύματος γλυκίνης σε 100 mL αποστειρωμένο νερό</li> <li>• 2 mL από το παραπάνω διάλυμα περιέχει 2 mg L<sup>-1</sup> FAN.</li> </ul>

### 2.5.6 Ποσοτικός προσδιορισμός ενδοκυτταρικού λίπους

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό της συγκέντρωσης του ενδοκυτταρικού λίπους, σε επιλεγμένα δείγματα, μετά τη ζύγιση της ξηρής βιομάζας προστέθηκε σε αυτή μικρή ποσότητα μίγματος διαλυτών χλωροφορμίου ( $\text{CHCl}_3$ )– μεθανόλης σε αναλογία 2:1 (Folch et al., 1957, τροποποιημένο από Aggelis et al., 1995). Η χρήση

του συγκεκριμένου διαλύματος έχει τη δυνατότητα να εκχυλίζει το συνολικό μικροβιακό λίπος.

Μετά την πάροδο 72 ωρών, κατά την οποία τα δείγματα παρέμειναν σε ξηρό και σκοτεινό μέρος όπου και πραγματοποιήθηκε η εκχύλιση, έγινε απομάκρυνση της βιομάζας με διήθηση μέσω ηθμού. Το διήθημα συλλέχθηκε και προστέθηκε σε προζυγισμένη με ζυγό ακριβείας φιάλη εξάτμισης. Έπειτα ακολούθησε εξάτμιση του διηθήματος με τη χρήση περιστροφικού εξάτμιστήρα (Flash Evaporator – Rotavapor R-114) υπό κενό, σε θερμοκρασία 50 – 55 °C έτσι ώστε να απομακρυνθούν πλήρως οι διαλύτες και να παραμείνει μόνο το μικροβιακό λίπος. Τέλος, τα ενδοκυτταρικά λιπίδια (L) ζυγίστηκαν σε ζυγό ακριβείας και εκφράστηκαν σε g μικροβιακών λιπιδίων ανά g ξηρής βιομάζας και συνακόλουθα σε g λιπιδίων ανά L καλλιέργειας.



**Εικόνα 2.6** *Debaryomyces Hansenii* EMBT Y-41  
από οπτικό μικροσκόπιο

### 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

#### 3.1 Γενική Παρουσίαση

Στόχος της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής, ήταν η μελέτη της ικανότητας του στελέχους *Debaryomyces hansenii* Y-41 να αναπτύσσεται σε διάφορα υποστρώματα με σκοπό την μέγιστη παραγωγή αραβιτόλης. Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκαν ζυμώσεις σε γλυκόζη και φρουκτόζη εμπορικής προελεύσεως, σε συνθετική ξυλόζη και αραβινόζη, καθώς και σε ακάθαρτη γλυκερόλη. Στη συνέχεια διενεργήθηκε βελτιστοποίηση των συνθηκών ζύμωσης δύο εκ των υποστρωμάτων. Τελικά, έγινε επιλογή των συνθηκών μιας εκ των ζυμώσεων ασυνεχούς λειτουργίας που πραγματοποιήθηκαν, η οποία έδωσε την μέγιστη παραγωγή αραβιτόλης και διεξήχθει σε βιοαντιδραστήρα.

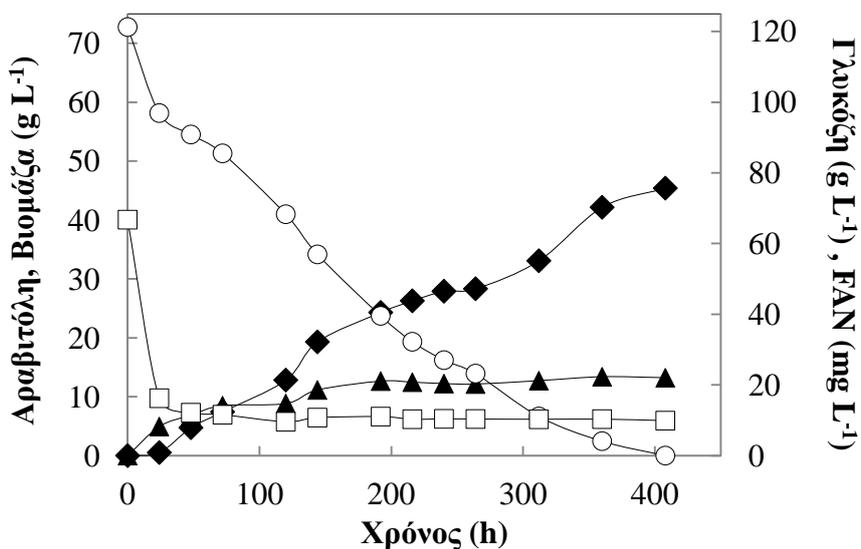
##### 3.1.1 Μελέτη των πηγών άνθρακα ως προς την παραγωγή αραβιτόλης

Ο εν λόγω μικροοργανισμός ανήκει στην κατηγορία των ωσμόφιλων ζυμών, γεγονός που καταστεί δυνατή την ανάπτυξη του σε υψηλές συγκεντρώσεις σακχάρων. Με βάση αυτό, καθώς και λαμβάνοντας υπ' όψιν προηγούμενα πειράματα που είχαν διενεργηθεί, στη συγκεκριμένη εργασία πραγματοποιήθηκαν ζυμώσεις με υψηλή αρχική συγκέντρωση σακχάρων (περίπου  $120 \text{ g L}^{-1}$ ) όπως παρουσιάζεται στον Πίνακα 2.2. Τα πειράματα με τα πέντε διαφορετικά υποστρώματα πραγματοποιήθηκαν σε θερμοκρασία  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $\text{pH } 5,5 \pm 0,3$  και με λόγο άνθρακα προς άζωτο (C/N)  $120 \text{ mol mol}^{-1}$ . Ωστόσο στην συνέχεια της πειραματικής μελέτης παρουσιάζονται μόνο τα υποστρώματα γλυκόζη φρουκτόζη και γλυκερόλη τα οποία αφομοίωσε η ζύμη προς παραγωγή αραβιτόλης.

###### 3.1.1.1 Μικροβιακές ζυμώσεις διαλείποντος έργου σε υπόστρωμα εμπορικής γλυκόζης

Το Διάγραμμα 3.1 απεικονίζει την παραγωγή αραβιτόλης και βιομάζας καθώς επίσης και την κατανάλωση γλυκόζης και FAN κατά την διεξαγωγή ζύμωσης διαλείποντος έργου με την ζύμη *Debaryomyces hansenii* Y-41 στους  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $\text{pH } 5,5$  και λόγο C/N ίσο με  $120 \text{ mol mol}^{-1}$ . Σύμφωνα με αυτό, η μέγιστη συγκέντρωση αραβιτόλης ίση με  $45,40 \text{ g L}^{-1}$  παρατηρήθηκε στις 408 h μικροβιακής ζύμωσης. Την

ίδια χρονική στιγμή η απόδοση της ζύμωσης υπολογίστηκε ως 0,36 g προϊόντος ανά g υποστρώματος και 0,11 g βιομάζας ανά g υποστρώματος. Όσον αφορά τη βιομάζα παρατηρείται ότι μέχρι τις 144 h αυξάνεται με γρήγορο ρυθμό ενώ από τις 192 h μέχρι το τέλος της ζύμωσης η τιμή της παραμένει σχεδόν σταθερή (12,7 g L<sup>-1</sup>) με ελάχιστες διακυμάνσεις. Το FAN παρατηρείται ότι έχει σχεδόν εξαντληθεί στις πρώτες 24 h ζύμωσης. Η αύξηση της αραβιτόλης πραγματοποιείται με σταθερό ρυθμό 0,12 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> στο μεγαλύτερο μέρος της ζύμωσης. Από την άλλη η γλυκόζη καταναλώνεται με ρυθμό 0,30 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> στο τέλος της ζύμωσης ενώ έχει εξαντληθεί πλήρως στις 408 h. Αξίζει να σημειωθεί ότι κατά την μεγαλύτερη χρονική περίοδο τη ζύμωσης από τις 144 h μέχρι τις 312 h η απόδοση του προϊόντος προς το υπόστρωμα ήταν 0,31 g g<sup>-1</sup>.

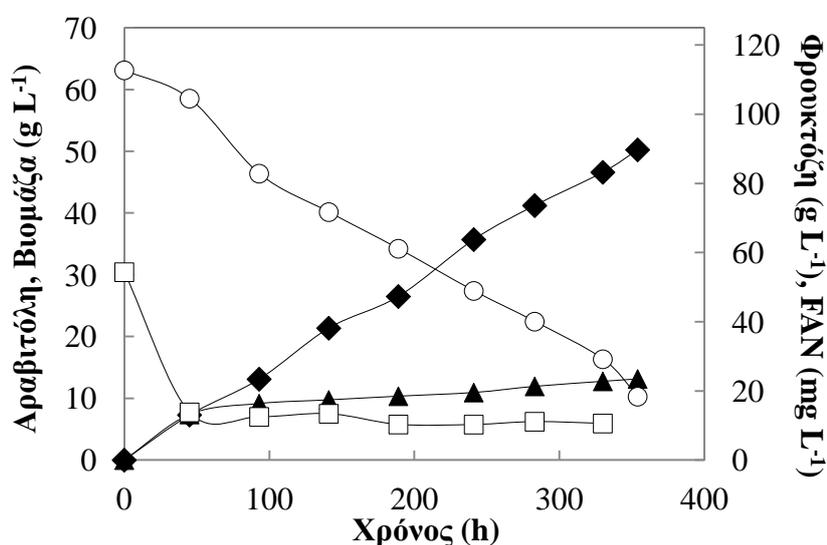


**Διάγραμμα 3.1** Παραγωγή αραβιτόλης (♦) και βιομάζας (▲) και κατανάλωση γλυκόζης (○) και FAN (□) κατά την καλλιέργεια του στελέχους *Debaryomyces hansenii* Y-41 σε υπόστρωμα συνθετικής γλυκόζης στους 30 °C, pH 5,5±0,3 και με λόγο C/N 120 mol mol<sup>-1</sup>.

### 3.1.1.2 Μικροβιακές ζυμώσεις διαλείποντος έργου σε υπόστρωμα εμπορικής φρουκτόζης

Το Διάγραμμα 3.2 απεικονίζει την παραγωγή αραβιτόλης και βιομάζας καθώς επίσης και την κατανάλωση φρουκτόζης και FAN κατά την διεξαγωγή ζύμωσης διαλείποντος έργου με την ζύμη *Debaryomyces hansenii* Y-41 στους 30 °C, pH 5,5 και λόγο C/N ίσο με 120 mol mol<sup>-1</sup>. Σύμφωνα με αυτό, η μέγιστη συγκέντρωση

αραβιτόλης ίση με  $50,24 \text{ g L}^{-1}$  παρατηρήθηκε στις 354 h μικροβιακής ζύμωσης. Την ίδια χρονική στιγμή η απόδοση της ζύμωσης υπολογίστηκε ως  $0,53 \text{ g}$  προϊόντος ανά  $\text{g}$  υποστρώματος και  $0,14 \text{ g}$  βιομάζας ανά  $\text{g}$  υποστρώματος. Όσον αφορά τη βιομάζα παρατηρείται ότι μέχρι τις 93 h αυξάνεται με γρήγορο ρυθμό ενώ από εκείνη τη στιγμή μέχρι το τέλος της ζύμωσης η τιμή της παραμένει σχεδόν σταθερή με μέγιστο στις 354 h όπου είχε τιμή  $13,14 \text{ g L}^{-1}$ . Το FAN παρατηρείται ότι έχει σχεδόν εξαντληθεί στις πρώτες 45 h ζύμωσης. Η αύξηση της αραβιτόλης πραγματοποιείται με σταθερό ρυθμό  $0,14 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  ενώ στο τέλος της ζύμωσης 354 h η ζύμη έχει καταναλώσει το  $83,72 \%$  της φρουκτόζης ( $94,37 \text{ g L}^{-1}$ ) με ρυθμό κατανάλωσης  $0,27 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ .

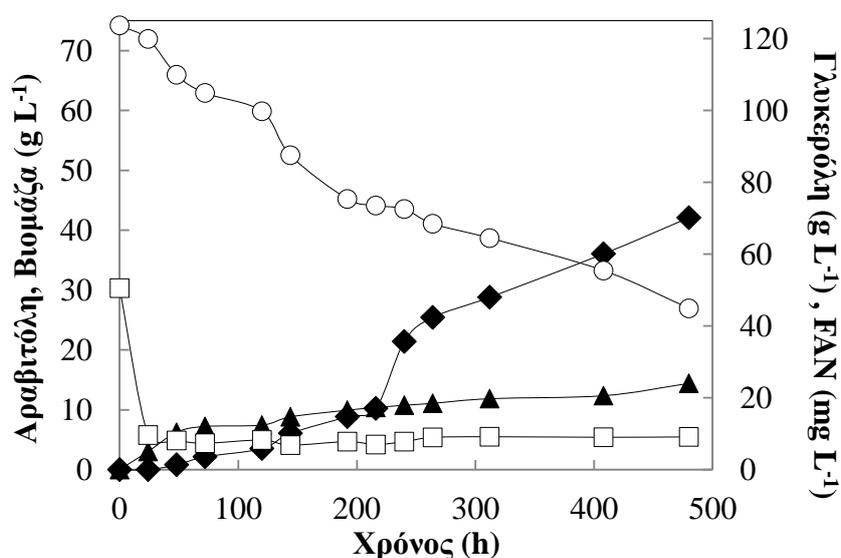


**Διάγραμμα 3.2** Παραγωγή αραβιτόλης (♦) και βιομάζας (▲) και κατανάλωση φρουκτόζης (○) και FAN (□) κατά την καλλιέργεια του στελέχους *Debaryomyces hansenii* Y-41 σε υπόστρωμα συνθετικής φρουκτόζης στους  $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $\text{pH } 5,5 \pm 0,3$  και με λόγο  $\text{C/N } 120 \text{ mol mol}^{-1}$ .

### 3.1.1.3 Μικροβιακές ζυμώσεις διαλείποντος έργου σε υπόστρωμα βιομηχανικής γλυκερόλης

Το Διάγραμμα 3.3 απεικονίζει την παραγωγή αραβιτόλης και βιομάζας καθώς επίσης και την κατανάλωση γλυκερόλης και FAN κατά την διεξαγωγή ζύμωσης διαλείποντος έργου με την ζύμη *Debaryomyces hansenii* Y-41 στους  $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $\text{pH } 5,5$  και λόγο  $\text{C/N}$  ίσο με  $120 \text{ mol mol}^{-1}$ . Σύμφωνα με αυτό, η μέγιστη συγκέντρωση αραβιτόλης ίση με  $42,09 \text{ g L}^{-1}$  παρατηρήθηκε στις 480 h μικροβιακής ζύμωσης ενώ στις 408 h η παραγωγή ήταν  $36,06 \text{ g L}^{-1}$ . Η απόδοση στις χρονικές αυτές περιόδους

ήταν σταθερή στα 0,53 g προϊόντος ανά g υποστρώματος και 0,18 g βιομάζας ανά g υποστρώματος. Όσον αφορά τη βιομάζα, παρατηρείται ότι σε όλη τη διάρκεια της ζύμωσης αυξανόταν με γρήγορο ρυθμό με μέγιστη συγκέντρωση 14,42 g L<sup>-1</sup> στις 480 h. Επιπλέον, το FAN έχει σχεδόν εξαντληθεί στις πρώτες 24 h ζύμωσης. Στην αρχή της ζύμωσης η αραβιτόλη έχει κυμαινόμενο ρυθμό παραγωγής με μέγιστο 0,05 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> στις 216 h ενώ από τις 240 h και μέχρι το τέλος της ζύμωσης είχε σταθερό ρυθμό 0,09 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>. Στο τέλος της ζύμωσης, έχει καταναλωθεί το 63,71 % του υποστρώματος δηλαδή 78,80 g L<sup>-1</sup> με ρυθμό κατανάλωσης 0,16 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>.



**Διάγραμμα 3.3** Παραγωγή αραβιτόλης (♦) και βιομάζας (▲) και κατανάλωση γλυκερόλης (○) και FAN (□) κατά την καλλιέργεια του στελέχους *Debaryomyces hansenii* Y-41 σε υπόστρωμα βιομηχανικής γλυκερόλης στους 30 °C, pH 5,5±0,3 και με λόγο C/N 120 mol mol<sup>-1</sup>.

Σύμφωνα με τα παραπάνω, στην συγκεκριμένη περίπτωση η απόδοση της γλυκερόλης είναι εμφανώς υψηλότερη σε σύγκριση με τη χρήση γλυκόζης και φρουκτόζης ως υπόστρωμα ωστόσο όπως ειπώθηκε παραπάνω στην αρχή της ζύμωσης η ζύμη είχε πολύ μικρή ικανότητα κατανάλωσης του υποστρώματος το οποίο και εν τέλει δεν καταναλώθηκε πλήρως (63,71 %). Επιπροσθέτως, συγκρίνοντας τα δύο υποστρώματα, γλυκερόλη και γλυκόζη, την ίδια χρονική στιγμή (408 h) η γλυκόζη ως υπόστρωμα έδωσε 9,34 g L<sup>-1</sup> περισσότερη αραβιτόλη.

Στη συνέχεια της πειραματικής πορείας, λαμβάνοντας υπ όψιν όλα τα παραπάνω, επιλέχθηκε η γλυκόζη και η φρουκτόζη ως τα υποστρώματα που έδωσαν τη μέγιστη συγκέντρωση αραβιτόλης 45,40 g L<sup>-1</sup> και 32,50 g L<sup>-1</sup> αντίστοιχα, καθώς και τους μέγιστους συντελεστές προϊόντος προς υπόστρωμα 0,36 g g<sup>-1</sup> και 0,32 g g<sup>-1</sup>



αντίστοιχα. Επιπλέον, αναφορικά με τη γλυκερόλη, παρόλο που παρουσίασε υψηλό συντελεστή προϊόντος προς υποστρώματος ( $0,53 \text{ g g}^{-1}$ ) αλλά και υψηλή τελική συγκέντρωση αραβιτόλης ( $42,09 \text{ g L}^{-1}$ ), δεν επιλέχθηκε για επιπλέον έρευνα λόγω του γεγονότος ότι η ζύμη άρχισε να αναπτύσσεται σε αξιόλογο βαθμό μετά από 200 h καλλιέργειας καθώς και γιατί έχει μελετηθεί εκτενώς στη βιβλιογραφία.

Επιπλέον θα πρέπει να αναφερθεί το γεγονός ότι στις παραπάνω ζυμώσεις πραγματοποιήθηκε μελέτη για την δυνατότητα παραγωγής μικροβιακού λίπους με χρήση των υποστρωμάτων γλυκόζη, φρουκτόζη και γλυκερόλη. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η ζύμη που χρησιμοποιήθηκε για την συγκεκριμένη μελέτη δεν είναι ελαιογόνος ενώ τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.1.

**Πίνακας 3.1** Παραγωγή λιπιδίων των μικροβιακών ζυμώσεων με υπόστρωμα γλυκόζη φρουκτόζη και γλυκερόλη από τον μικροοργανισμό *Debaryomyces hansenii*.

<b>Ζύμωση</b>	<b>Χρόνος (h)</b>	<b>Lipids %</b>
<b>Glucose 30 °C, pH 5,5, C/N 120</b>	96	3,44
	312	3,73
<b>Glycerol 30 °C, pH 5,5, C/N 120</b>	96	4,38
	312	4,23
<b>Fructose 30°C, pH 5,5,C/N 120</b>	96	2,34
	192	2,46

Τέλος, όσον αφορά τα υποστρώματα αραβινόζη και ξυλόζη παρατηρήθηκε ανικανότητα του στελέχους *Debaryomyces hansenii* Y-41 να τα καταναλώσει προς παραγωγή προϊόντος.

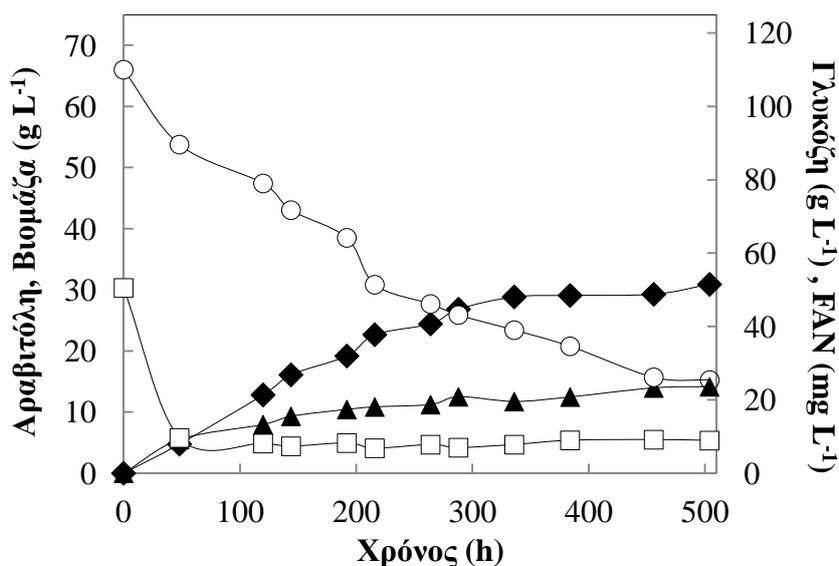
### **3.1.2 Μελέτη της επίδρασης των θερμοκρασιών ως προς την παραγωγή αραβιτόλης**

Στη συνέχεια της μελέτης, πραγματοποιήθηκαν πειράματα με διαφορετικές θερμοκρασίες ( $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$  και  $32 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ) χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα εμπορική γλυκόζη με στόχο τη βελτιστοποίηση της διεργασίας παραγωγής αραβιτόλης.

#### **3.1.2.1 Μικροβιακές ζυμώσεις διαλείποντος έργου σε εμπορική γλυκόζη και σε θερμοκρασία $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$**

Το Διάγραμμα 3.4 απεικονίζει την παραγωγή αραβιτόλης και βιομάζας καθώς επίσης και την κατανάλωση γλυκόζης και FAN κατά την διεξαγωγή ζύμωσης

διαλείποντος έργου με την ζύμη *Debaryomyces hansenii* Y-41 στους 25 °C, pH 5,5 και λόγο C/N ίσο με 120 mol mol<sup>-1</sup>. Σύμφωνα με αυτό, η μέγιστη συγκέντρωση αραβιτόλης ίση με 30,90 g L<sup>-1</sup> παρατηρήθηκε στις 504 h μικροβιακής ζύμωσης. Την ίδια χρονική στιγμή η απόδοση της ζύμωσης υπολογίστηκε ως 0,37 g προϊόντος ανά g υποστρώματος και 0,17 g βιομάζας ανά g υποστρώματος. Όσον αφορά τη βιομάζα παρατηρείται ότι μέχρι τις 144 h αυξάνεται με γρήγορο ρυθμό ενώ από τις 192 h μέχρι το τέλος της ζύμωσης η τιμή της παραμένει σχεδόν σταθερή (12,4 g L<sup>-1</sup>) και μέγιστη τιμή ίση με 14,14 g L<sup>-1</sup> στο τέλος της ζύμωσης. Το FAN παρατηρείται ότι έχει σχεδόν εξαντληθεί στις πρώτες 48 h ζύμωσης. Η αύξηση της αραβιτόλης πραγματοποιείται με σταθερό ρυθμό 0,10 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> μέχρι και τις 288 h ενώ στην συνέχεια ο ρυθμός παραγωγής ανά ώρα σταθερά μειώνεται. Στο τέλος της ζύμωσης 504 h η ζύμη έχει καταναλώσει το 76,89 % του υποστρώματος με ρυθμό κατανάλωσης 0,17 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>.

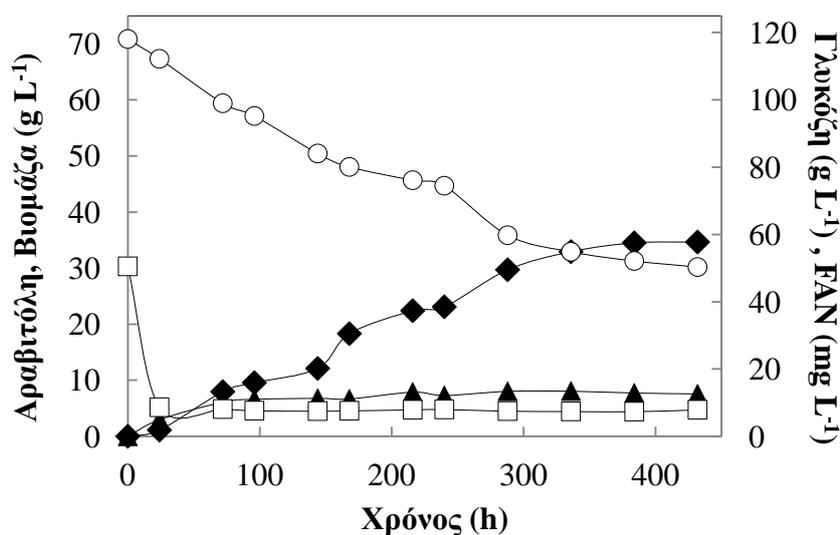


**Διάγραμμα 3.4** Παραγωγή αραβιτόλης (♦) και βιομάζας (▲) και κατανάλωση γλυκόζης (○) και FAN (□) κατά την καλλιέργεια του στελέχους *Debaryomyces hansenii* Y-41 σε υπόστρωμα συνθετικής γλυκόζης στους 25 °C, pH 5,5±0,3 και με λόγο C/N 120 mol mol<sup>-1</sup>.

### 3.1.2.2 Μικροβιακές ζυμώσεις διαλείποντος έργου σε εμπορική γλυκόζη και σε θερμοκρασία 32 °C

Το Διάγραμμα 3.5 απεικονίζει την παραγωγή αραβιτόλης και βιομάζας καθώς επίσης και την κατανάλωση γλυκόζης και FAN κατά την διεξαγωγή ζύμωσης διαλείποντος έργου με την ζύμη *Debaryomyces hansenii* Y-41 στους 32 °C, pH 5,5

και λόγο C/N ίσο με  $120 \text{ mol mol}^{-1}$ . Σύμφωνα με αυτό, η μέγιστη συγκέντρωση αραβιτόλης ίση με  $34,65 \text{ g L}^{-1}$  παρατηρήθηκε στις 432 h μικροβιακής ζύμωσης. Την ίδια χρονική στιγμή η απόδοση της ζύμωσης υπολογίστηκε ως  $0,51 \text{ g}$  προϊόντος ανά  $\text{g}$  υποστρώματος και  $0,11 \text{ g}$  βιομάζας ανά  $\text{g}$  υποστρώματος. Όσον αφορά τη βιομάζα παρατηρείται ότι μέχρι τις 72 h αυξάνεται με γρήγορο ρυθμό ενώ από τις 96 h μέχρι το τέλος της ζύμωσης η τιμή της παραμένει σχεδόν σταθερή, με μικρές διακυμάνσεις και μέγιστη τιμή ίση με  $8,06 \text{ g L}^{-1}$  στις 336 h. Το FAN παρατηρείται ότι έχει σχεδόν εξαντληθεί στις πρώτες 24 h ζύμωσης. Η αύξηση της αραβιτόλης πραγματοποιείται με σταθερό ρυθμό  $0,10 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  σχεδόν σε όλη τη διάρκεια της ζύμωσης. Στο τέλος της ζύμωσης 432 h η ζύμη έχει καταναλώσει το  $57,39 \%$  του υποστρώματος με ρυθμό κατανάλωσης  $0,16 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ .



**Διάγραμμα 3.5** Παραγωγή αραβιτόλης (♦) και βιομάζας (▲) και κατανάλωση γλυκόζης (○) και FAN (□) κατά την καλλιέργεια του στελέχους *Debaryomyces hansenii* Y-41 σε υπόστρωμα συνθετικής γλυκόζης στους  $32 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $\text{pH } 5,5 \pm 0,3$  και με λόγο C/N  $120 \text{ mol mol}^{-1}$ .

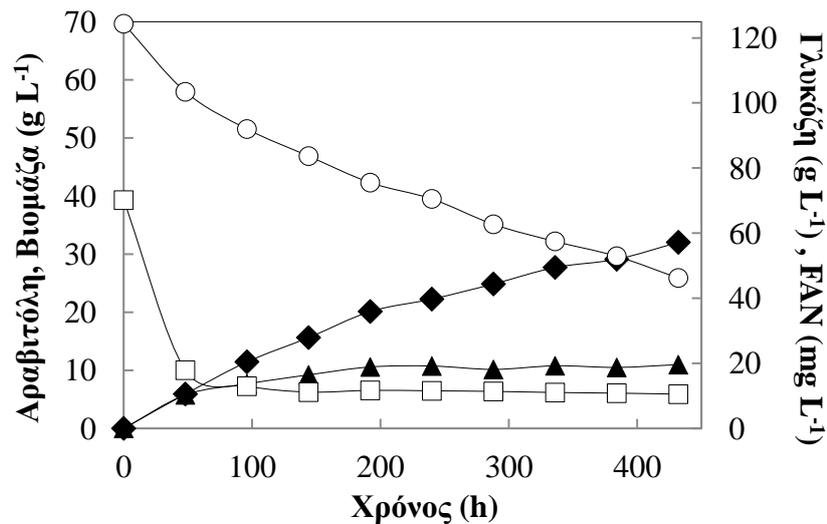
Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι και στις δύο ζυμώσεις το στέλεχος αναπτύχθηκε και έδωσε ικανοποιητικά αποτελέσματα, με επικρατέστερη τη δεύτερη ζύμωση στους  $32 \text{ }^{\circ}\text{C}$ . Ωστόσο στη ζύμωση που πραγματοποιήθηκε στους  $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$  (Διάγραμμα 3.1) παράχθηκε μεγαλύτερη ποσότητα αραβιτόλης σε μικρότερο χρονικό διάστημα. Για το λόγο αυτό για τα πειράματα που ακολούθησαν επιλέχθηκε η θερμοκρασία των  $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### 3.1.3 Μελέτη της επίδρασης διαφορετικών τιμών pH ως προς τη παραγωγή αραβιτόλης

Αφού επιλέχθηκε η θερμοκρασία των 30 °C ως η πιο αποδοτική για την παραγωγή αραβιτόλης πραγματοποιήθηκαν ζυμώσεις τόσο με υπόστρωμα γλυκόζης όσο και με φρουκτόζη, με διαφορετικά pH (3,5±0,3 και 6,5±0,3) και διαφορετικούς λόγους C/N (60mol mol<sup>-1</sup> και 180 mol mol<sup>-1</sup>).

#### 3.1.3.1 Μικροβιακές ζυμώσεις διαλείποντος έργου σε εμπορική γλυκόζη, σε pH 3,5±0,3

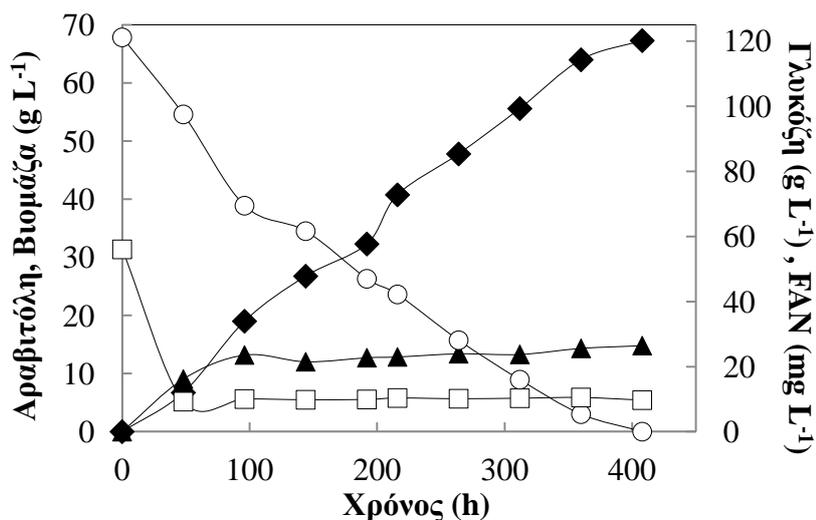
Το Διάγραμμα 3.6 απεικονίζει την παραγωγή αραβιτόλης και βιομάζας καθώς επίσης και την κατανάλωση γλυκόζης και FAN κατά την διεξαγωγή ζύμωσης διαλείποντος έργου με την ζύμη *Debaryomyces hansenii* Y-41 στους 30 °C, pH 3,5 και λόγο C/N ίσο με 120 mol mol<sup>-1</sup>. Σύμφωνα με αυτό, η μέγιστη συγκέντρωση αραβιτόλης ίση με 32,02 g L<sup>-1</sup> παρατηρήθηκε στις 432 h μικροβιακής ζύμωσης. Την ίδια χρονική στιγμή η απόδοση της ζύμωσης υπολογίστηκε ως 0,41 g προϊόντος ανά g υποστρώματος και 0,14 g βιομάζας ανά g υποστρώματος. Όσον αφορά τη βιομάζα παρατηρείται ότι μέχρι τις 48 h αυξάνεται με γρήγορο ρυθμό ενώ από τις 96 h μέχρι το τέλος της ζύμωσης η τιμή της παραμένει σχεδόν σταθερή, με μικρές διακυμάνσεις και μέγιστη τιμή ίση με 10,96 g L<sup>-1</sup> στο τέλος της ζύμωσης. Το FAN παρατηρείται ότι έχει σχεδόν εξαντληθεί στις πρώτες 48 h ζύμωσης. Η αύξηση της αραβιτόλης πραγματοποιείται με σταθερό ρυθμό 0,10 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> μέχρι και τις 192 h ενώ στην συνέχεια ο ρυθμός παραγωγής ανά ώρα μειώνεται σταδιακά. Στο τέλος της ζύμωσης 432 h η ζύμη έχει καταναλώσει το 62,82 % του υποστρώματος με ρυθμό κατανάλωσης 0,18 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>.



**Διάγραμμα 3.6** Παραγωγή αραβιτόλης (◆) και βιομάζας (▲) και κατανάλωση γλυκόζης (○) και FAN (□) κατά την καλλιέργεια του στελέχους *Debaryomyces hansenii* Y-41 σε υπόστρωμα συνθετικής γλυκόζης στους 30 °C, pH 3,5±0,3 και με λόγο C/N 120 mol mol<sup>-1</sup>.

### 3.1.3.2 Μικροβιακές ζυμώσεις διαλείποντος έργου σε εμπορική γλυκόζη με θερμοκρασία 30 °C και pH 6,5±0,3

Το Διάγραμμα 3.7 απεικονίζει την παραγωγή αραβιτόλης και βιομάζας καθώς επίσης και την κατανάλωση γλυκόζης και FAN κατά την διεξαγωγή ζύμωσης διαλείποντος έργου με την ζύμη *Debaryomyces hansenii* Y-41 στους 30 °C, pH 6,5 και λόγο C/N ίσο με 120 mol mol<sup>-1</sup>. Σύμφωνα με αυτό, η μέγιστη συγκέντρωση αραβιτόλης ίση με 67,30 g L<sup>-1</sup> παρατηρήθηκε στις 408 h μικροβιακής ζύμωσης. Την ίδια χρονική στιγμή η απόδοση της ζύμωσης υπολογίστηκε ως 0,56 g προϊόντος ανά g υποστρώματος και 0,12 g βιομάζας ανά g υποστρώματος. Όσον αφορά τη βιομάζα παρατηρείται ότι μέχρι τις 96 h αυξάνεται με γρήγορο ρυθμό ενώ από εκείνη τη χρονική στιγμή μέχρι το τέλος της ζύμωσης η τιμή της παραμένει σχεδόν σταθερή, με μικρές διακυμάνσεις και μέγιστη τιμή ίση με 14,81 g L<sup>-1</sup> στο τέλος της ζύμωσης. Το FAN παρατηρείται ότι έχει σχεδόν εξαντληθεί στις πρώτες 48 h ζύμωσης. Η αύξηση της αραβιτόλης πραγματοποιείται με σταθερό ρυθμό 0,18 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> σχεδόν σε όλη τη διάρκεια της ζύμωσης. Στο τέλος της ζύμωσης, 408 h το υπόστρωμα έχει καταναλωθεί πλήρως με ρυθμό κατανάλωσης 0,30 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>.



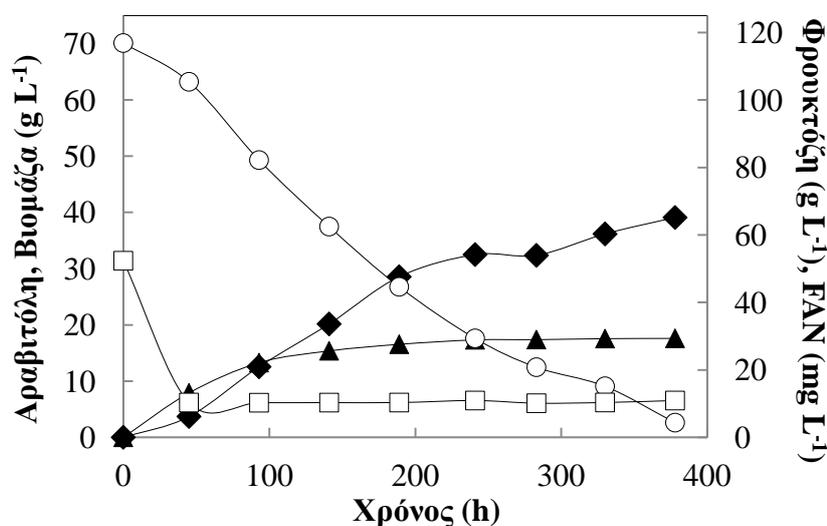
**Διάγραμμα 3.7** Παραγωγή αραβιτόλης (♦) και βιομάζας (▲) και κατανάλωση γλυκόζης (○) και FAN (□) κατά την καλλιέργεια του στελέχους *Debaryomyces hansenii* Y-41 σε υπόστρωμα συνθετικής γλυκόζης στους 30 °C, pH 6,5±0,3 και με λόγο C/N 120 mol mol<sup>-1</sup>.

Παρατηρώντας την κινητική της ζύμωσης που πραγματοποιήθηκε με χρήση γλυκόζης ως υπόστρωμα σε χαμηλή τιμή pH (Διάγραμμα 3.6), είναι φανερό πως το pH 3,5±0,3 είναι λιγότερο ευνοϊκό από το pH 5,5±0,3 το οποίο παρουσιάζεται στο Διάγραμμα 3.1. Παρόλο που η απόδοση στην περίπτωση του χαμηλού pH ήταν σταθερή, από τις 192 h και έπειτα, στην τιμή 0,41 g g<sup>-1</sup>, η συγκέντρωση της αραβιτόλης στις 432 h έφτασε τα 32,02 g L<sup>-1</sup> ενώ την ίδια χρονική στιγμή σε pH 5,5±0,3 η συγκέντρωση αυτής ήταν 45,40 g L<sup>-1</sup>. Σε αντίθεση με τα παραπάνω, όπως παρατηρείται στο Διάγραμμα 3.7, σε υψηλότερη τιμή pH 6,5±0,3, η αραβιτόλη είχε τη μέγιστη τιμή της με πλήρη κατανάλωση του υποστρώματος.

### 3.1.3.3 Μικροβιακές ζυμώσεις διαλείποντος έργου σε εμπορική φρουκτόζη σε θερμοκρασία 30 °C και pH 3,5±0,3

Το Διάγραμμα 3.8 απεικονίζει την παραγωγή αραβιτόλης και βιομάζας καθώς επίσης και την κατανάλωση φρουκτόζης και FAN κατά την διεξαγωγή ζύμωσης διαλείποντος έργου με την ζύμη *Debaryomyces hansenii* Y-41 στους 30 °C, pH 3,5 και λόγο C/N ίσο με 120 mol mol<sup>-1</sup>. Σύμφωνα με αυτό, η μέγιστη συγκέντρωση αραβιτόλης ίση με 39,10 g L<sup>-1</sup> παρατηρήθηκε στις 378 h μικροβιακής ζύμωσης. Την ίδια χρονική στιγμή η απόδοση της ζύμωσης υπολογίστηκε ως 0,35 g προϊόντος ανά g υποστρώματος και 0,16 g βιομάζας ανά g υποστρώματος. Όσον αφορά τη βιομάζα

παρατηρείται ότι μέχρι τις 93 h αυξάνεται με γρήγορο ρυθμό ενώ από εκείνη τη χρονική στιγμή μέχρι το τέλος της ζύμωσης η τιμή της παραμένει σχεδόν σταθερή, με μικρές διακυμάνσεις και μέγιστη τιμή ίση με  $17,61 \text{ g L}^{-1}$  στο τέλος της ζύμωσης. Το FAN παρατηρείται ότι έχει σχεδόν εξαντληθεί στις πρώτες 45 h ζύμωσης. Η αύξηση της αραβιτόλης πραγματοποιείται με σταθερό ρυθμό  $0,13 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  μέχρι και τις 241 h ενώ στην συνέχεια ο ρυθμός παραγωγής ανά ώρα μειώνεται σταδιακά. Στο τέλος της ζύμωσης 378 h το υπόστρωμα έχει σχεδόν καταναλωθεί με ρυθμό κατανάλωσης  $0,30 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ .

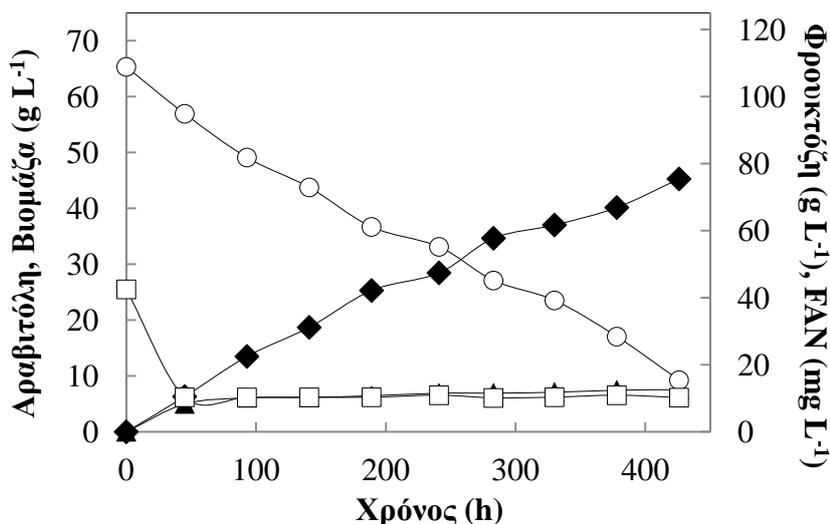


**Διάγραμμα 3.8** Παραγωγή αραβιτόλης (♦) και βιομάζας (▲) και κατανάλωση φρουκτόζης (○) και FAN (□) κατά την καλλιέργεια του στελέχους *Debaryomyces hansenii* Y-41 σε υπόστρωμα συνθετικής φρουκτόζης στους  $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $\text{pH } 3,5 \pm 0,3$  και με λόγο  $\text{C/N } 120 \text{ mol mol}^{-1}$ .

#### 3.1.3.4 Μικροβιακές ζυμώσεις διαλείποντος έργου σε εμπορική φρουκτόζη σε θερμοκρασία $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$ και $\text{pH } 6,5 \pm 0,3$

Το Διάγραμμα 3.9 απεικονίζει την παραγωγή αραβιτόλης και βιομάζας καθώς επίσης και την κατανάλωση φρουκτόζης και FAN κατά την διεξαγωγή ζύμωσης διαλείποντος έργου με την ζύμη *Debaryomyces hansenii* Y-41 στους  $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $\text{pH } 3,5$  και λόγο  $\text{C/N}$  ίσο με  $120 \text{ mol mol}^{-1}$ . Σύμφωνα με αυτό, η μέγιστη συγκέντρωση αραβιτόλης ίση με  $45,27 \text{ g L}^{-1}$  παρατηρήθηκε στις 426 h μικροβιακής ζύμωσης. Την ίδια χρονική στιγμή η απόδοση της ζύμωσης υπολογίστηκε ως  $0,48 \text{ g}$  προϊόντος ανά  $\text{g}$  υποστρώματος και  $0,08 \text{ g}$  βιομάζας ανά  $\text{g}$  υποστρώματος. Όσον αφορά τη βιομάζα παρατηρείται ότι μέχρι τις 93 h αυξάνεται με γρήγορο ρυθμό ενώ από εκείνη τη χρονική στιγμή μέχρι το τέλος της ζύμωσης η τιμή της παραμένει σχεδόν σταθερή, με

μικρές διακυμάνσεις και μέγιστη τιμή ίση με  $7,56 \text{ g L}^{-1}$  στο τέλος της ζύμωσης. Το FAN παρατηρείται ότι έχει σχεδόν εξαντληθεί στις πρώτες 45 h ζύμωσης. Η αύξηση της αραβιτόλης πραγματοποιείται με σταθερό ρυθμό  $0,13 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  μέχρι και τις 189 h ενώ στην συνέχεια ο ρυθμός παραγωγής ανά ώρα μειώνεται σταδιακά. Στο τέλος της ζύμωσης 426 h το υπόστρωμα έχει σχεδόν καταναλωθεί με ρυθμό κατανάλωσης  $0,22 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ .



**Διάγραμμα 3.9** Παραγωγή αραβιτόλης (♦) και βιομάζας (▲) και κατανάλωση φρουκτόζης (○) και FAN (□) κατά την καλλιέργεια του στελέχους *Debaryomyces hansenii* Y-41 σε υπόστρωμα συνθετικής φρουκτόζης στους  $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $\text{pH } 6,5 \pm 0,3$  και με λόγο  $\text{C/N } 120 \text{ mol mol}^{-1}$ .

Τα Διαγράμματα 3.8 και 3.9 αφορούν τις κινητικές που διεξήχθησαν με το στέλεχος *Debaryomyces hansenii* Y-41, με χρήση φρουκτόζης ως υπόστρωμα στους  $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$  και σε  $\text{pH } 3,5 \pm 0,3$  και  $6,5 \pm 0,3$  αντίστοιχα. Στο πείραμα με το χαμηλό  $\text{pH}$  η αραβιτόλη είχε συγκέντρωση  $36,17 \text{ g L}^{-1}$  στις 330h με σταθερή απόδοση  $0,35 \text{ g}$  προϊόντος ανά  $\text{g}$  υποστρώματος. Την ίδια χρονική στιγμή η βιομάζα είχε τιμή  $17,57 \text{ g L}^{-1}$  με απόδοση  $0,17 \text{ g g}^{-1}$ . Όσον αφορά τη ζύμωση με το  $\text{pH}$  να κυμαίνεται σε τιμή  $6,5 \pm 0,3$ , η συγκέντρωση του προϊόντος την ίδια χρονική στιγμή (330 h) είχε πολύ μικρή διαφορά με τη συγκέντρωση σε χαμηλό  $\text{pH}$ . Συγκεκριμένα, η συγκέντρωση σε  $\text{pH } 6,5 \pm 0,3$  ήταν  $37,02 \text{ g L}^{-1}$  με απόδοση προϊόντος  $0,53 \text{ g g}^{-1}$  ενώ η βιομάζα ήταν  $7,09 \text{ g L}^{-1}$  με απόδοση  $0,1 \text{ g g}^{-1}$ .

Συγκρίνοντας τα δύο αυτά πειράματα, Διάγραμμα 3.8 και 3.9, με τη ζύμωση που παρατίθενται στο Διάγραμμα 3.2, το οποίο έχει ίδιες συνθήκες και  $\text{pH } 5,5 \pm 0,3$ , και στο οποίο η αραβιτόλη είχε συγκέντρωση  $32,50 \text{ g L}^{-1}$  στις 336 h με απόδοση  $0,32$



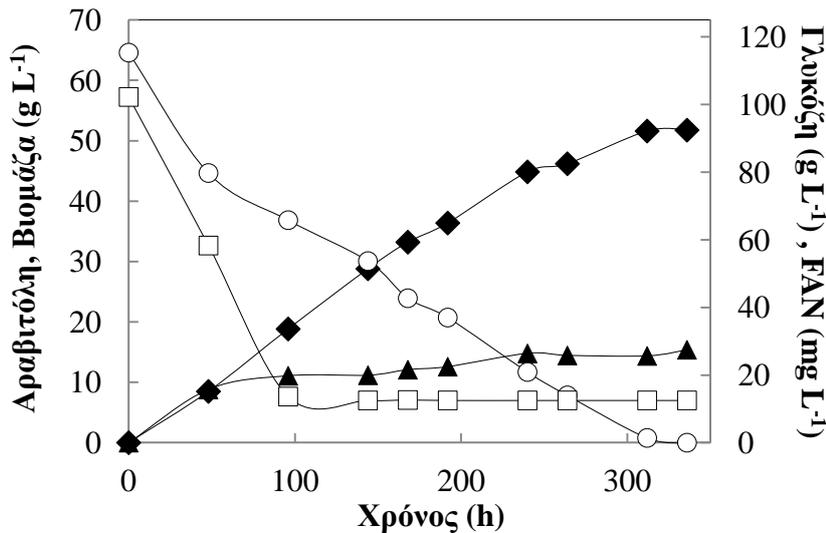
$\text{g g}^{-1}$  είναι φανερό ότι όπως συμβαίνει στη γλυκόζη έτσι και στην περίπτωση της χρήσης φρουκτόζης ως υπόστρωμα το υψηλό pH είναι ευνοϊκότερο για την μέγιστη παραγωγή αραβιτόλης.

Στη συνέχεια της πειραματικής διαδικασίας, πραγματοποιήθηκαν πειράματα με σταθερή θερμοκρασία  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ , με διαφορετικούς λόγους άνθρακα αζώτου καθώς και σε διαφορετικά pH με χρήση των υποστρωμάτων γλυκόζης και φρουκτόζης, τα οποία επιλέχθηκαν ως τα βέλτιστα για την παραγωγή αραβιτόλης.

### **3.1.4 Μελέτη της επίδρασης των λόγων άνθρακα προς άζωτο ως προς την παραγωγή αραβιτόλης**

#### *3.1.4.1 Μικροβιακές ζυμώσεις διαλείποντος έργου σε εμπορική γλυκόζη, σε θερμοκρασία $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ , pH $6,5\pm 0,3$ και C/N $60\text{ mol mol}^{-1}$*

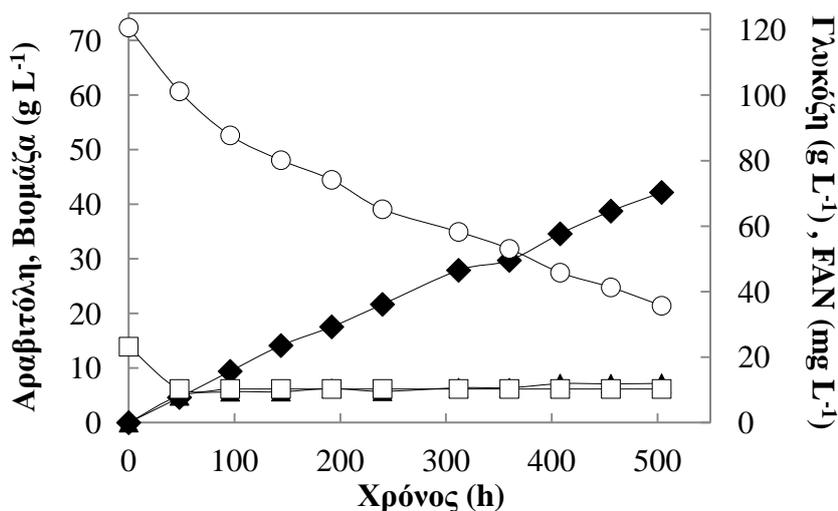
Το Διάγραμμα 3.10 απεικονίζει την παραγωγή αραβιτόλης και βιομάζας καθώς επίσης και την κατανάλωση γλυκόζης και FAN κατά την διεξαγωγή ζύμωσης διαλείποντος έργου με την ζύμη *Debaryomyces hansenii* Y-41 στους  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ , pH 6,5 και λόγο C/N ίσο με  $60\text{ mol mol}^{-1}$ . Σύμφωνα με αυτό, η μέγιστη συγκέντρωση αραβιτόλης ίση με  $51,75\text{ g L}^{-1}$  παρατηρήθηκε στις 336 h μικροβιακής ζύμωσης. Την ίδια χρονική στιγμή η απόδοση της ζύμωσης υπολογίστηκε ως  $0,45\text{ g}$  προϊόντος ανά  $\text{g}$  υποστρώματος και  $0,13\text{ g}$  βιομάζας ανά  $\text{g}$  υποστρώματος. Όσον αφορά τη βιομάζα, παρατηρείται ότι μέχρι τις 96 h αυξάνεται με γρήγορο ρυθμό ενώ από εκείνη τη χρονική στιγμή μέχρι το τέλος της ζύμωσης η τιμή της παραμένει σχεδόν σταθερή, με μικρές διακυμάνσεις και μέγιστη τιμή ίση με  $15,38\text{ g L}^{-1}$  στο τέλος της ζύμωσης. Το FAN στην συγκεκριμένη περίπτωση παρατηρείται ότι έχει σχεδόν εξαντληθεί στις πρώτες 96 h ζύμωσης. Η αύξηση της αραβιτόλης πραγματοποιείται με σταθερό ρυθμό  $0,20\text{ g L}^{-1}\text{ h}^{-1}$  μέχρι και τις 168 h ενώ στην συνέχεια ο ρυθμός παραγωγής ανά ώρα μειώνεται σταδιακά. Στο τέλος της ζύμωσης 336 h το υπόστρωμα έχει καταναλωθεί πλήρως με ρυθμό κατανάλωσης  $0,34\text{ g L}^{-1}\text{ h}^{-1}$ .



**Διάγραμμα 3.10** Παραγωγή αραβιτόλης (♦) και βιομάζας (▲) και κατανάλωση γλυκόζης (○) και FAN (□) κατά την καλλιέργεια του στελέχους *Debaryomyces hansenii* Y-41 σε υπόστρωμα συνθετικής γλυκόζης στους 30 °C, pH 6,5±0,3 και με λόγο C/N 60 mol mol<sup>-1</sup>.

#### 3.1.4.2 Μικροβιακές ζυμώσεις διαλείποντος έργου σε εμπορική γλυκόζη σε συνθήκες 30 °C, pH 6,5±0,3 και C/N 180 mol mol<sup>-1</sup>

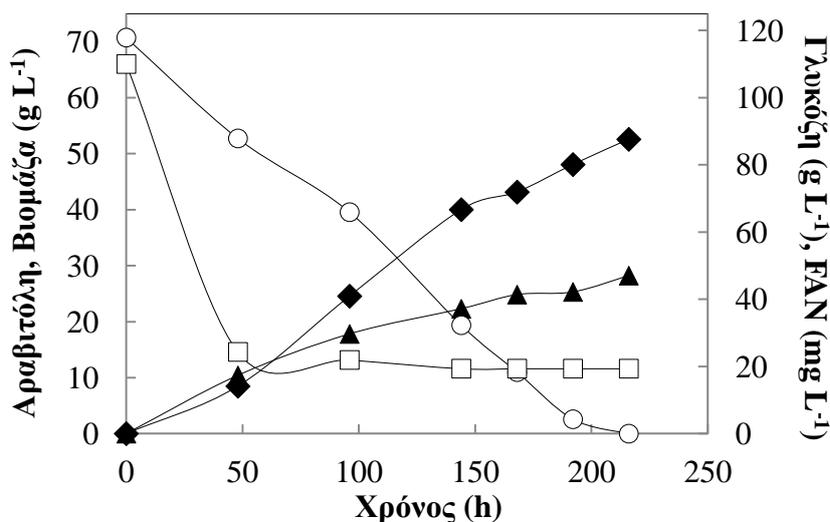
Το Διάγραμμα 3.11 απεικονίζει την παραγωγή αραβιτόλης και βιομάζας καθώς επίσης και την κατανάλωση γλυκόζης και FAN κατά την διεξαγωγή ζύμωσης διαλείποντος έργου με την ζύμη *Debaryomyces hansenii* Y-41 στους 30 °C, pH 6,5 και λόγο C/N ίσο με 180 mol mol<sup>-1</sup>. Σύμφωνα με αυτό, η μέγιστη συγκέντρωση αραβιτόλης ίση με 42,18 g L<sup>-1</sup> παρατηρήθηκε στις 504 h μικροβιακής ζύμωσης. Την ίδια χρονική στιγμή η απόδοση της ζύμωσης υπολογίστηκε ως 0,50 g προϊόντος ανά g υποστρώματος και 0,09 g βιομάζας ανά g υποστρώματος. Όσον αφορά τη βιομάζα, παρατηρείται ότι μέχρι τις 48 h αυξάνεται με γρήγορο ρυθμό ενώ από εκείνη τη χρονική στιγμή μέχρι το τέλος της ζύμωσης η τιμή της παραμένει σχεδόν σταθερή, με μικρές διακυμάνσεις και μέγιστη τιμή ίση με 7,22 g L<sup>-1</sup> στο τέλος της ζύμωσης. Το FAN παρατηρείται ότι έχει σχεδόν εξαντληθεί στις πρώτες 48 h ζύμωσης. Η αύξηση της αραβιτόλης πραγματοποιείται με σταθερό ρυθμό 0,10 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> μέχρι και τις 144 h ενώ στην συνέχεια ο ρυθμός παραγωγής ανά ώρα μειώνεται σταδιακά. Στο τέλος της ζύμωσης 504 h το υπόστρωμα έχει καταναλωθεί κατά 70,41 % με ρυθμό κατανάλωσης 0,17 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>.



**Διάγραμμα 3.11** Παραγωγή αραβιτόλης (◆) και βιομάζας (▲) και κατανάλωση γλυκόζης (○) και FAN (□) κατά την καλλιέργεια του στελέχους *Debaryomyces hansenii* Y-41 σε υπόστρωμα συνθετικής γλυκόζης στους 30 °C, pH 6,5±0,3 και με λόγο C/N 180 mol mol<sup>-1</sup>.

### 3.1.4.3 Μικροβιακές ζυμώσεις διαλείποντος έργου σε εμπορική γλυκόζη σε θερμοκρασία 30 °C, pH 5,5±0,3 και C/N 60 mol mol<sup>-1</sup>

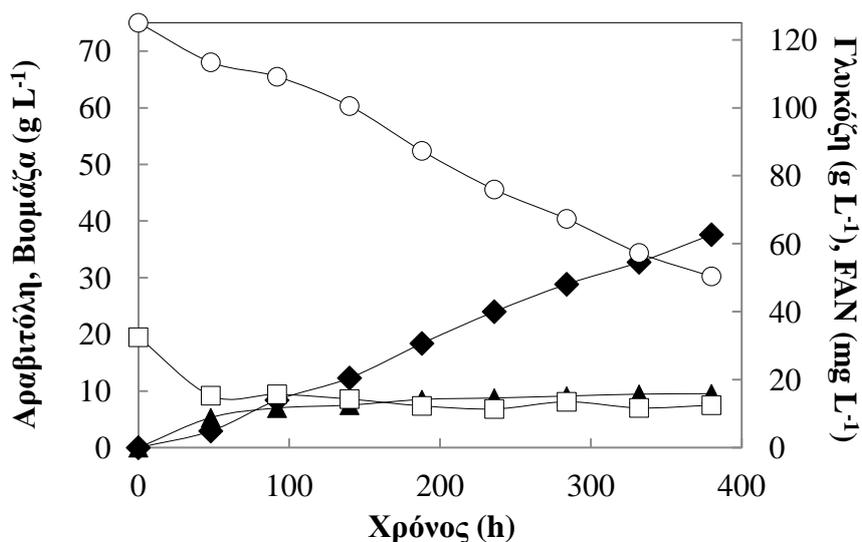
Το Διάγραμμα 3.12 απεικονίζει την παραγωγή αραβιτόλης και βιομάζας καθώς επίσης και την κατανάλωση γλυκόζης και FAN κατά την διεξαγωγή ζύμωσης διαλείποντος έργου με την ζύμη *Debaryomyces hansenii* Y-41 στους 30 °C, pH 5,5 και λόγο C/N ίσο με 60 mol mol<sup>-1</sup>. Σύμφωνα με αυτό, η μέγιστη συγκέντρωση αραβιτόλης ίση με 52,55 g L<sup>-1</sup> παρατηρήθηκε στις 216 h μικροβιακής ζύμωσης. Την ίδια χρονική στιγμή η απόδοση της ζύμωσης υπολογίστηκε ως 0,45 g προϊόντος ανά g υποστρώματος και 0,24 g βιομάζας ανά g υποστρώματος. Όσον αφορά τη βιομάζα, παρατηρείται ότι αυξάνεται με γρήγορο ρυθμό κατά τη διάρκεια της ζύμωσης με μέγιστη τιμή ίση με 28,22 g L<sup>-1</sup> στο τέλος της ζύμωσης. Το FAN παρατηρείται ότι έχει σχεδόν εξαντληθεί στις πρώτες 48 h ζύμωσης. Η αύξηση της αραβιτόλης πραγματοποιείται με σταθερό ρυθμό 0,28 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> μέχρι και τις 144 h ενώ στην συνέχεια ο ρυθμός παραγωγής ανά ώρα μειώνεται σταδιακά. Στο τέλος της ζύμωσης 216 h το υπόστρωμα έχει καταναλωθεί πλήρως με ρυθμό κατανάλωσης 0,55 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>.



**Διάγραμμα 3.12** Παραγωγή αραβιτόλης (♦) και βιομάζας (▲) και κατανάλωση γλυκόζης (○) και FAN (□) κατά την καλλιέργεια του στελέχους *Debaryomyces hansenii* Y-41 σε υπόστρωμα συνθετικής γλυκόζης στους 30 °C, pH 5,5±0,3 και με λόγο C/N 60 mol mol<sup>-1</sup>.

#### 3.1.4.4 Μικροβιακές ζυμώσεις διαλείποντος έργου σε εμπορική γλυκόζη σε θερμοκρασία 30 °C, pH 5,5±0,3 και C/N 180 mol mol<sup>-1</sup>

Το Διάγραμμα 3.13 απεικονίζει την παραγωγή αραβιτόλης και βιομάζας καθώς επίσης και την κατανάλωση γλυκόζης και FAN κατά την διεξαγωγή ζύμωσης διαλείποντος έργου με την ζύμη *Debaryomyces hansenii* Y-41 στους 30 °C, pH 5,5 και λόγο C/N ίσο με 180 mol mol<sup>-1</sup>. Σύμφωνα με αυτό, η μέγιστη συγκέντρωση αραβιτόλης ίση με 37,59 g L<sup>-1</sup> παρατηρήθηκε στις 380 h μικροβιακής ζύμωσης. Την ίδια χρονική στιγμή η απόδοση της ζύμωσης υπολογίστηκε ως 0,50 g προϊόντος ανά g υποστρώματος και 0,13 g βιομάζας ανά g υποστρώματος. Όσον αφορά τη βιομάζα, παρατηρείται ότι μέχρι τις 92 h αυξάνεται με γρήγορο ρυθμό ενώ από εκείνη τη χρονική στιγμή μέχρι το τέλος της ζύμωσης η τιμή της παραμένει σχεδόν σταθερή, με μικρές διακυμάνσεις και μέγιστη τιμή ίση με 9,51 g L<sup>-1</sup> στο τέλος της ζύμωσης. Το FAN παρατηρείται ότι έχει σχεδόν εξαντληθεί στις πρώτες 48 h ζύμωσης. Η αύξηση της αραβιτόλης πραγματοποιείται με σταθερό ρυθμό 0,10 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> σε όλη τη διάρκεια της ζύμωσης. Στο τέλος της ζύμωσης 380 h το υπόστρωμα έχει καταναλωθεί κατά 59,68 % με ρυθμό κατανάλωσης 0,20 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>.



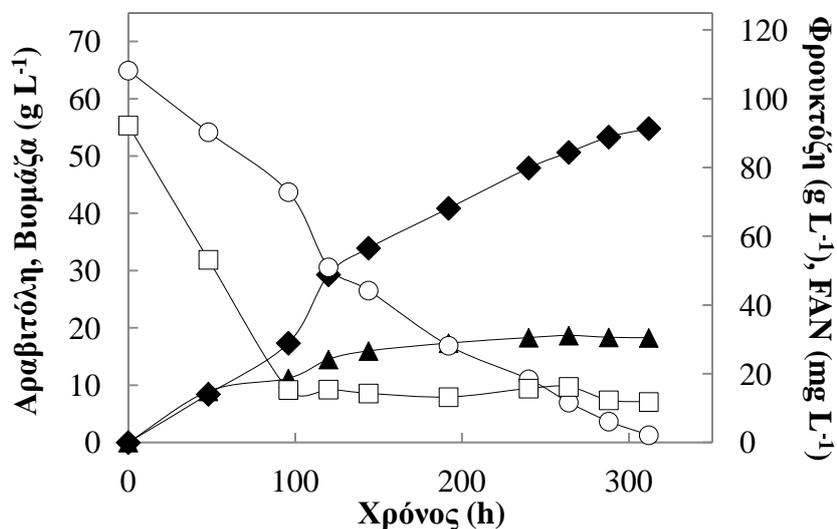
**Διάγραμμα 3.13** Παραγωγή αραβιτόλης (♦) και βιομάζας (▲) και κατανάλωση γλυκόζης (○) και FAN (□) κατά την καλλιέργεια του στελέχους *Debaryomyces hansenii* Y-41 σε υπόστρωμα συνθετικής γλυκόζης στους 30 °C, pH 5,5±0,3 και με λόγο C/N 180 mol mol<sup>-1</sup>.

Σαν συμπέρασμα από τα Διαγράμματα 3.10 και 3.11 μπορεί να λεχθεί πως όπως ήταν αναμενόμενο ανεξάρτητα από το pH με μείωση της συγκέντρωσης του αζώτου στην καλλιέργεια τα κύτταρα της ζύμης έχουν περιορισμένη ανάπτυξη και εμφανώς μικρότερη παραγωγή αραβιτόλης.

#### 3.1.4.5 Μικροβιακές ζυμώσεις διαλείποντος έργου σε εμπορική φρουκτόζη σε θερμοκρασία 30 °C, pH 5,5±0,3 και C/N 60 mol mol<sup>-1</sup>

Το Διάγραμμα 3.14 απεικονίζει την παραγωγή αραβιτόλης και βιομάζας καθώς επίσης και την κατανάλωση φρουκτόζης και FAN κατά την διεξαγωγή ζύμωσης διαλείποντος έργου με την ζύμη *Debaryomyces hansenii* Y-41 στους 30 °C, pH 5,5 και λόγο C/N ίσο με 60 mol mol<sup>-1</sup>. Σύμφωνα με αυτό, η μέγιστη συγκέντρωση αραβιτόλης ίση με 54,81 g L<sup>-1</sup> παρατηρήθηκε στις 312 h μικροβιακής ζύμωσης. Την ίδια χρονική στιγμή η απόδοση της ζύμωσης υπολογίστηκε ως 0,52 g προϊόντος ανά g υποστρώματος και 0,17 g βιομάζας ανά g υποστρώματος. Όσον αφορά τη βιομάζα, παρατηρείται ότι μέχρι τις 144 h αυξάνεται με γρήγορο ρυθμό ενώ από εκείνη τη χρονική στιγμή μέχρι το τέλος της ζύμωσης η τιμή της παραμένει σχεδόν σταθερή, με μικρές διακυμάνσεις και μέγιστη τιμή ίση με 18,67 g L<sup>-1</sup> στις 264 h ζύμωσης. Το FAN παρατηρείται ότι έχει σχεδόν εξαντληθεί στις πρώτες 96 h ζύμωσης. Η αύξηση της αραβιτόλης πραγματοποιείται με μέγιστο ρυθμό 0,24 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> στις 144 h ενώ από

αυτή τη χρονική στιγμή και έπειτα μειώνεται σταδιακά. Στο τέλος της ζύμωσης 312 h το υπόστρωμα έχει σχεδόν καταναλωθεί με ρυθμό κατανάλωσης  $0,34 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ .

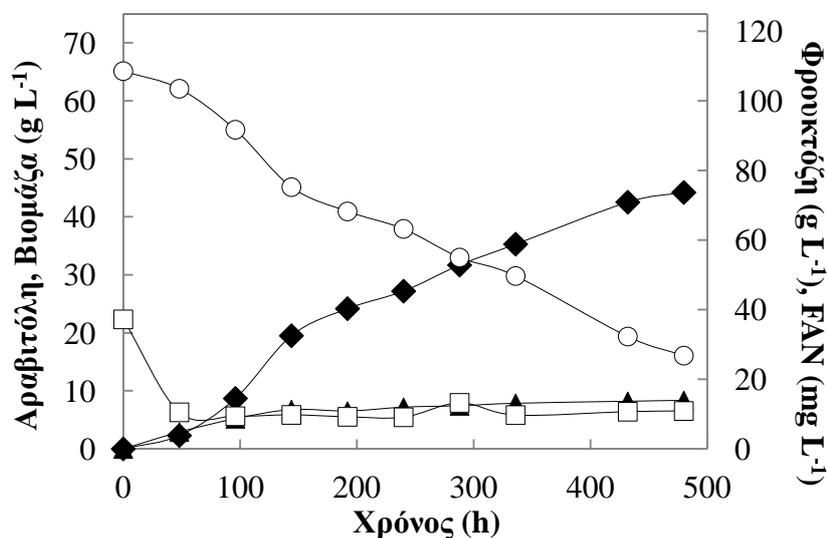


**Διάγραμμα 3.14** Παραγωγή αραβιτόλης (♦) και βιομάζας (▲) και κατανάλωση φρουκτόζης (○) και FAN (□) κατά την καλλιέργεια του στελέχους *Debaryomyces hansenii* Y-41 σε υπόστρωμα συνθετικής φρουκτόζης στους  $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $\text{pH } 5,5 \pm 0,3$  και με λόγο  $\text{C/N } 60 \text{ mol mol}^{-1}$ .

#### 3.1.4.6 Μικροβιακές ζυμώσεις διαλείποντος έργου σε εμπορική φρουκτόζη σε θερμοκρασία $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$ , $\text{pH } 5,5 \pm 0,3$ και $\text{C/N } 180 \text{ mol mol}^{-1}$

Το Διάγραμμα 3.15 απεικονίζει την παραγωγή αραβιτόλης και βιομάζας καθώς επίσης και την κατανάλωση φρουκτόζης και FAN κατά την διεξαγωγή ζύμωσης διαλείποντος έργου με την ζύμη *Debaryomyces hansenii* Y-41 στους  $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $\text{pH } 5,5$  και λόγο  $\text{C/N}$  ίσο με  $180 \text{ mol mol}^{-1}$ . Σύμφωνα με αυτό, η μέγιστη συγκέντρωση αραβιτόλης ίση με  $44,22 \text{ g L}^{-1}$  παρατηρήθηκε στις 480 h μικροβιακής ζύμωσης. Την ίδια χρονική στιγμή η απόδοση της ζύμωσης υπολογίστηκε ως  $0,54 \text{ g}$  προϊόντος ανά  $\text{g}$  υποστρώματος και  $0,10 \text{ g}$  βιομάζας ανά  $\text{g}$  υποστρώματος. Όσον αφορά τη βιομάζα, παρατηρείται ότι μέχρι τις 144 h αυξάνεται με γρήγορο ρυθμό ενώ από εκείνη τη χρονική στιγμή μέχρι το τέλος της ζύμωσης η τιμή της παραμένει σχεδόν σταθερή, με μικρές διακυμάνσεις και μέγιστη τιμή ίση με  $8,36 \text{ g L}^{-1}$  στο τέλος της ζύμωσης. Το FAN παρατηρείται ότι έχει σχεδόν εξαντληθεί στις πρώτες 48 h ζύμωσης. Η αύξηση της αραβιτόλης πραγματοποιείται με μέγιστο ρυθμό  $0,14 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  στις 144 h ενώ από αυτή τη χρονική στιγμή και έπειτα μειώνεται σταδιακά. Στο

τέλος της ζύμωσης 480 h το υπόστρωμα έχει καταναλωθεί κατά 75,31 % με ρυθμό κατανάλωσης  $0,17 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ .



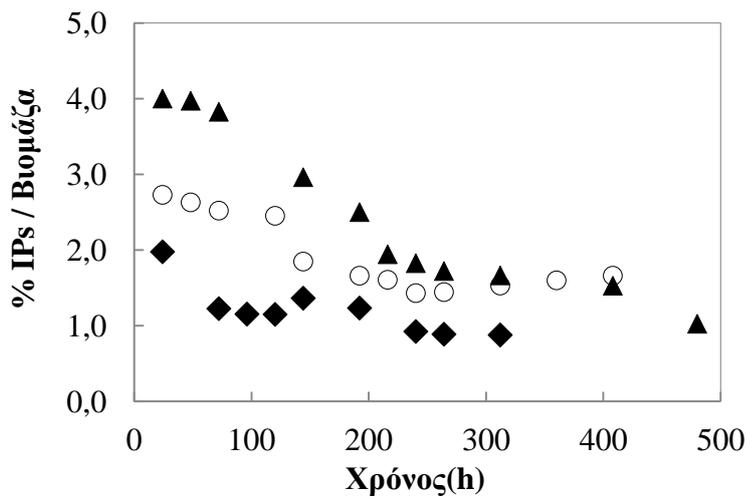
**Διάγραμμα 3.15** Παραγωγή αραβιτόλης (♦) και βιομάζας (▲) και κατανάλωση φρουκτόζης (○) και FAN (□) κατά την καλλιέργεια του στελέχους *Debaryomyces hansenii* Y-41 σε υπόστρωμα συνθετικής φρουκτόζης στους 30 °C, pH 5,5±0,3 και με λόγο C/N 180 mol mol<sup>-1</sup>.

Όπως και στην περίπτωση της γλυκόζης ως υπόστρωμα, σε λόγο C/N 60 mol mol<sup>-1</sup> (Διάγραμμα 3.14), η ζύμωση τελείωσε σε σχετικά σύντομο χρονικό διάστημα, 312 h. Όσον αφορά τη ζύμωση με τον υψηλό λόγο C/N, όπως και στις προηγούμενες ζυμώσεις με λόγο 180 mol mol<sup>-1</sup> το υπόστρωμα είχε πολύ μικρή κατανάλωση ενώ στις 480 h δεν είχε καταναλωθεί πλήρως.

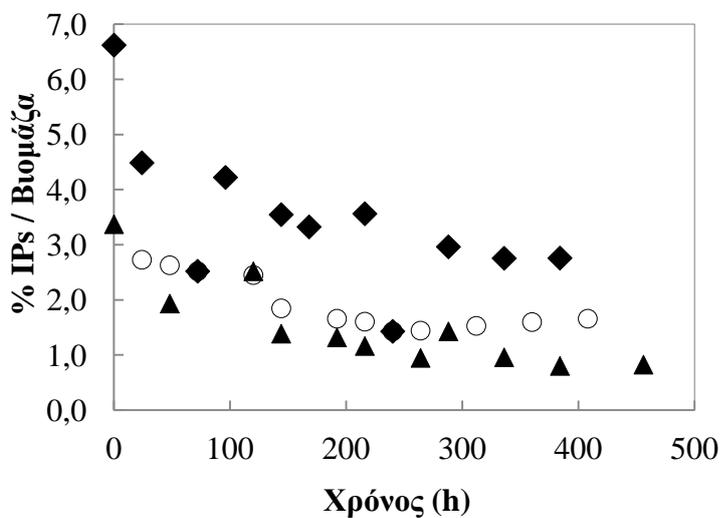
Επιπροσθέτως, για όλες τις ζυμώσεις έγινε μελέτη των ενδοπολυσακχαριτών και υπολογίστηκαν οι τιμές αυτών σε g L<sup>-1</sup>. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στα παρακάτω διαγράμματα.

### 3.1.5 Παραγωγή ενδοπολυσακχαριτών

Όσον αφορά την παραγωγή ενδοπολυσακχαριτών, όπως παρατηρείτε στα διαγράμματα 3.16, 3.17, 3.18 και 3.19, οι ενδοπολυσακχαρίτες στην αρχή της κάθε ζύμωσης έχουν μια μέγιστη τιμή η οποία στη συνέχεια μειώνεται παρουσιάζοντας ένα πλατό στο τέλος της ζύμωσης.

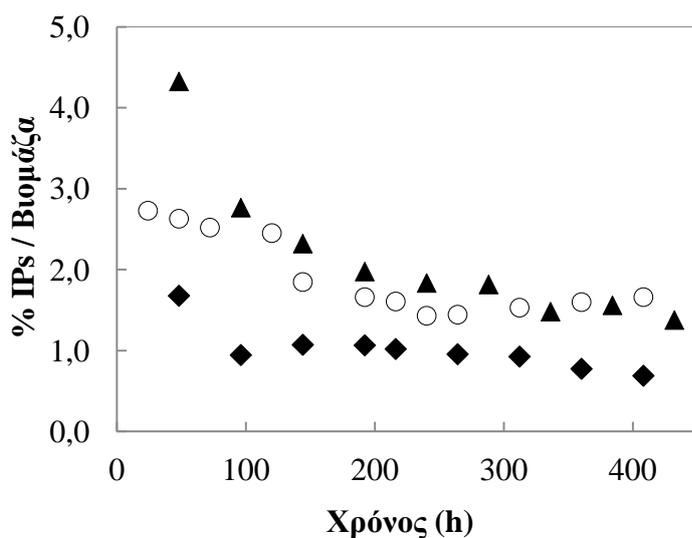


**Διάγραμμα 3.16** Συγκέντρωση των ενδοπολυσακχαριτών (IPs  $\text{g L}^{-1}$ ) εκφρασμένη % ως προς τη βιομάζα ( $\text{g L}^{-1}$ ) σε συνάρτηση με το χρόνο με χρήση των υποστρωμάτων (○) Γλυκόζη ( $\text{g L}^{-1}$ ), (◆) Φρουκτόζη ( $\text{g L}^{-1}$ ), και (▲) Γλυκερόλη ( $\text{g L}^{-1}$ ) και με συνθήκες  $30\text{ }^\circ\text{C}$ ,  $\text{pH } 5,5 \pm 0,3$  και λόγο άνθρακα προς άζωτο  $120 \text{ mol mol}^{-1}$ .

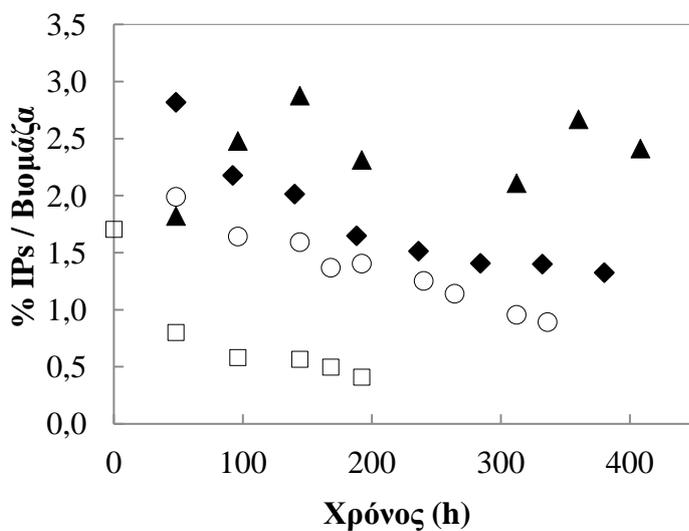


**Διάγραμμα 3.17** Συγκέντρωση των ενδοπολυσακχαριτών (IPs  $\text{g L}^{-1}$ ) εκφρασμένη % ως προς τη βιομάζα ( $\text{g L}^{-1}$ ) σε συνάρτηση με το χρόνο με χρήση υποστρώματος γλυκόζης και σε θερμοκρασίες (○)  $30\text{ }^\circ\text{C}$ , (◆)  $32\text{ }^\circ\text{C}$ , και (▲)  $25\text{ }^\circ\text{C}$ .

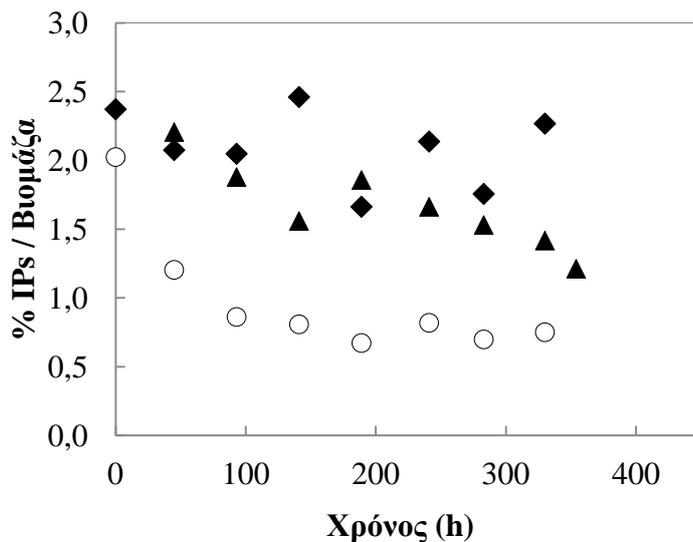




**Διάγραμμα 3.18** Συγκέντρωση των ενδοπολυσακχαριτών (IPs g L<sup>-1</sup>) εκφρασμένη % ως προς τη βιομάζα (g L<sup>-1</sup>) σε συνάρτηση με το χρόνο με χρήση υποστρώματος γλυκόζης σε θερμοκρασία 30 °C και σε συνθήκες pH (○) 5.5 ± 0.3, (◆) 3.5 ± 0.3 και (▲) 6.5 ± 0.3.



**Διάγραμμα 3.19** Συγκέντρωση των ενδοπολυσακχαριτών (IPs g L<sup>-1</sup>) εκφρασμένη % ως προς τη βιομάζα (g L<sup>-1</sup>) σε συνάρτηση με το χρόνο με χρήση υποστρώματος γλυκόζης σε θερμοκρασία 30 °C και σε συνθήκες (○) pH 6.5 ± 0.3 και C/N 60, (◆) pH 5.5 ± 0.3 και C/N 180, (▲) pH 6.5 ± 0.3 και C/N 180 και (□) pH 5.5 ± 0.3 και C/N 60.



**Διάγραμμα 3.20** Συγκέντρωση των ενδοπολυσακχαριτών (IPs  $\text{g L}^{-1}$ ) εκφρασμένη % ως προς τη βιομάζα ( $\text{g L}^{-1}$ ) σε συνάρτηση με το χρόνο με χρήση υποστρώματος φρουκτόζης σε θερμοκρασία 30 °C και σε συνθήκες pH (○)  $3.5 \pm 0.3$ , (◆)  $6.5 \pm 0.3$  και (▲)  $5.5 \pm 0.3$ .

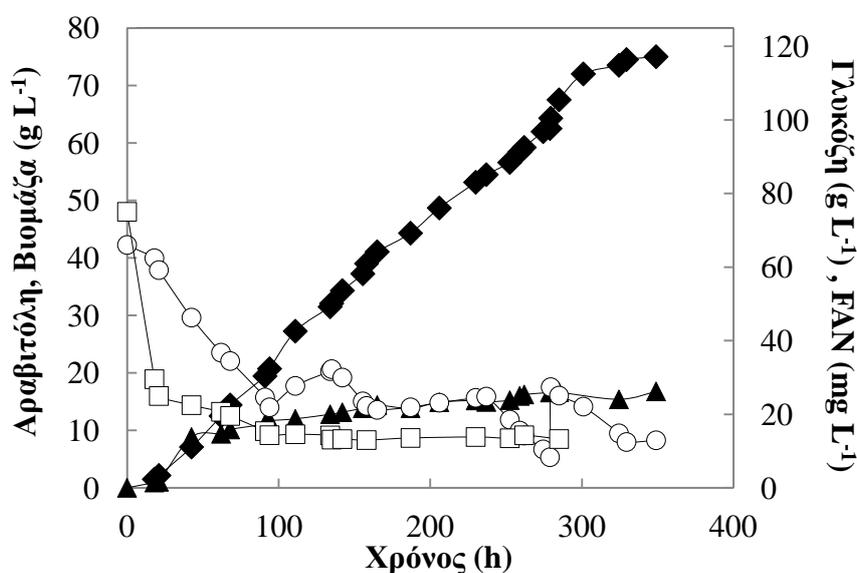
### 3.1.6 Παραγωγή αραβιτόλης σε ημισυνεχής ζύμωση σε βιοαντιδραστήρα με υπόστρωμα γλυκόζης

Εξετάζοντας τα αποτελέσματα όλων των ζυμώσεων διαλείποντος έργου που πραγματοποιήθηκαν, επιλέχθηκε η ζύμωση με την μεγαλύτερη παραγωγή αραβιτόλης για να διεξαχθεί σε βιοαντιδραστήρα ημισυνεχούς λειτουργίας. Για το σκοπό αυτό, πραγματοποιήθηκε καλλιέργεια του στελέχους *Debaryomyces hansenii* Y-41 σε υπόστρωμα εμπορικής γλυκόζης αρχικής συγκέντρωσης  $66 \text{ g L}^{-1}$ , στους 30 °C με λόγο C/N  $120 \text{ mol mol}^{-1}$  και pH  $6,5 \pm 0,3$  (όπως περιγράφεται στο υποκεφάλαιο 3.1.3.2)

Η ημισυνεχής καλλιέργεια πραγματοποιήθηκε με σύστημα συνεχούς τροφοδοσίας πυκνού διαλύματος εμπορικής γλυκόζης ούτως ώστε η συγκέντρωση του σακχάρου να διατηρείται περίπου στα  $20 \text{ g L}^{-1}$ .

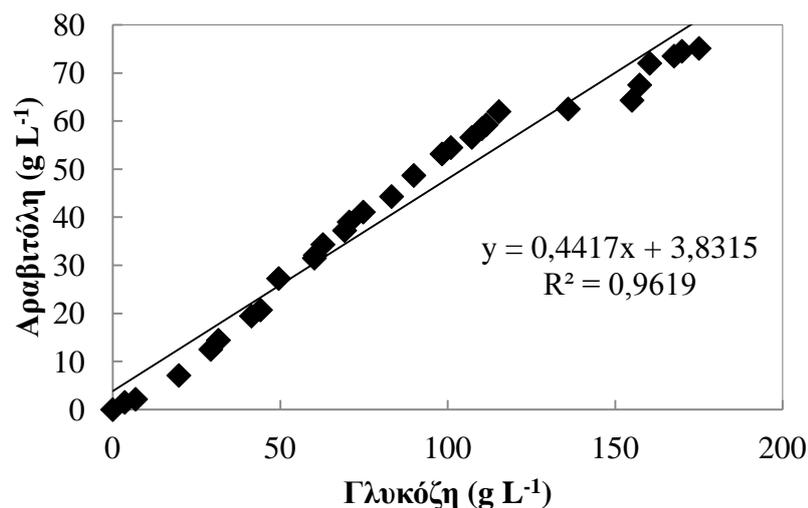
Το Διάγραμμα 3.21 απεικονίζει την παραγωγή αραβιτόλης και βιομάζας καθώς επίσης και την κατανάλωση γλυκόζης και FAN κατά την διεξαγωγή ζύμωσης ημισυνεχούς λειτουργίας με την ζύμη *Debaryomyces hansenii* Y-41 στους 30 °C, pH 6,5 και λόγο C/N ίσο με  $120 \text{ mol mol}^{-1}$ . Σύμφωνα με αυτό, η μέγιστη συγκέντρωση αραβιτόλης ίση με  $75,1 \text{ g L}^{-1}$  παρατηρήθηκε στις 349 h μικροβιακής ζύμωσης. Την ίδια χρονική στιγμή η απόδοση της ζύμωσης υπολογίστηκε ως  $0,44 \text{ g}$  προϊόντος ανά  $\text{g}$  υποστρώματος και  $0,10 \text{ g}$  βιομάζας ανά  $\text{g}$  υποστρώματος. Επίσης, η ζύμωση είχε

σταθερή μέγιστη απόδοση προϊόντος προς υπόστρωμα ( $0,54 \text{ g g}^{-1}$ ) από τις 158 h έως τις 274 h. Όσον αφορά τη βιομάζα, παρατηρείται ότι μέχρι τις 134 h αυξάνεται με γρήγορο ρυθμό ενώ από εκείνη τη χρονική στιγμή μέχρι το τέλος της ζύμωσης η τιμή της παραμένει σχεδόν σταθερή, με μικρές διακυμάνσεις και μέγιστη τιμή ίση με  $16,78 \text{ g L}^{-1}$  στο τέλος της ζύμωσης. Το FAN παρατηρείται ότι έχει σχεδόν εξαντληθεί στις πρώτες 68 h ζύμωσης. Η αύξηση της αραβιτόλης πραγματοποιείται με μέγιστο ρυθμό  $0,56 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  στις 165 h ενώ από αυτή τη χρονική στιγμή και έπειτα μειώνεται σταδιακά. Στο τέλος της ζύμωσης, η αραβιτόλη έχει παραγωγικότητα  $0,22 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ .



**Διάγραμμα 3.21** Παραγωγή αραβιτόλης (♦) και βιομάζας (▲) και κατανάλωση γλυκόζης (○) και FAN (□) κατά την καλλιέργεια του στελέχους *Debaryomyces hansenii* Y-41 σε σύστημα ημισυνεχούς λειτουργίας σε βιοαντιδραστήρα, σε υπόστρωμα συνθετικής γλυκόζης σε θερμοκρασίας  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $\text{pH } 6,5 \pm 0,3$  και με λόγο C/N  $120 \text{ mol mol}^{-1}$ .

Ο συντελεστής απόδοσης της συγκέντρωσης αραβιτόλης ως προς την κατανάλωση του υποστρώματος ( $0,44 \text{ g g}^{-1}$ ) παρουσιάζεται και στο Διάγραμμα 3.22 όπου παρατηρείται ότι ο συντελεστής συσχέτισης  $R^2$  είναι πολύ κοντά στη μονάδα.



**Διάγραμμα 3.22** Παραγωγή αραβιτόλης (♦) σε συνάρτηση με την κατανάλωση της γλυκόζης κατά την καλλιέργεια του στελέχους *Debaryomyces hansenii* Y-41 σε σύστημα ημισυνεχούς λειτουργίας σε βιοαντιδραστήρα, σε υπόστρωμα συνθετικής γλυκόζης σε θερμοκρασίας 30 °C, pH 6,5±0,3 και με λόγο C/N 120 mol mol<sup>-1</sup>.

Στη συνέχεια, παρατίθενται συνοπτικός πίνακας (Πίνακας 3.2) επιλεγμένων σημείων της κινητικής για καθένα από τα προαναφερθέντα υποστρώματα και σε όλες τις συνθήκες ζύμωσης, στα οποία παρατηρήθηκε μέγιστη συγκέντρωση αραβιτόλης, βιομάζας και ενδοπολυσακχαριτών.

**Πίνακας 3.2** Συγκεντρωτικός πίνακας παρουσίασης των μέγιστων τιμών της συγκέντρωσης της βιομάζας (DW), της αραβιτόλης (Ara) και των ενδοπολυσακχαριτών (IPs) για όλες τις ζυμώσεις που διενεργήθηκαν.

Υπόστρωμα	t (h)	S <sub>0</sub> (g L <sup>-1</sup> )	S <sub>con</sub> (g L <sup>-1</sup> )	DW (g L <sup>-1</sup> )	Ara (g L <sup>-1</sup> )	IPs (g L <sup>-1</sup> )	Y <sub>P/S</sub>	Y <sub>X/S</sub>
Φρουκτόζη 30 °C pH 5,5 C/N120	354	112,72	94,37	13,14	50,24*	0,40	0,53	0,14
	189		51,59	10,35	26,49	0,51*	0,51	0,20
Γλυκόζη 30 °C pH 5,5 C/N120	408	121,24	121,24	13,22	45,40*	0,56	0,37	0,11
	360		117,15	13,38*	42,15	0,56	0,36	0,11
	240		94,22	12,22	27,90	0,61*	0,30	0,13
Γλυκερόλη 30 °C pH 5,5 C/N120	480	123,68	78,80	14,42*	42,09*	0,37	0,53	0,18
	120		23,91	7,44	3,52	0,73*	0,15	0,31
Γλυκόζη 25 °C pH 5,5 C/N120	504	110,00	84,58	14,14*	30,90*	0,29	0,37	0,17
	48		20,41	5,50	4,75	0,46*	0,23	0,27
Γλυκόζη 32 °C pH 5,5 C/N120	432	118,08	67,77	7,58	34,65*	0,53	0,51	0,11
	336		63,23	8,06*	32,92	0,61	0,52	0,13
	144		34,03	6,78	12,10	0,72*	0,36	0,20
Γλυκόζη	408	124,34	78,11	10,96*	32,02*	0,38	0,41	0,14

<b>30 °C pH 3,5 C/N120</b>	144		40,67	9,20	15,63	0,56*	0,38	0,23
<b>Γλυκόζη 30 °C pH 6,5 C/N120</b>	408	121,18	121,18	14,81*	67,30*	0,37	0,56	0,12
	48		23,68	9,06	6,72	0,12*	0,28	0,38
<b>Γλυκόζη 30 °C pH 6,5 C/N60</b>	336	115,34	115,34	15,38*	51,75*	0,34	0,45	0,13
	96		49,54	11,07	18,83	0,50*	0,38	0,22
<b>Γλυκόζη 30 °C pH 6,5 C/N180</b>	504	120,64	84,94	7,22*	42,18*	0,37	0,50	0,09
	240		55,48	5,76	21,67	0,64*	0,39	0,10
<b>Γλυκόζη 30 °C pH 5,5 C/N60</b>	216	117,86	117,86	28,22*	52,55*	0,30	0,45	0,24
	48		30,01	10,40	8,47	0,48*	0,28	0,35
<b>Γλυκόζη 30 °C pH 5,5 C/N180</b>	380	125,00	74,60	9,51*	37,59*	0,32	0,50	0,13
	48		11,63	5,30	2,94	0,43*	0,25	0,46
<b>Φρουκτόζη 30 °C pH 3,5 C/N120</b>	378	116,88	112,53	17,61*	39,10*	0,34	0,35	0,16
	45		11,48	7,91	3,70	0,40*	0,32	0,69
<b>Φρουκτόζη 30 °C pH 6,5 C/N120</b>	426	108,90	93,48	7,56*	45,27*	0,38	0,48	0,08
	378		80,48	7,46	40,15	0,44*	0,50	0,09
<b>Φρουκτόζη 30 °C pH 5,5 C/N60</b>	312	108,23	106,09	18,27	54,81*	0,40	0,52	0,17
	264		102,13	18,67*	50,66	0,46	0,50	0,18
	144		64,01	15,98	33,93	0,51*	0,53	0,25
<b>Φρουκτόζη 30 °C pH 5,5 C/N180</b>	480	108,57	81,76	8,36*	44,22*	0,38	0,54	0,10
	192		40,32	6,52	24,19	0,51*	0,60	0,16
<b>Bioreactor: Γλυκόζη 30 °C pH 6,5 C/N120</b>	349	66	175,04	16,78*	75,10*	0,40	0,44	0,10
	206		89,88	14,90	48,69	0,45*	0,54	0,17
	155		69,55	13,85	36,75	0,58*	0,53	0,20

Όπου:

- A<sub>g</sub>, αραβιτόλη (g L<sup>-1</sup>)
- C/N, λόγος άνθρακα προς άζωτο
- DW, ξηρή μάζα (g L<sup>-1</sup>)
- F<sub>ru</sub>, φρουκτόζη (g L<sup>-1</sup>)
- I<sub>Ps</sub>, ενδοπολυσακχαρίτες (g L<sup>-1</sup>)
- S<sub>0</sub>, αρχική συγκέντρωση υποστρώματος (g L<sup>-1</sup>)
- S<sub>con</sub>, συγκέντρωση καταναλωθέντος υποστρώματος (g L<sup>-1</sup>)
- t, χρόνος (h)
- Y<sub>P/S</sub>, συντελεστής απόδοσης παραχθέντος προϊόντος προς καταναλωθέν υπόστρωμα (g g<sup>-1</sup>)
- Y<sub>X/S</sub>, συντελεστής απόδοσης παραχθέντος βιομάζας προς καταναλωθέν υπόστρωμα (g g<sup>-1</sup>)
- και (\*) η μέγιστη συγκέντρωση.

## 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η παρούσα ερευνητική μελέτη έχει ως κύριο σκοπό τη διερεύνηση των δυνατοτήτων του μικροοργανισμού *Debaryomyces hansenii* Y-41 να αναπτύσσεται σε διάφορα υποστρώματα με απόρροια την παραγωγή μεταβολικών προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας, καθώς και τη βελτιστοποίηση των συνθηκών ανάπτυξης αυτού, με στόχο την μέγιστη παραγωγή αραβιτόλης.

Ως γενικό συμπέρασμα αξίζει να σημειωθεί ότι ο συγκεκριμένος μικροοργανισμός, βρέθηκε ικανός να μεταβολίσει σε ικανοποιητικό βαθμό τα σάκχαρα γλυκόζη, φρουκτόζη καθώς και την ακάθαρτη γλυκερόλη προς παραγωγή αραβιτόλης ανεξάρτητα της υψηλής αρχικής συγκέντρωσης αυτών. Αντίθετα αποτελέσματα παρατηρήθηκαν στις ζυμώσεις στις οποίες η μοναδική πηγή άνθρακα ήταν η ξυλόζη και η αραβινόζη, που ο μικροοργανισμός δεν κατάφερε να μεταβολίσει.

Για την βελτιστοποίηση των συνθηκών ανάπτυξης επιλέχθηκαν τα σακχαρούχα υποστρώματα γλυκόζη και φρουκτόζη για να μελετηθούν εκτενέστερα. Για το σκοπό αυτό, σε καθένα από αυτά τα υποστρώματα διενεργήθηκαν ζυμώσεις σε τρία διαφορετικά pH και τρεις διαφορετικούς λόγους άνθρακα προς άζωτο, ενώ με χρήση γλυκόζης ως υπόστρωμα διενεργήθηκαν ζυμώσεις σε τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες, με σκοπό την αύξηση της τελικής συγκέντρωσης του προϊόντος.

Όσον αφορά τις ζυμώσεις διαλείποντος έργου, με μοναδική πηγή σακχάρου τη γλυκόζη, συγκρίνοντας τα αποτελέσματα όπως αυτά συνοψίζονται στον Πίνακα 3.2, παρατηρείται πως στην αρχική ζύμωση με χρήση γλυκόζης ως πηγή σακχάρου σε θερμοκρασία 30 °C, pH  $5,5 \pm 0,3$  και C/N 120 ο μικροοργανισμός στις 408 h παρήγαγε  $45,40 \text{ g L}^{-1}$  αραβιτόλη με απόδοση  $0,37 \text{ g g}^{-1}$  και  $13,22 \text{ g L}^{-1}$  βιομάζα, ενώ την ίδια χρονική στιγμή και στις ίδιες συνθήκες με μόνη διαφορά την αύξηση του pH στο  $6,5 \pm 0,3$ , η αραβιτόλη είχε συγκέντρωση  $67,30 \text{ g L}^{-1}$  με απόδοση  $0,56 \text{ g g}^{-1}$  και  $14,81 \text{ g L}^{-1}$  βιομάζα. Είναι φανερό πως η αύξηση του pH είχε θετική επίδραση στην παραγωγή του προϊόντος.

Λαμβάνοντας υπ' όψιν τα αποτελέσματα αυτά, πραγματοποιήθηκε ζύμωση ημισυνεχούς συστήματος σε βιοαντιδραστήρα με τις ίδιες ακριβώς συνθήκες με μόνη διαφορά τη μείωση της αρχικής συγκέντρωσης του υποστρώματος στα  $66 \text{ g L}^{-1}$ . Τα αποτελέσματα του βιοαντιδραστήρα έδειξαν αύξηση της συγκέντρωσης του προϊόντος στα  $75,1 \text{ g L}^{-1}$  με απόδοση  $0,44 \text{ g g}^{-1}$  και βιομάζα  $16,78 \text{ g L}^{-1}$  στις 349 h

ζύμωσης. Τα αποτελέσματα του βιοαντιδραστήρα είναι συγκρίσιμα με αυτά που δόθηκαν από τη ζύμωση διαλείποντος έργου που πραγματοποιήθηκε σε κωνικές φιάλες, ενώ κρίνονται βελτιωμένα λόγω του ότι η ζύμωση σε βιοαντιδραστήρα πραγματοποιήθηκε σε πλήρως ελεγχόμενες συνθήκες.

Αντίθετα, στα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν με χρήση φρουκτόζης ως μοναδική πηγή σακχάρου, παρατηρήθηκε αυξημένη συγκέντρωση αραβιτόλης αλλά και βιομάζας κυρίως όταν η ζύμωση διενεργήθηκε με υψηλή προσθήκη αζώτου. Συγκεκριμένα, η υψηλότερη συγκέντρωση του προϊόντος παρουσιάστηκε σε pH  $5,5 \pm 0,3$ , στους 30 °C και με λόγο C/N ίσο με  $60 \text{ mol mol}^{-1}$ , όπου η αραβιτόλη έφτασε τα  $54,81 \text{ g L}^{-1}$  με απόδοση 0,52 g προϊόντος ανά g καταναλωθέντος υποστρώματος στις 312 h. Επιπλέον, εκείνη τη χρονική στιγμή, η βιομάζα είχε συγκέντρωση  $18,27 \text{ g L}^{-1}$  ενώ το υπόστρωμα είχε καταναλωθεί πλήρως. Επομένως, η ζύμωση με χρήση υποστρώματος φρουκτόζης υπό αυτές τις συνθήκες, κρίνεται ιδιαίτερα αποδοτική κυρίως λόγω του ότι παράγεται υψηλή συγκέντρωση αραβιτόλης σε σύντομο χρονικό διάστημα. Προκύπτει επίσης, ότι με χρήση φρουκτόζης ως υπόστρωμα η παραγωγή αραβιτόλης εμφανίζει μέγιστο κατά την αύξηση του αζώτου στο μέσο γεγονός αξιοσημείωτο.

Επιπροσθέτως, σαν γενικό συμπέρασμα μπορεί να θεωρηθεί ότι ο υψηλός λόγος C/N, δηλαδή η μείωση του αζώτου στο μέσο, και η χαμηλή τιμή του pH, έχουν αρνητική επίδραση στην ανάπτυξη της ζύμης και μεταγενέστερα στην παραγωγή του προϊόντος.

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, το καλύτερο εναρκτήριο υπόστρωμα για την παραγωγή D-αραβιτόλης είναι η γλυκόζη, ένας μονοσακχαρίτης που μπορεί να αποκτηθεί φθηνά λόγω της αφθονίας της στη φύση. Υπάρχουν μερικές φυσικές ζύμες ικανές να μετατρέψουν τη γλυκόζη σε D-αραβιτόλη (Zakaria 2001, Saha et al., 2007, Zhu et al., 2010). Στη συνέχεια παρατίθενται συγκεντρωτικός πίνακας στον οποίο αναφέρονται ζύμες που αναπτύχθηκαν σε διαφορετικά υποστρώματα προς παραγωγή αραβιτόλης και άλλων μεταβολιτών.

**Πίνακας 4.1** Ερευνητικά αποτελέσματα διαφόρων ζυμών ικανών να μεταβολίσουν υποστρώματα προς παραγωγή αραβιτόλης και συνθήκες ανάπτυξης αυτών.

Οργανισμός	Υπόστρωμα (g L <sup>-1</sup> )	Αραβιτόλη (g L <sup>-1</sup> )	Y <sub>P/S</sub> (g g <sup>-1</sup> )	Παραπροϊόντα	Συνθήκες ζύμωσης	Αναφορά
<i>Metschnikowia reukaufii</i>	Γλυκόζη (200)	81,4	0,41	Ριβιτόλη, μανιτόλη, σορβιτόλη	pH 5,0 34°C	Nozaki et al., 2003
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i> NRRL 27264	Γλυκόζη (175)	83,4	0,48	Αιθανόλη, γλυκερόλη	pH 5,0 30 °C	Saha et al., 2007
<i>Kodamae ohmeri</i> NH-9	Γλυκόζη (200)	81,2	0,41	Δεν αναφέρονται	pH 7,0 37 °C	Zhu et al., 2010
<i>Pichia ohmeri</i> No 230	Γλυκόζη (100)	43,0	0,43	Δεν αναφέρονται	pH 6,6 30 °C	Podmore et al., 1961
<i>Hansenula polymorpha</i>	Γλυκόζη (<30)	18,8	0,14	Δεν προέκυψαν	pH 4,8 45 °C	Escalante et al., 1990
<i>Pichia quilliermondii</i>	L-αραβινόζη (50)	33,4	0,54	Δεν προέκυψαν	pH 4,0 34 °C	Fonesca et al., 2007
<i>Kluyveromyces lactis</i>	Λακτόζη (188)	14,0	0,25	Γλυκερόλη, Αιθανόλη	30 °C	Toyoda et al., 2011
<i>Debaryomyces nepalensis</i> NCYC	Γλυκόζη (150)	14,0	0,1	Αιθανόλη	pH 6,0 30 °C	Kumdam et al., 2013
	Γλυκόζη (100)	11,5	0,15			
	Αραβινόζη (100)	24,6	0,32			
	Φρουκτόζη (80)	0,7	0,01			
<i>Pichia anomala</i> TIB-x229	Γλυκόζη (100)	22,5	0,22	Ριβιτόλη	pH 7,5 30 °C	Zhang et al., 2014
<i>Candida quercitrusa</i> NBRC 1022	Γλυκερόλη (250)	67,1	0,41	Δεν αναφέρονται	pH 6,0 30 °C	Yoshikawa et al., (2014)
<i>Debaryomyces hansenii</i> NRRL Y-7483	Γλυκερόλη (150)	40,0	0,55	Δεν αναφέρονται	pH 6,7 30 °C	Koganti & Ju, 2013
<i>Debaryomyces hansenii</i> Y-41	Γλυκόζη (175)	75,10	0,44	Δεν προέκυψαν	pH 6,5 30 °C	Παρούσα μελέτη
	Φρουκτόζη (110)	54,81	0,52	Δεν προέκυψαν	pH 5,5 30 °C	Παρούσα μελέτη

Συγκρίνοντας τα βέλτιστα αποτελέσματα της συγκεκριμένης μελέτης με αυτά της βιβλιογραφίας και λαμβάνοντας υπ όψιν τις αποδόσεις του προϊόντος προς το υπόστρωμα για κάθε ζύμωση, συμπεραίνεται ότι η γλυκόζη και η φρουκτόζη αποτελούν ιδανικά υποστρώματα ανάπτυξης για την παραγωγή αραβιτόλης από το



στέλεχος *D. hansenii* Y-41. Συγκεκριμένα, στον Πίνακα 4.1 παρουσιάζεται η μέγιστη συγκέντρωση της αραβιτόλης,  $73,40 \text{ g L}^{-1}$ , όπως παρουσιάστηκε στο τέλος της ζύμωσης του στελέχους *D. hansenii* Y-41 με υπόστρωμα γλυκόζη, με απόδοση παραχθέντος προϊόντος προς καταναλωθέν υπόστρωμα  $0,38 \text{ g g}^{-1}$  στις 420 h. Ωστόσο, στην ίδια ζύμωση η απόδοση έφτασε τα  $0,54 \text{ g g}^{-1}$  στις 274 h ζύμωσης με τη συγκέντρωση του προϊόντος να είναι  $61,96 \text{ g L}^{-1}$ . Συγκρίνοντας την απόδοση αυτή με τα αποτελέσματα όπως παρουσιάζονται στον Πίνακα 4.1, παρατηρείτε ότι παρόμοιες αποδόσεις έδωσε η ζύμη *Pichia quilliermondii* με κατανάλωση L-αραβινόζης, το στέλεχος *D. hansenii* NRRL Y-7483 με κατανάλωση γλυκερόλης καθώς και το στέλεχος που μελετήσαμε με χρήση φρουκτόζης ως πηγή άνθρακος.

Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι κατά την αύξηση του στελέχους, παράχθηκε ως μοναδικό προϊόν της ζύμωσης η αραβιτόλη ενώ δεν υπήρξαν παραπροϊόντα σε καμία από τις ζυμώσεις που διεξήχθησαν.

Όσον αφορά τη ζύμη *Metschnikowia reukaufii*, τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στον Πίνακα 4.1 αφορούν ένα ασυνεχές σύστημα καλλιέργειας. Στη συνέχεια της ζύμωσης αυτής, πραγματοποιήθηκαν εκτενέστερα πειράματα σε ημισυνεχής καλλιέργεια με σιρόπι γλυκόζης ως πηγή άνθρακα, όπου η ζύμη θα μπορούσε να εκκρίνει μεγάλη ποσότητα αραβιτόλης. Συγκεκριμένα με την προσθήκη μεγάλης ποσότητας θεικού αμμωνίου και εκχυλίσματος ζύμης ως πηγές αζώτου, παρήχθησαν  $206 \text{ g L}^{-1}$  της πολυόλης σε 100 ώρες. Συμπεραίνεται επομένως, πως για το συγκεκριμένο στέλεχος, η αύξηση της τιμής του αζώτου έχει θετική επίδραση στην ζύμωση και αυξάνει πάρα πολύ την παραγωγικότητα της ζύμωσης  $3,96 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ , ενώ στα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη δεν παρατηρήθηκαν οι βέλτιστες τιμές με την αύξηση της πηγής αζώτου.

Επιπλέον, η ζύμη *Metschnikowia reukaufii* δύναται ικανή να παράγει D-αραβιτόλη και από άλλους τύπους σακχάρων συγκεκριμένα από D-φρουκτόζη και σουκρόζη με απόδοση περίπου  $0,41 \text{ g g}^{-1}$  αυξάνεται όμως και η παραγωγή άλλων προϊόντων, συγκεκριμένα της μαννιτόλης και της σορβιτόλης, γεγονός μη επιθυμητό για την παραγωγή αραβιτόλης αφού αυξάνεται πολύ το κόστος απομόνωσης της πολυόλης (Nozaki et al., 2003).

Η αποδοτικότητα των μικροοργανισμών *D. hansenii* και *M. reukaufii* αποδεικνύονται και από έρευνα που διεξήχθη από τους Koganti et al. (2011). Οι ερευνητές εξέτασαν 214 στελέχη ζυμομυκήτων, κυρίως από τους μικροοργανισμούς *Debaryomyces*, *Geotrichum*, *Metschnikowia*, *Candida* και *Dipodascus*, μεταξύ των

οποίων βρέθηκε ότι ο *Debaryomyces* και ο *Metchnikowia* έχουν τον μεγαλύτερο αριθμό στελεχών που παρήγαγαν αξιοσημείωτες ποσότητες αραβιτόλης και πολύ μικρές ποσότητες άλλων πολυολών από γλυκερόλη μετά από τρεις ημέρες ασυνεχούς συστήματος καλλιέργειας. Στην έρευνα τους, το πιο πολύτιμο στέλεχος βρέθηκε ότι είναι το *D. hansenii* NRRL Y-7483 όπου με θερμοκρασία ανάπτυξης τους 30 °C και συγκέντρωση γλυκερόλης πάνω από 90 g L<sup>-1</sup> έδινε απόδοση μεγαλύτερη του 20%. Η απόδοση παρουσιάστηκε υψηλότερη (50%) όταν η αρχική συγκέντρωση της γλυκερόλης ήταν 150 g L<sup>-1</sup>, αλλά η κατανάλωσή της από τη ζύμη μειώθηκε κάτω από αυτές τις συνθήκες και χρησιμοποιήθηκαν μόνο 30 g L<sup>-1</sup> υποστρώματος (Koganti et al., 2011). Μετά από μια σειρά πειραμάτων βελτιστοποίησης, οι ερευνητές διαπίστωσαν ότι ο *D. hansenii* NRRL Y-7483 μπορούσε να παράγει αραβιτόλη σε βιοαντιδραστήρα με απόδοση 0,55 g L<sup>-1</sup> σε 5 ημέρες. Η αποτελεσματικότητα της διαδικασίας επηρεάστηκε από το λόγο N / P στο μέσο, το επίπεδο του διαλυτού οξυγόνου (DO) και το pH. Οι βέλτιστες παράμετροι καθορίστηκαν ως εξής: αναλογία N/P 9, τιμή DO 5%, και pH 3,5, ωστόσο παρατηρήθηκε ότι ήταν ευεργετικό να ξεκινήσει η βιομετατροπή από μια υψηλή τιμή DO (περίπου 100%) και ένα ουδέτερο pH 6,7 και να επιτραπούν στις δύο παραμέτρους να πέσουν φυσικά στις τιμές ελέγχου. Με αυτό τον τρόπο η αραβιτόλη που παράχθηκε από γλυκερόλη είχε παραγωγικότητα 0,33 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> (Koganti and Ju, 2013).

Άλλο ένα στέλεχος ζύμης του γένους *Debaryomyces* απομονώθηκε από τους Kumar και Gummadi (2011), το οποίο γενετικά αναγνωρίστηκε ως *Debaryomyces nepalensis* NCYC 3413, ενώ παρήγαγε αραβιτόλη από γλυκόζη ως μοναδική πηγή άνθρακα. Παράλληλα το στέλεχος παρήγαγε και γλυκερόλη ως παραπροϊόν της αιθανολικής ζύμωσης. Πραγματοποιήθηκαν δύο ζυμώσεις με αρχικές συγκεντρώσεις γλυκόζης 400 g L<sup>-1</sup> και 200 g L<sup>-1</sup> ενώ οι συγκεντρώσεις που προέκυψαν ήταν πολύ μικρές της τάξης των 6,3 g L<sup>-1</sup> και 5,0 g L<sup>-1</sup> αντίστοιχα (Kumar and Gummadi, 2011).

Οι Zhang et al. (2014) μελέτησαν τη ζύμη *Pichia anomala* TIB-x229 (CGMCC No. 5482), η οποία ήταν ικανή να μετατρέπει τη γλυκόζη σε D-αραβιτόλη ως κύριο προϊόν και τη ριβιτόλη ως παραπροϊόν σε καλλιέργεια φιάλης. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι εκκρίνονταν περίπου 22,5 g L<sup>-1</sup> D-αραβιτόλης από 100 g L<sup>-1</sup> γλυκόζης μετά από επώαση 30 h και 39 g L<sup>-1</sup> αραβιτόλης από 180 g L<sup>-1</sup> γλυκόζης μετά από 70 h, δίδοντας απόδοση περίπου 0,22 g g<sup>-1</sup> (Zhang et al., 2014).

Οι Saha et al. (2007) απομόνωσαν ζύμες από κυψέλες μελισσών και επέλεξαν ένα στέλεχος, που αναγνωρίστηκε ως *Zygosaccharomyces rouxii*, το οποίο παρήγαγε

83,4 ± 1,1 g L<sup>-1</sup> D-αραβιτόλης από 175 ± 1,1 g L<sup>-1</sup> γλυκόζης σε 240 ώρες σε σύστημα συνεχούς καλλιέργειας. Οι ερευνητές βελτιστοποίησαν τη διαδικασία και διαπίστωσαν ότι η βέλτιστη θερμοκρασία ήταν 30 °C, το pH 5,0 (αφού έγιναν έρευνες σε pH 4,0 με 6,0) και η βέλτιστη ταχύτητα ανάδευσης ήταν στην περιοχή των 300-450 rpm min<sup>-1</sup>. Εκτός από τη γλυκόζη, το εξεταζόμενο στέλεχος θα μπορούσε να αφομοιώσει μια ποικιλία μονοσακχαριτών, π.χ. φρουκτόζη, γαλακτόζη, μαννόζη και ξυλόζη για την παραγωγή D-αραβιτόλης, αλλά δεν δύναται να χρησιμοποιήσει τη L-αραβινόζη. Με χρήση φρουκτόζης ως υπόστρωμα ο μικροοργανισμός παράγει D-αραβιτόλη, γλυκερόλη και αιθανόλη ενώ με ξυλόζη παράγει D-αραβιτόλη και ξυλιτόλη (Saha et al., 2007).

Οι Escalante et al. (1990) ανέφεραν ότι το στέλεχος *Hansenula polymorpha* DSM 70277 παράγει 18,8 g L<sup>-1</sup> αραβιτόλης με υπόστρωμα γλυκόζη μετά από 60 ώρες ημισυνεχούς καλλιέργειας σε συνθήκες 45 °C, pH 4-8 και ρυθμό ανάδευσης 1000 rev min<sup>-1</sup>. Ο Zakaria (2001) ανέφερε ότι η *Candida famata* R28 αναπτύχθηκε πολύ καλά σε ένα μέσο που περιείχε D-γλυκόζη ως μοναδική πηγή άνθρακα και ήταν σε θέση να παράγει D-αραβιτόλη ως το μοναδικό προϊόν του μεταβολισμού, αλλά πραγματοποίησε μόνο μια ποιοτική ανάλυση του προϊόντος.

Τέλος, όσον αφορά τη θερμοκρασία όπως αναφέρεται στα αποτελέσματα του Πίνακα 4.1, παρατηρείτε ότι η βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης των περισσότερων ζυμών προς παραγωγή αραβιτόλης ήταν οι 30 °C. Επιπλέον σε σχετική έρευνα που πραγματοποίησαν οι Koganti et al. (2011) εξέτασαν τις συγκεντρώσεις αραβιτόλης που παράγονται σε διαφορετικές θερμοκρασίες από τα στελέχη *D. hansenii* (SBP-1), *G. candidum* (SBP-12) και *M. Zobellii* (SBP-14), με χρήση υποστρώματος γλυκερόλης μετά από 3 ημέρες καλλιέργειας. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η μέγιστη παραγωγή αραβιτόλης ήταν στους 30 °C. Ο *D. hansenii* (SBP-1) βρέθηκε ιδιαίτερα ευαίσθητος σε υψηλότερη θερμοκρασία, παράγοντας αμελητέα ποσότητα αραβιτόλης στους 35 °C. Η παραγωγή αραβιτόλης από τον *M. Zobellii* (SBP-14) ήταν, από την άλλη πλευρά, παρόμοια στους 30 °C και στους 35 °C (Koganti et al., 2011).

Τα αποτελέσματα που αποκτήθηκαν από τους διάφορους επιστήμονες υποδηλώνουν ότι υπάρχουν διάφοροι παράγοντες που επηρεάζουν την παραγωγή αραβιτόλης από ζύμες, τόσο σε φιάλες ανακινήσεως όσο και σε βιοαντιδραστήρες. Μεταξύ των παραγόντων που επηρεάζουν την αφομοίωση του υποστρώματος και την έκκριση του προϊόντος είναι η θερμοκρασία επώασης, το μέσο σύνθεσης (το είδος

του υποστρώματος και οι συγκεντρώσεις των πηγών οξυγόνου και αζώτου) το pH, καθώς και η ταχύτητα ανάδευσης.

## 5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

- Η παρούσα μελέτη έδειξε ότι η ζύμη *Debaryomyces hansenii* Y-41 είναι ικανή να μεταβολίσει ικανοποιητικά τα τρία υποστρώματα στα οποία καλλιεργήθηκε, δηλαδή την εμπορική γλυκόζη και φρουκτόζη και τη βιομηχανική γλυκερόλη.
- Η καλλιέργεια του μικροοργανισμού *Debaryomyces hansenii* αποδείχθηκε αποδοτική, λόγω του ότι η αύξηση του συγκεκριμένου μικροοργανισμού επιτεύχθηκε σε υψηλή αρχική συγκέντρωση υποστρώματος, η οποία δεν καθίστανται παρεμποδιστική για την ανάπτυξη της ζύμης.
- Το στέλεχος *Debaryomyces hansenii* Y-41 έχει την δυνατότητα να αναπτύσσεται σε ένα μεγάλο εύρος pH, θερμοκρασιών και λόγων άνθρακα αζώτου.
- Τα αποτελέσματα της βέλτιστης ζύμωσης που προέκυψαν, είναι συγκρίσιμα με τα βέλτιστα της βιβλιογραφίας και από τα καλύτερα που έχουν αναφερθεί βιβλιογραφικά. Επιπλέον για τη ζύμη *Debaryomyces hansenii* Y-41 δεν έχουν αναφερθεί ζυμώσεις σε εμπορική γλυκόζη και φρουκτόζη στη βιβλιογραφία.
- Στις ζυμώσεις που διενεργήθηκαν στη συγκεκριμένη μελέτη παράγεται ως μοναδικό προϊόν η αραβιτόλη. Η μη παραγωγή παραπροϊόντων θεωρείται ευεργετική διότι δεν απαιτείται η απομόνωση αυτών, διαδικασία που αυξάνει το κόστος.
- Οι μικροβιακές ζυμώσεις για παραγωγή πολυολών αποτελεί πεδίο έρευνας τα τελευταία χρόνια λόγω της υψηλής αξίας αυτών.
- Ένα θέμα που θα αποτελέσει αντικείμενο μελλοντική μελέτης, είναι η προσπάθεια μείωσης του χρόνου της ζύμωσης, που όπως παρατηρήθηκε στις ζυμώσεις διαλείποντος έργου που διενεργήθηκαν μπορεί να πραγματοποιηθεί με αύξηση του αζώτου στο μέσο.
- Σε μεταγενέστερη έρευνα θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ο μικροοργανισμός *Debaryomyces hansenii* Y-41 σε υπόστρωμα γλυκόζης ή φρουκτόζης, ενδεχομένως και σε ένα μείγμα αυτών, τα οποία να προέρχονται από υδρόλυση λιγνινοκυτταρινούχων αποβλήτων ή από «ληγμένες» εδάδιμες πηγές (πχ. σιρόπι γλυκόζης).

## 6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Al Loman, A. and Ju, L.-K. (2014) ‘Arabitol production from glycerol by fermentation’, *ACS Symposium Series*, 1178

Ahmed, Z. (2001). The Properties of *Candida famata* R28 for D-Arabitol Production from D-glucose.

Babbar, N. and Oberoi, H. S. (2015) ‘Therapeutic and Nutraceutical Potential of Bioactive Compounds Extracted from Fruit Residues’, 337, pp. 319–337.

Belitz Hans Dieter, Grosch Werner and Scieberle Peter, (2009) Food Chemistry [Book]. S pringer-Verlag Berlin Heidelberg. 4<sup>th</sup> Edition.

Bio Intelligence Service, 2010. Preparatory Study on Food Waste Across EU 27. European Commission – Directorate C – Industry, Paris, France.

Breuer, U. and Harms, H. (2006) ‘*Debaryomyces hansenii* — an extremophilic yeast with biotechnological potential’, pp. 415–437.

Choi, S., Song, C. W., Shin, J. H., & Lee, S. Y. (2015). Biorefineries for the production of top building block chemicals and their derivatives. *Metabolic engineering*, 28, 223-239.

Diamantopoulou, P., Papanikolaou, S., Katsarou, E., Komaitis, M., Aggelis, G., & Philippoussis, A. (2012). Mushroom polysaccharides and lipids synthesized in liquid agitated and static cultures. Part II: study of *Volvariella volvacea*. *Applied biochemistry and biotechnology*, 167(7), 1890-1906.

Diamantopoulou, P., Papanikolaou, S., Kapoti, M., Komaitis, M., Aggelis, G., & Philippoussis, A. (2012). Mushroom polysaccharides and lipids synthesized in liquid agitated and static cultures. Part I: Screening various mushroom species. *Applied biochemistry and biotechnology*, 167(3), 536-551.

Escalante, Javier, et al. "Production of arabitol from glucose by *Hansenula polymorpha*." *Journal of fermentation and bioengineering* 70.4 (1990): 228-231.

Erickson, B., Nelson and Winters, P. (2012) ‘Perspective on opportunities in industrial biotechnology in renewable chemicals’, *Biotechnology Journal*, 7(2), pp. 176–185.

Fabre, C., Chamari, K., Mucci, P., Masse-Biron, J., & Prefaut, C. (2002). Improvement of cognitive function by mental and/or individualized aerobic training in healthy elderly subjects. *International journal of sports medicine*, 23(06), 415-421.

Fazenda, M. L., Seviour, R., McNeil, B., & Harvey, L. M. (2008). Submerged

culture fermentation of “higher fungi”: the macrofungi. *Advances in applied microbiology*, 63, 33-103.

Folch, J., Lees, M., & Sloane-Stanley, G. H. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem*, 226(1), 497-509.

Grijo, F. M., Amaro, C., Azinheira, H., Pelica, F., & Amaral-Collaco, M. T. (2000). Polyols production during single and mixed substrate fermentations in *Debaryomyces hansenii*. *Bioresource technology*, 71(3), 245-251.

Gaydos, R. M. (1981). Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology. Vol. 15.

Galanakis, C. M. (2012) ‘Recovery of high components from food wastes : Conventional , emerging technologies and commercialized applications’, *Trends in Food Science & Technology*. Elsevier Ltd, 26(2), pp. 68–87.

Goñi, I., & Hervert-Hernández, D. (2011). By-products from plant foods are sources of dietary fibre and antioxidants. In *Phytochemicals-bioactivities and impact on health*. InTech.

Gustavsson, A., Svensson, M., Jacobi, F., Allgulander, C., Alonso, J., Beghi, E., ... & Gannon, B. (2011). Cost of disorders of the brain in Europe 2010. *European neuropsychopharmacology*, 21(10), 718-779.

Hahn-Hägerdal, B., Karhumaa, K., Fonseca, C., Spencer-Martins, I., & Gorwa-Grauslund, M. F. (2007). Towards industrial pentose-fermenting yeast strains. *Applied microbiology and biotechnology*, 74(5), 937-953.

Jovall, P. A., Tunblad-Johansson, I., & Adler, L. (1990). <sup>13</sup>C NMR analysis of production and accumulation of osmoregulatory metabolites in the salt-tolerant yeast *Debaryomyces hansenii*. *Archives of microbiology*, 154(3), 209-214.

Kachrimanidou, V., Kopsahelis, N., Chatzifragkou, A., Papanikolaou, S., Yanniotis, S., Kookos, I., & Koutinas, A. A. (2013). Utilisation of by-products from sunflower-based biodiesel production processes for the production of fermentation feedstock. *Waste and Biomass Valorization*, 4(3), 529-537.

Kamm, B. and Kamm, M. (2006) ‘Biorefineries - Multi product processes’, *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 105(January), pp. 175–204.

Koganti, S., Kuo, T. M., Kurtzman, C. P., Smith, N., & Ju, L. K. (2011). Production of arabitol from glycerol: strain screening and study of factors affecting production yield. *Applied microbiology and biotechnology*, 90(1), 257-267.

Koganti, S., & Ju, L. K. (2013). *Debaryomyces hansenii* fermentation for arabitol production. *Biochemical engineering journal*, 79, 112-119.

Kordowska-Wiater, M. (2015). Production of arabitol by yeasts: current status and future prospects. *Journal of applied microbiology*, 119(2), 303-314.

Kumdam, H. B., Murthy, S. N., & Gummadi, S. N. (2012). A statistical approach to optimize xylitol production by *Debaryomyces nepalensis* NCYC 3413 in vitro. *Food and Nutrition Sciences*, 3(08), 1027.

Kumdam, H., Murthy, S. N., & Gummadi, S. N. (2013). Production of ethanol and arabitol by *Debaryomyces nepalensis*: influence of process parameters. *AMB Express*, 3(1), 23.

Kumdam, H., Murthy, S. N. and Gummadi, S. N. (2014) 'Arabitol production by microbial fermentation - biosynthesis and future applications', *International Journal of Sciences & Applied Research*, 1(1), pp. 1–12.

Levin, Y. (2002). Electrostatic correlations: from plasma to biology. *Reports on progress in physics*, 65(11), 1577.

Liang, Y., Sarkany, N., & Cui, Y. (2009). Biomass and lipid productivities of *Chlorella vulgaris* under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic growth conditions. *Biotechnology letters*, 31(7), 1043-1049.

Lie, S. (1973). The EBC-ninhydrin method for determination of free alpha amino nitrogen. *Journal of the Institute of Brewing*, 79(1), 37-41.

Ligthelm, M. E., Prior, B. A., & du Preez, J. C. (1988). The oxygen requirements of yeasts for the fermentation of D-xylose and D-glucose to ethanol. *Applied microbiology and biotechnology*, 28(1), 63-68.

Lindberg, B., Wachtmeister, C. A., & Wickberg, B. (1952). Studies on the chemistry of lichens. 2. Umbilicin, an arabitol galactoside from *Umbilicaria-Pustulata* (L) hoffm. *Acta chemical Scandina Vica*, 6(7), 1052-1055.

Loman, A. A., & Ju, L. K. (2013). Purification of arabitol from fermentation broth of *Debaryomyces hansenii* using glycerol as substrate. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 88(8), 1514-1522.

Miller (1959) *Anal. Chem.* 31(3):426-458

Neves, M. L., Oliveira, R. P., & Lucas, C. M. (1997). Metabolic flux response to salt-induced stress in the halotolerant yeast *Debaryomyces hansenii*. *Microbiology*, 143(4), 1133-1139.

Nozaki, H., Suzuki, S. I., Tsuyoshi, N., & Yokozeki, K. (2003). Production of D-arabitol by *Metschnikowia reukaufii* AJ14787. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 67(9), 1923-1929.

Onishi, H. and Suzuki, T. (1969) 'Microbial production of xylitol from glucose.', *Applied microbiology*, 18(6), pp. 1031-5.

Papagora, C., Roukas, T. and Kotzekidou, P. (2013) 'Optimization of extracellular lipase production by *Debaryomyces hansenii* isolates from dry-salted olives using response surface methodology', *Food and Bioproducts Processing*. Institution of Chemical Engineers, 91(4), pp. 413-420.

Papanikolaou, S., Chevalot, I., Komaitis, M., Aggelis, G., & Marc, I. (2001). Kinetic profile of the cellular lipid composition in an oleaginous *Yarrowia lipolytica* capable of producing a cocoa-butter substitute from industrial fats. *Antonie van Leeuwenhoek*, 80(3-4), 215-224.

Papanikolaou S., Aggelis G (2010). *Yarrowia lipolytica*: A model microorganism used for the production of tailor-made lipids. *European journal of Lipid Science and Technology* vol.112, p. 639-654.

Philippi, K., Tsamandouras, N., Grigorakis, S., & Makris, D. P. (2016). Ultrasound-assisted green extraction of eggplant peel (*Solanum melongena*) polyphenols using aqueous mixtures of glycerol and ethanol: optimisation and kinetics. *Environmental Processes*, 3(2), 369-386.

Podmore, W. D., Bebington, L. and Bennett, M. G. (1961) 'States Patent '50', pp. 1-2.

Prasertsan, S. and Prasertsan, P. (1996) 'Biomass residues from palm oil mills in Thailand: An overview on quantity and potential usage', *Biomass and Bioenergy*, 11(5), pp. 387-395. Products, B. (2007) 'metabolism in *Candida arabinofementans* PYCC 5603 and *Pichia guilliermondii* PYCC 3012 : influence of sugar and oxygen on product formation L -Arabinose', pp. 303-310.

Products, B. (2014) 'Production of D -arabitol from raw glycerol by *Candida quercitrusa*', pp. 2947-2953.

Qin, L., Liu, L., Zeng, A. P., & Wei, D. (2017). From low-cost substrates to single cell oils synthesized by oleaginous yeasts. *Bioresource Technology*.

Saha, B. C., Sakakibara, Y. and Cotta, M. A. (2007) 'Production of D-arabitol by a newly isolated *Zygosaccharomyces rouxii*', *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 34(7), pp. 519-523.



Seviour, R. J., Stasinopoulos, S. J., Auer, D. P. F., & Gibbs, P. A. (1992). Production of pullulan and other exopolysaccharides by filamentous fungi. *Critical Reviews in Biotechnology*, 12(3), 279-298.

Stacey, M., Barker, S., Uglevody zhivyykh tkanei. Moscow, (1965).

Sorensen, B. B. and Jakobsen, M. (1997) 'The combined effects of temperature, pH and NaCl on growth of *Debaryomyces hansenii* analyzed by flow cytometry and predictive microbiology', *International journal of food microbiology*, 34, pp. 209–220.

Suzuki, S. I., Sugiyama, M., Mihara, Y., HASHIGUCHI, K. I., & YOKOZEKI, K. (2002). Novel enzymatic method for the production of xylitol from D-arabitol by *Gluconobacter oxydans*. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 66(12), 2614-2620.

Talja, R. A., & Roos, Y. H. (2001). Phase and state transition effects on dielectric, mechanical, and thermal properties of polyols. *Thermochimica Acta*, 380(2), 109-121.

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

Tchakouteu, S. S., Kalantzi, O., Gardeli, C., Koutinas, A. A., Aggelis, G., & Papanikolaou, S. (2015). Lipid production by yeasts growing on biodiesel-derived crude glycerol: strain selection and impact of substrate concentration on the fermentation efficiency. *Journal of applied microbiology*, 118(4), 911-927.

Toyoda, T. and Ohtaguchi, K. (2011) 'Effect of temperature on D -arabitol production from lactose by *Kluyveromyces lactis*', pp. 1179–1185.

Tsouko, E., Kachrimanidou, V., dos Santos, A. F., Lima, M. E. D. N. V., Papanikolaou, S., de Castro, A. M., ... & Koutinas, A. A. (2017). Valorization of By-Products from Palm Oil Mills for the Production of Generic Fermentation Media for Microbial Oil Synthesis. *Applied biochemistry and biotechnology*, 181(4), 1241-1256.

Werpy, T. and Petersen, G. (2004) 'Top Value Added Chemicals from Biomass Volume I — Results of Screening for Potential Candidates from Sugars and Synthesis Gas Top Value Added Chemicals From Biomass Volume I: Results of Screening for Potential Candidates', *Other Information: PBD: 1 Aug 2004*, p. Medium: ED; Size: 76 pp. pages.

Wong, B., Leeson, S., Grindle, S., Magee, B., Brooks, E., & Magee, P. T. (1995). D-arabitol metabolism in *Candida albicans*: construction and analysis of mutants lacking D-arabitol dehydrogenase. *Journal of bacteriology*, *177*(11), 2971-2976.

Yoshikawa, J., Habe, H., Morita, T., Fukuoka, T., Imura, T., Iwabuchi, H., ... & Kitamoto, D. (2014). Production of D-arabitol from raw glycerol by *Candida quercitrusa*. *Applied microbiology and biotechnology*, *98*(7), 2947-2953.

Zhang, G., Lin, Y., He, P., Li, L., Wang, Q., & Ma, Y. (2014). Characterization of the sugar alcohol-producing yeast *Pichia anomala*. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, *41*(1), 41-48.

Zhu, H. Y., Xu, H., Dai, X. Y., Zhang, Y., Ying, H. J., & Ouyang, P. K. (2010). Production of D-arabitol by a newly isolated *Kodamaea ohmeri*. *Bioprocess and biosystems engineering*, *33*(5), 565-571.