

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΠΜΣ «ΕΠΙΣΤΗΜΗ & ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΔΙΑΤΡΟΦΗ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ»

ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ «ΒΙΟΔΙΕΡΓΑΣΙΕΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΒΙΟΔΙΪΛΙΣΤΗΡΙΑ»

Εργαστήριο Μικροβιολογίας & Βιοτεχνολογίας Τροφίμων

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

«Μελέτη της παραγωγής μικροβιακών λιπιδίων σε υποστρώματα από παραπροϊόντα της βιομηχανίας παραγωγής ζάχαρης»



Επιβλέπων : Απόστολος Κουτίνας, Επίκουρος Καθηγητής

Ευθυμία Α. Μποβιάτση

ΑΘΗΝΑ 2017

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΠΜΣ «ΕΠΙΣΤΗΜΗ & ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΔΙΑΤΡΟΦΗ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ»

ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ «ΒΙΟΔΙΕΡΓΑΣΙΕΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΒΙΟΔΙΪΛΙΣΤΗΡΙΑ»

Εργαστήριο Μικροβιολογίας & Βιοτεχνολογίας Τροφίμων

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

«Μελέτη της παραγωγής μικροβιακών λιπιδίων σε υποστρώματα από παραπροϊόντα της βιομηχανίας παραγωγής ζάχαρης»

Επιβλέπων : Απόστολος Κουτίνας, Επίκουρος Καθηγητής

Ευθυμία Α. Μποβιάτση

ΑΘΗΝΑ 2017

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

«Μελέτη της παραγωγής μικροβιακών λιπιδίων σε υποστρώματα από παραπροϊόντα της βιομηχανίας παραγωγής ζάχαρης»

Εξεταστική επιτροπή :

Απόστολος Κουτίνας, Επίκουρος Καθηγητής (Επιβλέπων)

Σεραφείμ Παπανικολάου, Αναπληρωτής Καθηγητής

Αθανάσιος Μαλλούχος, Λέκτορας

Ευθυμία Α. Μποβιάτση

ΑΘΗΝΑ 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 επίκουρο καθηγητή και επιβλέποντα μου, Δρ. Απόστολο Κουτίνα, 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 στην υποψήφια διδάκτορα Κατερίνα Παπαδάκη για την πολύτιμη βοήθειά της και τις χρήσιμες συμβουλές της κατά τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας και της συγγραφής της παρούσας μελέτης. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Αν. Καθηγητή Δρ. Σεραφείμ Παπανικολάου και τον Λέκτορα Δρ. Αθανάσιο Μαλλούχο 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.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο στόχος της παρούσας μελέτης ήταν η δυνατότητα παραγωγής μικροβιακών ελαίων από τις ζύμες *Rhodosporidium toruloides* Y-27012 και *Rhodosporidium kratochvilovae* Y-43 χρησιμοποιώντας υποστρώματα από την βιομηχανικής παραγωγής ζάχαρης, όπως μελάσα. Αρχικά, πραγματοποιήθηκαν ζυμώσεις υγρής κατάστασης σε κωνικές φιάλες χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα την ακατέργαστη ζάχαρη. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η μέγιστη παραγωγή βιομάζας και λίπους ήταν 22,0 g/L και 6,5 g/L, αντίστοιχα, για την ζύμη *R. toruloides* Y-27012 και 23,07 g/L και 10,6 g/L, αντίστοιχα, για την ζύμη *R. kratochvilovae* Y-43. Στη συνέχεια, μελετήθηκε η δυνατότητα λιποσυσσώρευσης των εν λόγω στελεχών σε υπόστρωμα μελάσας. Το γεγονός ότι η μελάσα, εκτός από την περιεχόμενη ποσότητα σακχάρων, είναι πλούσια πηγή σε άζωτο και σε ιχνοστοιχεία, οδήγησε σε ιδιαίτερα χαμηλή παραγωγή λίπους, καθώς ενισχύθηκε η αύξηση της βιομάζας έναντι της λιποσυσσώρευσης. Κατόπιν έγινε μελέτη της επίδρασης των φωσφορικών αλάτων, ιχνοστοιχείων, φαινολικών συστατικών, που περιέχονται στη μελάσα, καθώς και των εμπορικών πηγών αζώτου στην παραγωγή μικροβιακών λιπιδίων χρησιμοποιώντας μελάσα ως υπόστρωμα. Η μελέτη έδειξε ότι η βέλτιστη σύσταση του θρεπτικού μέσου ήταν προσθήκη φωσφορικών αλάτων για το στέλεχος *R. kratochvilovae* Y-43 με μέγιστη παραγωγή λίπους 9,1 g/L. Αντιθέτως, η μεγαλύτερη παραγωγή λίπους (8,4 g/L) για το στέλεχος *R. toruloides* Y-27012 επιτεύχθηκε υπό την απουσία φωσφορικών αλάτων και ιχνοστοιχείων. Επίσης, τα φαινολικά συστατικά φάνηκε ότι δεν επηρέασαν την διαδικασία της λιποσυσσώρευσης, ενώ η απουσία των εμπορικών πηγών αζώτου από το θρεπτικό μέσο οδήγησε στο συμπέρασμα ότι το περιεχόμενο άζωτο της μελάσας είναι επαρκές για την ανάπτυξη των ζυμών και την παραγωγή λίπους. Λαμβάνοντας υπόψη τα προηγούμενα αποτελέσματα, το στέλεχος *R. toruloides* Y-27012 επιλέχθηκε για την περαιτέρω μελέτη παραγωγής μικροβιακού λίπους σε βιοαντιδραστήρες, χρησιμοποιώντας την βελτιστοποιημένη σύσταση του θρεπτικού μέσου σε υπόστρωμα α) μελάσας και β) μελάσας άνευ φαινολικών συστατικών. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η μέγιστη παραγωγή λίπους ήταν 7,5 g/L σε υπόστρωμα μελάσας και 6,8 g/L σε μελάσα άνευ φαινολικών συστατικών. Τέλος, το παραγόμενο μικροβιακό λίπος αξιοποιήθηκε μαζί με την πολυόλη νεοπεντυλογλυκόλη για την παραγωγή βιολιπαντικών ουσιών, μέσω ενζυμικής διεργασίας. Ο βαθμός μετατροπής του λίπους ήταν 76% στα 5 min της αντίδρασης.

Λέξεις κλειδιά: βιοδιυλιστήριο, μελάσα, ελαιογόνες ζύμες, μικροβιακό λίπος, ελαιοχημικά, βιολιπαντικά

ABSTRACT

Aim of the present thesis was the ability to produce microbial oils from yeasts *Rhodospiridium toruloides* Y-27012 and *Rhodospiridium kratochvilovae* Y-43 using substrates from industrial sugar production such as molasses. Initially, liquid-state fermentations were performed in shake flasks using sugarcane as substrate. The results showed that the maximum biomass and lipid production was 22,0 g/L and 6,5 g/L, respectively, for the yeast *R. toruloides* Y-27012 and 23,07 g / L and 10,6 g / L, respectively, for the yeast *R. kratochvilovae* Y-43. Subsequently, the possibility of lipid accumulation of these strains on a molasses substrate was studied. The fact that molasses, in addition to the amount of sugar that contains, is a rich source of nitrogen and minerals, has led to particularly low lipid production, as the increase in biomass has been boosted against lipid accumulation. Then a study took place to find out the effect of phosphate buffers, minerals, phenolic components, contained in the molasses, and commercial nitrogen sources, in the production of microbial lipids using molasses as a substrate. The study showed that the optimum composition of the fermentation medium was the addition of phosphate buffers for the *R. kratochvilovae* Y-43 strain with a maximum lipid output of 9,1 g/L. In contrast, the biggest lipid production (8,4 g/L) for the strain of *R. toruloides* Y-27012 was achieved in the absence of phosphate buffers and minerals. Also, the phenolic components appeared to have not affected the process of lipid accumulation, and the absence of commercial sources of nitrogen from the fermentation medium led to the conclusion that the nitrogen content of molasses is sufficient for the growth of yeasts and lipid production. Taking into account the previous results, the strain *R. toruloides* Y-27012 was selected for further study of microbial oil production in bioreactors, using the optimized composition of the medium on substrate a) molasses and b) molasses without phenolic components. The results showed that maximum lipid production was 7,5 g/L on molasses and 6,8 g/L in molasses without phenolic components. Finally, the produced microbial oil was utilized with the polyol neopentylglycol for the production of biolubricants through an enzymatic process. The degree of oil conversion was 76% at the 5 min of the reaction.

Keywords: biorefinery, molasses, oleaginous yeasts, microbial oil, oleochemicals, biolubricants

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

1.	Εισαγωγή.....	14
1.1	Αξιοποίηση αποβλήτων τροφίμων στο πλαίσιο της Κυκλικής Οικονομίας.....	14
1.2	Παραγωγή αποβλήτων και παραπροϊόντων από την βιομηχανική επεξεργασία της ζάχαρης	15
1.3	Παραγωγή βιοτεχνολογικών προϊόντων σε υπόστρωμα μελάσας.....	20
1.4	Παραγωγή μικροβιακού λίπους.....	22
1.4.1	Ελαιογόνοι μικροοργανισμοί.....	22
1.4.2	Η σύσταση και ο ρόλος των μικροβιακών λιπιδίων.....	25
1.4.3	Βιοχημεία συσσώρευσης λίπους	26
1.4.4	Εφαρμογές μικροβιακού λίπους.....	28
1.5	Σκοπός μελέτης	34
2.	Υλικά και μέθοδοι	35
2.1	Βιολογικό υλικό.....	35
2.2	Παρασκευή του εμβολίου.....	35
2.3	Θρεπτικά υποστρώματα	35
2.4	Παραγωγή μικροβιακού λίπους σε ασυνεχείς υγρές ζυμώσεις	36
2.5	Παραγωγή μικροβιακού λίπους σε ημισυνεχείς υγρές ζυμώσεις σε βιοαντιδραστήρα.....	36
2.6	Παραγωγή βιολιπαντικών ουσιών με χρήση μικροβιακού λίπους ως πρώτη ύλη.....	37
2.7	Αναλυτικές μέθοδοι	38
2.7.1	Προσδιορισμός pH	38
2.7.2	Προσδιορισμός ξηρής βιομάζας	38
2.7.3	Προσδιορισμός σακχάρων	38
2.7.4	Μελέτη μικροβιακού λίπους.....	39
2.7.5	Προσδιορισμός αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων (FAN).....	41
2.7.6	Προσδιορισμός του ανόργανου φωσφόρου (IP)	42
2.7.7	Απομόνωση φαινολικών συστατικών της μελάσας.....	43
2.7.8	Προσδιορισμός βαθμού εστεροποίησης του μικροβιακού λίπους προς παραγωγή βιολιπαντικών ουσιών	43
3.	Αποτελέσματα.....	44
3.1	Παραγωγή μικροβιακού λίπους σε ασυνεχείς ζυμώσεις με ακατέργαστη ζάχαρη ως υπόστρωμα	44
3.1.1	Μελέτη της ζύμης <i>Rhodosporidium toruloides</i>	44
3.1.2	Μελέτη της ζύμης <i>Rhodosporidium kratochvilovae</i>	45
3.2	Παραγωγή μικροβιακού λίπους σε ασυνεχείς ζυμώσεις με μελάσα ως υπόστρωμα.....	46

3.2.1	Επίδραση της προσθήκης μίγματος φωσφορικών αλάτων και ιχνοστοιχείων στο θρεπτικό μέσο	46
3.2.2	Επίδραση της απουσίας μίγματος φωσφορικών αλάτων και ιχνοστοιχείων από το θρεπτικό μέσο	49
3.2.3	Επίδραση της προσθήκης φωσφορικών αλάτων στο θρεπτικό μέσο	50
3.2.4	Επίδραση της απουσίας των εμπορικών πηγών αζώτου	52
3.2.5	Επίδραση των φαινολικών συστατικών της μελάσας.....	54
3.3	Παραγωγή μικροβιακού λίπους σε ημισυνεχείς ζυμώσεις σε βιοαντιδραστήρα με μελάσα ως υπόστρωμα	56
3.4	Μελέτη της σύστασης λιπαρών οξέων των μικροβιακών λιπιδίων	59
3.5	Αξιοποίηση μικροβιακού λίπους για παραγωγή χημικών υψηλής προστιθέμενης αξίας	62
4.	Συζήτηση	63
	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	69
	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	71

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ

- Διάγραμμα 1** Κινητική παραγωγής μικροβιακού λίπους κατά την καλλιέργεια του στελέχους *Rhodospiridium toruloides* Y-27012 σε υπόστρωμα αποτελούμενο από 70 g/L ακατέργαστης ζάχαρης ως πηγή άνθρακα. (ο) Σάκχαρα (σακχαρόζη, γλυκόζη και φρουκτόζη) (g/L), (x) Άζωτο ελεύθερων αμινομάδων FAN (mg/L), (□) Ανόργανος Φώσφορος IP (g/L), (▲) Βιομάζα (g/L), (●) Λίπος (g/L)..... 45
- Διάγραμμα 2** Κινητική παραγωγής μικροβιακού λίπους κατά την καλλιέργεια του στελέχους *Rhodospiridium kratochvilovae* Y-43 σε υπόστρωμα αποτελούμενο από 70 g/L ακατέργαστης ζάχαρης ως πηγή άνθρακα. (ο) Σάκχαρα (σακχαρόζη, γλυκόζη και φρουκτόζη) (g/L), (x) Άζωτο ελεύθερων αμινομάδων FAN (mg/L), (□) Ανόργανος Φώσφορος IP (g/L), (▲) Βιομάζα (g/L), (●) Λίπος (g/L)..... 46
- Διάγραμμα 3** Κινητική παραγωγής μικροβιακού λίπους κατά την καλλιέργεια του στελέχους *R.toruloides* Y-27012 σε υπόστρωμα μελάσας με προσθήκη μίγματος φωσφορικών αλάτων και ιχνοστοιχείων (ο) Σάκχαρα (σακχαρόζη, γλυκόζη και φρουκτόζη) (g/L), (x) Άζωτο ελεύθερων αμινομάδων FAN (mg/L), (□) Ανόργανος Φώσφορος IP (g/L), (▲) Βιομάζα (g/L), (●) Λίπος (g/L)..... 48
- Διάγραμμα 4** Κινητική παραγωγής μικροβιακού λίπους κατά την καλλιέργεια του στελέχους *R.kratochvilovae* Y-43 σε υπόστρωμα μελάσας με προσθήκη μίγματος φωσφορικών αλάτων και ιχνοστοιχείων. (ο) Σάκχαρα (σακχαρόζη, γλυκόζη και φρουκτόζη) (g/L), (x) Άζωτο ελεύθερων αμινομάδων FAN (mg/L), (□) Ανόργανος Φώσφορος IP (g/L), (▲) Βιομάζα (g/L), (●) Λίπος (g/L)..... 48
- Διάγραμμα 5** Κινητική παραγωγής μικροβιακού λίπους κατά την καλλιέργεια του στελέχους *R.toruloides* Y-27012 σε υπόστρωμα μελάσας χωρίς προσθήκη μίγματος φωσφορικών αλάτων και ιχνοστοιχείων. (ο) Σάκχαρα (σακχαρόζη, γλυκόζη και φρουκτόζη) (g/L), (x) Άζωτο ελεύθερων αμινομάδων FAN (mg/L), (□) Ανόργανος Φώσφορος IP (g/L), (▲) Βιομάζα (g/L), (●) Λίπος (g/L)..... 49
- Διάγραμμα 6** Κινητική παραγωγής μικροβιακού λίπους κατά την καλλιέργεια του στελέχους *R.kratochvilovae* Y-43 σε υπόστρωμα μελάσας χωρίς προσθήκη μίγματος φωσφορικών αλάτων και ιχνοστοιχείων. (ο) Σάκχαρα (σακχαρόζη, γλυκόζη και φρουκτόζη) (g/L), (x) Άζωτο ελεύθερων αμινομάδων FAN (mg/L), (□) Ανόργανος Φώσφορος IP (g/L), (▲) Βιομάζα (g/L), (●) Λίπος (g/L)..... 50
- Διάγραμμα 7** Κινητική παραγωγής μικροβιακού λίπους κατά την καλλιέργεια του στελέχους *R.toruloides* Y-27012 σε υπόστρωμα μελάσας με προσθήκη φωσφορικών αλάτων. (ο) Σάκχαρα (σακχαρόζη, γλυκόζη και φρουκτόζη) (g/L), (x) Άζωτο ελεύθερων αμινομάδων FAN (mg/L), (□) Ανόργανος Φώσφορος IP (g/L), (▲) Βιομάζα (g/L), (●) Λίπος (g/L)..... 51
- Διάγραμμα 8** Κινητική παραγωγής μικροβιακού λίπους κατά την καλλιέργεια του στελέχους *R.kratochvilovae* Y-43 σε υπόστρωμα μελάσας με προσθήκη πηγής αζώτου και φωσφορικών αλάτων. (ο) Σάκχαρα (σακχαρόζη, γλυκόζη και φρουκτόζη) (g/L), (x) Άζωτο ελεύθερων αμινομάδων FAN (mg/L), (□) Ανόργανος Φώσφορος IP (g/L), (▲) Βιομάζα (g/L), (●) Λίπος (g/L)..... 52
- Διάγραμμα 9** Κινητική παραγωγής μικροβιακού λίπους κατά την καλλιέργεια του στελέχους *R.toruloides* Y-27012 σε υπόστρωμα μελάσας χωρίς καμία προσθήκη αλάτων, ιχνοστοιχείων και πηγών

αζώτου. (ο) Σάκχαρα (σακχαρόζη, γλυκόζη και φρουκτόζη) (g/L), (x) Άζωτο ελεύθερων αμινομάδων FAN (mg/L), (□) Ανόργανος Φώσφορος IP (g/L), (▲) Βιομάζα (g/L), (●) Λίπος (g/L).....	53
Διάγραμμα 10 Κινητική παραγωγής μικροβιακού λίπους κατά την καλλιέργεια του στελέχους R. kratochvilovae Y-43 σε υπόστρωμα μελάσας με προσθήκη φωσφορικών αλάτων και χωρίς προσθήκη πηγών αζώτου. (ο) Σάκχαρα (σακχαρόζη, γλυκόζη και φρουκτόζη) (g/L), (x) Άζωτο ελεύθερων αμινομάδων FAN (mg/L), (□) Ανόργανος Φώσφορος IP (g/L), (▲) Βιομάζα (g/L), (●) Λίπος (g/L).....	54
Διάγραμμα 11 Κινητική παραγωγής μικροβιακού λίπους κατά την καλλιέργεια του στελέχους R. toruloides Y-27012 σε υπόστρωμα μελάσας άνευ φαινολικών συστατικών, χωρίς καμία προσθήκη αλάτων, ιχνοστοιχείων και πηγών αζώτου. (ο) Σάκχαρα (σακχαρόζη, γλυκόζη και φρουκτόζη) (g/L), (x) Άζωτο ελεύθερων αμινομάδων FAN (mg/L), (□) Ανόργανος Φώσφορος IP (g/L), (▲) Βιομάζα (g/L), (●) Λίπος (g/L).	55
Διάγραμμα 12 Κινητική παραγωγής μικροβιακού λίπους κατά την καλλιέργεια του στελέχους R. kratochvilovae Y-43 σε υπόστρωμα μελάσας άνευ φαινολικών συστατικών, με προσθήκη φωσφορικών αλάτων. (ο) Σάκχαρα (σακχαρόζη, γλυκόζη και φρουκτόζη) (g/L), (x) Άζωτο ελεύθερων αμινομάδων FAN (mg/L), (□) Ανόργανος Φώσφορος IP (g/L), (▲) Βιομάζα (g/L), (●) Λίπος (g/L).....	56
Διάγραμμα 13 Ημισυνεχής καλλιέργεια της ζύμης R. toruloides Y-27012 σε υπόστρωμα μελάσας χωρίς καμία προσθήκη αλάτων, ιχνοστοιχείων και πηγών αζώτου. (ο) Σάκχαρα (σακχαρόζη, γλυκόζη και φρουκτόζη) (g/L), (x) Άζωτο ελεύθερων αμινομάδων FAN (mg/L), (□) Ανόργανος Φώσφορος IP (g/L), (▲) Βιομάζα (g/L), (●) Λίπος (g/L).	57
Διάγραμμα 14 Ημισυνεχής καλλιέργεια της ζύμης R. toruloides Y-27012 σε υπόστρωμα μελάσας άνευ φαινολικών συστατικών χωρίς καμία προσθήκη αλάτων, ιχνοστοιχείων και πηγών αζώτου. (ο) Σάκχαρα (σακχαρόζη, γλυκόζη και φρουκτόζη) (g/L), (x) Άζωτο ελεύθερων αμινομάδων FAN (mg/L), (□) Ανόργανος Φώσφορος IP (g/L), (▲) Βιομάζα (g/L), (●) Λίπος (g/L).	58
Διάγραμμα 15 Κινητική παραγωγής βιολιπαντικών μέσω ενζυμικής διεργασίας, χρησιμοποιώντας ως πρώτη ύλη υδρολυμένο μικροβιακό λίπος του στελέχους R. toruloides Y-27012.....	62

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1 Παγκόσμια παραγωγή ζαχαροκάλαμου κατά το έτος 2014 (Πηγή: FAOSTAT, προσπέλαση: 06/2017).	16
Εικόνα 2 Οι χώρες που παρουσιάζουν την μεγαλύτερη εξαγωγική δραστηριότητα ζάχαρης από ζαχαροκάλαμο για τα έτη 2007-2012. (Πηγή: USDA FAS Sugar, World Markets and Trade, May 2012). .	16
Εικόνα 3 Διεργασία παραγωγής ζάχαρης από ζαχαροκάλαμο (Πηγή: www.crsugar.com.au).	17
Εικόνα 4 Παγκόσμια παραγωγή μελάσας το έτος 2015. (Πηγή: http://www.indexbox.co.uk/blog/which-countries-produce-the-most-molasses/)	20

Εικόνα 5 Απόβλητα Βιομηχανίας Ζάχαρης (Πηγή: Μπεκατώρου, 2015).	22
Εικόνα 6 <i>Rhodosporidium kratochvilovae</i> Y-43.	24
Εικόνα 7 <i>Rhodosporidium toruloides</i> Y-27012.	24
Εικόνα 8 Παραγωγή βιολιπαντικής ουσίας μέσω ενζυμικής μετεστεροποίησης του μεθυλεστέρα του ρικινολεϊκού οξέος με τριμεθυλοπροπάνιο (TMP).....	33
Εικόνα 9 pH-μετρο τύπου Mettler Toledo.....	38
Εικόνα 10 Φιάλες πριν (αριστερή εικόνα) και μετά (δεξιά εικόνα) την εξάτμιση	39
Εικόνα 11 Αυτόματος τιτλοδότης	44
Εικόνα 12 Λιπαρά οξέα μετά από υδρόλυση του μονοκυτταρικού λίπους της ζύμης <i>R. toruloides</i> Y-27012.....	62

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1 Σύσταση (επί ξηρού καθαρού υλικού) μπαγκάσσας (Πηγή: Μπεκατώρου, 2015).....	17
Πίνακας 2 Σύσταση νωπού πολτού – ζαχαρόπιτας (Πηγή: Μπεκατώρου, 2015).	18
Πίνακας 3 Σύσταση Ελληνικής μελάσας (ΕΛΒΖ) (Πηγή: Μπεκατώρου, 2015).	18
Πίνακας 4 Ελαιογόνοι μικροοργανισμοί και περιεκτικότητα σε λίπος (Πηγή : Muniraj et al. 2015).....	23
Πίνακας 5 Σύσταση λιπαρών οξέων μικροβιακού λίπους παραγόμενων από τις ζύμες <i>R. toruloides</i> Y-27012 και <i>R. kratochvilovae</i> Y-43 σε υποστρώμα ακατέργαστης ζάχαρης και μελάσας.	60
Πίνακας 6 Βιβλιογραφική σύγκριση παραγωγής λίπους από τα είδη <i>R. toruloides</i> και <i>R. kratochvilovae</i>	65
Πίνακας 7 Σύσταση λιπαρών οξέων λίπους που έχει παραχθεί από τη ζύμη <i>R. toruloides</i> σε υπόστρωμα σακχάρων (ή παρόμοια μεταβολιζόμενα – όπως γλυκερόλη, μελάσα κπλ.) σε συνθήκες καλλιέργειας που ευνοούν τη συσσώρευση μικροβιακού λίπους. (Πηγή: Paranikolaou and Aggelis, 2011).....	67

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 1 Συνεισφορά του κύκλου του Krebs (transhydrogenase cycle) και του κύκλου κιτρικού/μηλικού οξέος (citrate/malate cycle) στην παροχή ακετυλοσυνένζυμου Α (acetyl-CoA) και NADPH στη διαδικασία λιπογένεσης στους ελαιογόνους μικροοργανισμούς. Ένζυμα : 1. αποκαρβοξυλάση του πυροσταφυλικού οξέος, 2. αφυδρογονάση του μηλικού οξέος, 3. μηλικό ένζυμο, 4. αφυδρογονάση του πυροσταφυλικού οξέος, 5. κιτρική συνθάση, 6. ATP: κιτρική λυάση, 7. ένζυμο υπεύθυνο για τη λειτουργία του

συστήματος μεταφοράς κιτρικού/μηλικού οξέος μεταξύ μιτοχονδρίου και κυτταροπλάσματος. (Ratledge, 2004)	27
Σχήμα 2 Διάμεσος μεταβολισμός γλυκόζης και γλυκερόλης στους ελαιογόνους μικροοργανισμούς. Παραγωγή κιτρικού οξέος ή/και μικροβιακού λίπους. a,b,c: Συστήματα μεταφοράς του πυροσταφυλικού οξέος από το κυτόπλασμα στο μιτοχόνδριο και του μηλικού οξέος αντιστρόφως, d : Σύστημα μεταφοράς του κιτρικού και του μηλικού οξέος μεταξύ κυτοπλάσματος και μιτοχονδρίου. TAGs: τριγλυκερίδια, EMP : Emden-Meyerhoff-Parnas (Papanikolaou 2011).....	28
Σχήμα 3 Σύνοψη διαφόρων οδών μέσω των οποίων τα λιπαρά οξέα μικροβιακού λίπους μετατρέπονται σε ανανεώσιμα ελαιοχημικά προϊόντα και οι τελικές τους χρήσεις (Probst, 2016).	30
Σχήμα 4 Μεταβολισμός Ελαιοχημικών. Τα μοριακά χαρακτηριστικά των ελαιοχημικών (π.χ. μοριακό βάρος, αριθμός άνθρακα, περιεχόμενο μεθυλενίου, διακλάδωση, υδροξυλίωση, τερματικό γκρουπ) μέσω μίας από τις τέσσερις διεργασίες. Η έναρξη ελέγχει τον αριθμό του άνθρακα και τη διακλάδωση. Η επιμήκυνση ελέγχει το μήκος της αλυσίδας και την ενσωμάτωση των εσωτερικών υποκαταστατών. Ο τερματισμός καθορίζει την κατηγορία του ελαιοχημικού (οξύ, εστέρας, αλδεΐδη, αλκοόλη, ολεφίνη, αλκάνιο). Η τροποποίηση περιλαμβάνει την εισαγωγή διπλών δεσμών, των ομάδων υδροξυλίου, και την διακλάδωση μετά τη σύνθεση της κύριας αλκυλο αλυσίδας (Pfleger et al., 2015).	31

1. Εισαγωγή

1.1 Αξιοποίηση αποβλήτων τροφίμων στο πλαίσιο της Κυκλικής Οικονομίας

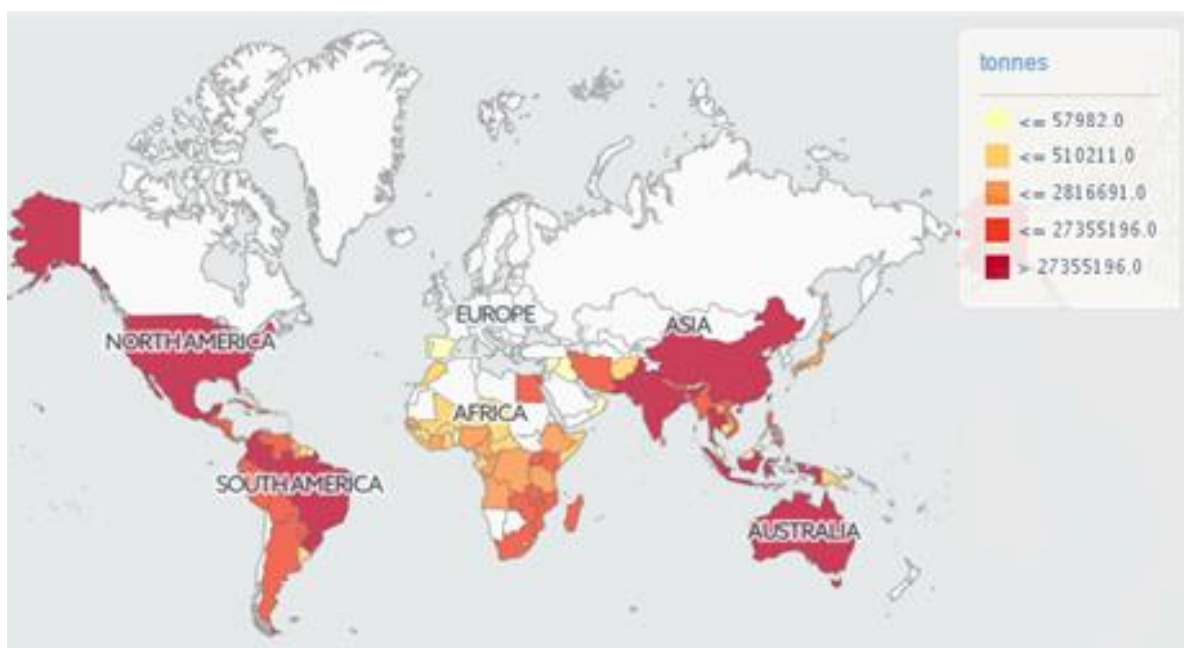
Περίπου 88 εκατομμύρια τόνοι τροφίμων χάνονται κάθε χρόνο στην Ευρωπαϊκή Ένωση (ΕΕ), με το σχετικό κόστος να υπολογίζεται στα 143 δις ευρώ (Fusions, 2016). Τα απόβλητα των τροφίμων είναι ένα σημαντικό ζήτημα για την παγκόσμια ασφάλεια των τροφίμων και την καλή περιβαλλοντική διακυβέρνηση, που συνδέονται 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) το οποίο οδηγεί σε αρνητικές επιπτώσεις σε ολόκληρη την αλυσίδα εφοδιασμού τροφίμων, συμπεριλαμβανομένων των νοικοκυριών. Υπάρχει επιτακτική ανάγκη για πρόληψη και μείωση των αποβλήτων των τροφίμων έτσι ώστε να γίνει η μετάβαση σε έναν πόρο που θα χρησιμοποιεί η Ευρώπη αποτελεσματικά.

Η μείωση των αποβλήτων των τροφίμων είναι άρρηκτα συνδεδεμένη με τη μείωση των πόρων που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή της τροφής που καταναλώνουμε. Με αποτελεσματικότερη διαχείριση των πόρων θα εξοικονομηθούν χρήματα και θα μειωθούν οι περιβαλλοντικές επιπτώσεις της παραγωγής και της κατανάλωσης τροφίμων. Η Ευρωπαϊκή Επιτροπή έχει λάβει το θέμα της αντιμετώπισης των αποβλήτων των τροφίμων πολύ σοβαρά. Η πρόληψη της δημιουργίας αποβλήτων των τροφίμων αποτελεί αναπόσπαστο μέρος του νέου «Πακέτου Κυκλικής Οικονομίας» της Ευρωπαϊκής Επιτροπής για να προωθηθεί η μετάβαση της Ευρώπης προς μία κυκλική οικονομία η οποία θα ενισχύσει την παγκόσμια ανταγωνιστικότητα, θα προωθήσει την βιώσιμη ανάπτυξη και θα δημιουργήσει νέες θέσεις εργασίας. Το «Πακέτο Κυκλικής Οικονομίας» αποτελείται από ένα σχέδιο δράσης της ΕΕ για την Κυκλική Οικονομία και από ένα παράρτημα της δράσης αυτής που περιγράφει το χρονοδιάγραμμα υλοποίησης των προτεινόμενων δράσεων, καθώς και τις συναφείς νομοθετικές προτάσεις σχετικά με τα απόβλητα, συμπεριλαμβανομένης μιας αναθεωρημένης οδηγίας για τα απόβλητα. Η ΕΕ και τα κράτη μέλη έχουν δεσμευθεί για την επίτευξη των

Στόχων της Βιώσιμης Ανάπτυξης (SDG), που εγκρίθηκαν τον Σεπτέμβριο του 2015 συμπεριλαμβανομένου του στόχου για μείωση κατά το ήμισυ της κατά κεφαλήν σπατάλης τροφίμων στο λιανικό εμπόριο αλλά και στο επίπεδο των καταναλωτών έως το 2030, και τη μείωση των απωλειών των τροφίμων κατά μήκος της παραγωγής τροφίμων και της εφοδιαστικής αλυσίδας (http://ec.europa.eu/food/safety/food_waste/eu_actions_en, προσπέλαση: 06/2017).

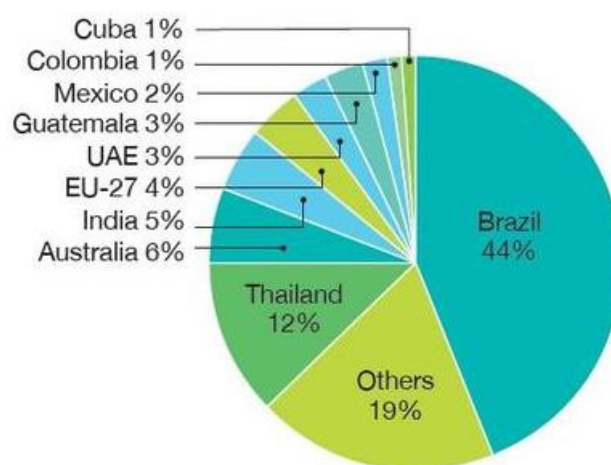
1.2 Παραγωγή αποβλήτων και παραπροϊόντων από την βιομηχανική επεξεργασία της ζάχαρης

Η παραγωγή ζάχαρης γίνεται είτε από ζαχαρότευτλα (sugar beet) είτε από ζαχαροκάλαμο (sugar cane). Η παγκόσμια παραγωγή ζάχαρης προερχόμενη από ζαχαρότευτλα είναι μόνο 20%, ενώ το ζαχαροκάλαμο αποτελεί το 80%. Η ΕΕ κατέχει περίπου το 50% της παγκόσμιας παραγωγής ζάχαρης από ζαχαρότευτλα, ενώ η αγορά της ζάχαρης ρυθμίζεται από τις ποσοτώσεις της παραγωγής, την ελάχιστη τιμή των τεύτλων και τους μηχανισμούς του εμπορίου (https://ec.europa.eu/agriculture/sugar_en, προσπέλαση: 06/2017). Σύμφωνα με τα στατιστικά στοιχεία του Παγκόσμιου Οργανισμού Τροφίμων και Γεωργίας (FAO) για το 2014, την πρώτη θέση στην παραγωγή ζαχαροκάλαμων κατέχει η Βραζιλία με παραγωγή 736 εκ. τόνων, ακολουθούν η Ινδία με 352 εκ. τόνους, η Κίνα με 125 εκ. τόνους, ενώ την τελευταία θέση κατέχουν οι Η.Π.Α. με παραγωγή 27 εκ. τόνους (Εικόνα 1).



Εικόνα 1 Παγκόσμια παραγωγή ζαχαροκάλαμου κατά το έτος 2014 (Πηγή: FAOSTAT, προσπέλαση: 06/2017).

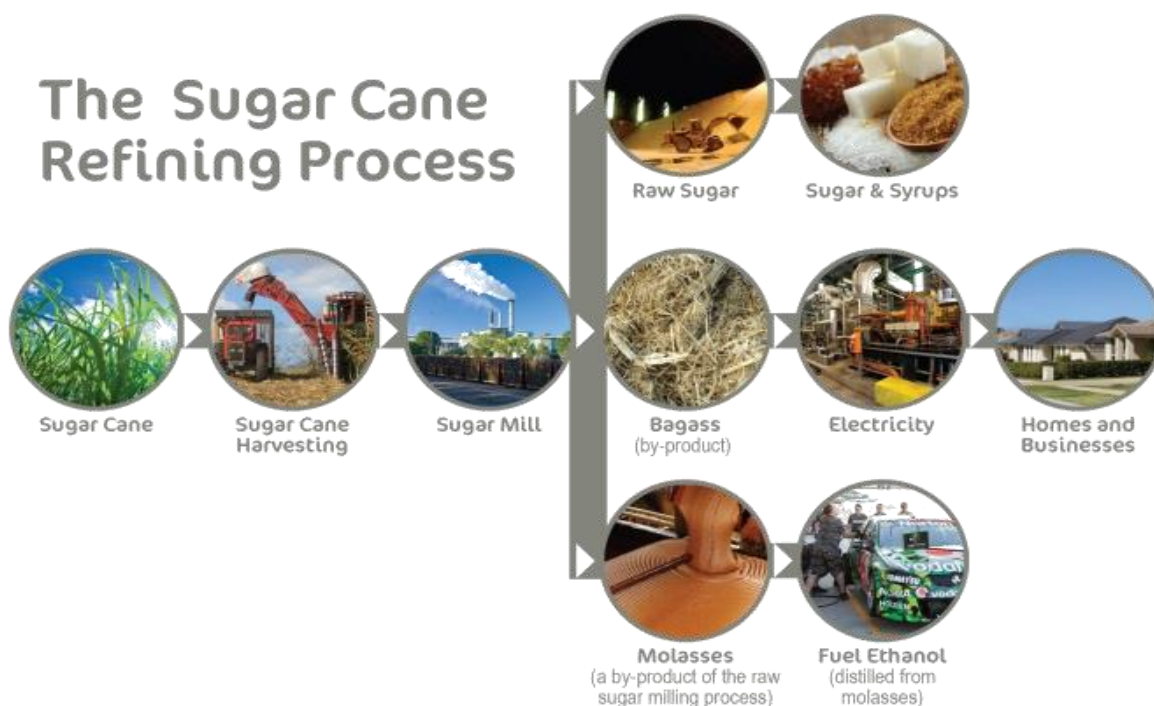
Οι κυριότερες χώρες που εξάγουν ζάχαρη παρουσιάζονται στο Εικόνα 2. Η Βραζιλία, η κυριότερη χώρα παραγωγής ζάχαρης, είναι επίσης και η κυριότερη χώρα εξαγωγής της με ποσοστό 44%, δηλαδή κατέχει σχεδόν τη μισή παγκόσμια εξαγωγή. Η Ινδία παρά το γεγονός ότι αποτελεί τη δεύτερη μεγαλύτερη παραγωγό χώρα σε ζάχαρη, έχει μικρή εξαγωγική δραστηριότητα. Το γεγονός αυτό δείχνει ότι το μεγαλύτερο μέρος της ζάχαρης που παράγει το καταναλώνει η ίδια η χώρα.



Εικόνα 2 Οι χώρες που παρουσιάζουν την μεγαλύτερη εξαγωγική δραστηριότητα ζάχαρης από ζαχαροκάλαμο για τα έτη 2007-2012. (Πηγή: USDA FAS Sugar, World Markets and Trade, May 2012).

Σε παγκόσμια κλίμακα, το ζαχαροκάλαμο είναι μία σημαντική εμπορική καλλιέργεια και μία από τις κυριότερες πηγές ζάχαρης, αλκοόλης και τζάγκερι (ένα ημι-ραφινρισμένο προϊόν ζάχαρης που χρησιμοποιείται στην Ινδική ήπειρο). Όπως απεικονίζεται και στην Εικόνα 3 το κύριο προϊόν της διεργασίας είναι η ακατέργαστη ζάχαρη (raw sugar), ενώ τα παραπροϊόντα είναι η μελάσα και η μπαγκάσσα (bagasse). Η μπαγκάσσα αποτελεί ινώδες υλικό το οποίο απομένει μετά τη θραύση του ζαχαροκάλαμου για εκχύλιση του χυμού. Παράγονται περίπου 3 τόνοι μπαγκάσσας ανά 10 τόνους ζαχαροκάλαμου. Συνιστά ένα υλικό εξαιρετικά ανομοιογενές (το 30-40% είναι παρεγγυματικές ίνες και το υπόλοιπο ποσοστό είναι σκληροεγγυματικές ίνες), γεγονός που δημιουργεί προβλήματα κυρίως στην παραγωγή χαρτιού. Ένα άλλο σημαντικό της μειονέκτημα αποτελεί το υψηλό ποσοστό υγρασίας (>40%) το οποίο δημιουργεί προβλήματα στην αξιοποίησή της ως βιοκαύσιμο. Η αναλυτική σύσταση της μπαγκάσσας φαίνεται στον Πίνακα 1. Γενικά, η μπαγκάσσα χρησιμοποιείται κυρίως για παραγωγή βιοκαυσίμων

(ηλεκτρικής ενέργειας με καύση ή βιοαιθανόλης και βιοαερίου με υδρόλυση/ζύμωση), χαρτιού, υλικών οικοδομής και άλλων βιοϋλικών, ζωοτροφών μετά από ανάμιξη με μελάσα και ενζυμική κατεργασία.



Εικόνα 3 Διεργασία παραγωγής ζάχαρης από ζαχαροκάλαμο (Πηγή: www.crsugar.com.au).

Πίνακας 1 Σύσταση (επί ξηρού καθαρού υλικού) μπαγκάσας (Πηγή: Μπεκατώρου, 2015).

Σύσταση	Ποσότητα (%)
Κυτταρίνη	45-55
Ημικυτταρίνες	20-25
Λιγνίνη	18-24
Τέφρα	1-4
Κηρώδεις ουσίες	<1

Όσον αφορά στον νωπό πολτό - ζαχαρόπιτα, που προέρχεται από το ζαχαροκάλαμο, είναι το συμπιεσμένο απόβλητο που προκύπτει μετά το φιλτράρισμα για παραλαβή χυμού, το οποίο συνήθως είτε απορρίπτεται είτε πωλείται ως πρώτη ύλη για κοπριά σε αγρότες. Η σύσταση

του πολτού αυτού αναφέρεται αναλυτικά στον Πίνακα 2. Αποτελεί καλή πηγή λιπάσματος, ενώ ενδεικτικά στην Ινδία παράγονται 12 εκ. τόνοι. Στην ξηρή του μορφή δύναται να χρησιμοποιηθεί για παραγωγή ενέργειας καθώς περιέχει μεγάλα ποσοστά καύσιμης ύλης, καθώς και για παραγωγή βιοαερίου.

Πίνακας 2 Σύσταση νωπού πολτού – ζαχαρόπιτας (Πηγή: Μπεκατώρου, 2015).

Σύσταση	Ποσότητα (%)
Υγρασία	9-14
Ξηρά συστατικά	88-91
Τέφρα	4-9
Ακατέργαστες ίνες	18-25
Ακατέργαστη πρωτεΐνη	8-13
Οργανικές μη-αζωτούχες ύλες	70-80
Σακχαρόζη	6-11

Η μελάσα είναι το παχύρευστο υγρό που προκύπτει από το τελικό στάδιο κρυστάλλωσης της ζάχαρης. Αναλόγα την πηγή προέλευσης η μελάσα έχει και διαφορετική σύσταση. Στον Πίνακα 3 παρουσιάζεται αναλυτικά η σύσταση της μελάσας που προέρχεται από την επεξεργασία του ζαχαροκάλαμου.

Πίνακας 3 Σύσταση Ελληνικής μελάσας (ΕΛΒΖ) (Πηγή: Μπεκατώρου, 2015).

Brix	78-80%
Ολικά σάκχαρα	48-52%
Ιμβερτοσάκχαρο	0,15-0,50%
pH	7,2-8,5
Τέφρα	12-14%
Πυκνότητα	1,38-1,42 g/cm ³

Κατά την επεξεργασία της μελάσας παράγονται μεγάλοι όγκοι αποβλήτων. Τα απόβλητα αυτά χαρακτηρίζονται από υψηλές τιμές COD (8000-10000 mg/L) και BOD (40000-50000 mg/L)

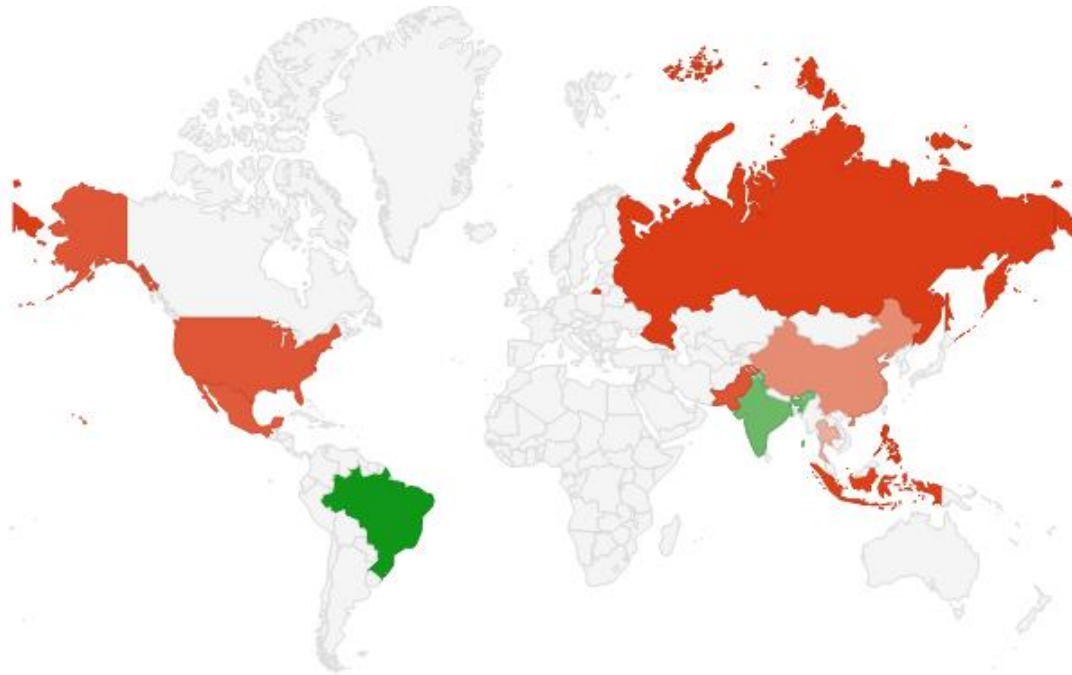
καθώς και από χαμηλό pH (4-5), άσχημη οσμή και σκούρο χρώμα (Central Pollution Control Board 1994,2003). Η απευθείας διάθεση των αποβλήτων μπορεί να προκαλέσει σοβαρά προβλήματα σε ένα οικοσύστημα. Εκτός των άλλων, η μελάσα περιέχει θρεπτικά στοιχεία, όπως άζωτο (1600-4200 mg/L), φώσφορο (225-3.038 mg/L) και κάλιο (9600-17475 mg/L) που μπορεί να οδηγήσουν σε προβλήματα ευτροφισμού.

Το σκούρο χρώμα της είναι αποτέλεσμα της καραμελοποίησης που υφίσταται κατά την θερμική επεξεργασία και την αλκαλοποίηση της στην παραγωγική διαδικασία. Προκαλεί μείωση της διείσδυσης των ακτινών του ήλιου στους υπερκείμενους υδροφόρους ορίζοντες, προκαλώντας μείωση της φωτοσυνθετικής δραστηριότητας και των αποθεμάτων οξυγόνου, με δυσμενείς επιπτώσεις στο υδάτινο περιβάλλον. Η απόρριψη της μελάσας στο έδαφος είναι εξίσου ζημιογόνα, αφού προκαλεί μείωση της αλκαλικότητας του εδάφους, παρεμπόδιση της εκβλάστησης των σπόρων και καταστροφή της βλάστησης. Επομένως, κρίνεται σημαντική η βιοτροποποίηση ενός τέτοιου αποβλήτου τόσο για την παραγωγή μεταβολικών προϊόντων όσο και για την βιοεξυγίανσή του (Dahiya et al. 2001; Peters 2006).

Η μελάσα χρησιμοποιείται κυρίως για :

- Παραγωγή αλκοόλης και αλκοολούχων ποτών
- Παραγωγή ζυμών διατροφής ή ζωοτροφής
- Ανάκτηση οργανικών οξέων, μαγνησίου, βεταΐνης, κ.α.
- Παραγωγή με ζύμωση προϊόντων όπως βιοατασιενεργά (π.χ. σοφορολιπίδια-τασενεργές γλυκολιπιδικές ενώσεις), βιοϋδρογόνο, βουτανόλη, γλυκερόλη, οργανικάοξέα, βιοπλαστικά (π.χ. ολιγοσακχαρίτες), ένζυμα, κόμμεα, σορβιτόλη, κ.α.
- Παραγωγή σύνθετων (composites) υλικών
- Παραγωγή υλικών οικοδομής (μονωτικά τούβλα, τσιμέντο κ.α.)

Η παγκόσμια παραγωγή μελάσας το έτος 2015 έφθασε τους 65,916 χιλιάδες τόνους. Οι χώρες με τη μεγαλύτερη παραγωγή ήταν η Βραζιλία (15,532 χιλιάδες τόνοι), η Ινδία (12,482 χιλιάδες τόνοι), η Ταϊλάνδη (6,063 χιλιάδες τόνοι), η Κίνα (4,495 χιλιάδες τόνοι) και το Μεξικό (2,491 χιλιάδες τόνοι) όπως παρουσιάζονται στην Εικόνα 4. (<http://www.indexbox.co.uk/blog/which-countries-produce-the-most-molasses/>, προσπέλαση: 06/2017).



Εικόνα 4 Παγκόσμια παραγωγή μελάσας το έτος 2015. (Πηγή:<http://www.indexbox.co.uk/blog/which-countries-produce-the-most-molasses/>)

1.3 Παραγωγή βιοτεχνολογικών προϊόντων σε υπόστρωμα μελάσας

Από την δεκαετία του '80 έχουν γίνει διάφορες μελέτες για την παραγωγή αιθανόλης με πηγή άνθρακα τη μελάσα τόσο από το ζαχαρότευτλο όσο και από το ζαχαροκάλαμο. Κατά κύριο λόγο χρησιμοποιήθηκαν ελεύθερα ή ακινητοποιημένα κύτταρα της ζύμης *Saccharomyces cerevisiae* και του βακτηρίου *Zygomonas mobilis*. Το κιτρικό οξύ αποτελεί ένα ακόμη βιοτεχνολογικό προϊόν το οποίο παράγεται κατά κύριο λόγο από το μύκητα *Aspergillus niger*, χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα τη μελάσα. Το κιτρικό οξύ αποτελεί έναν ενδιάμεσο μεταβολίτη του κύκλου των τρικαρβοξυλικών οξέων και χρησιμοποιείται στη Βιομηχανία Τροφίμων, στη Φαρμακευτική και σε άλλες Βιομηχανίες (Wang and Liu, 1996).

Επίσης, η παραγωγή του γλυκονικού οξέος σε υπόστρωμα μελάσας πραγματοποιείται με ζύμωση με την χρήση γενετικά τροποποιημένων στελεχών του μύκητα *Aspergillus niger*, σε ζύμωση στερεού υποστρώματος (Solid-state fermentation-SSF), η οποία ήταν πιο αποδοτική σε σχέση με τη ζύμωση τύπου βυθού. Το γλυκονικό οξύ βρίσκει εφαρμογή στη Φαρμακευτική, στη Βιομηχανία Απορρυπαντικών, Τροφίμων, Δερμάτων κ.α. (Pandey et al., 2001).

Οι φρουκτο-ολιγοσακχαρίτες παράγονται επίσης από τη μελάσα. Οι φρουκτο-ολιγοσακχαρίτες καθώς και οι ισομαλτο-ολιγοσακχαρίτες είναι πρεβιοτικές ουσίες, δηλαδή ουσίες που επηρεάζουν την ανάπτυξη και τη δραστηριότητα συγκεκριμένων μικροοργανισμών και κυρίως των ενδογενών bifidobacteria. Οι φρουκτο-ολιγοσακχαρίτες παράγονται βιομηχανικά από

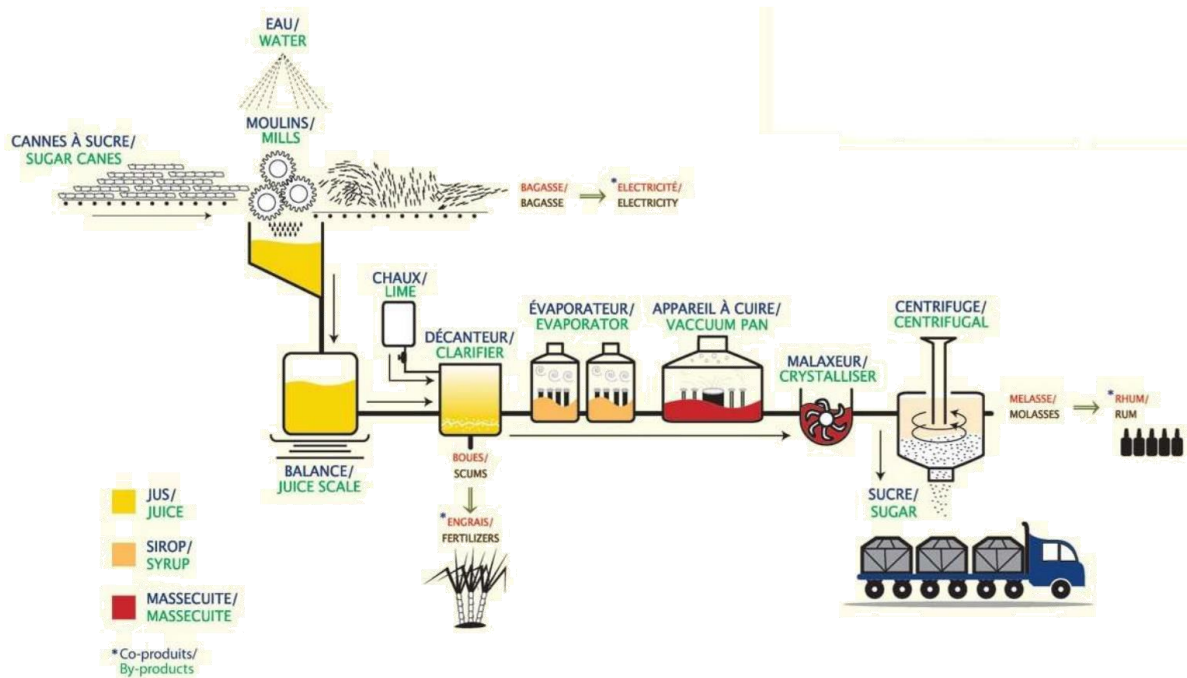
καθαρή σακχαρόζη χρησιμοποιώντας ενδοκυτταρικά ένζυμα από το μύκητα *Aspergillus* (Hidaka et al., 1988; Hirayama et al., 1989) ή το ζυμοειδές *Aureobasidium* (Yun et al., 1990).

Ένα επιπλέον βιοτεχνολογικό προϊόν είναι το ηλεκτρικό οξύ. Παράγεται από διάφορα μεταβολικά μονοπάτια τόσο αερόβιων όσο και δυνητικά αερόβιων οργανισμών και αποτελεί πρόδρομη ουσία για πληθώρα προϊόντων, που περιλαμβάνουν εμπορικά, χημικά, φαρμακευτικά, πρόσθετα τροφών, διαλύτες και βιοαποικοδομήσιμα πλαστικά (Wilke and Vorlop, 2004).

Η παραγωγή μικροβιακού λίπους χρησιμοποιώντας ανανεώσιμες πρώτες ύλες είναι ένα πολλά υποσχόμενο μεταβολικό προϊόν, Το μικροβιακό λίπος αποτελεί προϊόν που παράγεται κατά την καλλιέργεια ζυμών ή μυκήτων.. Οι Zhu et al. (2008) μελέτησαν την ζύμη *Trichosporon fermentans* σε υπόστρωμα μελάσας και το παραγόμενο μικροβιακό λίπος είχε σύσταση παρόμοια με αυτή των φυτικών ελαίων. Τα αποτελέσματα αναλύσεων έδειξαν ότι τα λιπαρά οξέα που παράγονται από τη ζύμη *T. fermentans* περιλάμβαναν κυρίως παλμιτικό οξύ, στεαρικό οξύ, ελαϊκό οξύ και λινολενικό οξύ και το ποσοστό των ακόρεστων λιπαρών οξέων ήταν περίπου 64%. Οι παράγοντες που επηρεάζουν την αποδοτικότητα της ζύμωσης ποικίλουν. Οι σημαντικότεροι έχουν να κάνουν με τη σύνθεση του υποστρώματος, όπως είναι για παράδειγμα η πηγή αζώτου και ο λόγος C/N, ενώ σημαντική επίδραση ασκούν οι συνθήκες καλλιέργειας όπως η θερμοκρασία και το pH (Chatzifragkou et al., 2010; Fakas et al., 2007; Koike et al., 2001; Suutari et al., 1993; Paranikolaou et al., 2007).

Τέλος, οι El-Enshay et al. (2008) χρησιμοποίησαν τον ακτινομύκητα *Saccharopolyspora erythraea* και πραγματοποιώντας υγρή ζύμωση κατάφεραν να παράξουν από τη μελάσα το αντιβιοτικό ερυθρομυκίνη. Η ερυθρομυκίνη είναι ένας δευτερογενής μεταβολίτης και η παραγωγή του αποτελεί μια πολύπλοκη διαδικασία η οποία εξαρτάται τόσο από τη σύνθεση του υποστρώματος όσο και από τις συνθήκες καλλιέργειας. Όσον αφορά στο υπόστρωμα, σημαντικό ρόλο έχουν η συγκέντρωση των υδατανθράκων, η πηγή αζώτου, η πηγή φωσφόρου και τα ιχνοστοιχεία (Singh et al., 1981). Γενικά, η πηγή άνθρακα πρέπει να χρησιμοποιείται σε υψηλές συγκεντρώσεις και γι' αυτό τον λόγο η χρήση μελάσας θεωρείται καλή πηγή άνθρακα. Η παραγωγή της έχει μελετηθεί και από τους Metsoviti et al., (2011) σε μελέτη βακτηριοσινών. Χρησιμοποιείται στην Φαρμακευτική για την καταπολέμηση των Gram- και Gram+ βακτηρίων, όπως για παράδειγμα τα βακτήρια *Staphylococci* spp. και *Neisseria* spp. (Lesmana et al., 2001)

ενώ μπορεί να συνδυαστεί με άλλα φάρμακα για την καταπολέμηση της ελονοσίας.



Εικόνα 5 Απόβλητα Βιομηχανίας Ζάχαρης (Πηγή: Μπεκατώρου, 2015).

1.4 Παραγωγή μικροβιακού λίπους

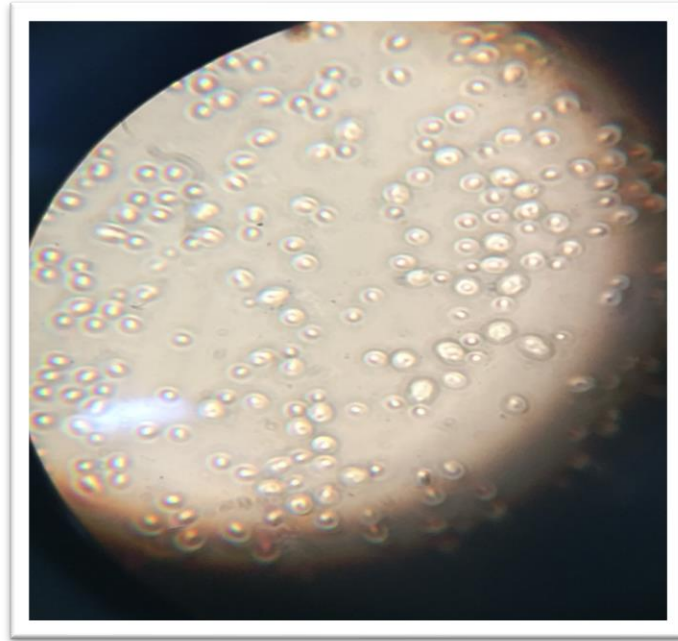
1.4.1 Ελαιογόνοι μικροοργανισμοί

Ορισμένοι μικροοργανισμοί (φύκη, ζύμες, μύκητες και βακτήρια) δύνανται να συσσωρεύσουν περισσότερο από το 20% των λιπιδίων στο κύτταρό τους ως τριακυλογλυκερόλη (TAG) (Πίνακας 4). Οι μικροοργανισμοί αυτοί καλούνται ελαιογόνοι μικροοργανισμοί (Muniraj et al., 2015). Αυτό που κάνει αυτούς τους μικροοργανισμούς ιδιαίτερους δεν είναι κάποιος ιδιαίτερος μηχανισμός παραγωγής και συσσώρευσης λιπιδίων αλλά η μεγάλη ικανότητά τους να παράγουν συνεχώς ακετυλοσυνένζυμο Α (Acetyl-CoA) απευθείας στο κυτταρόπλασμα και η δυνατότητα του μικροοργανισμού να παρέχει επαρκείς ποσότητες NADPH (Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate), το οποίο είναι σημαντικό αναγωγικό μέσο κατά την σύνθεση λιπαρών οξέων. Ορισμένα γένη ζυμομυκήτων όπως: *Rhodosporidium* sp., *Rhodotorula* sp. και *Lipomyces* sp. μπορούν να συσσωρεύσουν ενδοκυτταρικά λιπίδια έως και 70% επί του ξηρού βάρους της βιομάζας τους (Kitcha et al, 2011).

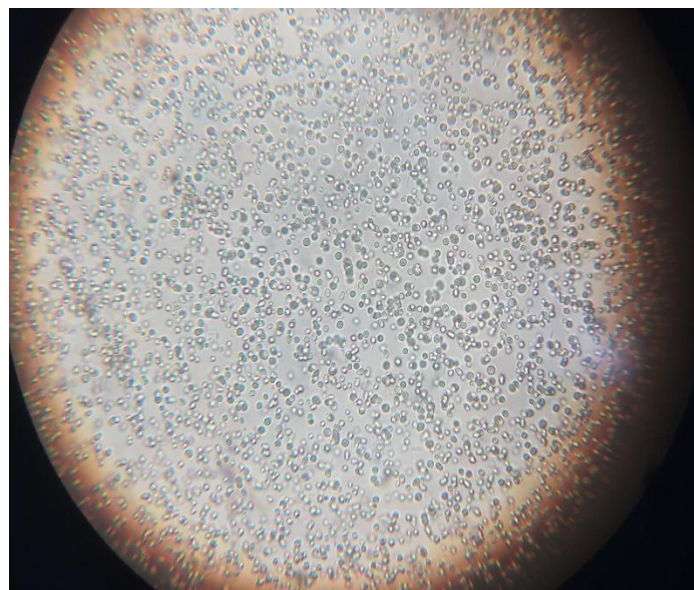
Πίνακας 4 Ελαιογόνοι μικροοργανισμοί και περιεκτικότητα σε λίπος (Πηγή : Muniraj et al. 2015).

Μικροοργανισμοί	Περιεκτικότητα σε λίπος (% ξηρού βάρους)
Μικροφύκη	
<i>Botryococcus braunii</i>	25-75
<i>Cylindrotheca</i> sp.	16-37
<i>Chlorella</i> sp.	28-32
<i>Cryptocodinium cohnii</i>	20
<i>Dunaliella primolecta</i>	23
<i>Isochrysis</i> sp.	25-33
<i>Monallanthus salina</i>	>20
<i>Nannochloris</i> sp.	20-35
<i>Nannochloropsis</i> sp.	31-68
<i>Neochloris oleoabundans</i>	35-54
<i>Nitzschia</i> sp.	45-47
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	20-30
<i>Schizochytrium</i> sp.	50-77
<i>Tetraselmis suecica</i>	15-23
Βακτήρια	
<i>Arthrobacter</i> sp.	>40
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	27-38
<i>Rhodococcus opacus</i>	24-25
<i>Bacillus alcalophilus</i>	18-24
Ζύμες	
<i>Cylindrotheca</i> sp.	16-37
<i>Chlorella</i> sp.	28-32
<i>Rhodotorula glutinis</i>	72
Μύκητες	
<i>Aspergillus oryzae</i>	57
<i>Mortierella isabellina</i>	86
<i>Humicola lanuginosa</i>	75
<i>Mortierella vinacea</i>	66

Οι μικροοργανισμοί του γένους *Rhodosporidium*, και πιο συγκεκριμένα οι ζύμες *Rhodosporidium toruloides* (Εικόνα 7) και *Rhodosporidium kratochvilovae* (Εικόνα 6) παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον τόσο γιατί μπορούν να λιποσυσσωρεύσουν πάνω από το 50% της ξηρής βιομάζας όσο και για την ικανότητα τους να χρησιμοποιούν ως υπόστρωμα προϊόντα υδρόλυσης φυτικής βιομάζας με 5 και 6 άτομα άνθρακα (Wiebe et al., 2012).



Εικόνα 6 *Rhodosporidium kratochvilovae* Y-43.



Εικόνα 7 *Rhodosporidium toruloides* Y-27012.

1.4.2 Η σύσταση και ο ρόλος των μικροβιακών λιπιδίων

Τα λιπίδια (έλαια), οι πρωτεΐνες και οι υδατάνθρακες είναι τα τρία μακρομόρια που απαντώνται φυσικά σε μικροβιακά συστήματα. Τα λιπίδια είναι ένα σημαντικό δομικό συστατικό της μικροβιακής μεμβράνης του κυττάρου. Τα λιπίδια που συνθέτουν οι μικροοργανισμοί που αναφέρθηκαν στην παράγραφο 1.4.1 είναι γνωστά ως μικροβιακά λιπίδια ή μονοκυτταρικά λιπίδια (Single-Cell Oil, SCO). Αποτελούνται κυρίως από τριγλυκερίδια (TAG's) αλλά και από ελεύθερα λιπαρά οξέα, ουδέτερα λιπίδια, στερόλες και πολικά κλάσματα (όπως φωσφολιπίδια, σφιγγολιπίδια, γλυκολιπίδια) σε αξιοσημείωτες ποσότητες. Οι συγκεντρώσεις των παραγόμενων λιπιδίων εξαρτώνται από το υπόστρωμα και τον μικροοργανισμό που θα χρησιμοποιηθούν. Για παράδειγμα όσον αφορά τα υποστρώματα, έχει παρατηρηθεί γενικά ότι οι ελαιογόνοι μικροοργανισμοί που αυξάνονται σε υδρόφοβα υποστρώματα παράγουν λιπίδια με μικρότερο ποσοστό τριγλυκεριδίων σε σχέση με αυτούς που αυξάνονται σε σάκχαρα (Paranikolaou and Aggelis, 2011).

Η σύσταση των μικροβιακών λιπιδίων έχει σημαντικό ρόλο, ανάλογα την τελική εφαρμογή που θα έχει το λίπος, και μπορεί να ελεγχθεί με χρήση των κατάλληλων υποστρωμάτων και μικροοργανισμών. Τα τελευταία χρόνια η εξέλιξη της γενετικής μηχανικής έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία νέων βελτιωμένων στελεχών. Το ενδιαφέρον των μικροβιακών λιπιδίων είναι μεγάλο, καθώς αυτά θεωρούνται άριστη πηγή πολυακόρεστων λιπαρών οξέων όπως είναι το γ-λινολενικό, το δίομο-γ-λινολενικό, το αραχιδονικό, το εικοσιπεντανοϊκό κ.ά.. Αυτά τα λιπαρά οξέα χρησιμοποιούνται στην κλινική διατροφή και ως πρώτες ύλες για παραγωγή ειδικών τροφών και καλλυντικών. Από την άλλη πλευρά, μερικοί μικροοργανισμοί, κάτω από ορισμένες συνθήκες αύξησης, συσσωρεύουν λιπιδιακά αποθέματα των οποίων η δομή παρουσιάζει εξαιρετικό ενδιαφέρον, επειδή μοιάζει με τη δομή διαφόρων «εξωτικών» λιπών, όπως είναι το λίπος του κακάο, της φάλαινας κλπ. Η παραγωγή των λιπών αυτών είναι περιορισμένη, επειδή προσκρούει σε φυσικούς περιορισμούς (όπως το λίπος ζωικών ειδών που είναι υπό εξαφάνιση) ή είναι προνόμιο ορισμένων μόνο χωρών (όπως το λίπος του κακάο). Τέλος, έχει βρεθεί ότι τα λιπίδια στους περισσότερους ελαιογόνους μικροοργανισμούς έχουν δομή και σύνθεση παρόμοια με αυτήν των φυτικών ελαίων που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή βιοντήζελ και αποτελούν ιδανικούς υποψήφιους αντικαταστάτες αυτών (Yong-Hong et al., 2006). Η αυξανόμενη χρήση και ζήτηση των φυτικών ελαίων για παραγωγή βιοντήζελ έχει οδηγήσει σε αύξηση της τιμής τους τη στιγμή που το ηθικό ζήτημα περί χρήσης της αρόσιμης γης με σκοπό την παραγωγή ενέργειας έναντι της παραγωγής των τροφίμων,

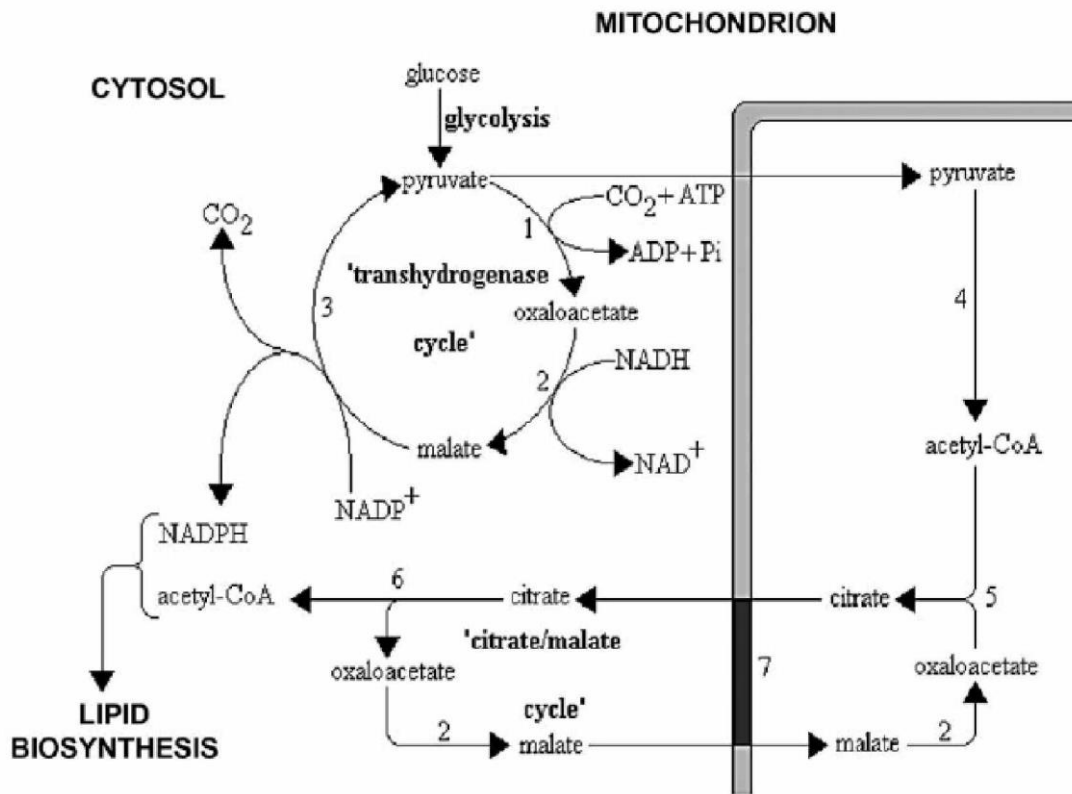
δεδομένου ότι μεγάλος μέρος του πληθυσμού υποσιτίζεται, καθιστά της αντικατάστασή τους απαραίτητη (Αγγελής, 2007).

1.4.3 Βιοχημεία συσσώρευσης λίπους

Αναγκαία συνθήκη προκειμένου να επιτευχθεί συσσώρευση μικροβιακού λίπους εντός του μικροοργανισμού αποτελεί η καλλιέργεια αυτού σε περιβάλλον με περίσσεια πηγής άνθρακα και περιορισμό σε άζωτο. Όταν το άζωτο της καλλιέργειας εξαντληθεί, οι ελαιογόνοι μικροοργανισμοί να αφομοιώνουν την πηγή άνθρακα μετατρέποντάς την σε τριγλυκερίδια, τα οποία συσσωρεύονται εντός των κυττάρων.

Οι λόγοι για τους οποίους ορισμένοι μικροοργανισμοί καθίστανται ελαιογόνοι επιμερίζονται σε δύο συνιστώσες. Η πρώτη αφορά στη δυνατότητα συνεχούς παραγωγής acetyl-CoA απευθείας στο κυτταρόπλασμα του κυττάρου δρώντας ως ο απαραίτητος προάγγελος για την συνθετάση των λιπαρών οξέων. Η δεύτερη αφορά στην ικανότητα του μικροοργανισμού να παράγει επαρκείς ποσότητες NADPH, ενός βασικού αναγωγικού μέσου που χωρεί κατά την βιοσύνθεση των λιπαρών οξέων.

Κατά την εξάντληση της πηγής αζώτου στο μέσο της καλλιέργειας, παρατηρείται διακοπή του κύκλου του Krebs (Σχήμα 1). Το φαινόμενο αυτό οφείλεται στην ενεργοποίηση του ενζύμου AMP-απαμινάση, η οποία καταλύει τη διάσπαση του AMP σε IMP και NH₃. Ως εκ τούτου, παρατηρείται ταχύτατη πτώση του επιπέδου του AMP και παρεμπόδιση της δράσης του ενζύμου ισοκιτρική αφυδρογονάση (Ratledge 1994; Paranikolaou et al. 2004), και κατά συνέπεια το κιτρικό οξύ συσσωρεύεται εντός του μιτοχονδρίου. Μέσω του συστήματος μεταφοράς κιτρικού/μηλικού οξέος, όταν η συγκέντρωση του κιτρικού οξέος υπερβεί τη συγκέντρωση ανοχής, εξέρχεται από το μιτοχόνδριο στο κυτταρόπλασμα. Ο σχηματισμός του acetyl-CoA στους ελαιογόνους μικροοργανισμούς αποδίδεται από πολλούς ερευνητές στην παρουσία του ενζύμου ATP : κιτρική λυάση (ACL), η οποία δεν ευρίσκεται στους μη ελαιογόνους μικροοργανισμούς (Ratledge 2006).



Σχήμα 1 Συνεισφορά του κύκλου του Krebs (transhydrogenase cycle) και του κύκλου κιτρικού/μηλικού οξέος (citrate/malate cycle) στην παροχή ακετυλοσυνένζυμου Α (acetyl-CoA) και NADPH στη διαδικασία λιπογένεσης στους ελαιόγόνους μικροοργανισμούς. Ένζυμα : 1. αποκαρβοξυλάση του πυροσταφυλικού οξέος, 2. αφυδρογονάση του μηλικού οξέος, 3. μηλικό ένζυμο, 4. αφυδρογονάση του πυροσταφυλικού οξέος, 5. κιτρική συνθάση, 6. ATP: κιτρική λύαση, 7. ένζυμο υπεύθυνο για τη λειτουργία του συστήματος μεταφοράς κιτρικού/μηλικού οξέος μεταξύ μιτοχονδρίου και κυτταροπλάσματος. (Ratledge, 2004)

Η αντίδραση η οποία καταλύεται είναι η ακόλουθη :

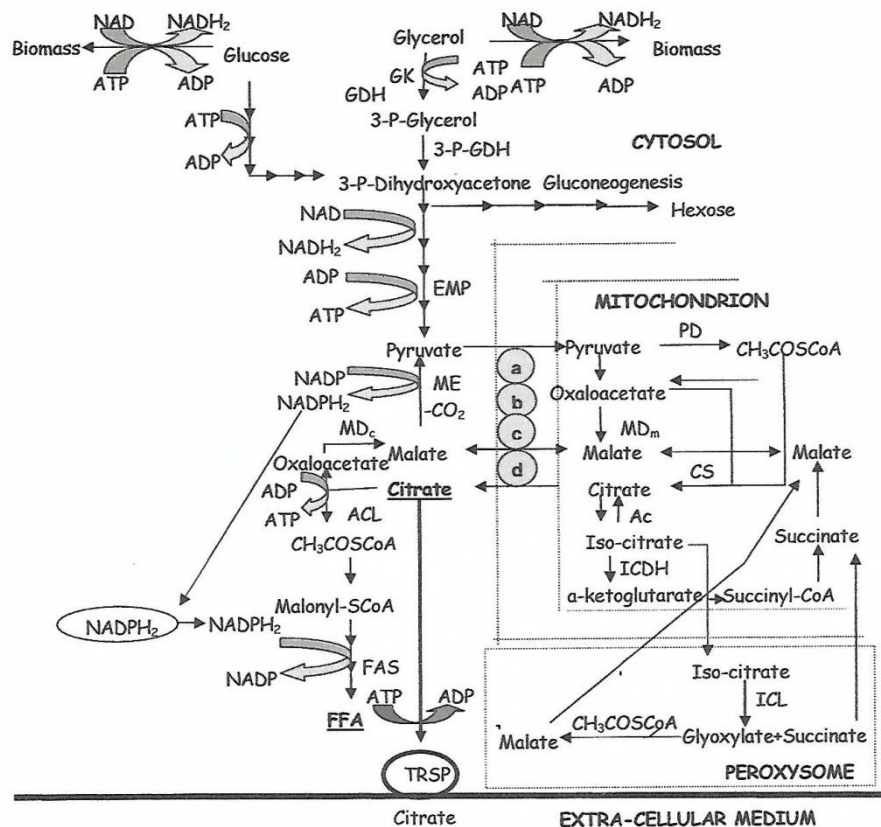


Εξίσου σημαντική είναι η συνεισφορά του μηλικού ενζύμου στη βιοσυσσώρευση λίπους ως προμηθευτής NADPH κατά την ακόλουθη αντίδραση :



Το μηλικό ένζυμο φέρεται να σχηματίζει ένα σταδιακό μεταβολικό σύμπλοκο που συνδυάζεται με την ATP : κιτρική λύαση και τη σύνθεση των λιπαρών οξέων, για την εξασφάλιση μιας άμεσης διόδου επικοινωνίας κατά την μετατροπή του acetyl-CoA σε λιπαρά οξέα, τα οποία εστεροποιούνται τελικώς με γλυκερόλη σε τριγλυκερίδια. Τα τελευταία ενσωματώνονται μέσω του ενδοπλασματικού δικτύου σε σταγονίδια λιπαρών οξέων (Ratledge 2004).

Θα πρέπει ωστόσο να επισημανθεί, ότι σε περίπτωση που το ένζυμο ATP: κιτρική λυάση απουσιάζει από έναν μικροοργανισμό ή είναι ανενεργό, η εξάντληση των αποθεμάτων αζώτου στο μέσο της καλλιέργειας οδηγεί σε απέκκριση του παραγόμενου ενδοκυτταρικού κιτρικού οξέος. Διαπιστώνεται λοιπόν, ότι οι διεργασίες συσσώρευσης ενδοκυτταρικού λίπους και συσσώρευσης κιτρικού οξέος, κατά τα πρώτα στάδια τους είναι βιοχημικά ταυτόσημες, και οι μικροοργανισμοί κατηγοριοποιούνται σε αυτούς οι οποίοι δύνανται να συνθέσουν λίπος και σε αυτούς οι οποίοι δύνανται να συνθέσουν κιτρικό οξύ (Anastassiadis and Rehm, 2005). Στο παρακάτω σχήμα απεικονίζεται η βιοσυσσώρευση λίπους στους ελαιογόνους μικροοργανισμούς, καθώς και η έκκριση κιτρικού οξέος κατά την καλλιέργειά τους σε γλυκόζη ή γλυκερόλη.



Σχήμα 2 Διάμεσος μεταβολισμός γλυκόζης και γλυκερόλης στους ελαιογόνους μικροοργανισμούς. Παραγωγή κιτρικού οξέος ή/και μικροβιακού λίπους. a,b,c: Συστήματα μεταφοράς του πυροσταφυλικού οξέος από το κυτόπλασμα στο μιτοχόνδριο και του μηλικού οξέος αντιστρόφως, d : Σύστημα μεταφοράς του κιτρικού και του μηλικού οξέος μεταξύ κυτοπλάσματος και μιτοχονδρίου. TAGs: **τριγλυκερίδια**, EMP: **Emden-Meyerhoff-Parnas** (Papanikolaou 2011)

1.4.4 Εφαρμογές μικροβιακού λίπους

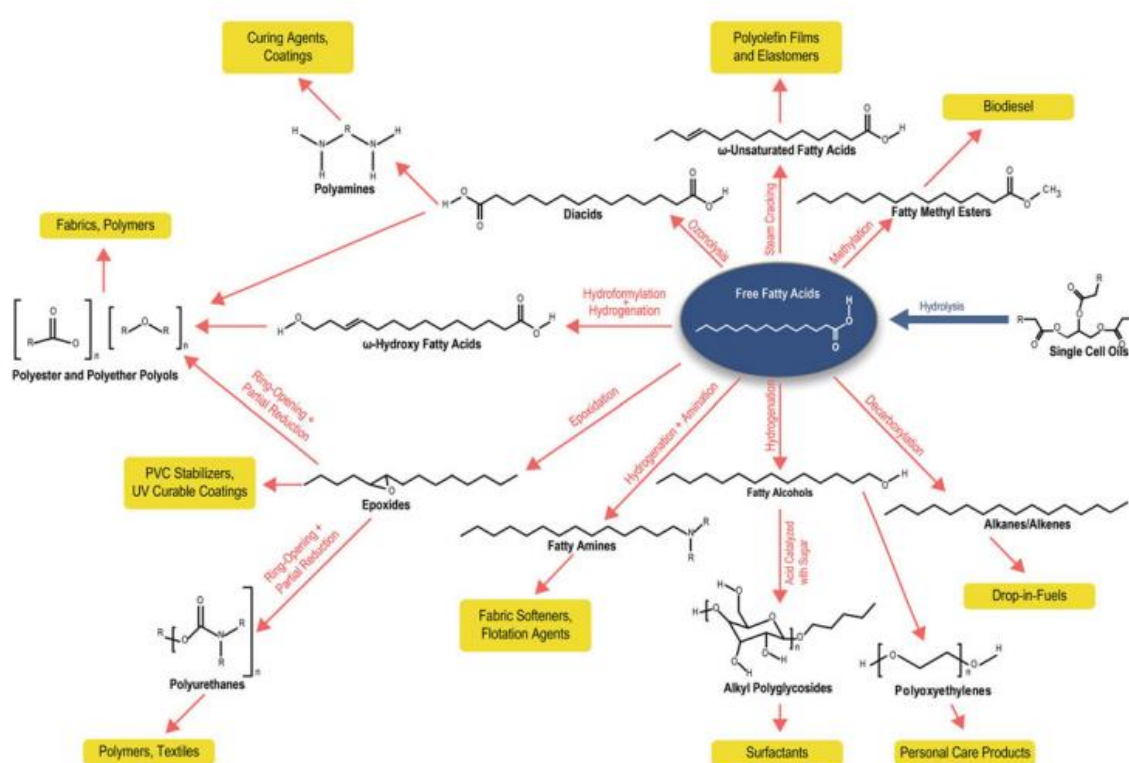
Οι ελαιογόνες ζύμες έχουν μία μοναδική φυσιολογία η οποία τις καθιστά ως το κατάλληλο περιβάλλον για την παραγωγή λίπους, ελαιοχημικών και πετρελαιοειδών. Η υψηλή τους

λιπογένεση, η ικανότητα τους να αναπτύσσονται σε μία πληθώρα διαφορετικών πηγών άνθρακα (περιλαμβανομένων των λιγνοκυτταρινούχων σακχάρων), η ευκολία καλλιέργειας σε μεγάλη κλίμακα, και ένας αυξανόμενος αριθμός γενετικών εργαλείων είναι κάποια από τα πλεονεκτήματα που έχουν ενισχύσει τη χρήση τους για την ανάπτυξη βιώσιμων διαδικασιών (Adrio, 2017).

Οι ζύμες αυτές γενικά είναι μη-παθογόνες και δύνανται να συνθέτουν και να συσσωρεύουν λιπίδια των οποίων η σύσταση είναι παρόμοια με αυτή των φυτικών και των ζωικών λιπών. Καθώς τα θέματα προστασίας του περιβάλλοντος και η εξάντληση των αποθεμάτων του αργού πετρελαίου γίνονται επιτακτικές προκλήσεις για τα εργοστάσια πετρελαίου, δεν προκαλεί έκπληξη η αυξανόμενη επένδυση των βιοτεχνολογικών εταιρειών στην ανάπτυξη των πρώτης- και δεύτερης-γενιάς βιοκαυσίμων από φυτά και υπολείμματα καλλιεργειών, αντίστοιχα (Beopoulos et al., 2011). Το βιοντήζελ είναι ένα ανανεώσιμο, ασφαλές και μη-τοξικό βιοκαύσιμο το οποίο μπορεί να παραχθεί από μία μεγάλη ποικιλία εδώδιμων και μη-εδώδιμων ελαιογόνων πρώτων υλών. Η μετατροπή των ελαιογόνων πρώτων υλών σε βιοντήζελ λαμβάνει χώρα μέσω της ομοιογενώς ή ετερογενώς καταλυόμενης μετεστεροποίησης των τριγλυκεριδίων με μεγάλη αλυσίδα σε μικρότερους, με ευθείες αλυσίδες, εστέρες. Το υψηλό κόστος των πρώτων υλών για την παραγωγή βιοντήζελ είναι και το μεγαλύτερο εμπόδιο για την εμπορευματοποίηση του προϊόντος. Επιπλέον, εάν οι πρώτες ύλες προέρχονται από γεωργικές καλλιέργειες, συχνά υποστηρίζεται ότι αυτός ο τύπος βιοντήζελ μπορεί να συμβάλει στην αύξηση τιμών των τροφίμων. Για το λόγο αυτό οι επιστήμονες επικεντρώνονται στην επιλογή ανανεώσιμων πρώτων υλών που δεν ανταγωνίζονται την τροφική αλυσίδα (Muniraj et al., 2015).

Σήμερα, φαίνεται πολύ πιθανό οι μικροοργανισμοί να θεωρούνται ως εργοστάσια για την παραγωγή μορίων με ισάξιες ή πιο βελτιωμένες ιδιότητες σε σύγκριση με αυτές που προκύπτουν από τα ορυκτά έλαια. Η γραμμή παραγωγής μικροβιακού λίπους από φυτική βιομάζα δεν μπορεί να ανταγωνιστεί με την παραγωγή των τροφίμων εάν ως υπόστρωμα χρησιμοποιούνται απόβλητα, όπως είναι η λιγνοκυτταρινούχα βιομάζα. Στην πραγματικότητα θα μπορούσε να παρουσιάσει άλλα πλεονεκτήματα σε σύγκριση με τα φυτά, όπως είναι ένας πιο σύντομος κύκλος διαδικασίας, ανεξαρτησία από την εποχή και το κλίμα, και ευκολότερη κλιμάκωση. Επιπλέον, η εμφάνιση νέων τεχνικών μεταγενέστερης επεξεργασίας καταλήγει σε μια αισιόδοξη πρόβλεψη για την εμπορευματοποίηση προϊόντων ζύμης-λίπους στο μέλλον. Μια καινοτόμος προσέγγιση προς το σκοπό αυτό χρησιμοποιεί τη λευκή βιοτεχνολογία και τη

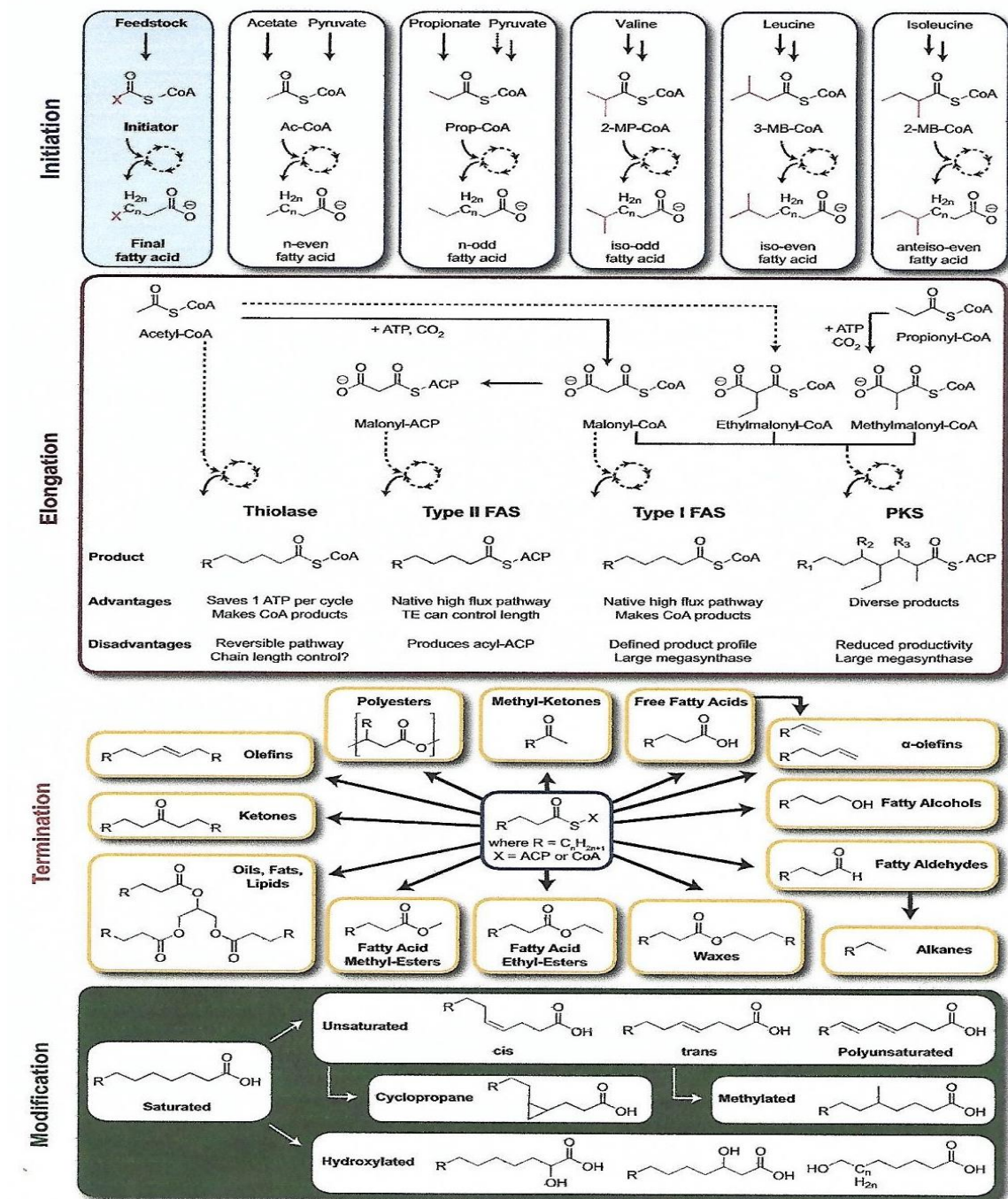
μεταβολική μηχανική των μικροοργανισμών τόσο για την παραγωγή βιοκαυσίμων όσο και για προϊόντα που δεν περιέχουν καύσιμα, όπως είναι τα επιφανειοδραστικά, οι διαλύτες, τα χρώματα, οι κηροί, τα πλαστικά και τα λιπαντικά (ελαιοχημικά-Σχήμα 3). Ωστόσο, είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι μόνο τα υψηλής αξίας λίπη έχουν πιθανότητες να παραχθούν με τέτοια βιοτεχνολογικά μέσα, καθώς είναι επί του παρόντος οι μικροοργανισμοί δεν δύναται να παράγουν τα κοινά έλαια και λίπη τόσο φθηνά όσο οι φυτικές και ζωικές πηγές (Beoroulos et al., 2011).



Σχήμα 3 Σύνοψη διαφόρων οδών μέσω των οποίων τα λιπαρά οξέα μικροβιακού λίπους μετατρέπονται σε ανανεώσιμα ελαιοχημικά προϊόντα και οι τελικές τους χρήσεις (Probst, 2016).

Τα ελαιοχημικά προϊόντα συντίθενται μέσω ενζυμικών αντιδράσεων οι οποίες χρησιμοποιούν ελεύθερα λιπαρά οξέα ή ακυλο-θειοεστέρες ως υποστρώματα. Συνεπώς, οι στρατηγικές της μεταβολικής μηχανικής για την παραγωγή ελαιοχημικών προϊόντων από μικροβιακά κύτταρα ξεκινούν ανακατευθύνοντας τη ροή του άνθρακα από το μεταβολισμό λιπαρών οξέων προς ένα επιθυμητό προϊόν. Ο μεταβολισμός των λιπαρών οξέων είναι ένα πολύπλοκο, υψηλό-ρυθμισμένο δίκτυο ενζυμικών αντιδράσεων το οποίο λειτουργεί σε ενδιάμεσα ακυλο-θειοεστέρα. Το δίκτυο χρησιμοποιεί ένα επαναληπτικό μονοπάτι αντιδράσεων για να παράγει ένα ευρύ φάσμα ακυλο-αλυσίδων από ένα μικρό σύνολο δομικών στοιχείων. Το βιοσυνθετικό

μονοπάτι για κάθε ελαιοχημικό μπορεί να χωριστεί σε τέσσερις διεργασίες: έναρξη της αλυσίδας, επιμήκυνση της αλυσίδας, τερματισμός της αλυσίδας και τροποποίηση της αλυσίδας. Καθεμία από αυτές τις διεργασίες παρέχει ευκαιρίες για προσαρμογή ενός μονοπατιού για την παραγωγή ενός καινοτόμου ελαιοχημικού (Σχήμα 4) (Pfleger et al., 2015).

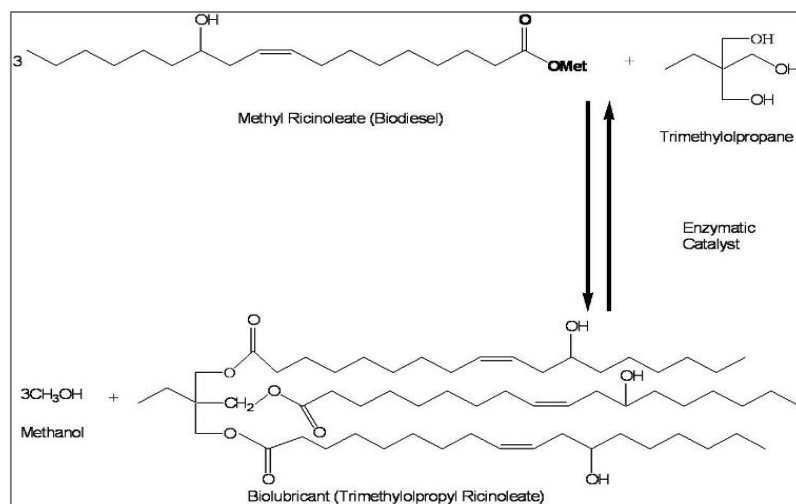


Σχήμα 4 Μεταβολισμός Ελαιοχημικών. Τα μοριακά χαρακτηριστικά των ελαιοχημικών (π.χ. μοριακό βάρος, αριθμός άνθρακα, περιεχόμενο μεθυλενίου, διακλάδωση, υδροξυλίωση, τερματικό γκρουπ) μέσω μίας από τις τέσσερις διεργασίες. Η έναρξη ελέγχει τον αριθμό του άνθρακα και τη διακλάδωση. Η επιμήκυνση ελέγχει το μήκος της αλυσίδας και την ενσωμάτωση των εσωτερικών υποκαταστατών. Ο τερματισμός καθορίζει την κατηγορία του ελαιοχημικού (οξύ, εστέρας, αλδεϋδη, αλκοόλη, ολεφίνη, αλκάνιο). Η τροποποίηση περιλαμβάνει την εισαγωγή διπλών δεσμών, των ομάδων υδροξυλίου, και την διακλάδωση μετά τη σύνθεση της κύριας αλκυλο αλυσίδας (Pfleger et al., 2015).

Ο όρος βιολιπαντικά (biolubricants) εφαρμόζεται σε όλα τα λιπαντικά που είναι ταυτόχρονα ταχέως βιοαποικοδομήσιμα και μη-τοξικά για τον άνθρωπο και το υδάτινο περιβάλλον. Ένα βιολιπαντικό μπορεί να παραχθεί από φυτικό λίπος (π.χ. κραμβέλαιο) ή να προέρχεται από συνθετικούς εστέρες που παράγονται από τροποποιημένα ανανεώσιμα έλαια ή από προϊόντα με βάση τα ορυκτέλαια (Salimon et al., 2010). Λίπανση είναι η διαδικασία ή η τεχνική η οποία ασχολείται με τη μείωση της φθοράς μεταξύ μίας ή δύο επιφανειών σε κοντινή απόσταση, και τη μετακίνηση μεταξύ τους, παρεμβάλλοντας μια ουσία μεταξύ των επιφανειών, το λιπαντικό, για να μεταφέρουν ή να βοηθήσουν στη μεταφορά του φορτίου (δημιουργείται πίεση) μεταξύ των αντίθετων επιφανειών. Γιατί όμως βιο-λιπαντικά; Τα λιπαντικά κατά κύριο λόγο είναι με βάση το πετρέλαιο. Το πετρέλαιο όμως είναι μη-ανανεώσιμο και τοξικό προς το περιβάλλον. Η τάση να χρησιμοποιείται βιο-μάζα για τη σύνθεση ποικίλων προϊόντων προστιθέμενης αξίας είναι σε ζώνη προτεραιότητας από τους ερευνητές οι οποίοι έχουν ανακαλύψει διάφορες ανανεώσιμες πρώτες ύλες, όπως είναι οι πρωτεΐνες, τα φύλλα των δένδρων, διάφορα φύκη, φυτικά λίπη, πολτός του καφέ, λύς χαρτοποιίας, λιγνοκυτταρινούχα και άλλα αγροτικά κατάλοιπα, για τη σύνθεση βιο-πλαστικών, βιοντήζελ, βιο-λιπαντικών, βιο-προσροφητικών, βιο-διεγερτικών και βιο-αιθανόλης. Όλα αυτά τα προϊόντα χρησιμοποιούνται σήμερα σε εμπορικό επίπεδο με επιτυχία σε πολλές ανεπτυγμένες χώρες. Πολλή έρευνα και μελέτη έχει γίνει για τη βελτίωση των φυσικοχημικών ιδιοτήτων των φυτικών λιπών έτσι ώστε να μπορούν να ανταγωνιστούν με τα λιπαντικά που έχουν ως βάση το πετρέλαιο. Πολλά λιπαντικά που έχουν ως βάση τα φυτά έχουν αναπτυχθεί για διάφορους τομείς της Βιομηχανίας (Panchal et al., 2017).

Οι βιολιπαντικές ουσίες είναι το αποτέλεσμα της εστεροποίησης/μετεστεροποίησης μίας λιπαρής ύλης (λιπαρό οξύ ή τριγλυκερίδιο) ή του μεθυλεστέρα της εν λόγω λιπαρής ύλης με μία πολυόλη. Η εστεροποίηση πραγματοποιείται είτε χημικά, παρουσία όξινου ή βασικού καταλύτη, είτε με την δράση ενζύμων (Salimon et al., 2014). Παρόλο το υψηλό κόστος της αγοράς του ενζύμου, η διεργασία θεωρείται πιο φιλική για το περιβάλλον έναντι της χημικής, καθώς δεν απαιτείται η χρήση διαλυτών και υψηλών ποσών ενέργειας. Τα ένζυμα που είναι κατάλληλα γι' αυτές τις βιομετατροπές είναι λιπάσες που έχουν τη δυνατότητα να εστεροποιούν ή να μετεστεροποιούν τις λιπαρές ύλες με την πολυόλη προς παραγωγή των επιθυμητών εστέρων. Οι πιο συνηθισμένες πολυόλες που χρησιμοποιούνται για την σύνθεση τέτοιων εστέρων είναι η νεοπεντυλογλυκόλη (Neopentyl glycol, NPG), το τριμεθυλοπροπάνιο (Trimethylolpropane, TMP) (Εικόνα 8) και η πενταερυθριτόλη (Pentaerythritol, PE). Οι

περισσότερες έρευνες μέχρι τώρα έχουν εστιάσει στην χρήση κυρίως του TMP λόγω του χαμηλού κόστους και του χαμηλού σημείου τήξεως, σε σχέση με τις άλλες δύο πολυόλες. Οι πηγές λιπαρής ύλης που έχουν χρησιμοποιηθεί έως σήμερα για την παραγωγή βιολιπαντικών από TMP είναι το φοινικέλαιο, κραμβέλαιο, σογιέλαιο, ηλιέλαιο, καστορέλαιο κ.α. (da Silva et al., 2012; Kania et al., 2015).



Εικόνα 8 Παραγωγή βιολιπαντικής ουσίας μέσω ενζυμικής μετεστεροποίησης του μεθυλεστέρα του ρικινολεϊκού οξέος με τριμεθυλοπροπάνιο (TMP).

Τέλος, οι κηροί αποτελούν ένα σημαντικό ελαιοχημικό. Οι κηροί είναι εστέρες μακράς αλυσίδας που αποτελούνται από λιπαρά οξέα εστεροποιημένα σε λιπαρές αλκοόλες με μήκος αλυσίδας άνω των 12 ατόμων άνθρακα. Οι εστέρες κηρών αποτελούν πρώτη ύλη μεγάλης σημασίας για διάφορες εφαρμογές συμπεριλαμβανομένων των κεριών, των λιπαντικών, των επιστρώσεων, της συσκευασίας, της βιομηχανίας των τροφίμων και τη βιομηχανία των καλλυντικών. (Doan et al., 2017; Fiume et al., 2015; Anonymous, 2010; Petersson et al., 2005). Η εφαρμογή τους καθώς και οι ιδιότητές τους (π.χ. σημείο τήξης, οξειδωτική σταθερότητα) εξαρτώνται από το βαθμό ακορεστότητας και από τον αριθμό ατόμων άνθρακα τόσο της λιπαρής αλκοόλης όσο και του λιπαρού οξέος. Η συνεχής μείωση της παγκόσμιας προμήθειας πετρελαϊκού κηρού που αντιπροσωπεύει το 70% της συνολικής προμήθειας, άνοιξε το δρόμο για την ανάπτυξη φυσικών κηρών.

Οι κοινοί ζωικοί κηροί είναι ο κηρός των μελισσών και το έλαιο σπερμακετίνης. Εκτός από τους εστέρες των κηρών (58%), ο κηρός των μελισσών περιέχει υδρογονάνθρακες (26,8%) καθώς και μικρότερες ποσότητες ελεύθερων λιπαρών οξέων και ελεύθερων λιπαρών αλκοολών (Doan et al., 2017). Το έλαιο της σπερμακετίνης αποτελείται από ένα μίγμα υγρών εστέρων των κηρών και τριγλυκεριδίων. Η χρήση προϊόντων σπερμακετίνης σταμάτησε το 1971 όταν

απαγορεύτηκε το κυνήγι των φαλαινών (Nieschlag et al., 1977), και έκτοτε χρησιμοποιούνταν ορυκτά και φυτικά προϊόντα. Οι κύριοι κηροί που έχουν φυτική προέλευση είναι το έλαιο «jojoba» και το καρναουβικό κερί. Το έλαιο «jojoba» παράγεται από τον θάμνο jojoba (*Simmondsia chinensis*) που καλλιεργείται σε ερημικές εκτάσεις (Iven et al. 2016).

Το έλαιο «jojoba» χρησιμοποιήθηκε ως εναλλακτική λύση για το έλαιο της σπερμακετίνης (Shivaraju et al., 2011). Ωστόσο, δεδομένου ότι η παραγωγή ελαίου «jojoba» περιορίζεται σε ερημικές περιοχές, υπάρχει ενδιαφέρον για την παραγωγή φυσικών κηρών μέσω χημικής ή ενζυματικής κατάλυσης. Καθώς η χημική οδός έχει πολλά μειονεκτήματα, όπως τα απαιτούμενα διαβρωτικά οξέα, η υψηλή κατανάλωση ενέργειας και η αποικοδόμηση των συντιθέμενων εστέρων, η ενζυμικά-καταλυόμενη μέθοδος που χρησιμοποιεί ακινητοποιημένη λιπάση σε ένα σύστημα χωρίς διαλύτες είναι μια ελπιδοφόρα και βιώσιμη εναλλακτική (Serrano-Arnaldos et al., 2016).

Τα μικροβιακά λιπίδια που παράγονται από ελαιογόνες ζύμες και μύκητες περιέχουν κυρίως λιπαρά οξέα με 16-18 άτομα άνθρακα με υψηλή περιεκτικότητα σε ουδέτερα λίπη και καθώς επίσης και με χαμηλότερη σύνθεση σφιγγολιπιδίων, γλυκολιπιδίων και φωσφολιπιδίων. Τα μικροβιακά λιπίδια χρησιμοποιήθηκαν κυρίως για την παραγωγή βιοντήζελ χαμηλής προστιθέμενης αξίας (Leiva-Candia et al., 2014), ωστόσο, έχουν χρησιμοποιηθεί επιτυχώς ως πρώτη ύλη για την παραγωγή κηρών (Paradaki et al., under revision).

1.5 Σκοπός μελέτης

Αντικείμενο της παρούσας εργασίας είναι η μελέτη διαφόρων μικροοργανισμών (ζύμες) όσον αφορά στη δυνατότητα παραγωγής μικροβιακών ελαίων, οι οποίες δύνανται να αφομοιώνουν πηγές άνθρακα που απαντώνται στα παραπροϊόντα της βιομηχανικής παραγωγής ζάχαρης, όπως: σακχαρόζη, φρουκτόζη, γλυκόζη. Οι ελαιογόνοι μικροοργανισμοί επιλέχθηκαν να μελετηθούν σε ζυμώσεις υγρής καλλιέργειας με στόχο την βελτιστοποίηση των συνθηκών παραγωγής μικροβιακών λιπιδίων. Στόχος της παρούσας μελέτης είναι η παραγωγή μικροβιακών λιπιδίων από ανανεώσιμες πηγές άνθρακα και η περαιτέρω αξιοποίησή του προς την σύνθεση χημικών υψηλής προστιθέμενης αξίας. Η μελέτη αποτελείται από δύο στάδια:

Το πρώτο στάδιο περιλαμβάνει την μελέτη των ζυμών *Rhodosporidium toruloides* Y-27012 και *Rhodosporidium kratochvilovae* Y-43 ως προς την ανάπτυξη και παραγωγή μικροβιακών λιπιδίων σε υποστρώματα αποτελούμενα από παραπροϊόντα της βιομηχανίας ζάχαρης. Για την διεξαγωγή των πειραμάτων οι μικροοργανισμοί μελετήθηκαν σε ζυμώσεις υγρής κατάστασης

σε κωνικές φιάλες με όλα τα απαραίτητα θρεπτικά συστατικά. Οι ζυμώσεις έγιναν αρχικά σε υπόστρωμα με ακατέργαστη ζάχαρη, ως πηγή άνθρακα, κι έπειτα σε μελάσα. Οι ζυμώσεις σε μελάσα μελετήθηκαν ως προς την παρουσία ή απουσία μείγματος αλάτων και ιχνοστοιχείων. Στη συνέχεια έγινε επιλογή εκείνων των μικροοργανισμών που παρουσίασαν τα καλύτερα αποτελέσματα και μελετήθηκε η παραγωγή μικροβιακού λίπους σε ζυμώσεις υγρής κατάστασης σε βιοαντιδραστήρα.

Στο δεύτερο στάδιο, το παραγόμενο μικροβιακό λίπος παραλήφθηκε με σκοπό την αξιοποίησή του για την σύνθεση χημικών υψηλής προστιθέμενης αξίας μέσω μη συμβατικής βιοκατάλυσης. Συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκε ενζυμική αντίδραση για την παραγωγή βιολιπαντικών ουσιών με χρήση της πολυόλης νεοπεντυλογλυκόλη.

2. Υλικά και μέθοδοι

2.1 Βιολογικό υλικό

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν μικροοργανισμοί που ανήκουν στην κατηγορία των ζυμών οι οποίοι βρίσκονται στην τράπεζα του Εργαστηρίου Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών. Τα στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν είναι του είδους *Rhodospiridium* και συγκεκριμένα οι ζύμες *Rhodospiridium toruloides* Y-27012 και *Rhodospiridium kratochvilovae* Y-43.

Οι εν λόγω μικροοργανισμοί διατηρούνταν σε τρυβλία Petri πληρωμένα με θρεπτικό μέσο YPD (Yeast Peptone Dextrose Agar) με σύσταση 10 g/L εκχύλισμα ζύμης, 10 g/L πεπτόνη και 10 g/L γλυκόζη, στους 4 °C. Η ανανέωση τους λάμβανε χώρα ανά τακτά χρονικά διαστήματα προκειμένου να διατηρηθεί η ζωτικότητα τους.

2.2 Παρασκευή του εμβολίου

Για την παρασκευή της προκαλλιέργειας (εμβόλιο) οι μικροοργανισμοί καλλιεργήθηκαν αρχικά σε θρεπτικό μέσο YPD για 24 ώρες και επώαστηκαν σε θερμοκρασία 28 °C. Στη συνέχεια το εμβόλιο (10% v/v) μεταφερόταν σε κωνικές φιάλες των 250 mL για την διεξαγωγή του εκάστοτε πειράματος με θρεπτικό μέσο που αναλύεται σε επόμενη ενότητα.

2.3 Θρεπτικά υποστρώματα

Για την διεξαγωγή των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν ακατέργαστη ζάχαρη καθαρότητας 99% και μελάσα ως πηγές άνθρακα. Οι πρώτες ύλες παραχωρήθηκαν από την εταιρεία Petrobras

που εδρεύει στο Ρίο ντε Τζανέιρο της Βραζιλίας. Η σύσταση της μελάσας ήταν: σάκχαρα 47% (σακχαρόζη 72%, γλυκόζη 14% και φρουκτόζη 14%), άζωτο κατά Kjeldahl (TKN) 0.52%, πρωτεΐνη (TKN x 6,25) 3,2%, εκχύλισμα φαινολικών συστατικών 0,07%.

2.4 Παραγωγή μικροβιακού λίπους σε ασυνεχείς υγρές ζυμώσεις

Οι υγρές ζυμώσεις ασυνεχούς συστήματος πραγματοποιήθηκαν σε κωνικές φιάλες των 250 mL πληρωμένες κατά το 1/5 τους (50±1 mL) με θρεπτικό μέσο το οποίο αποτελούταν από μία πηγή άνθρακα και αζώτου και από ένα μίγμα αλάτων, υπό ανάδευση 180 rpm. Αρχικά, για την διεξαγωγή των πειραμάτων, χρησιμοποιήθηκε ως υπόστρωμα η ακατέργαστη ζάχαρη (raw cane sugar) και στη συνέχεια αντικαταστάθηκε με μελάσα. Αναλυτικά η σύσταση του υποστρώματος ήταν (g/L): 70 ακατέργαστη ζάχαρη ή ~140 μελάσα (με περιεκτικότητα σε σάκχαρα ~50%), 0,5 εκχύλισμα ζύμης και 0,5 (NH₄)₂SO₄ ως πηγές αυξητικών παραγόντων, 7 KH₂PO₄ και 2,5 Na₂HPO₄ ως πηγές φωσφορικών αλάτων και με ρυθμιστική ιδιότητα για την τιμή του pH, καθώς και το εξής μίγμα ιχνοστοιχείων: 1,5 MgSO₄ ·7H₂O, 0,15 CaCl₂·2H₂O, 0,15 FeCl₃·6H₂O, 0,06 MnSO₄·H₂O, 0,02 ZnSO₄·7H₂O. Το pH του υποστρώματος ρυθμιζόταν στο 5.8 περίπου. Κατά την διάρκεια της ζύμωσης γινόταν ρύθμιση του pH με NaOH 5M. Τα υλικά και τα θρεπτικά μέσα που χρησιμοποιήθηκαν αποστειρώθηκαν σε αυτόκλειστο στους 121 °C για 20 min, ενώ οι πηγές αζώτου αποστειρώθηκαν ξεχωριστά και προστέθηκαν ασηπτικά στο υγρό της ζύμωσης πριν τον εμβολιασμό.

Στην προσπάθεια βελτιστοποίησης της διεργασίας παραγωγής ενδοκυτταρικού λίπους σε υπόστρωμα μελάσας, πραγματοποιήθηκαν ζυμώσεις με παρουσία ή μη των πηγών αζώτου, καθώς η μελάσα περιέχει σημαντική ποσότητα αζώτου, με παρουσία ή μη μίγματος αλάτων, αλλά και με μελάσα που είχε προηγουμένως επεξεργαστεί καταλλήλως για την απομόνωση και αφαίρεση των φαινολικών συστατικών.

2.5 Παραγωγή μικροβιακού λίπους σε ημισυνεχείς υγρές ζυμώσεις σε βιοαντιδραστήρα

Κατόπιν της βελτιστοποίησης της σύστασης του υποστρώματος (κεφ. 2.3), πραγματοποιήθηκαν ασυνεχείς ζυμώσεις σε βιοαντιδραστήρα (Labfors 4, Infors HT) με ενεργό όγκο 700 mL. Για τη διεξαγωγή των πειραμάτων, χρησιμοποιήθηκε ως υπόστρωμα η μελάσα (140 g/L, περίπου 70 g/L συγκέντρωση σακχάρων) και εμβόλιο (10% v/v) όπως αναλύθηκε στην παράγραφο 2.2. Το pH ήταν σταθερό στο 6 ± 0,2 κατά τη διάρκεια της ζύμωσης με αυτόματη προσθήκη NaOH 5M ή H₂SO₄ 10%. Ο ρυθμός ανάδευσης στο βιοαντιδραστήρα ρυθμίστηκε στα

150-350 rpm έτσι ώστε ο κορεσμός του διαλυμένου οξυγόνου (DO) να διατηρείται στο 20%. Η εισαγωγή αέρα ρυθμίστηκε στο 1vvm και η θερμοκρασία στους 28 °C. Η τροφοδότηση της ζύμωσης ξεκινούσε όταν η συγκέντρωση των συνολικών σακχάρων έφτανε στα 20 g/L περίπου, με προσθήκη διαλύματος ακατέργαστης ζάχαρης με αρχική συγκέντρωση ολικών σακχάρων ~650 g/L.

2.6 Παραγωγή βιολιπαντικών ουσιών με χρήση μικροβιακού λίπους ως πρώτη ύλη

Η εστεροποίηση του μικροβιακού λίπους πραγματοποιήθηκε σε δύο στάδια: α) υδρόλυση του μονοκυτταρικού λίπους (SCO) και β) παραλαβή ελεύθερων λιπαρών οξέων και εστεροποίηση αυτών μέσω ενζυμικής αντίδρασης για την παραγωγή βιολιπαντικών. Δεδομένου ότι δεν υπάρχουν εμπορικά διαθέσιμα πρότυπα για όλα τα λιπαρά οξέα για να γίνει ποσοτικός προσδιορισμός των παραγόμενων προϊόντων μέσω αέριας χρωματογραφίας (GC), το στάδιο της υδρόλυσης του λίπους είναι απαραίτητο ούτως ώστε να γίνει έμμεσος ποσοτικός προσδιορισμός μέσω της μεσω της διαφοράς της οξύτητας μεταξύ των ληφθέντων δειγμάτων.

Αναλυτικά, για την υδρόλυση του μικροβιακού λίπους προσθέτουμε ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl 0,1 M σε αναλογία 1:1 (v/v) και 2% (w/w) από την εμπορική λιπάση Lipomod™ 34 MDP (Biocatalysts Inc., USA) ώστε να γίνει η αντίδραση στους 30 °C για 24 h. Ο τερματισμός της αντίδρασης γίνεται με προσθήκη εξανίου. Το μίγμα τοποθετείται σε διαχωριστική χοάνη για τον διαχωρισμό της οργανικής (λίπος, ελεύθερα λιπαρά οξέα και διαλύτης) και της υδατικής (γλυκερόλη, ρυθμιστικό διάλυμα και ένζυμα) φάσης. Μετά τον διαχωρισμό, παραλήφθηκε η οργανική φάση και σε περιστροφικό εξατμιστήρα διαχωρίστηκαν τα ελεύθερα λιπαρά οξέα από τον διαλύτη.

Το δεύτερο στάδιο αποτελείται από την εστεροποίηση των λιπαρών οξέων του μονοκυτταρικού λίπους (SCOFA) με μία πολυόλη. Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε η νεοπεντυλογλυκόλη, C₅H₁₂O₂, (2,2-dimethylpropane-1,3-diol κατά IUPAC, εν συντομία από εδώ και στο εξής θα αναφέρεται ως DIP). Η πολυόλη DIP περιέχει δύο υδροξυλομάδες και το μοριακό της βάρος είναι 104,15 g/mol. Οι ενζυμικές αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν σε σφαιρικές φιάλες των 50 mL, χρησιμοποιώντας SCOFA 0,5 g ή 1 g και την πολυόλη DIP. Η μοριακή αναλογία βασίστηκε στην στοιχειομετρία της αντίδρασης και ήταν 2:1 (SCOFA:πολυόλη).

Η ποσοτικοποίηση του βαθμού εστεροποίησης του υδρολυμένου μικροβιακού λίπους πραγματοποιήθηκε έμμεσα με τον προσδιορισμό της διαφοράς της οξύτητας μεταξύ των ληφθέντων δειγμάτων και περιγράφεται αναλυτικά στο κεφ. 2.7.8.

2.7 Αναλυτικές μέθοδοι

2.7.1 Προσδιορισμός pH

Το pH του μέσου καλλιέργειας μετρήθηκε με pH-μετρο τύπου Mettler Toledo (Εικόνα 9). Κατά τη μέτρηση του εκάστοτε σημείου της κινητικής γινόταν διόρθωση του pH σε όλες τις φιάλες, όπου ήταν απαραίτητο, ώστε να κυμαίνεται στο εύρος των τιμών $6\pm 0,2$ με προσθήκη, υπό ασηπτικές συνθήκες, διαλύματος NaOH 5M.



Εικόνα 9 pH-μετρο τύπου Mettler Toledo.

2.7.2 Προσδιορισμός ξηρής βιομάζας

Ο προσδιορισμός της ξηρής βιομάζας πραγματοποιήθηκε με την συλλογή της και φυγοκέντρηση της σε φυγόκεντρο τύπου Heraeus Sepatech Suprafuge 320 (9000 rpm, 10 min, 4 °C). Ακολουθούσαν δύο φορές έκπλυση της βιομάζας με απιονισμένο νερό και ξανά φυγοκέντρηση κάτω από τις ίδιες συνθήκες. Στη συνέχεια, η βιομάζα μεταφερόταν σε προζυγισμένα φιαλίδια McCartney και τοποθετούταν στον φούρνο προς ξήρανση ($70\pm 5^\circ\text{C}$) μέχρι σταθεροποίησης του βάρους. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν σε g/L καλλιέργειας.

2.7.3 Προσδιορισμός σακχάρων

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης των σακχάρων και των παραγόμενων προϊόντων πραγματοποιήθηκε με χρήση Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) (Shimadzu, Japan), εξοπλισμένη με ανιχνευτή διαφορικού διαθλασίμετρου (RID-10A, Shimadzu). Η ταυτοποίηση των σακχάρων βασίστηκε στο χρόνο

κατακράτησης, ο οποίος συγκρίθηκε με γνωστά πρότυπα αυτών. Ως κινητή φάση χρησιμοποιήθηκε υδατικό διάλυμα H_2SO_4 (10mM), η ροή ρυθμίστηκε στα 0,6 mL/min και η θερμοκρασία στους 65 °C. Η στήλη με την οποία επιτεύχθηκε ο διαχωρισμός του μίγματος ήταν τύπου ROA-Organic Acid H^+ (Phenomenex).

2.7.4 Μελέτη μικροβιακού λίπους

2.7.4.1 Εκχύλιση μικροβιακού λίπους

Για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης ενδοκυτταρικού λίπους που παράγεται από τις ζύμες κατά τη διάρκεια της ζύμωσης, μετά τη ζύγιση της ξηρής βιομάζας προστέθηκε στην ξηρή βιομάζα μίγμα διαλυτών χλωροφορμίου-μεθανόλης σε αναλογία 2:1 (Folch et al., 1957; Παπανικολαου et al., 2001). Μετά την πάροδο 72 h όπου τα δείγματα παρέμειναν σε ξηρό και σκοτεινό μέρος έγινε απομάκρυνση της βιομάζας με διήθηση, ενώ το εκχύλισμα λίπους τοποθετήθηκε σε προζυγισμένη φιάλη εξάτμισης (Εικόνα 10, αριστερά) και διαχωρίστηκε από το μίγμα διαλυτών με εξάτμιση σε περιστροφικό εξατμιστήρα (BUCHI Waterbath B-480, BUCHI Rotavapor R-114). Τελικά, στην φιάλη εξάτμισης παρέμενε το μικροβιακό λίπος (Εικόνα 10, δεξιά) και αφού η φιάλη ερχόταν σε θερμοκρασία δωματίου ζυγίζοταν και το αποτέλεσμα εκφραζόταν σε g/g ξηρής μάζας και g/L καλλιέργειας.



Εικόνα 10 Φιάλες πριν (αριστερή εικόνα) και μετά (δεξιά εικόνα) την εξάτμιση

2.7.4.2 Προσδιορισμός σύστασης μικροβιακού λίπους

Στη συνέχεια, το ενδοκυτταρικό λίπος μετατρέπεται με μεθυλίωση στους αντίστοιχους μεθυλικούς εστέρες (FAMES, Fat Acid Methyl Esters), με την γενικευμένη μέθοδο AFNOR(1959), προκειμένου να γίνει ο ποιοτικός προσδιορισμός των λιπαρών οξέων που περιέχονται σε αυτό, μιας και οι μεθυλεστέρες αυτοί είναι πτητικές ενώσεις. Η εστεροποίηση πραγματοποιείται σε δύο στάδια, το πρώτο σε αλκαλικό περιβάλλον και το δεύτερο σε όξινο. Κατά το πρώτο στάδιο τελείται η πυρηνόφιλη υποκατάσταση στο μόριο των τριγλυκεριδίων

και των φωσφολιπιδίων, με τελικό προϊόν τους αντίστοιχους μεθυλεστέρες των λιπαρών οξέων. Παράλληλα, τα ήδη υπάρχοντα ελεύθερα λιπαρά οξέα (FFAs, Free Fatty Acids) αντιδρούν με το διάλυμα του μεθανολικού νατρίου και παραλαμβάνονται οι αντίστοιχοι σάπωνες τους. Στο δεύτερο στάδιο πραγματοποιείται η μετατροπή των σαπώνων των λιπαρών οξέων προς τους αντίστοιχους μεθυλεστέρες.

- **Εφαρμογή της μεθόδου**

Στην σφαιρική φιάλη με το ζυγισθέν κυτταρικό λίπος προστίθενται λίγες πέτρες βρασμού και 10 mL διαλύματος μεθανολικού νατρίου ($\text{MeO}^- \text{Na}^+$). Τοποθετείται το δείγμα προς βρασμό για 20 min σε κάθετο ψυκτήρα και μετά το πέρας του χρόνου προστίθενται μερικά mL υδροχλωρικής μεθανόλης (έως ότου το δείγμα αποχρωματιστεί) και αφήνεται προς βρασμό για άλλα 20 min. Ακολουθεί προσθήκη νερού προκειμένου η αντίδραση να λάβει τέλος και το δείγμα μεταφέρεται σε εκχυλιστική χοάνη. Προστίθενται εν συνεχεία 6 mL εξάνιου, το δείγμα αναδεύεται έντονα και αφήνεται για λίγα λεπτά προκειμένου να διαχωριστούν οι δύο φάσεις (η οργανική με το εξάνιο και η υδατική φάση). Η άνω φάση, η οποία αποτελείται από τους εστέρες των λιπαρών οξέων και το εξάνιο συλλέγεται σε μικρό φιαλίδιο, στο οποίο προστίθεται μικρή ποσότητα άνυδρου θειικού νατρίου (Na_2SO_4) προς απορρόφηση της υγρασίας, ενώ η κάτω φάση απορρίπτεται. Τέλος, το δείγμα που συλλέγεται αναλύεται στον αέριο χρωματογράφο (GC).

Τα δείγματα που προκύπτουν από την μεθυλεστεροποίηση οδηγούνται στον αέριο χρωματογράφο για την ανάλυση της σύστασης των λιπιδίων στα επιμέρους λιπαρά οξέα. Πραγματοποιείται έγχυση 1 μL από το διάλυμα μεθυλεστέρων με ειδική σύριγγα στην υποδοχή του αέριου χρωματογράφου 8000 series FISIONS.

Συνθήκες αέριου χρωματογράφου :

- Θερμοκρασία εισαγωγέα 250 °C
- Θερμοκρασία ανιχνευτή (FID) 270 °C
- Split ratio 1:50
- Φέρον αέριο He (ροή 2 mL/ min)
- He (90 kPa), H_2 (60 kPa), Air (120 kPa)
- Τύπος στήλης CPWAX 52CB
 - Μήκος 30 m

- Διάμετρος 0,32 mm
- Πάχος επικάλυψης εσωτερικά που έρχεται σε επαφή με το δείγμα DF = 0,25 μm.

Για την ανάλυση των μεθυλεστέρων η θερμοκρασία του φούρνου ήταν αρχικά στους 100 °C και παρέμεινε για 1 min. Στη συνέχεια με ρυθμό 25 °C /min ανέβηκε στους 200 °C παραμένοντας για 1 min, έπειτα με ρυθμό 3 °C/min στους 230 °C για 6 min, και με ρυθμό 30 °C /min έφθασε στους 250 °C όπου και παρέμεινε για 2.5 min. Με τη χρήση πρότυπων μεθυλεστέρων των κυριότερων λιπαρών οξέων, ταυτοποιήθηκαν οι αντίστοιχοι χρόνοι κατακράτησης για τους μεθυλεστέρες κάθε λιπαρού οξέος.

2.7.5 Προσδιορισμός αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων (FAN)

Η αναλυτική μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό του αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων και πεπτιδίων (FAN, Free Amino Nitrogen) στο μέσο της καλλιέργειας ήταν η φωτομετρική μέθοδος της νινυδρίνης (Lie, 1973).

- **Εφαρμογή της μεθόδου**

1 mL κατάλληλα αραιωμένου δείγματος μεταφέρεται σε δοκιμαστικό σωλήνα και προστίθεται 0,5 mL αντιδραστήριο χρώσης (color reagent). Οι δοκιμαστικοί καλύπτονται με αλουμινόχαρτο ώστε να αποφευχθεί η εξάτμιση και τοποθετούνται στους 100 °C για ακριβώς 16 min. Μετά το πέρας του βρασμού ακολουθεί ταχεία ψύξη σε νερό με πάγο (~4° C) για 20 min. Στη συνέχεια προστίθενται 2,5 mL αντιδραστηρίου αραιώσης (dilution reagent) και ακολουθεί ανάδευση σε vortex για 20 sec. Τέλος, μετράται η απορρόφηση των δειγμάτων στα 570 nm σε φασματοφωτόμετρο (Hitachi U-2000). Το τυφλό που χρησιμοποιείται για μηδενισμό του φασματοφωτόμετρου περιέχει 1mL απιονισμένου νερού αντί για δείγμα. Όλα τα δείγματα μετρήθηκαν εις διπλούν.

Η συγκέντρωση του δείγματος σε άζωτο υπολογίζεται με τη βοήθεια πρότυπης καμπύλης αναφοράς και εκφράζεται σε mg/L FAN. Για την πρότυπη καμπύλη αναφοράς ακολουθείται η ίδια διαδικασία, χρησιμοποιώντας διαφορετικές συγκεντρώσεις πρότυπου διαλύματος γλυκίνης.

Προετοιμασία-Παρασκευή Αντιδραστηρίων:

- *Αντιδραστήριο χρώσης (color reagent):*

Το αντιδραστήριο αυτό αποτελείται από 49,71 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 5 g νινυδρίνη, 3 g φρουκτόζη και 60 g KH_2PO_4 διαλυμένα σε 1 L απιονισμένου H_2O . Κατά τη διάρκεια παρασκευής του αντιδραστηρίου το pH πρέπει να κυμαίνεται από 6,6 - 6,8. Ως εκ τούτου όποτε κρίνεται αναγκαίο το pH διορθώνεται ούτως ώστε να κυμαίνεται εντός του προαναφερθέντος εύρους, με προσθήκη κατάλληλης ποσότητας KH_2PO_4 . Το αντιδραστήριο αποθηκεύεται στους 4 °C.

- *Αντιδραστήριο αραιώσης (dilution reagent):*

Αρχικά 2 g KIO_3 διαλύονται σε 616 mL απιονισμένου νερού. Ακολούθως 384 mL καθαρής αιθανόλης προστίθενται στο διάλυμα, το οποίο τελικά έχει όγκο 1 L.

2.7.6 Προσδιορισμός του ανόργανου φωσφόρου (IP)

Ο ανόργανος φώσφορος (IP) προσδιορίστηκε με τη φασματοφωτομετρική μέθοδο του μολυβδαινικού αμμωνιακού και περιγράφηκε από τους Harland και Harland (1990). Η μέθοδος αυτή βασίστηκε στην οξείδωση του οργανικά συνδυασμένου φωσφόρου με το υπερχλωρικό οξύ με σκοπό την παραγωγή ορθοφωσφορικού. Κάτω από όξινες συνθήκες το μολυβδαινικό αμμώνιο αντιδρά με το ορθοφωσφορικό για να σχηματίσει φωσφορομολυβδαίνιο που μειώνεται περαιτέρω σε κυανό του μολυβδαινίου. Το μπλε χρώμα μετράται φασματοφωτομετρικά στα 730 nm.

• Εφαρμογή της μεθόδου

Για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης του ανόργανου φωσφόρου, τα δείγματα αραιώνονται κατάλληλα με τελικό όγκο τα 5 mL και τοποθετούνται σε δοκιμαστικούς σωλήνες. Σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα προστίθεται, σε απαγωγό, 0,4 mL υπερχλωρικού οξέος (60% v/v) και αναδεύεται σε vortex για 10 sec. Έπειτα, προστίθεται 0,3 mL ασκορβικού οξέος (1% w/v) το οποίο έχει παρασκευαστεί πρόσφατα και αναδεύεται ξανά ο κάθε δοκιμαστικός σωλήνας σε vortex για 10 sec. Τέλος, προστίθεται το μολυβδαινικό αμμώνιο (4% w/v) και τα δείγματα αναδεύονται έντονα. Οι δοκιμαστικοί σωλήνες αφήνονται για 10 min, επιτρέποντας στο χρώμα να αναπτυχθεί και στη συνέχεια μετράται η απορρόφηση στα 730 nm χρησιμοποιώντας φασματοφωτόμετρο (Hitachi U-2000). Το τυφλό που χρησιμοποιείται για μηδενισμό του φασματοφωτόμετρου περιέχει 1mL απιονισμένου νερού αντί για δείγμα. Όλα τα δείγματα μετρήθηκαν εις διπλούν.

2.7.7 Απομόνωση φαινολικών συστατικών της μελάσας

Ο διαχωρισμός των φαινολικών συστατικών της μελάσας έγινε με τη χρήση οξικού αιθυλεστέρα, όπως περιγράφεται από τους Alexandri et al. (2016). Αρχικά, έγινε αραιώση της μελάσας 1/5. Το pH του διαλύματος που προκύπτει ρυθμίστηκε με προσθήκη πυκνού HCl ούτως ώστε να είναι ≤ 2 . Στη συνέχεια, στην αραιωμένη μελάσας προστίθεται οξικός αιθυλεστέρας σε αναλογία 1:3 (μελάσα:διαλύτης, κατ' όγκο) και όλα μαζί μεταφέρονται σε φιάλη Duran και αναδεύονται για 30 λεπτά. Έπειτα, μεταφέρεται το διάλυμα σε διαχωριστική χοάνη όπου και παραμένει για 10 min έως ότου διαχωριστεί η οργανική με την υδατική φάση. Στη συνέχεια, παραλαμβάνεται η υδατική φάση, η οποία συμπυκνώνεται με χρήση περιστροφικού εξατμιστήρα μέχρις ότου απομακρυνθούν υπολείμματα διαλύτη. Το εκχύλισμα των φαινολικών συστατικών που περιέχεται στην οργανική φάση, ανακτήθηκε με χρήση περιστροφικού εξατμιστήρα χρησιμοποιείται για την ανάκτηση του διαλύτη. Η υδατική φάση που θα αποτελέσει και το υγρό των ζυμώσεων που θα αναλυθούν παρακάτω συμπυκνώνεται σε περιστροφικό εξατμιστήρα.

2.7.8 Προσδιορισμός βαθμού εστεροποίησης του μικροβιακού λίπους προς παραγωγή βιολιπαντικών ουσιών

Η ποσοτικοποίηση του βαθμού εστεροποίησης του υδρολυμένου μικροβιακού λίπους πραγματοποιήθηκε έμμεσα με τον προσδιορισμό της διαφοράς της οξύτητας μεταξύ των ληφθέντων δειγμάτων. Τα δείγματα ζυγίζονταν σε ζυγό ακριβείας τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων. στη συνέχεια προστίθονταν 40 mL διαλύματος αιθανόλης και ακετόνης σε αναλογία 1:1 και ακολουθούσε τιτλοδότηση με 0,04 M NaOH σε αυτόματο τιτλοδότη (Εικόνα 11).

Αρχικά, υπολογίστηκε η οξύτητα των δειγμάτων με τον παρακάτω τύπο:

$$\text{Οξύτητα (\%)} = \frac{V * M * m}{w}$$

Όπου, V είναι ο όγκος του NaOH που καταναλώθηκε (L), M η συγκέντρωση του NaOH (0,04 M), m είναι το μοριακό βάρος των ελεύθερων λιπαρών οξέων, και το w είναι το βάρος του δείγματος (g). Το μοριακό βάρος των λιπαρών οξέων υπολογίστηκε περίπου 270 g/mol για την ζύμη *R. toruloides*, βάση της σύστασης του μικροβιακού λίπους.

Στη συνέχεια ο βαθμός εστεροποίησης για κάθε χρονική στιγμή κατά τη διάρκεια της αντίδρασης υπολογίστηκε σύμφωνα με τον τύπο:

$$\text{Βαθμός εστεροποίησης (\%)} = \frac{A_i - A_f}{A_i} * 100$$

Όπου, A_i είναι οξύτητα των λιπαρών οξέων και A_f η οξύτητα του προϊόντος.



Εικόνα 11 Αυτόματος τιτλοδότης

3. Αποτελέσματα

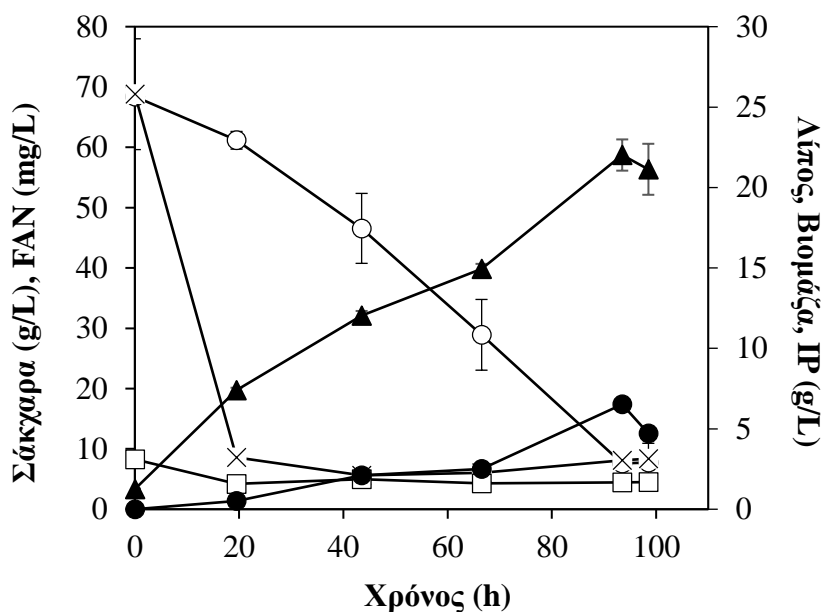
3.1 Παραγωγή μικροβιακού λίπους σε ασυνεχείς ζυμώσεις με ακατέργαστη ζάχαρη ως υπόστρωμα

3.1.1 Μελέτη της ζύμης *Rhodosporidium toruloides*

Η δυνατότητα παραγωγής λίπους σε υποστρώματα αποτελούμενα από μίγμα σακχάρων όπως σακχαρόζη, γλυκόζη και φρουκτόζη από το στέλεχος *R. toruloides* Y-27012 αξιολογήθηκε αρχικά χρησιμοποιώντας ακατέργαστη ζάχαρη ως πηγή άνθρακα. Οι ασυνεχείς ζυμώσεις που έλαβαν χώρα σε κωνικές φιάλες περιείχαν ακατέργαστη ζάχαρη σε συγκέντρωση 70 g/L και μίγμα αλάτων, η σύσταση του οποίου έχει αναφερθεί στο κεφάλαιο 2.3. Στο Διάγραμμα 1 που ακολουθεί παρουσιάζεται η κατανάλωση των σακχάρων, του αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων (FAN) και του ανόργανου φωσφόρου (IP), καθώς και η παραγωγή της βιομάζας και του ενδοκυτταρικού λίπους.

Αρχικά παρατηρείται ότι το FAN και ο IP καταναλώθηκαν στις πρώτες 20 h της ζύμωσης, χρονική στιγμή κατά την οποία η ζύμη ξεκίνησε την διαδικασία της λιποσυσσώρευσης, δεδομένου ότι η παραγωγή λίπους αποτελεί προϊόν δευτερογενούς μεταβολισμού. Τα σάκχαρα (σακχαρόζη, γλυκόζη και φρουκτόζη) καταναλώθηκαν πλήρως στις 98,5 h και η μέγιστη παραγωγή μικροβιακού λίπους ήταν 6,5 g/L στις 93,5 h. Η παραγωγικότητα ήταν 0,07

g/L/h και η απόδοση 0,11 g λίπους/g καταναλωθέντων σακχάρων. Τέλος, η μέγιστη λιποσυσσώρευση που επιτεύχθηκε ήταν 29% και η βιομάζα έφθασε τα 22 g/L.

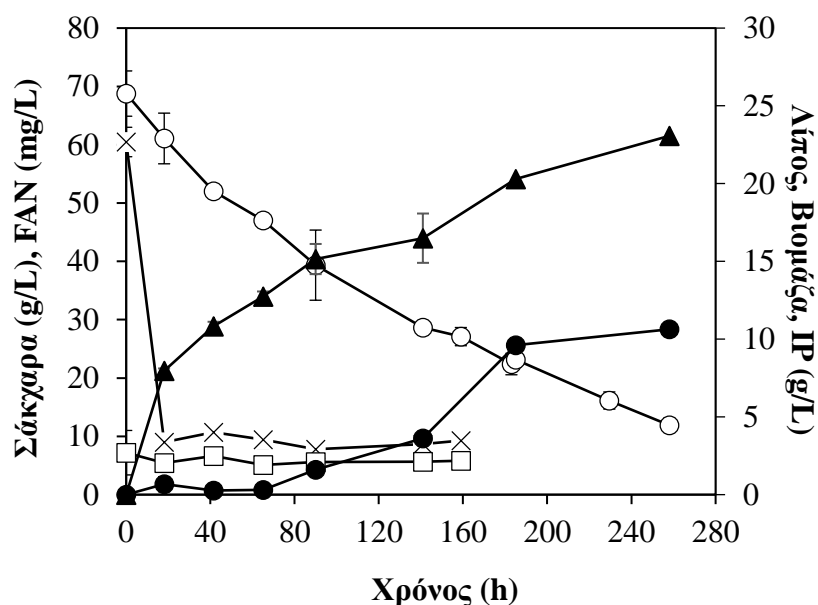


Διάγραμμα 1 Κινητική παραγωγής μικροβιακού λίπους κατά την καλλιέργεια του στελέχους *Rhodospiridium toruloides* Y-27012 σε υπόστρωμα αποτελούμενο από 70 g/L ακατέργαστης ζάχαρης ως πηγή άνθρακα. (ο) Σάκχαρα (σακχαρόζη, γλυκόζη και φρουκτόζη) (g/L), (x) Άζωτο ελεύθερων αμινομάδων FAN (mg/L), (□) Ανόργανος Φώσφορος IP (g/L), (▲) Βιομάζα (g/L), (●) Λίπος (g/L).

3.1.2 Μελέτη της ζύμης *Rhodospiridium kratochvilovae*

Αντίστοιχη ζύμωση με τις ίδιες συνθήκες με αυτές που αναφέρθηκαν στην παράγραφο 3.1.1 πραγματοποιήθηκε και από το στέλεχος *Rhodospiridium kratochvilovae* Y-43. Στο Διάγραμμα 2 που ακολουθεί παρουσιάζεται η κατανάλωση των σακχάρων, FAN και του IP, καθώς και η παραγωγή της βιομάζας και του ενδοκυτταρικού λίπους.

Αρχικά παρατηρείται ότι το FAN και ο IP καταναλώθηκαν στις πρώτες 18 h της ζύμωσης, χρονική στιγμή κατά την οποία η ζύμη ξεκίνησε την διαδικασία της λιποσυσσώρευσης. Στις 258 h της ζύμωσης είχε καταναλωθεί το 82,7% της αρχικής συγκέντρωσης των σακχάρων (σακχαρόζη, γλυκόζη και φρουκτόζη) λήθηκαν πλήρως και η μέγιστη παραγωγή μικροβιακού λίπους και βιομάζας ήταν 10,6 g/L και 23, g/L, αντίστοιχα, σημειώνοντας υψηλή λιποπεριεκτικότητα που έφθασε το 46%. Η παραγωγικότητα ήταν 0,04 g/L/h και η απόδοση 0,19 g/g.



Διάγραμμα 2 Κινητική παραγωγής μικροβιακού λίπους κατά την καλλιέργεια του στελέχους *Rhodospiridium kratochvilovae* Y-43 σε υπόστρωμα αποτελούμενο από 70 g/L ακατέργαστης ζάχαρης ως πηγή άνθρακα. (ο) Σάκχαρα (σακχαρόζη, γλυκόζη και φρουκτόζη) (g/L), (x) Άζωτο ελεύθερων αμινομάδων FAN (mg/L), (□) Ανόργανος Φώσφορος IP (g/L), (▲) Βιομάζα (g/L), (●) Λίπος (g/L).

3.2 Παραγωγή μικροβιακού λίπους σε ασυνεχείς ζυμώσεις με μελάσα ως υπόστρωμα

Ο στόχος της παρούσας μελέτης είναι η αξιοποίηση της μελάσας ως μοναδική πηγή άνθρακα για την παραγωγή βιοτεχνολογικών προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας, όπως το μικροβιακό λίπος. Σε αυτό το στάδιο της πειραματικής μελέτης χρησιμοποιήθηκε μελάσα αντί για ακατέργαστη ζάχαρη. Η σύσταση του υποστρώματος, όπως αυτό έχει περιγραφεί στο κεφ. 2.4, περιλαμβάνει ένα μίγμα πηγών αζώτου κι ένα μίγμα ιχνοστοιχείων και φωσφορικών αλάτων. Με σκοπό την εύρεση της καλύτερης σύστασης του υποστρώματος που θα οδηγήσει στην μέγιστη λιποσυσσώρευση των ζυμών *R. toruloides* και *R. kratochvilovae*, μελετήθηκε η επίδραση: α) της παρουσίας ή απουσίας των φωσφορικών αλάτων ή/και των ιχνοστοιχείων στο θρεπτικό μέσο της ζύμωσης και β) της απουσίας των εμπορικών πηγών αζώτου, δεδομένου ότι η μελάσα περιέχει άζωτο.

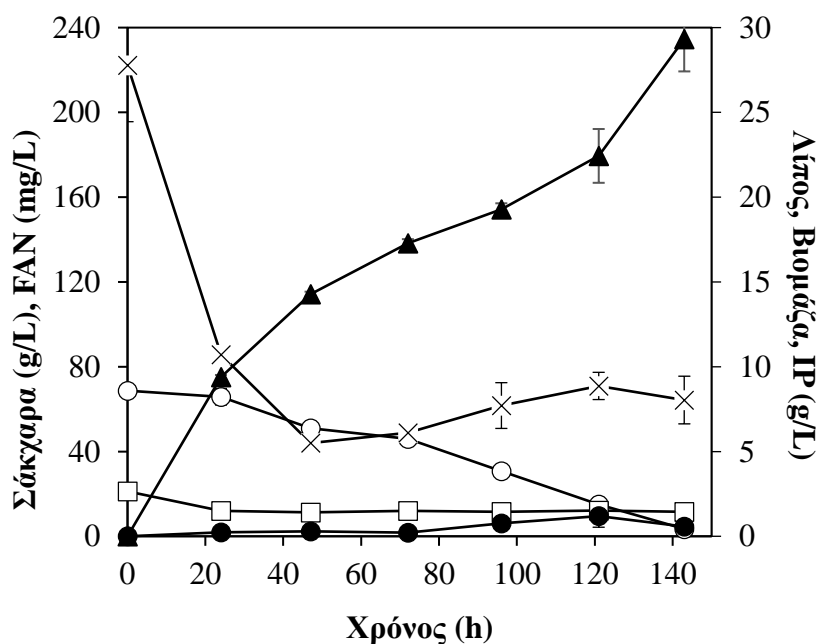
3.2.1 Επίδραση της προσθήκης μίγματος φωσφορικών αλάτων και ιχνοστοιχείων στο θρεπτικό μέσο

Στο αυτό το στάδιο της μελέτης πραγματοποιήθηκαν υγρές ασυνεχείς ζυμώσεις σε υπόστρωμα μελάσας. Τόσο στην περίπτωση του *R. toruloides* Y-27012, όσο και στην περίπτωση του

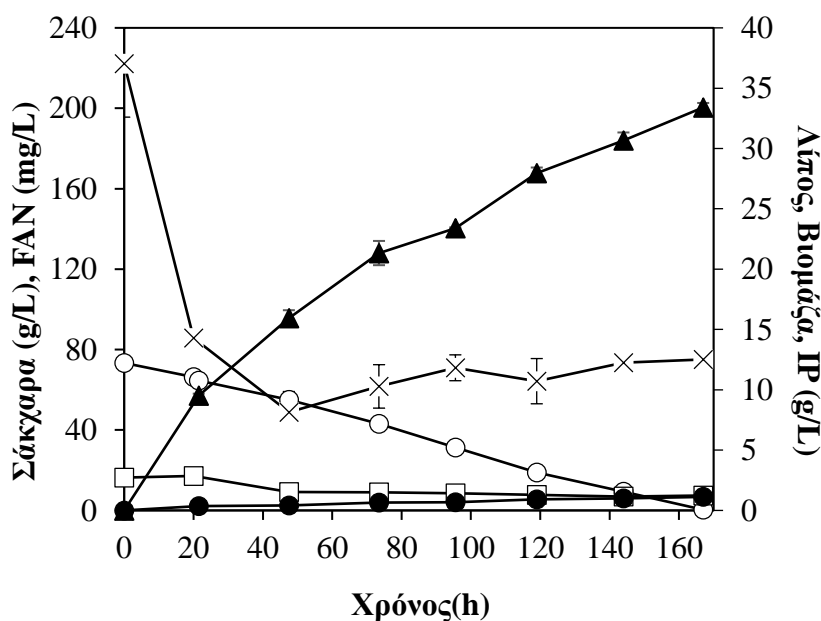
στελέχους *R. kratochvilovae* Y-43 το θρεπτικό μέσο αποτελούνταν από μελάσα με αρχική συγκέντρωση σακχάρων περίπου 70 g/L, εκχύλισμα ζύμης 0,5 g/L και $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,5 g/L ως πηγές αζώτου, KH_2PO_4 7 g/L και Na_2HPO_4 2,5 g/L ως πηγές φωσφορικών αλάτων και το μίγμα ιχνοστοιχείων όπως έχει αναφερθεί στο κεφ. 2.4. Ο λόγος C/FAN ήταν περίπου 55-80.

Στο Διάγραμμα 3, που ακολουθεί παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της ζύμωσης για το στέλεχος *R. toruloides* Y-27012. Από τα αποτελέσματα παρατηρήθηκε ότι η μεγαλύτερη παραγωγή λίπους ήταν μόλις 1,2 g/L στις 121 h, σημειώνοντας χαμηλή απόδοση της τάξης του 0,02 g/g και λιποπεριεκτικότητα 5,4%. Το FAN καταναλώθηκε πολύ αργότερα (47 h) σε σχέση με την αντίστοιχη ζύμωση σε ακατέργαστη ζάχαρη και η συγκέντρωση της βιομάζας έφθασε τα 29,3 g/L στις 143 h. Η τιμή της βιομάζας ήταν αυξημένη σε σχέση με την αντίστοιχη ζύμωση σε ακατέργαστη ζάχαρη και υποστηρίζεται από το γεγονός ότι η μελάσα περιέχει άζωτο.

Τα αποτελέσματα από την αντίστοιχη ζύμωση του στελέχους *R. kratochvilovae* Y-43 (Διάγραμμα 4) έδειξαν ότι και σε αυτήν την περίπτωση δεν ευνοήθηκε η παραγωγή λίπους. Συγκεκριμένα, η μέγιστη συγκέντρωση λίπους ήταν 1,1 g/L, με παραγωγή βιομάζας 33,4 g/L και λιποπεριεκτικότητα μόλις 3,3 %. Η παραγωγικότητα όπως και η απόδοση της ζύμωσης ήταν ιδιαίτερος χαμηλές (0,01 g/L/h και 0,02 g/g, αντίστοιχα). Γενικά, συμπεραίνεται ότι και για τα δύο στελέχη που μελετήθηκαν η συγκεκριμένη σύσταση του θρεπτικού μέσου δεν ευνόησε την λιποσυσσώρευση.



Διάγραμμα 3 Κινητική παραγωγής μικροβιακού λίπους κατά την καλλιέργεια του στελέχους *R.toruloides* Y-27012 σε υπόστρωμα μελάσας με προσθήκη μίγματος φωσφορικών αλάτων και ιχνοστοιχείων (ο) Σάκχαρα (σακχαρόζη, γλυκόζη και φρουκτόζη) (g/L), (x) Άζωτο ελεύθερων αμινομάδων FAN (mg/L), (□) Ανόργανος Φώσφορος IP (g/L), (▲) Βιομάζα (g/L), (●) Λίπος (g/L).

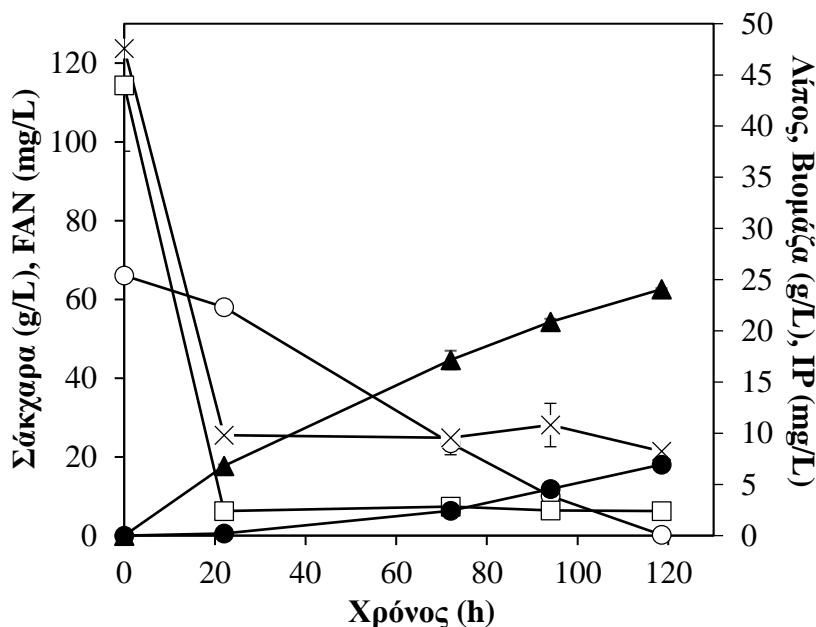


Διάγραμμα 4 Κινητική παραγωγής μικροβιακού λίπους κατά την καλλιέργεια του στελέχους *R.kratochvilovae* Y-43 σε υπόστρωμα μελάσας με προσθήκη μίγματος φωσφορικών αλάτων και ιχνοστοιχείων. (ο) Σάκχαρα (σακχαρόζη, γλυκόζη και φρουκτόζη) (g/L), (x) Άζωτο ελεύθερων αμινομάδων FAN (mg/L), (□) Ανόργανος Φώσφορος IP (g/L), (▲) Βιομάζα (g/L), (●) Λίπος (g/L).

3.2.2 Επίδραση της απουσίας μίγματος φωσφορικών αλάτων και ιχνοστοιχείων από το θρεπτικό μέσο

Λαμβάνοντας υπόψη τα προηγούμενα αποτελέσματα, σε αυτό το στάδιο της πειραματικής μελέτης πραγματοποιήθηκαν ζυμώσεις σε υπόστρωμα μελάσας με τα στελέχη *R. toruloides* Y-27012 και *R. kratochvilovae* Y-43, χωρίς όμως την προσθήκη μίγματος φωσφορικών αλάτων και ιχνοστοιχείων. Το θρεπτικό μέσο της ζύμωσης περιείχε μελάσα με αρχική συγκέντρωση σακχάρων περίπου 70 g/L, εκχύλισμα ζύμης 0,5 g/L και $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,5 g/L ως πηγές αζώτου με λόγο C/FAN περίπου 55-60.

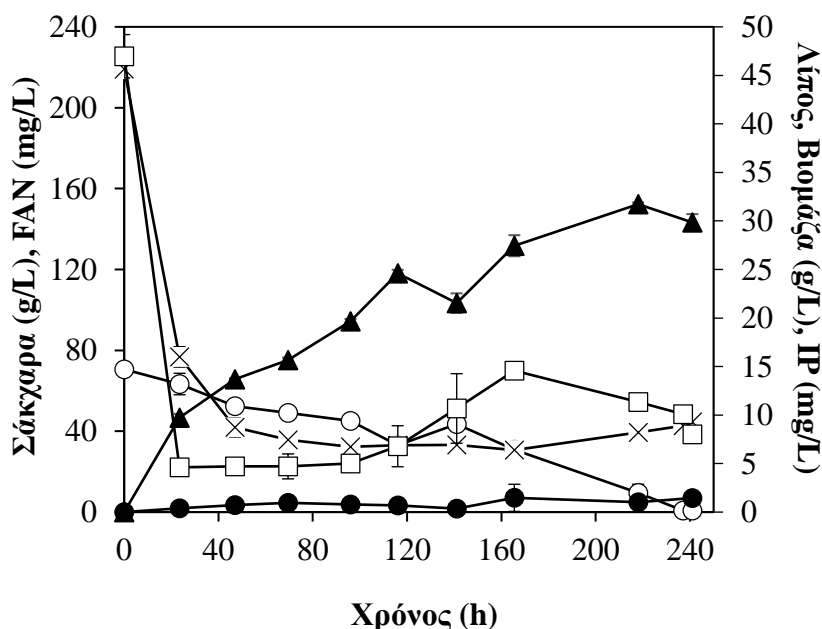
Στο Διάγραμμα 5, παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της ζύμωσης για το στέλεχος *R. toruloides* Y-27012 και παρατηρείται ότι η απουσία του μίγματος των φωσφορικών αλάτων και των ιχνοστοιχείων επέδρασε θετικά στην παραγωγή λίπους σε σύγκριση με τις αντίστοιχες ζυμώσεις που έγιναν στο προηγούμενο κεφάλαιο. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε ότι η παραγωγή λίπους ήταν 6.9 g/L στις 119 h, σημειώνοντας απόδοση και λιποπεριεκτικότητα της τάξης του 0,10 g/g και 28,8%, αντίστοιχα. Η τιμή της βιομάζας έλαβε την μέγιστη τιμή της, 24,1 g/L, στις 119 h.



Διάγραμμα 5 Κινητική παραγωγής μικροβιακού λίπους κατά την καλλιέργεια του στελέχους *R. toruloides* Y-27012 σε υπόστρωμα μελάσας χωρίς προσθήκη μίγματος φωσφορικών αλάτων και ιχνοστοιχείων. (○) Σάκχαρα (σακχαρόζη, γλυκόζη και φρουκτόζη) (g/L), (x) Αζωτο ελεύθερων αμινομάδων FAN (mg/L), (□) Ανόργανος Φώσφορος IP (g/L), (▲) Βιομάζα (g/L), (●) Λίπος (g/L).

Τα αποτελέσματα της ζύμωσης για το στέλεχος *R. kratochvilovae* Y-43 παρουσιάζονται στο Διάγραμμα 6. Η παραγωγή λίπους σημείωσε ανοδική τάση μέχρι τις 165,5 h, όπου και έφθασε το μέγιστό της (1,5 g/L). Στην αντίστοιχη ώρα η βιομάζα ήταν 27,4 g/L, με λιποπεριεκτικότητα 5,3%. Η απόδοση ήταν 0,04 g/g.

Συμπερασματικά, η αφαίρεση του μίγματος φωσφορικών αλάτων και ιχνοστοιχείων από το θρεπτικό μέσο της ζύμωσης ευνόησε σημαντικά την παραγωγή μικροβιακού λίπους για το στέλεχος *R. toruloides* Y-27012. Μικρή βελτίωση παρατηρήθηκε και τον μεταβολισμό του *R. kratochvilovae* Y-43 προς τη λιποσυσσώρευση, σε σχέση με τις αντίστοιχες ζυμώσεις που έγιναν με την παρουσία του εν λόγω μίγματος.



Διάγραμμα 6 Κινητική παραγωγής μικροβιακού λίπους κατά την καλλιέργεια του στελέχους *R. kratochvilovae* Y-43 σε υπόστρωμα μελάσας χωρίς προσθήκη μίγματος φωσφορικών αλάτων και ιχνοστοιχείων. (○) Σάκχαρα (σακχαρόζη, γλυκόζη και φρουκτόζη) (g/L), (x) Άζωτο ελεύθερων αμινομάδων FAN (mg/L), (□) Ανόργανος Φώσφορος IP (g/L), (▲) Βιομάζα (g/L), (●) Λίπος (g/L).

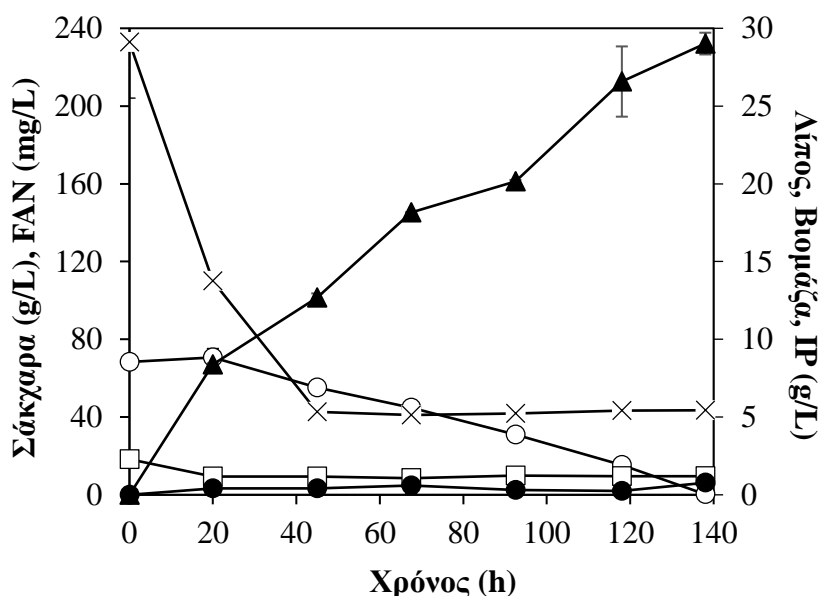
3.2.3 Επίδραση της προσθήκης φωσφορικών αλάτων στο θρεπτικό μέσο

Στο πλαίσιο βελτιστοποίησης της σύστασης του θρεπτικού μέσου ζύμωσης με υπόστρωμα την μελάσα και λαμβάνοντας υπόψη τα προηγούμενα αποτελέσματα, μελετήθηκε η επίδραση της προσθήκης μόνο του μίγματος των φωσφορικών αλάτων, στην παραγωγή λίπους των ζυμών *R. toruloides* και *R. kratochvilovae*. Συγκεκριμένα, το θρεπτικό μέσο αποτελούνταν από μελάσα

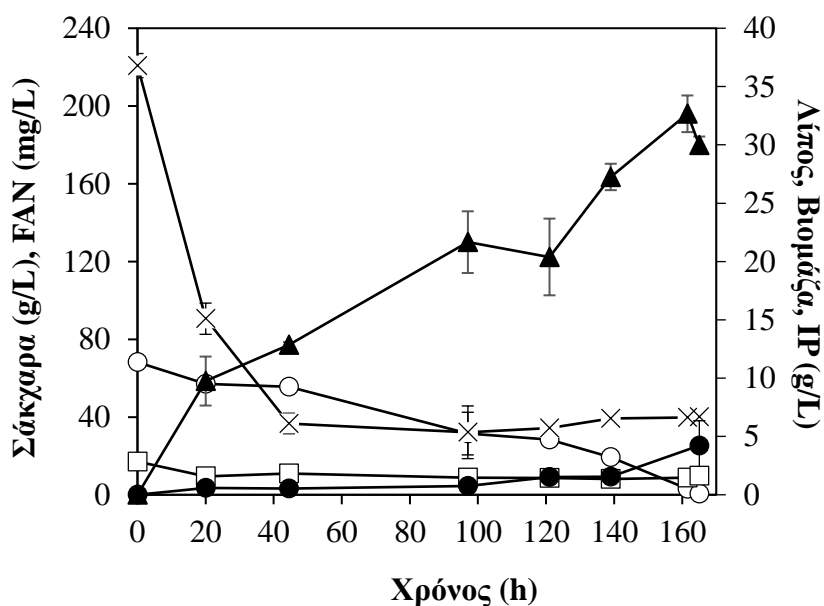
με αρχική συγκέντρωση σακχάρων περίπου 70 g/L, εκχύλισμα ζύμης 0,5 g/L και $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,5 g/L ως πηγές αζώτου, KH_2PO_4 7 g/L και Na_2HPO_4 2,5 g/L ως φωσφορικά άλατα, ενώ δεν προστέθηκε το μίγμα των ιχνοστοιχείων. Ο λόγος C/FAN ήταν περίπου 55.

Στο Διάγραμμα 7, που ακολουθεί παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της ζύμωσης για το στελέχος *R. toruloides* Y-27012 και παρατηρείται ότι η προσθήκη μόνο των φωσφορικών αλάτων δε επέδρασε θετικά στην παραγωγή λίπους, συσγκρινόμενη με τις προηγούμενες ζυμώσεις. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε ότι η μεγαλύτερη παραγωγή λίπους ήταν μόλις 0,8 g/L στις 138h, σημειώνοντας αρκετά χαμηλή απόδοση και λιποπεριεκτικότητα (0,01 g/g και 2,7%, αντίστοιχα). Η παραγωγή της βιομάζας ήταν 29 g/L στις 138 h, τιμή μεγαλύτερη από την αντίστοιχες ζυμώσεις που παρουσιάστηκαν πιο πάνω.

Αντίθετα κατά την καλλιέργεια του στελέχους *R. kratochvilovae* Y-43, υπό τις ίδιες συνθήκες, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η προσθήκη του μίγματος των φωσφορικών αλάτων ευνόησε την παραγωγή λίπους, σημειώνοντας την μεγαλύτερη παραγωγή λίπους (4,2 g/L) που έχει παρατηρηθεί έως τώρα στην παρούσα μελέτη σε υπόστρωμα μελάσας (Διάγραμμα 8). Η λιποπεριεκτικότητα ήταν 11,1 %. Η παραγωγικότητα ήταν 0,03 g/L/h και η απόδοση 0,06 g/g.



Διάγραμμα 7 Κινητική παραγωγής μικροβιακού λίπους κατά την καλλιέργεια του στελέχους *R. toruloides* Y-27012 σε υπόστρωμα μελάσας με προσθήκη φωσφορικών αλάτων. (ο) Σάκχαρα (σακχαρόζη, γλυκόζη και φρουκτόζη) (g/L), (x) Αζωτο ελεύθερων αμινομαδων FAN (mg/L), (οικονομικά) Ανόργανος Φώσφορος IP (g/L), (▲) Βιομάζα (g/L), (●) Λίπος (g/L).



Διάγραμμα 8 Κινητική παραγωγής μικροβιακού λίπους κατά την καλλιέργεια του στελέχους *R.kratochvilovae* Y-43 σε υπόστρωμα μελάσας με προσθήκη πηγής αζώτου και φωσφορικών αλάτων. (ο) Σάκχαρα (σακχαρόζη, γλυκόζη και φρουκτόζη) (g/L), (x) Άζωτο ελεύθερων αμινομάδων FAN (mg/L), (□) Ανόργανος Φώσφορος IP (g/L), (▲) Βιομάζα (g/L), (●) Λίπος (g/L).

Γενικά, διαπιστώνεται ότι η προσθήκη του μίγματος φωσφορικών αλάτων στο θρεπτικό μέσο της ζύμωσης βελτίωσε την παραγωγή μικροβιακού λίπους στην περίπτωση του *R. kratochvilovae* Y-43, δεν ευνόησε όμως τον μεταβολισμό προς λιποσυσσώρευση του στελέχους *R. toruloides* Y-27012.

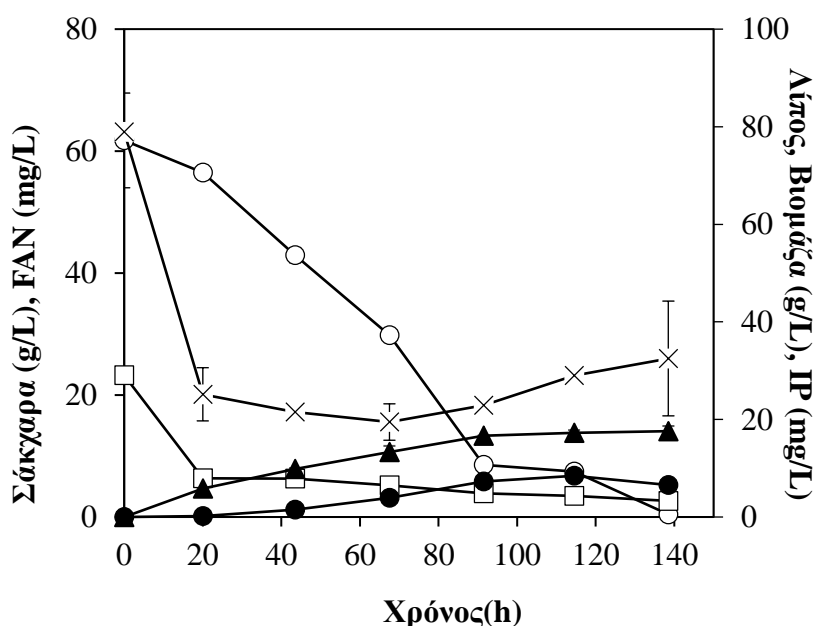
3.2.4 Επίδραση της απουσίας των εμπορικών πηγών αζώτου

Δεδομένου ότι η μελάσα είναι πηγή αζώτου, όπως φαίνεται και στην αναλυτική της σύσταση στο κεφ. 2.3, πραγματοποιήθηκε μελέτη της παραγωγής μικροβιακού λίπους σε υπόστρωμα μελάσας χωρίς όμως την παρουσία πρόσθετων εμπορικών πηγών αζώτου (εκχύλισμα ζύμης και $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$). Επίσης, αξιολογώντας τα αποτελέσματα όλων των ζυμώσεων έως εδώ και για τα δύο στελέχη καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι για τον *R. toruloides* Y-27012 μεγαλύτερα ποσοστά λίπους παρατηρούνται όταν δεν υπάρχει πηγή φωσφορικών αλάτων και ιχνοστοιχείων στο μέσο της καλλιέργειας. Αντίστοιχα για τον μικροοργανισμό *R. kratochvilovae* Y-43 παρατηρήθηκε ότι η ύπαρξη πηγής φωσφορικών αλάτων ευνοεί την παραγωγή λίπους.

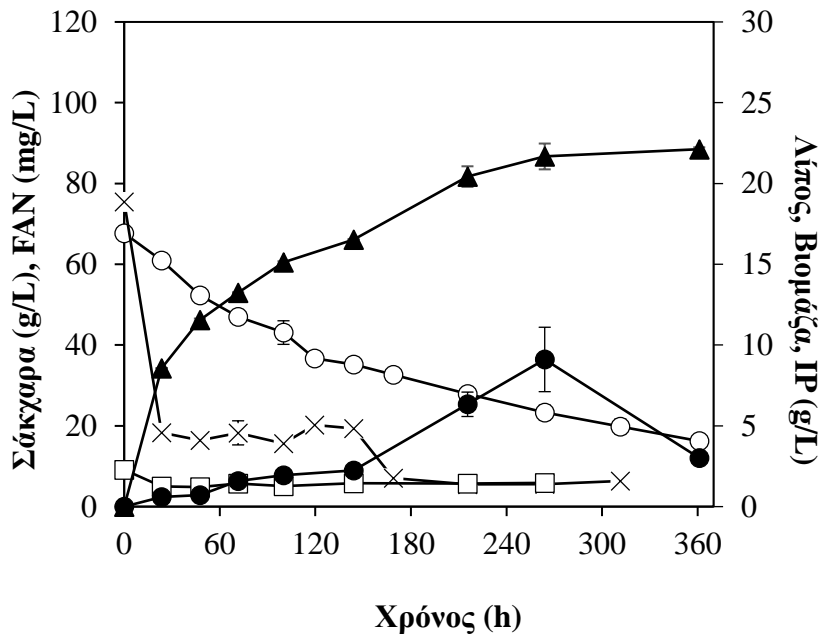
Έτσι, η επίδραση της απουσίας πρόσθετων πηγών αζώτου μελετήθηκε για το στελέχος *R. toruloides* Y-27012 σε θρεπτικό μέσο που περιείχε μόνο μελάσα με αρχική συγκέντρωση σακχάρων περίπου 70 g/L, ενώ στην περίπτωση του στελέχους *R. kratochvilovae* Y-43 σε θρεπτικό μέσο που περιλάμβανε μελάσα (70 g/L σάκχαρα) και το μίγμα φωσφορικών αλάτων.

Τα αποτελέσματα της ζύμωσης για το στελέχος *R. toruloides* Y-27012 έδειξαν ότι αφαίρεση πρόσθετων πηγών αζώτου ευνόησε την παραγωγή του λίπους, καθώς η συγκέντρωση έφθασε στα 8,4 g/L στις 114,5 h, σημειώνοντας υψηλή λιποπεριεκτικότητα της τάξεως των 49,1% (Διάγραμμα 9). Η βιομάζα ήταν 17,2 g/L στις 114,5 h. Η παραγωγικότητα ήταν 0,08 g/L/h και η απόδοση 0,15 g/g.

Στην περίπτωση του στελέχους *R. kratochvilovae* Y-43 η μεγαλύτερη παραγωγή λίπους ήταν 9,1 g/L και παρατηρήθηκε στις 264 h, χρονική στιγμή κατά την οποία η βιομάζα ήταν 21,7 g/L. Διαπιστώθηκε, επίσης, ότι η απόδοση και η λιποπεριεκτικότητα ήταν υψηλή δηλ. 0,18 g/g και 41,9%, αντίστοιχα. (Διάγραμμα 10).



Διάγραμμα 9 Κινητική παραγωγής μικροβιακού λίπους κατά την καλλιέργεια του στελέχους *R. toruloides* Y-27012 σε υπόστρωμα μελάσας χωρίς καμία προσθήκη αλάτων, ιχνοστοιχείων και πηγών αζώτου. (ο) Σάκχαρα (σακχαρόζη, γλυκόζη και φρουκτόζη) (g/L), (x) Άζωτο ελεύθερων αμινομάδων FAN (mg/L), (□) Ανόργανος Φώσφορος IP (g/L), (▲) Βιομάζα (g/L), (●) Λίπος (g/L).



Διάγραμμα 10 Κινητική παραγωγής μικροβιακού λίπους κατά την καλλιέργεια του στελέχους *R. kratochvilovae* Y-43 σε υπόστρωμα μελάσας με προσθήκη φωσφορικών αλάτων και χωρίς προσθήκη πηγών αζώτου. (ο) Σάκχαρα (σακχαρόζη, γλυκόζη και φρουκτόζη) (g/L), (x) Άζωτο ελεύθερων αμινομάδων FAN (mg/L), (□) Ανόργανος Φώσφορος IP (g/L), (▲) Βιομάζα (g/L), (●) Λίπος (g/L).

Το γενικό συμπέρασμα είναι ότι η μελάσα είναι πλούσιο θρεπτικό υπόστρωμα και μπορεί να αποτελέσει πηγή άνθρακα και αζώτου ταυτόχρονα για τις μικροβιακές ζυμώσεις. Η παρούσα μελέτη έδειξε ότι τα στελέχη *R. toruloides* Y-27012 και *R. kratochvilovae* Y-43 δύναται να παράξουν μικροβιακό λίπος χρησιμοποιώντας την μελάσα ως μοναδική πηγή άνθρακα και αζώτου επιτυγχάνοντας υψηλά ποσοστά λιποσυσσώρευσης.

3.2.5 Επίδραση των φαινολικών συστατικών της μελάσας

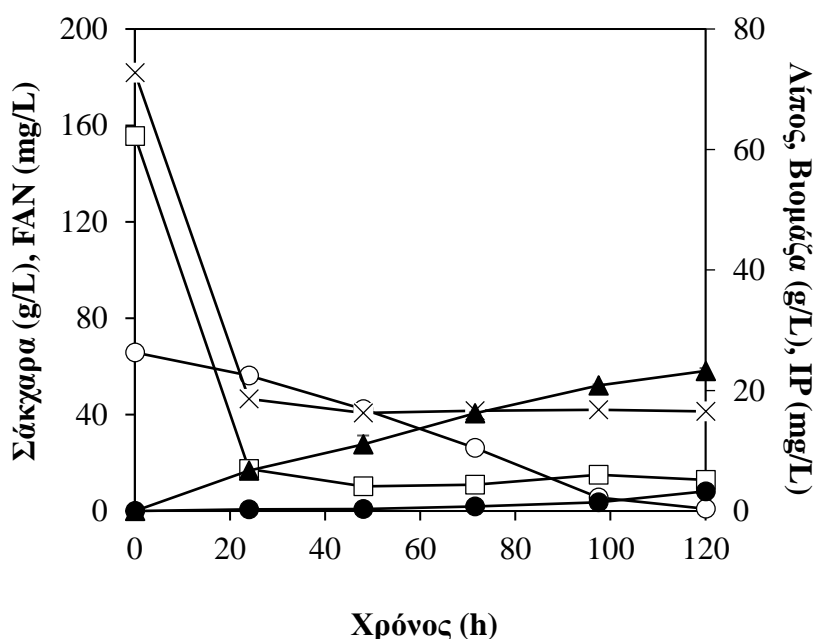
Τα φαινολικά συστατικά που εμπεριέχονται στη μελάσα θα μπορούσαν να δρουν παρεμποδιστικά ως προς την παραγωγή του μικροβιακού λίπους, γι' αυτό και πραγματοποιήθηκε απομόνωση των φαινολικών συστατικών της μελάσας και χρησιμοποίηση της μελάσας άνευ φαινολικών ουσιών ως υπόστρωμα ζύμωσης.

Για την πραγματοποίηση των ζυμώσεων χρησιμοποιήθηκε η καλύτερη σύσταση θρεπτικού μέσου για το κάθε στέλεχος αντικαθιστώντας την μελάσα με μελάσα απαλλαγμένη από φαινολικά συστατικά. Έτσι, για τη ζύμη *R. toruloides* Y-27012 χρησιμοποιήθηκε μελάσα άνευ φαινολικών συστατικών με αρχική συγκέντρωση σακχάρων περίπου 70 g/L χωρίς την

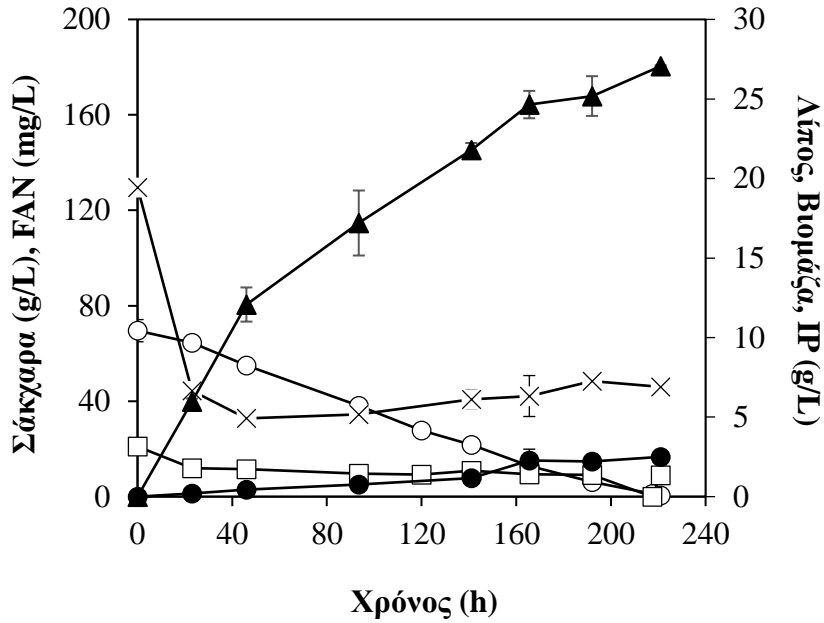
προσθήκη αλάτων, ιχνοστοιχείων και πρόσθετων πηγών αζώτου. Για τη ζύμη *R. kratochvilovae* Y-43 χρησιμοποιήθηκε μελάσα άνευ φαινολικών συστατικών (70 g/L συγκέντρωση σακχάρων) και προσθήκη φωσφορικών αλάτων. Ο λόγος C/FAN ήταν περίπου 80-110.

Στην περίπτωση του στελέχους *R. toruloides* Y-27012 η παραγωγή λίπους που επιτεύχθηκε ήταν 3,3 g/L στις 120 h, με χαμηλή λιποπεριεκτικότητα της τάξεως του 14% και χαμηλή απόδοση λίπους ανά καταναλωθέν υπόστρωμα (0,05 g/g) (Διάγραμμα 11). Αξιοσημείωτο είναι δε το γεγονός ότι η συσσώρευση ενδοκυτταρικού λίπους παρουσιάζει αυξανόμενη τάση έως το τέλος της ζύμωσης. Παρόμοια χαμηλή συγκέντρωση μικροβιακού λίπους παρατηρήθηκε και στην περίπτωση της ζύμης *R. kratochvilovae* Y-43 (Διάγραμμα 12). Η μεγαλύτερη παραγωγή λίπους ήταν 2,5 g/L στις 221 h. Η λιποπεριεκτικότητα ήταν 9,2% και η απόδοση λίπους ανά καταναλωθέν υπόστρωμα ήταν 0,04 g/g.

Συμπερασματικά, η απομάκρυνση των φαινολικών συστατικών της μελάσας φαίνεται ότι δεν λειτούργησε θετικά στην παραγωγή λίπους σε κανένα από τα δύο στελέχη.



Διάγραμμα 11 Κινητική παραγωγής μικροβιακού λίπους κατά την καλλιέργεια του στελέχους *R. toruloides* Y-27012 σε υπόστρωμα μελάσας άνευ φαινολικών συστατικών, χωρίς καμία προσθήκη αλάτων, ιχνοστοιχείων και πηγών αζώτου. (o) Σάκχαρα (σακχαρόζη, γλυκόζη και φρουκτόζη) (g/L), (x) Άζωτο ελεύθερων αμινομάδων FAN (mg/L), (□) Ανόργανος Φώσφορος IP (g/L), (▲) Βιομάζα (g/L), (●) Λίπος (g/L).

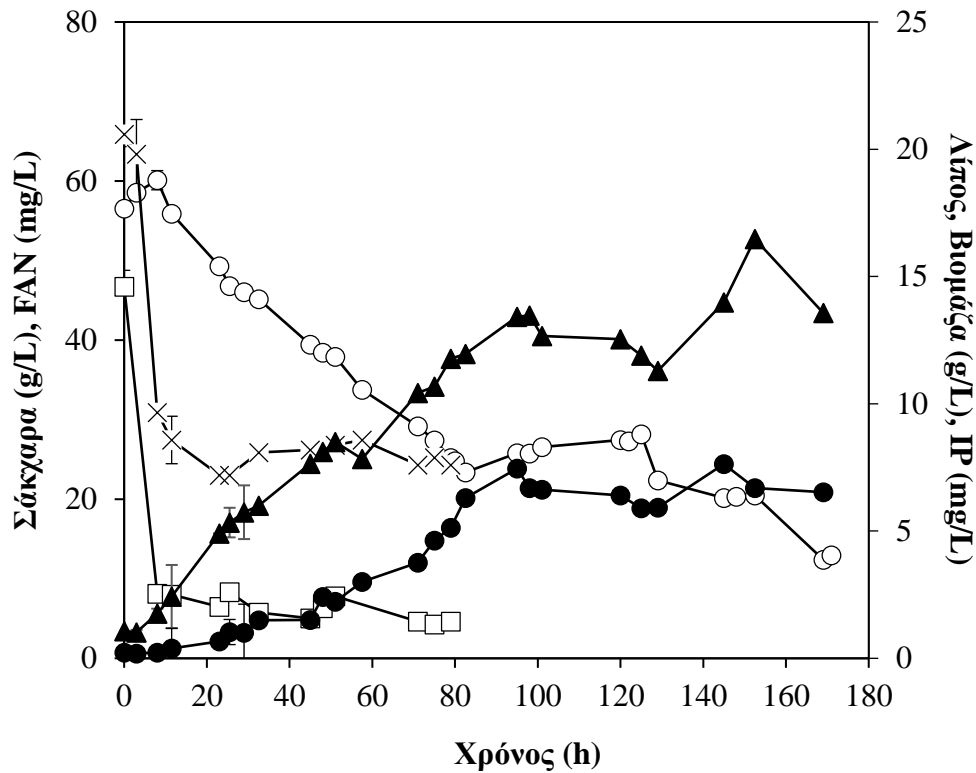


Διάγραμμα 12 Κινητική παραγωγής μικροβιακού λίπους κατά την καλλιέργεια του στελέχους *R.kratochvilovae* Y-43 σε υπόστρωμα μελάσας άνευ φαινολικών συστατικών, με προσθήκη φωσφορικών αλάτων. (ο) Σάκχαρα (σακχαρόζη, γλυκόζη και φρουκτόζη) (g/L), (x) Άζωτο ελεύθερων αμινομάδων FAN (mg/L), (□) Ανόργανος Φώσφορος IP (g/L), (▲) Βιομάζα (g/L), (●) Λίπος (g/L).

3.3 Παραγωγή μικροβιακού λίπους σε ημισυνεχείς ζυμώσεις σε βιοαντιδραστήρα με μελάσα ως υπόστρωμα

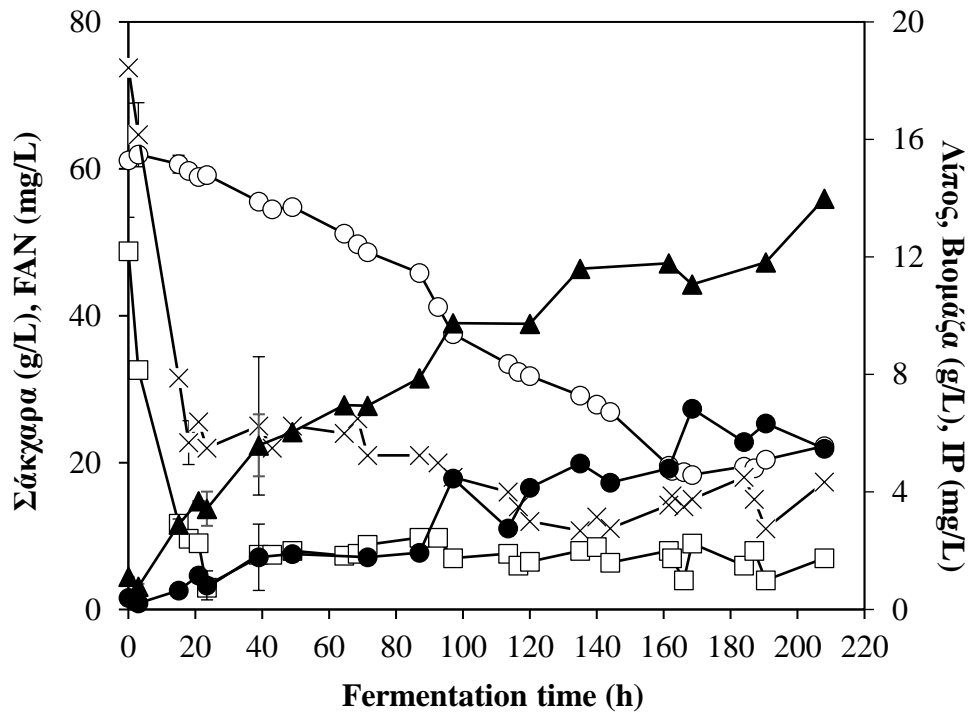
Το στέλεχος *R. toruloides* Y-27012 επιλέχθηκε να μελετηθεί περαιτέρω σε ζυμώσεις ημισυνεχούς συστήματος σε βιοαντιδραστήρα, καθώς τα αποτελέσματα των ζυμώσεων που πραγματοποιήθηκαν σε κωνικές φιάλες έδειξαν ότι η ζύμη αυτή δύναται να παράγει λίπος σε υψηλές συγκεντρώσεις σε υπόστρωμα μελάσας χωρίς την προσθήκη αλάτων, ιχνοστοιχείων και πρόσθετων εμπορικών πηγών αζώτου στο θρεπτικό μέσο. Οι ημισυνεχείς καλλιέργειες πραγματοποιήθηκαν με σύστημα συνεχούς τροφοδοσίας πυκνού διαλύματος ακατέργαστης ζάχαρης ούτως ώστε η συγκέντρωση των συνολικών σακχάρων να διατηρείται περίπου στα 20 g/L.

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε ζύμωση του στελέχους *R. toruloides* Y-27012 σε μελάσα με αρχική συγκέντρωση σακχάρων περίπου 70 g/L (Διάγραμμα 13). Η ζύμωση αυτή διήρκησε συνολικά 169 h, ενώ η μέγιστη απόδοση επιτεύχθηκε στις 95 h και ήταν 0,17 g/g. Η μέγιστη παραγωγή λίπους στις 95 h ήταν 7,46 g/L με συγκέντρωση βιομάζας 13,42 g/L και λιποπεριεκτικότητα 56%.



Διάγραμμα 13 Ημισυνεχής καλλιέργεια της ζύμης *R. toruloides* Y-27012 σε υπόστρωμα μελάσας χωρίς καμία προσθήκη αλάτων, ιχνοστοιχείων και πηγών αζώτου. (○) Σάκχαρα (σακχαρόζη, γλυκόζη και φρουκτόζη) (g/L), (x) Άζωτο ελεύθερων αμινομάδων FAN (mg/L), (□) Ανόργανος Φώσφορος IP (g/L), (▲) Βιομάζα (g/L), (●) Λίπος (g/L).

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε ζύμωση σε βιοαντιδραστήρα χρησιμοποιώντας μελάσα άνευ φαινολικών συστατικών, παρόλο που τα πειράματα ασυνεχούς συστήματος έδειξαν ότι η απομάκρυνση των φαινολικών συστατικών δεν ευνόησε την συσσώρευση ενδοκυτταρικού λίπους. Η ζύμωση πραγματοποιήθηκε με μελάσα άνευ φαινολικών συστατικών με αρχική συγκέντρωση σακχάρων περίπου 70 g/L χωρίς καμία άλλη προσθήκη αλάτων, ιχνοστοιχείων και πρόσθετων πηγών αζώτου. Όπως φαίνεται στο Διάγραμμα 14, η ζύμωση διήρκησε περισσότερο από την αντίστοιχη ζύμωση σε υπόστρωμα μελάσας. Στις 168,5 h παρατηρήθηκε η μεγαλύτερη συγκέντρωση λίπους (6,83 g/L) με βιομάζα 11 g/L, και σημειώνοντας υψηλή λιποπεριεκτικότητα 61,7%.



Διάγραμμα 14 Ημισυνεχής καλλιέργεια της ζύμης *R. toruloides* Y-27012 σε υπόστρωμα μελάσας άνευ φαινολικών συστατικών χωρίς καμία προσθήκη αλάτων, ιχνοστοιχείων και πηγών αζώτου. (ο) Σάκχαρα (σακχαρόζη, γλυκόζη και φρουκτόζη) (g/L), (x) Άζωτο ελεύθερων αμινομάδων FAN (mg/L), (□) Ανόργανος Φώσφορος IP (g/L), (▲) Βιομάζα (g/L), (●) Λίπος (g/L).

3.4 Μελέτη της σύστασης λιπαρών οξέων των μικροβιακών λιπιδίων

Τα ολικά λιπίδια και των δύο υπό μελέτη ζυμών περιείχαν λιπαρά οξέα με 10 έως 22 άτομα άνθρακα, τα κυριότερα από τα οποία ήταν τα κορεσμένα παλμιτικό οξύ (C16:0) και στεατικό οξύ (C18:0), το μονοακόρεστο ελαϊκό οξύ (C18:1) και τα πολυακόρεστα λινελαϊκό οξύ (C18:2) και α-λινολενικό οξύ (C18:3) (Πίνακας 5). Επίσης, σε χαμηλότερα ποσοστά βρέθηκαν τα οξέα λαυρικό, μυριστικό, μυριστελαϊκό και παλμιτελαϊκό.

Το μικροβιακό λίπος που παρήχθη και από τα δύο στελέχη ζυμών χαρακτηρίζεται ως ακόρεστο, καθώς το ελαϊκό και το λινελαϊκό οξύ παρουσίασαν άθροισμα άνω του 50% της τελικής σύστασης των λιπαρών οξέων, τόσο στις κωνικές φιάλες όσο και στο βιοαντιδραστήρα. Η παραγωγή του παλμιτικού οξέος κυμάνθηκε από 18.5% έως 32.5% καθ' όλη τη διάρκεια της ζύμωσης. Το ελαϊκό οξύ ήταν το κύριο λιπαρό οξύ σε όλες τις περιπτώσεις. Είναι αξιοσημείωτο το γεγονός ότι η προσθήκη αλάτων και ιχνοστοιχείων επηρέασαν την σύσταση των λιπαρών οξέων. Αναλυτικότερα, το ποσοστό του ελαϊκού οξέος στο τέλος της ζύμωσης κυμάνθηκε από 45% έως 61% στην περίπτωση του *R. toruloides* Y-27012. Αντίστοιχα αποτελέσματα παρατηρούνται και στις ζυμώσεις του *R. kratochvilovae* Y-43 όπου το ελαϊκό οξύ έφθασε περίπου στο 64% όταν χρησιμοποιήθηκε μελάσα ως υπόστρωμα με προσθήκη φωσφορικών αλάτων.

Πίνακας 5 Σύσταση λιπαρών οξέων μικροβιακού λίπους παραγόμενων από τις ζύμες *R. toruloides* Y-27012 και *R. kratochvilovae* Y-43 σε υποστρώμα ακατέργαστης ζάχαρης και μελάσας.

Στέλεχος	Συνθήκες Ζύμωσης	Υπόστρωμα	Χρόνος (h)	C16:0	C18:0	C18:1	C18:2	^{Δ9,12,15} C18:3	Άλλα
<i>R. toruloides</i> Y-27012	Shake flask	Ακατέργαστη ζάχαρη (με φωσφ. άλατα & ιχνοστοιχεία)	43.5	31.43	6.66	52.94	3.71	0.29	4.97
			93.5	29.86	7.11	54.10	4.91	0.63	3.39
	Shake flask	Μελάσα (με φωσφ. άλατα & ιχνοστοιχεία)	96	29.10	18.13	42.12	5.03	0.47	5.15
			121	27.47	18.52	45.34	3.96	0.36	4.35
	Shake flask	Μελάσα (χωρίς φωσφ. άλατα & ιχνοστοιχεία)	72	30.48	11.45	53.69	2.39	-	1.99
			118.5	15.57	9.88	68.13	3.32	-	3.17
	Shake flask	Μελάσα (με φωσφ. άλατα)	92.5	28.83	15.16	37.71	8.36	0.52	9.42
			138	26.31	14.88	48.50	4.45	0.33	5.53
	Shake flask	Μελάσα (χωρίς φωσφ. άλατα, ιχνοστοιχεία & άζωτο)	43.5	28.22	7.20	54.54	6.91	1.06	2.07
			91.5	29.38	6.77	56.38	4.99	0.85	1.63
			114.5	29.25	6.85	55.68	5.51	1.01	1.70
	Shake flask	Μελάσα άνευ φαινολικών (χωρίς φωσφ. άλατα, ιχνοστοιχεία & άζωτο)	48	30.81	10.65	52.05	3.16	-	3.33
			97.5	30.13	9.11	56.07	1.76	-	2.93
			120	30.35	7.73	56.85	2.16	-	2.91
	Fed batch - bioreactor	Μελάσα (χωρίς φωσφ. άλατα, ιχνοστοιχεία & άζωτο)	29	27.26	6.82	55.40	8.60	-	1.92
			75	29.08	5.06	58.26	5.13	-	2.47
			95	29.22	4.49	59.17	4.52	0.32	2.28
	Fed batch - bioreactor	Μελάσα άνευ φαινολικών (χωρίς φωσφ. άλατα, ιχνοστοιχεία & άζωτο)	49	21.38	22.90	51.93	2.55	-	1.24
			135	21.20	26.27	49.97	0.95	-	1.61
			231	23.60	10.81	61.03	2.60	0.10	1.86
<i>R. kratochvilovae</i> Y-43	Shake flask	Ακατέργαστη ζάχαρη (με φωσφ. άλατα & ιχνοστοιχεία)	41.5	26.41	4.44	51.27	8.36	0.17	9.35
			90	32.53	4.08	47.07	6.85	0.14	9.33
			185	28.73	4.88	47.30	8.89	0.22	9.98
	Shake flask	Μελάσα (με φωσφ. άλατα & ιχνοστοιχεία)	47.5	19.63	5.04	51.71	13.48	1.84	8.30
			119	23.78	5.53	51.71	10.39	1.47	7.12
			167	24.85	4.35	53.64	9.93	1.18	6.05
			96	23.85	8.85	58.77	2.56	0.17	5.80

Shake flask	(χωρίς φωσφ. άλατα & ιχνοστοιχεία)	165.5	24.54	8.30	58.35	2.26	0.14	6.41
		241	27.00	5.50	56.96	4.51	0.22	5.81
Shake flask	Μελάσα (με φωσφ. άλατα)	44.5	21.61	5.13	42.01	21.74	1.77	7.74
		121	19.91	5.75	64.16	6.00	1.47	10.45
		165	20.94	4.53	63.43	6.61	1.18	3.31
Shake flask	Μελάσα (χωρίς ιχνοστοιχεία & άζωτο)	47.5	28.27	6.73	42.12	12.39	4.84	5.65
		100	31.68	7.72	39.64	9.55	5.80	5.61
		264	32.38	7.63	40.23	9.59	5.45	4.72
Shake flask	Μελάσα άνευ φαινολικών (χωρίς φωσφ. άλατα, ιχνοστοιχεία & άζωτο)	141	28.66	5.02	48.56	10.14	3.37	4.25
		221	28.97	3.64	49.77	10.20	3.37	4.05

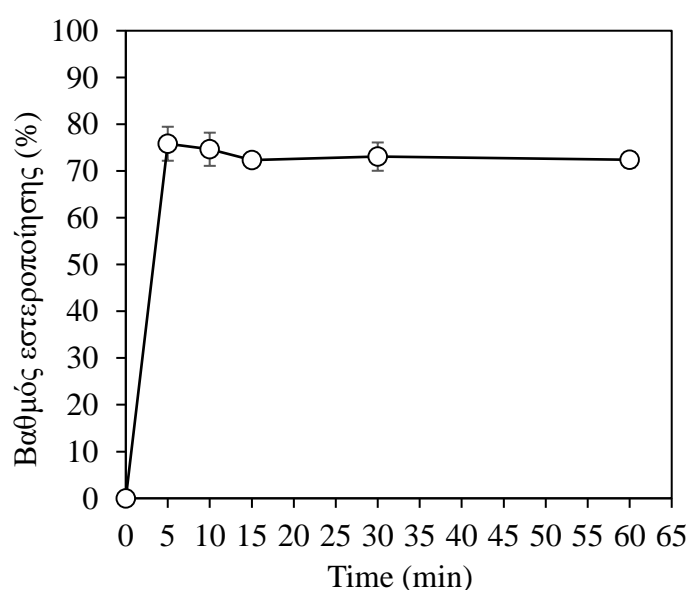
3.5 Αξιοποίηση μικροβιακού λίπους για παραγωγή χημικών υψηλής προστιθέμενης αξίας

Όπως αναλύθηκε και στην παράγραφο 1.4.4 το μικροβιακό λίπος δύναται να χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή χημικών υψηλής προστιθέμενης αξίας. Στο τελευταίο στάδιο της παρούσας μελέτης πραγματοποιήθηκαν πειράματα παραγωγής βιολιπαντικών ουσιών χρησιμοποιώντας ως πρώτη ύλη υδρολυμένο μικροβιακό λίπος (Εικόνα 12), μέσω μη-συμβατικής βιοκατάλυσης.



Εικόνα 12 Λιπαρά οξέα μετά από υδρόλυση του μονοκυτταρικού λίπους της ζύμης *R. toruloides* Y-27012

Κατόπιν της υδρόλυσης του λίπους, το μίγμα λιπαρών οξέων που ανακτήθηκε μετρήθηκε ως προς την οξύτητά του και βρέθηκε 98%. Τα αποτελέσματα της κινητικής της παραγωγής εστέρων με βιολιπαντικές ιδιότητες, μέσω ενζυμικής διεργασίας, παρουσιάζονται στο Διάγραμμα 15. Είναι αξιοσημείωτο ότι η ενζυμική εστεροποίηση των λιπαρών οξέων έφθασε σε plateau μόλις στα 5 min της αντίδρασης. Ο βαθμός εστεροποίησης που επιτεύχθηκε ήταν 75,8%.



Διάγραμμα 15 Κινητική παραγωγής βιολιπαντικών μέσω ενζυμικής διεργασίας, χρησιμοποιώντας ως πρώτη ύλη υδρολυμένο μικροβιακό λίπος του στελέχους *R. toruloides* Y-27012.

4. Συζήτηση

Τα τελευταία χρόνια, δίνεται μεγάλη προσοχή στην παραγωγή ανανεώσιμων καυσίμων λόγω της εξάντλησης των συμβατικών καυσίμων, καθώς και για περιβαλλοντικούς λόγους, παρά το γεγονός ότι άνω του 80% του κόστους των ανανεώσιμων καυσίμων συνδέεται με την παραγωγή των πρώτων υλών.

Τα μικροβιακά λίπη, γνωστά και ως μονοκυτταρικά λίπη (SCO), εδώ και αρκετό καιρό θεωρούνται ως εναλλακτική στις παραδοσιακές πηγές λίπους. Οι ελαιογόνες ζύμες συνήθως παρουσιάζουν μεγάλο ειδικό ρυθμό αύξησης, μπορούν να χρησιμοποιήσουν μια ποικιλία απόβλητων πηγών άνθρακα συμπεριλαμβανομένων των φθηνών αγρο-βιομηχανικών υπολειμμάτων, και μπορούν να φθάσουν το λιπιδιακό περιεχόμενο από 20 έως 80% (σε ξηρό βάρος) όταν αναπτύσσονται σε βιοαντιδραστήρα κάτω από συνθήκες ελεγχόμενης υπέρβασης σε άνθρακα και περιορισμό σε άζωτο (Vieira et al., 2014).

Η διεργασία παραγωγής μικροβιακού λίπους κοστίζει πολύ περισσότερο από την παραγωγή φυτικών και ζωικών λιπών, κυρίως λόγω του κόστους των πηγών άνθρακα που χρησιμοποιούνται. Εκτιμάται ότι το κόστος της γλυκόζης αποτελεί το 80% του συνολικού κόστους παραγωγής βιοκαυσίμων. Όσον αφορά στη μείωση του κόστους, έχουν μελετηθεί εκτενώς πολλά υλικά χαμηλού κόστους ως ανταγωνιστικές εναλλακτικές για την παραγωγή μονοκυτταρικού λίπους. Για να γίνει οικονομικά βιώσιμη η παραγωγή λίπους από ζύμη, ο πιο ελκυστικός τρόπος είναι να παραχθεί το επιθυμητό υψηλής προστιθέμενης αξίας λίπος ταυτόχρονα με τη μετατροπή των χαμηλής αξίας βιο-αποβλήτων και/ή υδατικών λυμμάτων (Qin et al., 2017).

Η μελάσα, η οποία αποτελεί παραπροϊόν της βιομηχανίας ζάχαρης μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως θρεπτικό μέσο για την παραγωγή μονοκυτταρικού λίπους (SCO). Πρόκειται για μία πηγή πλούσια σε σάκχαρα, σε ιχνοστοιχεία όπως, οξείδιο του φωσφόρου, οξείδιο του ασβεστίου, οξείδιο του μαγνησίου, οξείδιο του καλίου, διοξείδιο του πυριτίου, οξείδιο του αλουμινίου, διοξείδιο του σιδήρου, σε άζωτο κ.α. (Vieira et al., 2014).

Από τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης προκύπτει ότι οι ζύμες *Rhodosporidium toruloides* Y-27012 και *Rhodosporidium kratochvilovae* Y-43 αποτελούν πολλά υποσχόμενες ελαιογόνες ζύμες που δύναται να παράξουν μικροβιακό λίπος σε υψηλές συγκεντρώσεις και λιποπεριεκτικότητες. Αρχικά οι ζύμες μελετήθηκαν σε υπόστρωμα ακατέργαστης ζάχαρης και τα αποτελέσματα έδειξαν υψηλή παραγωγή μικροβιακού λίπους και λιποσυσσώρευσης.

Αντίθετα το υπόστρωμα μελάσας δεν ευνόησε στον ίδιο βαθμό την λιποσυσσώρευση. Το μικροβιακό λίπος αποτελεί προϊόν δευτερογενούς μεταβολισμού και η αυξημένη περιεκτικότητα της μελάσας σε αζώτου και ιχνοστοιχεία ευνόησαν την αύξηση της βιομάζας έναντι της λιποσυσσώρευσης. Για το λόγο αυτό πραγματοποιήθηκαν πειράματα που μελετούσαν την παρουσία ή απουσία μείγματος αλάτων, ιχνοστοιχείων και των εμπορικών πηγών αζώτου. Όσον αφορά στο στέλεχος *Rhodosporidium toruloides* Y-27012 η μέγιστη παραγωγή λίπους κατά την καλλιέργεια σε κωνικές φιάλες, παρατηρήθηκε σε υπόστρωμα μελάσας, χωρίς καμία περαιτέρω προσθήκη πηγής αζώτου, ιχνοστοιχείων ή φωσφορικών αλάτων. Συγκεκριμένα, η μέγιστη συγκέντρωση λίπους 8,4 g/L, παρουσιάστηκε στις 114,5 h με τη βιομάζα να φτάνει τα 17,2 g/L. Για την *Rhodosporidium kratochvilovae* Y-43 οι καλύτερες συνθήκες καλλιέργειας φάνηκαν να είναι η μελάσα με μοναδική προσθήκη αυτή των φωσφορικών αλάτων KH_2PO_4 και Na_2HPO_4 (υπο την απουσία ιχνοστοιχείων και πηγής αζώτου). Η μέγιστη παραγωγή λίπους σε αυτήν την περίπτωση ήταν 9,1 g/L και στις 264 h.

Η μελέτη της επίδρασης των φαινολικών συστατικών της μελάσας έδειξε αρχικά ότι η μελάσα άνευ φαινολικών συστατικών δεν βελτίωσε την παραγωγή λίπους σε σύγκριση με τις αντίστοιχες ζυμώσεις σε μελάσα χωρίς προηγούμενη επεξεργασία. Ωστόσο, όταν η ίδια ζύμωση πραγματοποιήθηκε σε βιοαντιδραστήρα για τον μικροοργανισμό *Rhodosporidium toruloides* Y-27012 τα αποτελέσματα παραγωγής λίπους ήταν συγκρίσιμα με την αντίστοιχη ζύμωση σε βιοαντιδραστήρα χρησιμοποιώντας μελάσα ως υπόστρωμα.

Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα των δύο ειδών *Rhodosporidium* sp. που μελετήσαμε εκτενώς, με αντίστοιχες ζυμώσεις της Βιβλιογραφίας (Πίνακες 6 και 7), διαπιστώνεται αρχικά ότι τα εν λόγω είδη δεν έχουν μελετηθεί εκτενώς σε υποστρώματα προερχόμενα από ανανεώσιμες πρώτες ύλες. Όσον αφορά στο στέλεχος *R. kratochvilovae* Y-43 φαίνεται ότι πρόκειται για μία νέα πολλά υποσχόμενη ελαιογόνα ζύμη για την οποία δεν υπάρχουν αναφορές στη διεθνή βιβλιογραφία.

Πίνακας 6 Βιβλιογραφική σύγκριση παραγωγής λίπους από τα είδη *R. toruloides* και *R. kratochvilovae*.

Ζύμη	Υπόστρωμα/Ζύμωση	Χρόνος (h)	Βιομάζα (g/L)	Λίπος (g/L)	Περιεκτικότητα σε λίπος (%)	Πηγή
<i>R. toruloides</i> <i>ACC1, DGA1</i> ¹	Γλυκόζη Κωνικές Φιάλες	-	-	16,4	61,1	Zhang et al. (2016b)
<i>R. toruloides</i> <i>ACC1, DGA1</i>	Ξυλόζη Κωνικές Φιάλες	-	-	9,5	43,4	Zhang et al. (2016b)
<i>R. toruloides</i> <i>ACC1, DGA1</i>	Γλυκόζη Βιοαντιδραστήρας	-	-	62,8	72,9	Zhang et al. (2016b)
<i>R. toruloides</i> <i>ACC1, DGA1, SCD1</i>	Γλυκόζη Βιοαντιδραστήρας	-	-	89,4	75,6	Zhang et al. (2016b)
<i>R. toruloides</i> DSM 4444	Βιοαντιδραστήρας Στερεά αμυλοπρωτεϊνούχα απόβλητα της βιομηχανίας παραγωγής προϊόντων ζαχαροπλαστικής Βιοαντιδραστήρας Στερεά αμυλοπρωτεϊνούχα απόβλητα της βιομηχανίας παραγωγής προϊόντων ζαχαροπλαστικής	-	49,0	28,2	57,5	Tsakona et al. (2015)
<i>R. toruloides</i> DSM 4444	Βιοαντιδραστήρας Στερεά αμυλοπρωτεϊνούχα απόβλητα της βιομηχανίας παραγωγής προϊόντων ζαχαροπλαστικής	-	61,2	37,8	61,8	Tsakona et al. (2015)
<i>R. toruloides</i>	Γλυκόζη Κωνικές Φιάλες	-	18,2	13,9	76,1	Li et al. (2006)
<i>R. toruloides</i> DSM 4444	Γλυκόζη Κωνικές Φιάλες	96	9,5	2,17	22,8	Κυριάκου Μ. (2016)
<i>R. toruloides</i> Y- 27012	Γλυκόζη Κωνικές Φιάλες	92	22,2	7,03	31,7	Κυριάκου Μ. (2016)
<i>R. kratochvilovae</i> Y-42	Γλυκόζη Κωνικές Φιάλες	112	16,3	1,40	8,8	Κυριάκου Μ. (2016)
<i>R. kratochvilovae</i> Y-43	Γλυκόζη Κωνικές Φιάλες	112	17,4	3,15	18,5	Κυριάκου Μ. (2016)
<i>R. kratochvilovae</i> HIMPA 1	Φρουκτόζη Κωνικές Φιάλες	-	13,22	7,5	56,73	Patel et al. (2015a)
<i>R. kratochvilovae</i> HIMPA 1	Σουκρόζη Κωνικές Φιάλες	-	13,38	7,72	57,69	Patel et al. (2015a)
<i>R. toruloides</i> Y- 27012	Μελάσα (χωρίς φωσφ. άλατα, ιχνοστοιχεία & άζωτο)	114,5	17,2	8,4	49,1	Παρούσα μελέτη
<i>R. kratochvilovae</i> Y-43	Μελάσα (χωρίς ιχνοστοιχεία & άζωτο)	264	21,7	9,1	41,9	Παρούσα μελέτη

Η σύσταση των λιπαρών οξέων του στελέχους *R. toruloides* Y-27012 τόσο σε υπόστρωμα ακατέργαστης ζάχαρης όσο και σε υπόστρωμα μελάσας ήταν παρόμοια με αυτή που παρουσιάζουν οι Li et al. (2007), οι Hu et al. (2009) και οι Wu et al. (2010, 2011) όπως φαίνεται και στον Πίνακα 10.

Η σύνθεση των λιπαρών οξέων μπορεί να παρουσιάσει διαφορές που εξαρτώνται από το στέλεχος, ενώ καλλιέργειες σε γλυκόζη ή γλυκερόλη έχουν δείξει διαφορές στη σύσταση των λιπαρών οξέων οι οποίες οφείλονται στη διαφορετική αρχική συγκέντρωση του υποστρώματος, στο ρυθμό αραίωσης (όσον αφορά τις συνεχείς ζυμώσεις) και στην προσθήκη φυσικών ενώσεων στο μέσο της καλλιέργειας (André et al., 2009).

Επίσης, οι συνθήκες ζύμωσης (θερμοκρασία, αερισμός) επιδρούν σημαντικά στην σύσταση των παραγόμενων μικροβιακών λιπιδίων και δύναται να αυξήσουν την περιεκτικότητά τους σε ελαϊκό οξύ. Μάλιστα, σύμφωνα με τους Suutari et al. (1993) το περιεχόμενο του ελαϊκού οξέος αυξήθηκε από το 52 στο 60% όταν η θερμοκρασία κατά τη φάση συσώρευσης μειώθηκε από τους 28 °C στους 15 °C και ταυτόχρονα, το παλμιτικό οξύ μειώθηκε από το 33% στο 26%. Η αλλαγή της θερμοκρασίας μετά τη φάση της συσώρευσης δεν επηρέασε ούτε τη σύνθεση ούτε την ποσότητα των παραγόμενων λιπιδίων.

Τα μικροβιακά έλαια στην παρούσα μελέτη περιέχουν κυρίως ελαϊκό και παλμιτικό οξύ, όπως στην περίπτωση του φοινικέλαιου. Μία ακόμη ομοιότητα μεταξύ του μικροβιακού λίπους και του φοινικέλαιου είναι ο μεγάλος βαθμός κορεσμού, ο οποίος είναι υψηλότερος στην περίπτωση του φοινικέλαιου σε σχέση με άλλα κύρια φυτικά έλαια που χρησιμοποιούνται πλέον για την παραγωγή βιοντήζελ. Το μικροβιακό λίπος παρουσιάζει μεγαλύτερο βαθμό ακορεστότητας (UD) από το φοινικέλαιο, το οποίο θεωρείται πλεονέκτημα στην περίπτωση της παραγωγής βιοντήζελ επειδή βελτιώνει την οικονομική βιωσιμότητα της διεργασίας της εστεροποίησης, μειώνει τη βέλτιστη θερμοκρασία αντίδρασης και αυξάνει τη μετατροπή των τριγλυκεριδίων (Leiva-Candia et al., 2015).

Οι Sargeant et al. (2014) ανέφεραν ότι με το χειρισμό των παραμέτρων της ζύμωσης κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας του *Rhodotorula glutinis* είναι δυνατό να παραχθεί ένα έλαιο πλούσιο σε μονοακόρεστα λιπαρά οξέα το οποίο θα έχει ιδιότητες παρόμοιες με αυτές της ελαιοκράμβης που έχει περιεκτικότητα σε παλμιτικό οξύ 55-65% ή ένα έλαιο πλούσιο σε κορεσμένα λιπαρά οξέα το οποίο θα έχει παρόμοιες ιδιότητες με το φοινικέλαιο που έχει περιεκτικότητα σε κορεσμένα λιπαρά οξέα 35-50%. Η πρώτη περίπτωση ελαίου επιτεύχθη σε

υψηλές συνθήκες θερμοκρασίας και σε υψηλές αναλογίες αζώτου, ενώ η τελευταία επιτεύχθη σε χαμηλές θερμοκρασίες και υψηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης. Οι Wu et al. (2010) επίσης παρατήρησαν ότι ο βαθμός ακορεστότητας στα λιπίδια που παράγονται από τον *C. curvatus* μειώθηκε με τη μείωση της θερμοκρασίας. Ο χειρισμός της σύνθεσης λιπαρών οξέων του μικροβιακού λίπους που παράγεται από ελαιογόνες ζύμες με απλή αλλαγή των παραμέτρων της ζύμωσης παρέχει την ευκαιρία να διαφοροποιηθεί η αγορά, αφού διαφορετικά μικροβιακά έλαια από την ίδια βιομηχανία θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν σε βιομηχανίες παραγωγής βιοντήζελ, τροφίμων και ελαιοχημικών.

Πίνακας 7 Σύσταση λιπαρών οξέων λίπους που έχει παραχθεί από τη ζύμη *R. toruloides* σε υπόστρωμα σακχάρων (ή παρόμοια μεταβολιζόμενα – όπως γλυκερόλη, μελάσα κπλ.) σε συνθήκες καλλιέργειας που ευνοούν τη συσσώρευση μικροβιακού λίπους. (Πηγή: Paranikolaou and Aggelis, 2011).

Στέλεχος	Λίπος (% w/w)	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3	Πηγή
<i>Rhodospiridium toruloides</i>	67.5	20	1	15	47	13	3	Li et al. (2007)
<i>Rhodospiridium toruloides</i>	65.2	34	T.	13	48	1	T.	Hu et al. (2009)
<i>Rhodospiridium toruloides</i>	62.1	26	2	5	62	3	T.	Wu et al. (2010)
<i>Rhodospiridium toruloides</i>	55.6	43	T.	16	35	2	T.	Wu et al. (2011)

Σήμερα, τα φυτικά έλαια αποτελούν τη σημαντικότερη πρώτη ύλη για την παραγωγή ελαιοχημικών. Ως συνέπεια της αυξανόμενης ζήτησης των ελαιοχημικών προϊόντων η παραγωγή φυτικών ελαίων αυξάνεται σταθερά (αύξηση 14% από το 2010-11 μέχρι 2013-14) και αναμένεται να αυξηθεί περαιτέρω. Η χρήση φυτικών ελαίων μπορεί να χωριστεί σε τρεις κατηγορίες: τρόφιμα, βιοντίζελ και ελαιοχημικά. Από τα 157 εκατομμύρια τόνους φυτικών ελαίων που καταναλώθηκαν το 2012-13, το 77% χρησιμοποιήθηκε για την παραγωγή τροφίμων, το 12% χρησιμοποιήθηκε για την παραγωγή βιοντίζελ και το υπόλοιπο 11% για την παραγωγή ελαιοχημικών προϊόντων (OECD, 2014; Oilseeds: World Markets and Trade, 2014). Η χρήση βρώσιμου φυτικού ελαίου για βιομηχανική παραγωγή ελαιοχημικών οδηγεί στο ερώτημα κατά πόσο πρέπει να καλλιεργηθεί γη για καύσιμα ή τρόφιμα. Το πρόβλημα αυτό θα συνεχίσει να υπάρχει, γι' αυτό δύο πιθανές λύσεις είναι η παραγωγή λιπιδίων σε φωτο-

αυτροφικά φύκη ή η μεταροπή φυτικής βιομάζας χρησιμοποιώντας μικροοργανισμούς (Pfleger et al., 2015).

Η παγκόσμια ετήσια παραγωγή λιπαντικών ανέρχεται σε περίπου 35 εκατ. τόνους (Lindemann et al., 2012), με τα βιολιπαντικά που παράγονται κυρίως από φυτικά έλαια να αποτελούν περίπου το 2% της συνολικής παραγωγής. Η χρήση φυτικών ελαίων πλούσιων σε κορεσμένα λιπαρά οξέα (π.χ. παλμιτικό οξύ) οδηγούν στην παραγωγή βιολιπαντικών με ανεπιθύμητες ιδιότητες (π.χ. υψηλό σημείο ροής) (Heikal et al., 2017), ενώ η χρήση πολυακόρεστων ελαίων (π.χ. λινελαϊκό οξύ) μειώνει την οξειδωτική σταθερότητά τους (Salih et al., 2011). Αυτό σημαίνει ότι τα μικροβιακά λιπίδια είναι κατάλληλα λόγω της υψηλής περιεκτικότητας σε ελαϊκό οξύ (>50%). Η παρούσα μελέτη έδειξε ότι οι ζύμες *Rhodosporidium toruloides* Y-27012 και *Rhodosporidium kratochvilovae* Y-43 δύνανται να παράξουν υψηλές συγκεντρώσεις μικροβιακού λίπους. Επίσης, η σύσταση του θρεπτικού μέσου είχε σημαντικό ρόλο στην σύσταση του λίπους, καθώς η προσθήκη ή η αφαίρεση αλάτων και ιχνοστοιχείων επηρέασε τα ποσοστά του ελαϊκού οξέος. Συγκεκριμένα για το στέλεχος *Rhodosporidium toruloides* η αφαίρεση αλάτων ευνόησε την παραγωγή ελαϊκού οξέος ενώ για το στέλεχος *Rhodosporidium kratochvilovae* η προσθήκη τους ήταν αυτή που οδήγησε στην αύξηση του παραγόμενου ελαϊκού οξέος.

Συμπερασματικά οι μικροοργανισμοί *Rhodosporidium toruloides* Y-27012 και *Rhodosporidium kratochvilovae* Y-43 αποτελούν ζύμες με υποσχόμενη προοπτική παραγωγής μικροβιακών λιπιδίων χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα τη μελάσα, ενώ περαιτέρω μελέτη θα μπορούσε να επικεντρωθεί στην βελτιστοποίηση των ζυμών σε βιοαντιδραστήρα για να επιτευχθεί μεγαλύτερη παραγωγή μικροβιακού λίπους. Είναι αξιοσημείωτο το γεγονός ότι τα εν λόγω είδη δεν έχουν μελετηθεί εκτενώς σε υποστρώματα προερχόμενα από ανανεώσιμες πρώτες ύλες και ειδικά όσον αφορά στο στέλεχος *R. kratochvilovae* Y-43 για το οποίο δεν υπάρχουν ανάλογες δημοσιεύσεις στη διεθνή βιβλιογραφία. Το μικροβιακό λίπος από το στέλεχος *Rhodosporidium toruloides* Y-27012 χρησιμοποιήθηκε επιτυχώς για την παραγωγή βιολιπαντικών ουσιών μέσω ενζυμικής αντίδρασης και μάλιστα ο βαθμός εστεροποίησης που επιτεύχθηκε ήταν 75,8%. Αξιοσημείωση θα ήταν περαιτέρω έρευνα όσον αφορά στη μελέτη των φυσικοχημικών ιδιοτήτων των παραγόμενων βιολιπαντικών ουσιών.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Τα αποτελέσματα των πειραμάτων, που αφορούν στην παραγωγή λίπους από τις ζύμες *Rhodospiridium toruloides* Y-27012 και *Rhodospiridium kratochvilovae* Y-43, μπορούν να συνοψισθούν στα ακόλουθα:

- ✓ Το υπόστρωμα της μελάσας δύναται να χρησιμοποιηθεί για υψηλή παραγωγή λίπους.
- ✓ Η καλλιέργεια του *Rhodospiridium kratochvilovae* Y-43 σε υπόστρωμα μελάσας με προσθήκη φωσφορικών αλάτων και χωρίς την παρουσία εμπορικών πηγών αζώτου έδωσε την μεγαλύτερη παραγωγή λίπους (9,1 g/L).
- ✓ Η καλλιέργεια του *Rhodospiridium toruloides* Y-27012 σε υπόστρωμα μελάσας χωρίς την προσθήκη φωσφορικών αλάτων, ιχνοστοιχείων και εμπορικών πηγών αζώτου έδωσε την μεγαλύτερη παραγωγή λίπους (8,4 g/L).
- ✓ Η καλλιέργεια του *Rhodospiridium toruloides* Y-27012 σε υπόστρωμα μελάσας σε βιοαντιδραστήρα χωρίς την προσθήκη φωσφορικών αλάτων, ιχνοστοιχείων και εμπορικών πηγών αζώτου έδωσε παραγωγή λίπους 7,46 g/L.
- ✓ Η καλλιέργεια του *Rhodospiridium toruloides* Y-27012 σε υπόστρωμα μελάσας άνευ φαινολικών σε βιοαντιδραστήρα χωρίς την προσθήκη φωσφορικών αλάτων, ιχνοστοιχείων και εμπορικών πηγών αζώτου έδωσε παραγωγή λίπους 6,83 g/L.
- ✓ Σημειώθηκε ικανοποιητική λιποσυσσώρευση (> 50%) και για τα δύο στελέχη ζυμών.
- ✓ Το μικροβιακό λίπος και των δύο στελεχών είχε παρόμοια σύσταση και χαρακτηρίστηκε ως ακόρεστο.
- ✓ Η σύσταση των μικροβιακών λιπιδίων έπηρεάστηκε από την σύσταση του θρεπτικού μέσου.
- ✓ Υψηλά ποσοστά ελαϊκού οξέος (> 60%) επιτεύχθηκαν όταν το θρεπτικό μέσο περιείχε μελάσα με προσθήκη φωσφορικών αλάτων και χωρίς την παρουσία εμπορικών πηγών αζώτου για τον *Rhodospiridium kratochvilovae* Y-43 και χωρίς την προσθήκη φωσφορικών αλάτων, ιχνοστοιχείων και εμπορικών πηγών αζώτου για τον *Rhodospiridium toruloides* Y-27012.

Τα αποτελέσματα των πειραμάτων, που αφορούν στην παραγωγή χημικών υψηλής προστιθέμενης αξίας από τη ζύμη *Rhodospiridium toruloides* Y-27012, μπορούν να συνοψισθούν στα ακόλουθα:

- ✓ Το μικροβιακό λίπος χρησιμοποιήθηκε επιτυχώς για την παραγωγή βιολιπαντικών ουσιών μέσω ενζυμικής αντίδρασης.
- ✓ Ο βαθμός εστεροποίησης που επιτεύχθηκε ήταν 75,8% σε μόλις 5 min.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Adrio J. (2017). Oleaginous yeasts: promising platforms for the production of oleochemicals and biofuels. *Biotechnology and Bioengineering* DOI 10.1002/bit.26337.
- Alexandri, M., Papapostolou, H., Vlysidis, A., Gardeli, C., Komaitis, M., Papanikolaou, S. and Koutinas, A. A. (2016). Extraction of phenolic compounds and succinic acid production from spent sulphite liquor. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 91: 2751–2760.
- Anastassiadis S., Rehm H. (2005). Citric acid production from glucose by yeast *Candida oleophila* ATCC 20177 under batch, continuous and repeated batch cultivation. *Electronic Journal of Biotechnology*, 9:26-39.
- Anonymous 2010, Global wax industry 2010: Market analysis and opportunities, Report Y635A, The Kline Group, www.klinegroup.com/reports/brochures/y635a/brochure.pdf.
- Beopoulos A., Nicaud J., Gaiilardin C. (2011). An overview of lipid metabolism in yeasts and its impact on biotechnological processes. *Microbiology and Biotechnology*, 90:1193-1206.
- Chatzifragkou A., Fakas S., Galiotou-Panagiotou M., Komaitis M., Aggelis G., Papanikolaou S. (2010). Commercial sugars as substrates for lipid accumulation by *Cunninghamella echinulate* and *Mortierella isabellina* fungi. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 112:1048-1057.
- Dahiya J., Singh D., Nigam P. (2001). Decolorization of molasses wastewater by cells of *Pseudomonas fluorescens* immobilized on porous cellulose carrier. *Bioresource Technology*, 78:111-114.
- da Silva, J. A. C., Habert, A. C., and Freire, D. M. G. (2012). A potential biodegradable lubricant from castor biodiesel esters. *Lubrication Science*, doi: 10.1002/lis.1205.
- Doan, C.D., To, C.M., De Vrieze, M., Lynen, F., Danthine, S., Brown, A., Dewettinck, K., Patel, AR. (2017). Chemical profiling of the major components in natural waxes to elucidate their role in liquid oil structuring. *Food Chemistry*, 214, 717-725.
- El-Enshasy H.A., Mohamed N.A., Farid M.A., El-Diwany A.I. (2008). Improvement of erythromycin production by *Saccharopolyspora erythraea* in molasses based medium through cultivation medium optimization. *Bioresource Technology*, 99:4263-4268.
- Fakas S., Certik M., Papanikolaou S., Aggelis G., Komaitis M., Galiotou-Panayotou M. (2007). Gamma-linolenic acid production by *Cunninghamella echinulata* growing on complex organic nitrogen sources. *Bioresource Technology*, 99(13):5986-90.
- Fiume, M.M., Heldreth, B.A., Bergfeld, W.F., Belsito, D.V., Hill, R.A., Klaassen, C.D., Liebler, D.C., Marks Jnr, J.G., Shank, R.C., Slaga, T.J., Snyder, P.W., Andersen, F.A. (2015). Safety

- Assessment of Alkyl Esters as used in Cosmetics. *International Journal of Toxicology*, 34, 55-695.
- Folch J., Lees M., Stanley G.H.S. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *The Journal of Biological Chemistry*, 226, 497-509.
- Gustavsson J., Cederberg C., Sonesson U., van Otterdijk R., Meybeck A. (2011). *Global Food Losses and Food Waste: Extent, Causes and Prevention*. Rome: Food and Agriculture Organisation of the United Nations.
- Heikal E.K., Elmelawy M.S., Khalil S.A., Elbasuny N.M. (2017). Manufacturing of environmental friendly biolubricants from vegetable oils. *Egyptian Journal of Petroleum*, 26: 53-59.
- Hu C., Zhao X., Zhao J., Wu S., Zhao B. (2009). Effects of biomass hydrolysis by-products on oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides*. *Bioresource Technology*, 100:4843-4847.
- Iven, T., Hornung, E., Heilmann, M., Feussner, I. (2016). Synthesis of oleyl oleate wax esters in *Arabidopsis thaliana* and *Camelina sativa* seed oil. *Plant Biotechnology Journal*, 14, 252-259.
- Kania, D., Yunus, R., Omar, R., Rashid, S. A., Jan, B. M. (2015). A review of biolubricants in drilling fluids: Recent research, performance, and applications. *Journal of Petroleum Science and Engineering*, 135, 177-184.
- Kitcha S., Cheirsilp B. (2011). Screening of Oleaginous Yeasts and Optimization for Lipid Production Using Crude Glycerol as a Carbon Source. *Energy Procedia*.
- L.A. Sargeant, C.J. Chuck, J. Donnelly, C.D. Bannister, R.J. Scott (2014). Optimizing the lipid profile, to produce either a palm oil or biodiesel substitute, by manipulation of the culture conditions for *Rhodotorula glutinis*. *Biofuels*, 5 pp. 33-43.
- Leiva-Candia, D.E., Tsakona, S., Kopsahelis, N., García, I.L., Papanikolaou, S., Dorado, M.P., Koutinas, A.A. (2015). Biorefining of by-product streams from sunflower-based biodiesel production plants for integrated synthesis of microbial oil and value-added co-products. *Bioresource Technology*, 190, 57-65.
- Leiva-Candia D., Pinzi S., Redel-Macías M., Koutinas A., Webb C. and Dorado M. (2014). The potential for agro-industrial waste utilization using oleaginous yeast for the production of biodiesel. *Science Direct Fuel* 123:33-42.

- Li YH., Liu B., Zhao ZB., Bai FW. (2006). Optimized culture medium and fermentation conditions for lipid production by *Rhodospiridium toruloides*. Chinese Journal of Biotechnology, 22(4):650–656.
- Li H., Zhao B., Bai W. (2007). High density cultivation of oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides* Y4 in fed-batch culture. Enzyme and Microbial Technology, 41 :312-317.
- Lie, S. (1973). The EBC-ninhydrin method for determination of free alpha amino nitrogen. Journal of the Institute of Brewing, 79 :37–41.
- Lindemann and Gosalia, 2012. Proceedings of the 18th TAE International Colloquium Tribology, p. 2.
- Metsoviti M., Paramithiotis S., Drosinos E., Skandamis P., Galiotou-Panayotou M., Papanikolaou S. (2011). Biotechnological valorization of low-cost sugar-based media for bacteriocin production by *Leuconostoc mesenteroides* E131. New Biotechnology, 28:600-608.
- Muniraj I., Uthandi S., Hu Z., Xiao L., Zhanet X. (2015). Microbial lipid production from renewable and waste materials for second-generation biodiesel feedstock. Environmental Technology Reviews.
- Nieschlag, H.J., Spencer, G.F., Madrigal, R.V., Rothfus, J.A. (1977). Synthetic wax esters and diesters from Crambe and Limnanthes seed oils. Industrial & Engineering Chemistry Product Research and Development, 16, 203-207.
- OECD, 2014. OECD/Food and Agriculture Organization of the United Nations, OECDFAO Agricultural Outlook 2014. OECD Publishing http://dx.doi.org/10.1787/agr_outlook-2014-en (, in:).
- Oilseeds: World Markets and Trade, 2014.
- Panchal T., Patel A., Chauhan D., Thomas M., Patel J. (2017). A methodological review on bio-lubricants from vegetable oil based resources. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 70 :65-70.
- Pandey, A., Soccol, C. R., Rodriguez-León, J. A. and Nigam, P. (2001). Production of organic acids by solid-state fermentation. In: Solid-state fermentation in biotechnology -fundamentals and applications. New Delhi: Asiatech Publishers. pp. 113-126.

- Papadaki A., Mallouchos A., Efthymiou M-N., Gardeli C., Kopsahelis N., Agueiras E., Freire D., Papanikolaou S., Koutinas A. (2017). Production of wax esters via microbial oil synthesis from food industry waste and by-product streams. *Bioresource Technology*, (*under revision*).
- Papanikolaou S., Sarantou S., Komaitis M., Aggelis, G. (2004). Repression of reserve lipid turnover in *Cunninghamella echinulata* and *Mortierella isabellina* cultivated in multiple-limited media. *Journal of Applied Microbiology* 97: 867-875.
- Papanikolaou S., Chevalot I., Galiotou-Panayotou M., Komaitis M., Marc I., Aggelis G. (2007). Industrial derivative of tallow: a promising renewable substrate for microbial lipid, single-cell protein and lipase production by *Yarrowia lipolytica*. *Electronic Journal of Biotechnology*, 10:425-435.
- Papanikolaou S., Aggelis G. (2011). Lipids of oleaginous yeasts. Part I: biochemistry of single cell oil production. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 113:1031–1051.
- Patel A, Pruthi V, Singh R, Pruthi P (2015a). Synergistic effect of fermentable and non-fermentable carbon sources enhances TAG accumulation in oleaginous yeast *Rhodospiridium kratochvilovae* HIMPA1. *Bioresource Technology*, 188:136–144
- Peters D., (2006). Carbohydrates for fermentation. *Biotechnology Journal*.
- Petersson, A.E.V., Gustafsson, L.M., Nordblad, M., Borjesson, P., Mattiasson, B., Adlercreutz, P. (2005). Wax esters produced by solvent-free energy-efficient enzymatic synthesis and their applicability as wood coatings. *Green Chemistry*, 7, 837-843.
- Pfleger B., Gossing M., Nielsen J. (2015). Metabolic engineering strategies for microbial synthesis of oleochemicals. *Metabolic Engineering*, 29: 1-11.
- Probst V.P., Schulte L.R., Durrett T.P., Rezac M.E. & Vadlani P.V. (2016). Oleaginous yeast: a value-added platform for renewable oils. *Critical Reviews in Biotechnology* Vol. 36, Iss. 5.
- Qin L., Liu L., Zeng A-P., Wei D. (2017). From low-cost substrates to single cell oils synthesized by oleaginous yeasts. *Bioresource Technology*, doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2017.05.163>
- Ratlidge C., (1994). Yeasts, molds, algae and bacteria as sources of lipids. In: *Technological advances in improved and alternative sources of lipids*, Kamel B.S., Kakuda Y. (Eds), Blackie academic and professional, London, 235-291.

- Ratledge C., (2004). Fatty acid biosynthesis in microorganisms being used for Single Cell Oil production. *Biochimie* 86:807-815.
- Ratledge C, Hopkins S., (2006). Lipids from microbial sources. In: Gunstone FD, ed. *Modifying lipids for use in food*. England, Woodhead Publishing Limited, 80-113.
- Ratledge C., Wynn J.P., (2006). Microbial production of oils and fats. In: *Food Biotechnology*. Second Edition. Taylor & Fancis, 460-481.
- Salih N., Salimon J., Yousif E. (2011). The physicochemical and tribological properties of oleic acid based trimeric biolubricants. *Industrial Crops and Products* 34: 1089-1096.
- Salimon J., Salih N., Yousif E. (2010). Biolubricants: Raw materials, chemical modifications and environmental benefits. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 112:519-530.
- Serrano-Arnaldos, M., Maximo-Martin, M.F., Montiel-Morte, M.C., Ortega-Requena, S., Gomez-Gomez, E., Bastida-Rodriguez, J. (2016). Solvent-free enzymatic production of high quality cetyl esters. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 39, 641-649.
- Shivaraju, A., Prasad, R.B.N., Kanjilal, S. (2011). Synthesis of undecenoic acid-based liquid wax esters. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 43, 64-68.
- Tsakona S., Kopsahelis N., Chatzifragkou A., Papanikolaou S., Kookos I.K., Koutinas A.A., (2014). Formulation of fermentation media from flour-rich waste streams for microbial lipid production by *Lipomyces starkeyi*. *Journal of Biotechnology*, 189:36-45.
- Tsakona S., Skiadaresis A., Kopsahelis N., Chatzifragkou A., Papanikolaou S., Kookos I., Koutinas A. (2015). Valorisation of side streams from wheat milling and confectionery industries for consolidated production and extraction of microbial lipids. *Food Chemistry*, 198:85-92.
- Wiebe M., Koivuranta K., Penttilä M., Ruohonen L. (2012). Lipid production in batch and fed-batch cultures of *Rhodospiridium toruloides* from 5 and 6 carbon carbohydrates. *BMC Biotechnology*, 12:26, doi: 10.1186/1472-6750-12-26.
- Willke TH., Vorlop KD. (2004). Industrial bioconversion of renewable resources as an alternative to conventional chemistry. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 66:131-142.
- Wu, C. Hu, X. Zhao, Z.K. Zhao (2010). Production of lipid from N-acetylglucosamine by *Cryptococcus curvatus*. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 112, pp. 727-733

- Wu S., Hu C., Jin C., Zhao X., Zhao B. (2010). Phosphate-limitation mediated lipid production by *Rhodospiridium toruloides*. *Bioresource Technology*, 101:6124-6129.
- Wu S., Zhao X., Shen H., Wang Q., Zhao B. (2011). Microbial lipid production by *Rhodospiridium toruloides* under sulfate-limited conditions. *Bioresource Technology*, 102:1803-1807.
- Vieira J.P.F, Ienczak J.L., Rossell C.E.V., Pradella J.G.C., Franco T.T. (2014). Microbial lipid production: screening with yeasts grown on Brazilian molasses. *Biotechnology Letters*, 36: 2433-2442.
- Yong-Hong L., Bo L., Zong-Bao Z., Feng-Wu B. (2006). Optimization of culture conditions for lipid production by *Rhodospiridium toruloides*. *Chinese Journal of Biotechnology*, 22:650–656.
- Zhang S., Ito M., Skerker JM., Arkin AP., Rao CV. (2016b). Metabolic engineering of the oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides* IFO0880 for lipid overproduction during high-density fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100:9393-9405.
- Zhu L.Y., Zong M.H., Wu H. (2008). Efficient lipid production with *Trichosporon fermentans* and its use for biodiesel preparation. *Bioresource Technology*, 99:7881-7885.

- Αγγελής Γ. (2007). Μικροβιολογία και Μικροβιακή Τεχνολογία. Εκδόσεις Σταμούλη, Αθήνα.
- Κυριάκου Μ. (2016). *Μελέτη και επιλογή ελαιογόνων ζυμών που παράγουν μικροβιακά έλαια σε διάφορες ανανεώσιμες πρώτες ύλες*. Μεταπτυχιακή Μελέτη, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα.
- Μπεκατώρου Α. (2015). Παραγωγή προϊόντων προστιθέμενης αξίας από απόβλητα της βιομηχανίας τροφίμων. Διάλεξη στα πλαίσια του μαθήματος «Επεξεργασία αποβλήτων στην βιομηχανία τροφίμων», Π.Μ.Σ. Επιστήμη Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.