

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

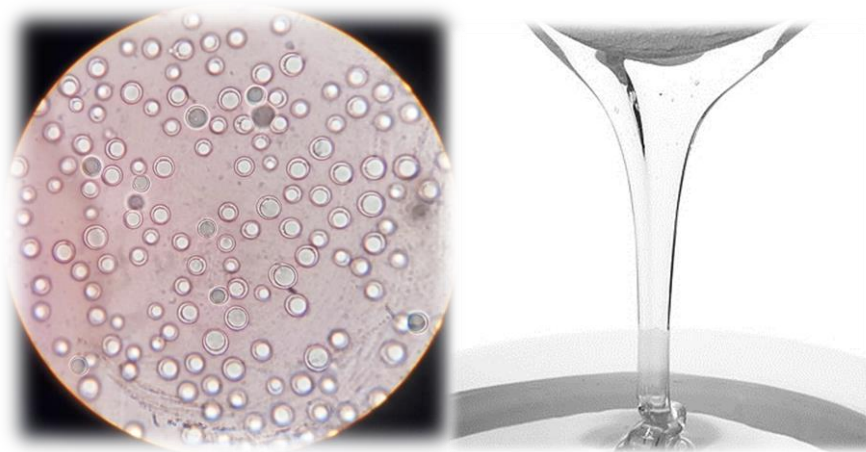
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

ΠΜΣ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ & ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ

ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ ΒΙΟΔΙΕΡΓΑΣΙΩΝ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΒΙΟΔΙΫΛΙΣΤΗΡΙΩΝ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

*Μελέτη παραγωγής λιπιδίων και άλλων μικροβιακών προϊόντων κατά την αύξηση της ζύμης *Lipomyces starkeyi* DSM 70296, σε απόβλητα της βιομηχανίας τροφίμων*



Έλενα Μ. Κρητικού

ΑΘΗΝΑ, 2017

Επιβλέπων: Παπανικολάου Σεραφείμ

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΤΡΟΦΙΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ & ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ &
ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Τίτλος: Μελέτη παραγωγής λιπιδίων και άλλων μικροβιακών προϊόντων κατά την αύξηση της ζύμης *Lipomyces starkeyi* DSM 70296, σε απόβλητα της βιομηχανίας τροφίμων

Εκπλήτρια: Έλενα Μ. Κρητικού

ΑΘΗΝΑ, 2017

Επιβλέπων: Παπανικολάου Σεραφείμ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Τίτλος: Μελέτη παραγωγής λιπιδίων και άλλων μικροβιακών προϊόντων κατά την αύξηση της ζύμης *Lipomyces starkeyi* DSM 70296, σε απόβλητα της βιομηχανίας τροφίμων

Εκπλήτρια: Έλενα Μ. Κρητικού

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή:

Παπανικολάου Σεραφείμ, Αναπληρωτής Καθηγητής (Επιβλέπων)

Κουτίνας Απόστολος, Επίκουρος Καθηγητής

Στοφόρος Νικόλαος, Καθηγητής

*Στους γονείς μου Μιχαήλ & Αθηνά,
στον αδερφό μου Γιώργο,
στον Λάμπρο*

*'The world will not be inherited by the strongest, it will
be inherited by those most able to change.'*

~Charles Darwin

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα μεταπτυχιακή μελέτη έλαβε χώρα στο εργαστήριο «Μικροβιολογίας & Βιοτεχνολογίας Τροφίμων» του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών. Θα ήθελα στο σημείο αυτό να εκφράσω τις ειλικρινείς ευχαριστίες μου σε όλους όσους συνέβαλαν στην επιτυχή διεξαγωγή της.

Κατ' αρχάς θα ήθελα να ευχαριστήσω τον αναπληρωτή καθηγητή και επιβλέποντά μου, κ. Παπανικολάου Σεραφείμ και τον υποψήφιο διδάκτορα κ. Ξερόπουλο Ευάγγελο για την αποτελεσματική συνεργασία και καθοδήγησή τους, χωρίς την οποία η εκπόνηση της παρούσας πτυχιακής δεν θα μπορούσε να έχει ολοκληρωθεί.

Ξεχωριστά ευχαριστώ τον επίκουρο καθηγητή κ. Κουτίνα Απόστολο και τον καθηγητή κ. Στοφόρο Νικόλαο για τη συμμετοχή τους στην τριμελή εξεταστική επιτροπή και για το χρόνο που αφιέρωσαν για τη μελέτη της παρούσας εργασίας.

Θα ήθελα επίσης να εκθειάσω τη σημαντική βοήθεια της κ. Καλαντζή Ουρανίας (μέλος ΕΔΙΠ) και των υποψήφιων διδασκάλων Λαδάκη Δημητρίου, Μάινα Σοφίας, Παλαιογεώργου Νατάσας, Παπαδάκη Κατερίνας, Τσούκο Έρης και Φιλιπούση Ροζανίνας για τις πολύτιμες συμβουλές και υποδείξεις τους καθ' όλη τη διάρκεια της διεξαγωγής της πειραματικής διαδικασίας της παρούσας μεταπτυχιακής έρευνας.

Ξεχωριστά ευχαριστώ θερμά τους γονείς, τον αδερφό και τους φίλους μου που μοναδικά με υπέμειναν και με στήριξαν σε όλη τη διάρκεια των σπουδών μου, καθώς επίσης και τις συμφοιτήτριές μου για την τόσο ευχάριστη και αποτελεσματική συνεργασία τους.

Θα ήθελα, τέλος, να εκφράσω την εκτίμηση και τις ευχαριστίες μου σε όλους τους καθηγητές μου κατά τη διετή φοίτησή μου στο μεταπτυχιακό πρόγραμμα σπουδών, καθώς θεωρώ τη συμβολή καθενός ξεχωριστά, στις γνώσεις μου ιδιαίτερος πολύτιμη.

Έλενα Μ. Κρητικού

Αθήνα, 2017

ΣΥΝΟΨΗ

Στόχος της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας υπήρξε η βελτιστοποίηση της μεθόδου εκχύλισης μονοκυτταρικών λιπιδίων και η συνακόλουθη μελέτη λιποσυσσώρευσης της ελαιογόνας ζύμης *L. starkeyi* DSM 70296 σε υπόστρωμα σιροπιού γλυκόζης, με ή χωρίς προσθήκη NaCl. Η μέθοδος εκχύλισης που απέδωσε την υψηλότερη λιποπεριεκτικότητα ήταν η Soxhlet (74.5% επί ξ.β.). Ωστόσο, λόγω του αυξημένου κόστους και των μεγάλων χρόνων που απαιτεί ο χειρισμός της, επιλέχθηκε να χρησιμοποιηθεί η εκχύλιση με Folch-HCl. Ζυμώσεις βυθού σε υπόστρωμα γλυκόζης αποτέλεσαν το μάρτυρα των πειραμάτων. Έπειτα, ο μικροοργανισμός αναπτύχθηκε σε ληγμένο σιρόπι γλυκόζης. Η παραγωγή βιομάζας και η λιποσυσσώρευση κυμάνθηκαν σε παρόμοια επίπεδα με εκείνα του μάρτυρα. Ο συντελεστής απόδοσης βιομάζας, ωστόσο, ήταν αισθητά αυξημένος φτάνοντας τα 0.65 g/g έναντι των 0.42 g/g του μάρτυρα. Στα πλαίσια της επίτευξης οικονομικότερων διεργασιών, ακολούθησαν ζυμώσεις βυθού σε υπόστρωμα σιροπιού γλυκόζης με την προσθήκη NaCl. Απώτερος στόχος του εγχειρήματος αυτού ήταν η αξιοποίηση αλατούχων υποστρωμάτων ως οικονομικής πρώτης ύλης για τη διενέργεια μικροβιακών ζυμώσεων, προς παραγωγή βιομάζας και μικροβιακών λιπιδίων. Η ζύμη *L. starkeyi* κατηγοριοποιείται ως λίγο αλατοανθεκτική, αφού συγκεντρώσεις αλατιού από 30 g/L (3.0% w/v) και πάνω παρεμπόδιζαν την ανάπτυξή της. Ωστόσο, ιδιαίτερα ενδιαφέρον είναι το γεγονός πως μέχρι τα 20 g/L η προσθήκη άλατος όχι μόνο δεν παρεμπόδιζε την αύξηση της ζύμης αλλά ενίσχυε και τη συσσώρευση ενδοκυτταρικών λιπιδίων. Η μέγιστη λιποσυσσώρευση ανήλθε στα 10.0 g/L (40.4% επί ξ.β.) έναντι 4.2 g/L (31.2% επί ξ.β.) της αντίστοιχης καλλιέργειας χωρίς αλάτι. Τέλος, έλαβε χώρα ημι-συνεχής καλλιέργεια σε βιοαντιδραστήρα, η οποία έφτασε το μέγιστο των 53.6 g/L βιομάζας και 55.7% λιποπεριεκτικότητα. Η παραγωγικότητα των λιπιδίων έφτασε τα 0.11 g/L/h, αποτελώντας ικανοποιητική τιμή της διεθνούς βιβλιογραφίας. Τα αποτελέσματα αυτά είναι εμφανώς καλύτερα από τα αντίστοιχα των κλειστών καλλιεργειών βυθού. Τέλος, το λίπος που παρήχθη από τη ζύμη περιείχε κυρίως ελαϊκό και παλμιτικό οξύ, καθώς επίσης και παλμιτελαϊκό και στεατικό οξύ, σε μικρότερες ποσότητες. Αποτελεί, συνεπώς, εξαιρετική πρώτη ύλη για την παραγωγή 2^{ης} γενιάς βιοντίζελ.

Λέξεις κλειδιά: εκχύλιση λίπους, μονοκυτταρικά λιπίδια, ελαιογόνες ζύμες, *Lipomyces starkeyi*, βιοντίζελ, σιρόπι γλυκόζης, NaCl, αλατοανθεκτικότητα

ABSTRACT

Thesis title: Study of produced lipids and other microbial products during the yeast's *Lipomyces starkeyi* DSM 70296 growth on food industry's wastes.

The ultimate purpose of this thesis was to optimize the lipid extraction method and also study the lipid accumulation of the yeast *Lipomyces starkeyi* DSM 70296 on glucose syrup substrate, with and without NaCl addition. Lipid extraction using Soxhlet device resulted the highest lipid content (74.5% on Cell Dry Weight, CDW), though being both more expensive and time consuming compared to all other methods tried herein. As a consequence, Folch-HCl, which was the second more efficient lipid extraction method, was selected for the conduction of the experimental procedure discussed hereafter. Batch-flask fermentations on commercial glucose were firstly carried out as blank experiments. Continuously, expired glucose syrup was employed for the conduction of batch-flask cultures. Maximum biomass and lipid production were similar to those of the blank. Nonetheless, the biomass yield on consumed substrate reached 0.65 g/g, unlike the blank's 0.42 g/g. There were also culture trials on increasing NaCl concentrations, aiming the utilization of low-cost raw materials for biomass and Single Cell Oils production. *L. starkeyi* could tolerate up to 20 g/L NaCl (2.0% w/v), and the strain was hence classified as slightly halotolerant. The addition of NaCl in the fermentation broth up to this concentration was stimulating lipid accumulation reaching the maximum of 10.0 g/L (40.4% on CDW), unlike the 4.2 g/L (31.2% on CDW) of the respective culture without salt addition. NaCl concentrations of 30 g/L (3.0% w/v) or more were inhibiting substrate's consumption and the strain's growth, as well. Finally, the yeast was cultured in fed-batch bioreactor process employing glucose syrup as carbon source, achieving 53.6 g/L biomass and 55.7% lipid content, with a lipid productivity of 0.11 g/L/h, which was satisfactory compared to the international literature. Apparently, fed-batch bioreactor resulted higher yields compared to bath-flask fermentations. Last but not least, fatty acid profile analysis revealed that lipids extracted from *L. starkeyi* DSM 70296 are excellent potential feedstock for 2nd generation biodiesel production, since they mainly constitute of oleic, palmitic and to lesser extent palmitoleic and stearic acids.

Key words: lipid extraction, Single Cell Oils, oleaginous yeasts, *Lipomyces starkeyi*, biodiesel, glucose syrup, NaCl, halotolerance

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΣΥΝΟΨΗ	5
ABSTRACT.....	6
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1-ΕΙΣΑΓΩΓΗ	15
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2-ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ.....	17
2.1 Απόβλητα τροφίμων.....	18
2.2 Σιρόπι γλυκόζης.....	20
2.3 Βιοκαύσιμα & μικροβιακά έλαια	26
2.3.1 Δομή & ρόλος των μονοκυτταρικών λιπιδίων	32
2.3.2 Ελαιογόνες ζύμες.....	33
2.3.3 Μικροβιακός μεταβολισμός: Βιοχημεία λιποσυσσώρευσης.....	36
2.4 Εφαρμογές μονοκυτταρικού λίπους	41
2.4.1 Μικροβιακά έλαια στη διατροφή του ανθρώπου	42
2.4.2 Μικροβιακά έλαια στην παραγωγή ελαιοχημικών ουσιών	43
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3-ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ	45
3.1 Βιολογικό υλικό	45
3.2 Υποστρώματα.....	46
3.3 Συνθήκες καλλιέργειας.....	48
3.3.1 Καλλιέργειες βυθού.....	48
3.3.2 Καλλιέργειες σε βιοαντιδραστήρα	49
3.4 Προσδιορισμός pH.....	49
3.5 Παραλαβή βιομάζας.....	50
3.5.1 Ξήρανση	50
3.5.2 Λυοφιλίωση.....	51
3.6 Προσδιορισμός σακχάρων.....	51
3.6.1 Ανάγοντα σάκχαρα.....	51
3.6.2 Ολικά σάκχαρα.....	53
3.6.3 Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC).....	53
3.7 Αναλύσεις ενδοκυτταρικών λιπιδίων	54
3.7.1 Μέθοδοι εκχύλισης λίπους	54
3.7.2 Εξάτμιση διαλυτών & ποσοτικός προσδιορισμός λιποπεριεκτικότητας	57

3.7.3	Προσδιορισμός κλασμάτων λιπιδίων	58
3.7.4	Χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας	60
3.7.5	Προσδιορισμός της σύστασης των λιπαρών οξέων του μικροβιακού λίπους .	61
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4-ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....		64
4.1	Αριστοποίηση εκχύλισης μικροβιακού λίπους.....	64
4.1.1.	Κλασμάτωση λιπιδίων-TLC	66
4.2	Καλλιέργειες βυθού της ζύμης <i>L. starkeyi</i>	68
4.2.1	Κινητική της κυτταρικής αύξησης, της κατανάλωσης υποστρώματος και της παραγωγής ενδοκυτταρικών λιπιδίων του <i>L. starkeyi</i> σε υπόστρωμα εμπορικής γλυκόζης	69
4.2.2	Κινητική της κυτταρικής αύξησης, της κατανάλωσης υποστρώματος και της παραγωγής ενδοκυτταρικών λιπιδίων του <i>L. starkeyi</i> σε υπόστρωμα σιροπιού γλυκόζης	73
4.2.3	Κινητική της κυτταρικής αύξησης, της κατανάλωσης υποστρώματος και της παραγωγής ενδοκυτταρικών λιπιδίων του <i>L. starkeyi</i> σε υπόστρωμα σιροπιού γλυκόζης με προσθήκη άλατος.....	77
4.3	Κινητική της κυτταρικής αύξησης, της κατανάλωσης υποστρώματος και της παραγωγής ενδοκυτταρικών λιπιδίων του <i>L. starkeyi</i> σε υπόστρωμα σιροπιού γλυκόζης, σε βιοαντιδραστήρα ημι-συνεχούς λειτουργίας	82
4.4	Ανάλυση της σύστασης των λιπαρών οξέων του μικροβιακού λίπους	85
4.5	Συζήτηση	89
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5-ΕΠΙΛΟΓΟΣ		99
5.1	Προτάσεις για περαιτέρω μελέτη	101
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ		102

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1 Σύνθεση γλυκαντικών προερχόμενων από την υδρόλυση του αμύλου. DP ₁ : μονοσακχαρίτες (δεξτρόζη, δεξτρόζη + φρουκτόζη σε HFS, φρουκτόζη σε κρυσταλλική φρουκτόζη), DP ₂ : δισακχαρίτες (κυρίως μαλτόζη), DP ₃ : τρισακχαρίτες (κυρίως μαλτοτριόζη), DP ₄ : ολιγοσακχαρίτες (μαλτοτερόζη + ανώτερα σάκχαρα), HM: High maltose, (IE): Ion-exchanged. (Hobbs, 2009).....	22
Πίνακας 2 Κόστος παραγωγής ισογλυκόζης & σύγκριση τιμών με τον αραβόσιτο και τη ζάχαρη για τα έτη 2013-2016. (NFU, 2017)	25
Πίνακας 3 Ελαιογόνοι μικροοργανισμοί (Προσαρμογή από: Αγγελής, 2007; Kitcha & Cheirsilp, 2011; Muniraj et al., 2015)	31
Πίνακας 4 Πρώτες ύλες για την παραγωγή μονοκυτταρικών λιπιδίων.	32
Πίνακας 5 Κατηγορίες ακόρεστων Λ.Ο. (Ganesan et al., 2014).....	43
Πίνακας 6 Επιστημονική ταξινόμηση του <i>L. starkeyi</i>	45
Πίνακας 7 Σύσταση προκαλλιέργειας.	46
Πίνακας 8 Σύσταση μεταλλικών αλάτων κύριας καλλιέργειας. (Papanikolaou <i>et al.</i> , 2001) .	47
Πίνακας 9 Δεδομένα για την κατασκευή πρότυπης καμπύλης D-γλυκόζης.	53
Πίνακας 10 Αναλυτικές συνθήκες αεριοχρωματογράφου.....	62
Πίνακας 11 Αποτελέσματα αριστοποίησης εκχύλισης μικροβιακών λιπιδίων.	65
Πίνακας 12 Αποτελέσματα λιποσυσσώρευσης κλασμάτων % επί του συνολικού λίπους.....	67
Πίνακας 13 Αποτελέσματα κινητικής του <i>L. starkeyi</i> σε υπόστρωμα με πηγή άνθρακα εμπορική γλυκόζη αρχικής συγκέντρωσης σακχάρων 40 g/L. a: YL/X _{max} , b: L _{max} , c: X _{max}	69
Πίνακας 14 Αποτελέσματα κινητικής του <i>L. starkeyi</i> σε υπόστρωμα με πηγή άνθρακα εμπορική γλυκόζη αρχικής συγκέντρωσης σακχάρων 60 g/L. a: YL/X _{max} , b: L _{max} , c: X _{max}	70
Πίνακας 15 Αποτελέσματα κινητικής του <i>L. starkeyi</i> σε υπόστρωμα με πηγή άνθρακα εμπορική γλυκόζη αρχικής συγκέντρωσης σακχάρων 80 g/L. a: YL/X _{max} , b: L _{max} , c: X _{max}	71
Πίνακας 16 Αποτελέσματα κινητικής του <i>L. starkeyi</i> σε υπόστρωμα με πηγή άνθρακα σιρόπι γλυκόζης αρχικής συγκέντρωσης σακχάρων 40 g/L. a: YL/X _{max} , b: L _{max} , c: X _{max}	73
Πίνακας 17 Αποτελέσματα κινητικής του <i>L. starkeyi</i> σε υπόστρωμα με πηγή άνθρακα σιρόπι γλυκόζης αρχικής συγκέντρωσης σακχάρων 60 g/L. a: YL/X _{max} , b: L _{max} , c: X _{max}	74
Πίνακας 18 Αποτελέσματα κινητικής του <i>L. starkeyi</i> σε υπόστρωμα με πηγή άνθρακα σιρόπι γλυκόζης αρχικής συγκέντρωσης σακχάρων 80 g/L. a: YL/X _{max} , b: L _{max} , c: X _{max}	74

Πίνακας 19 Αποτελέσματα κινητικής του <i>L. starkeyi</i> σε υπόστρωμα με πηγή άνθρακα σιρόπι γλυκόζης αρχικής συγκέντρωσης σακχάρων 80 g/L και προσθήκη NaCl 10 g/L. a: YL/Xmax, b: Lmax, c: Xmax.....	77
Πίνακας 20 Αποτελέσματα κινητικής του <i>L. starkeyi</i> σε υπόστρωμα με πηγή άνθρακα σιρόπι γλυκόζης αρχικής συγκέντρωσης σακχάρων 80 g/L και προσθήκη NaCl 20 g/L. a: YL/Xmax, b: Lmax, c: Xmax.....	78
Πίνακας 21 Αποτελέσματα κινητικής του <i>L. starkeyi</i> σε υπόστρωμα με πηγή άνθρακα σιρόπι γλυκόζης αρχικής συγκέντρωσης σακχάρων 80 g/L και προσθήκη NaCl 30 g/L. a: YL/Xmax, b: Lmax, c: Xmax.....	81
Πίνακας 22 Αποτελέσματα κινητικής του <i>L. starkeyi</i> σε υπόστρωμα με πηγή άνθρακα σιρόπι γλυκόζης αρχικής συγκέντρωσης σακχάρων 80 g/L και προσθήκη NaCl 40 g/L. a: YL/Xmax, b: Lmax, c: Xmax.....	81
Πίνακας 23 Αποτελέσματα κινητικής του <i>L. starkeyi</i> σε υπόστρωμα με πηγή άνθρακα σιρόπι γλυκόζης, σε βιοαντιδραστήρα ημι-συνεχούς λειτουργίας. a: YL/Xmax, b: Lmax, c: Xmax.	83
Πίνακας 24 Σύσταση Λ.Ο. των τριών λιπιδιακών κλασμάτων από ζύμωση τύπου βυθού σε υπόστρωμα εμπορικής γλυκόζης.....	85
Πίνακας 25 Σύσταση Λ.Ο. μικροβιακού λίπους από ζυμώσεις τύπου βυθού σε υπόστρωμα εμπορικής γλυκόζης.....	86
Πίνακας 26 Σύσταση Λ.Ο. μικροβιακού λίπους από ζυμώσεις τύπου βυθού σε υπόστρωμα σιροπιού γλυκόζης.....	87
Πίνακας 27 Σύσταση Λ.Ο. μικροβιακού λίπους από ζυμώσεις τύπου βυθού σε υπόστρωμα σιροπιού γλυκόζης με προσθήκη NaCl.....	88
Πίνακας 28 Σύσταση Λ.Ο. μικροβιακού λίπους της καλλιέργεια σε βιοαντιδραστήρα σε υπόστρωμα σιροπιού γλυκόζης με προσθήκη NaCl.....	89
Πίνακας 29 Συγκεντρωτικά αποτελέσματα κινητικών όλων των ζυμώσεων που έλαβαν χώρα. S ₀ : Αρχική συγκέντρωση σακχάρων (g/L), S _t : Συγκέντρωση σακχάρων σε χρόνο t (g/L), S _{0/NaCl} : Αρχική συγκέντρωση αλατιού (g/L), t: Χρόνος (h), S _{cons} : Συγκέντρωση καταναλωθέντος σακχάρου (g/L), X: Συγκέντρωση βιομάζας (g/L), L: Συγκέντρωση ενδοκυτταρικών λιπιδίων (g/L), Y _{LX} : Συντελεστής απόδοσης λιπιδίων ως προς τη βιομάζα (%), Y _{L/Scons} : Συντελεστής απόδοσης λιπιδίων ως προς το καταναλωθέν υπόστρωμα (g/L/h), Lipid yield: Παραγωγικότητα λιπιδίων (g/L/h), a: Μέγιστη λιποπεριεκτικότητα (%), b: Μέγιστη παραγωγή λιπιδίων (g/L), c: Μέγιστη παραγωγή βιομάζας (g/L).....	92
Πίνακας 30 Σύγκριση αποτελεσμάτων των ζυμώσεων με προσθήκη NaCl με τη βιβλιογραφία.....	94
Πίνακας 31 Βιβλιογραφική ανασκόπηση αποτελεσμάτων της καλλιέργειας της ζύμης <i>L. starkeyi</i> σε υδρόφιλα υποστρώματα.....	97
Πίνακας 32 Βιβλιογραφική ανασκόπηση της σύστασης του μονοκυτταρικού λίπους της ζύμης <i>L. starkeyi</i>	98

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΓΡΑΦΗΜΑΤΩΝ

Γράφημα 1 Ευρωπαϊκές οδηγίες για τη χρήση ανανεώσιμων πηγών ενέργειας έως το 2020. (European Commission, 2016).....	29
Γράφημα 2 Πρότυπη καμπύλη αναφοράς γλυκόζης.	53
Γράφημα 3 Συγκέντρωση ενδοκυτταρικών λιπιδίων.	65
Γράφημα 4 Συγκεντρώσεις κλασμάτων λιπιδίων σε απόλυτες τιμές.	67
Γράφημα 5 Κινητική παραγωγής βιομάζας και μικροβιακού λίπους κατά την καλλιέργεια του στελέχους <i>L. starkeyi</i> DSM 70296 σε υπόστρωμα με πηγή άνθρακα εμπορική γλυκόζη αρχικής συγκέντρωσης σακχάρων 80 g/L. (□) Βιομάζα (g/L), (■) Λιπίδια (g/L).....	71
Γράφημα 6 Κινητική κατανάλωσης υποστρώματος κατά την καλλιέργεια του στελέχους <i>L. starkeyi</i> DSM 70296 σε υπόστρωμα με πηγή άνθρακα εμπορική γλυκόζη αρχικής συγκέντρωσης σακχάρων 80 g/L. (○) Σάκχαρα (g/L).....	72
Γράφημα 7 Σχέση βιομάζας-καταναλωθέντος υποστρώματος κατά την καλλιέργεια της ζύμης <i>L. starkeyi</i> σε 80 g/L αρχική συγκέντρωση σακχάρων. Πηγή άνθρακα: Εμπορική γλυκόζη. 72	
Γράφημα 8 Κινητική παραγωγής βιομάζας και μικροβιακού λίπους κατά την καλλιέργεια του στελέχους <i>L. starkeyi</i> DSM 70296 σε υπόστρωμα με πηγή άνθρακα σιρόπι γλυκόζης αρχικής συγκέντρωσης σακχάρων 80 g/L. (□) Βιομάζα (g/L), (■) Λιπίδια (g/L).	75
Γράφημα 9 Κινητική κατανάλωσης υποστρώματος κατά την καλλιέργεια του στελέχους <i>L. starkeyi</i> DSM 70296 σε υπόστρωμα με πηγή άνθρακα σιρόπι γλυκόζης αρχικής συγκέντρωσης σακχάρων 80 g/L. (○) Σάκχαρα (g/L).....	76
Γράφημα 10 Σχέση βιομάζας-καταναλωθέντος υποστρώματος κατά την καλλιέργεια της ζύμης <i>L. starkeyi</i> σε 80 g/L αρχική συγκέντρωση σακχάρων. Πηγή άνθρακα: Σιρόπι γλυκόζης.	76
Γράφημα 11 Κινητική παραγωγής βιομάζας και μικροβιακού λίπους κατά την καλλιέργεια του στελέχους <i>L. starkeyi</i> DSM 70296 σε υπόστρωμα με πηγή άνθρακα σιρόπι γλυκόζης αρχικής συγκέντρωσης σακχάρων 80 g/L και προσθήκη 20 g/L NaCl. (□) Βιομάζα (g/L), (■) Λιπίδια (g/L).....	79
Γράφημα 12 Κινητική κατανάλωσης υποστρώματος κατά την καλλιέργεια του στελέχους <i>L. starkeyi</i> DSM 70296 σε υπόστρωμα με πηγή άνθρακα σιρόπι γλυκόζης αρχικής συγκέντρωσης σακχάρων 80 g/L και προσθήκη 20 g/L NaCl. (○) Σάκχαρα (g/L).....	80
Γράφημα 13 Σχέση βιομάζας-καταναλωθέντος υποστρώματος κατά την καλλιέργεια της ζύμης <i>L. starkeyi</i> σε 80 g/L αρχική συγκέντρωση σακχάρων. Πηγή άνθρακα: Σιρόπι γλυκόζης & 20 g/L NaCl.	80
Γράφημα 14 Κινητική παραγωγής βιομάζας και μικροβιακού λίπους, καθώς επίσης και κατανάλωσης σακχάρων, κατά την καλλιέργεια του στελέχους <i>L. starkeyi</i> DSM 70296 σε υπόστρωμα με πηγή άνθρακα σιρόπι γλυκόζης αρχικής συγκέντρωσης σακχάρων 50 g/L σε βιοαντιδραστήρα ημι-συνεχούς λειτουργίας. (□) Βιομάζα (g/L), (○) Σάκχαρα (g/L), (■) Λιπίδια (g/L).....	83

Γράφημα 15 Σχέση λιπιδίων-καταναλωθέντος υποστρώματος κατά την καλλιέργεια της ζύμης *L. starkeyi* σε βιοαντιδραστήρα ημι-συνεχούς λειτουργίας. Πηγή άνθρακα: Σιρόπι γλυκόζης..... 84

Γράφημα 16 Λιποπεριεκτικότητα από διαφορετικές μεθόδους εκχύλισης (% ξ.β.). 90

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1 Παραγωγή συνολικών αποβλήτων στην ΕΕ-28 το έτος 2014. (Eurostat, 2017).....	17
Εικόνα 2 Απόβλητα τροφίμων ανά τομέα στην ΕΕ-28 για το έτος 2012. (Fusions, 2016).....	19
Εικόνα 3 Σχεδιαγραμματική απεικόνιση βιοδιύλιστηρίου. (Gameiro, 2016)	20
Εικόνα 4 Διαδικασία βιομηχανικής παραγωγής σιροπιού γλυκόζης. (Maarel, Veen, Uitdehaag, Leemhuis & Dijkhuizen, 2001).....	23
Εικόνα 5 Παραγωγή ισογλυκόζης στην Ευρώπη. (National Farming Union, 2017).....	24
Εικόνα 6 Αντίδραση παραγωγής βιοντίζελ. (Garba, Alhassan & Kono, 2006)	27
Εικόνα 7 Πορεία προσφοράς ανανεώσιμων πηγών ενέργειας για την περίοδο 2010-2014. (OECD, 2017)	28
Εικόνα 8 Γλυκολυτικό μονοπάτι EMP. (Giri, 2016).....	37
Εικόνα 9 Οξειδωτικός κύκλος φωσφοροπεντοζών.	38
Εικόνα 10 Μεταβολικό μονοπάτι του κύκλου των τρικαρβοξυλικών οξέων (TCA) και του κιτρικού/μηλικού, κατά τη λιποσυσσώρευση σε 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 μεταφοράς κιτρικού/μηλικού οξέος. (Ratledge & Wynn, 2002) ..	39
Εικόνα 11 Βιοσύνθεση τριγλυκεριδίων. DHAP: P-διϋδροξυ-ακετόνη, G-3-P: 3-P-γλυκερόλη, LPA: λυσοφωσφατιδικό οξύ, PA: φωσφατιδικό οξύ, DAG: διγλυκερίδιο, TAG: τριγλυκερίδιο. Ένζυμα: glycerol-3-P dH: αφυδρογονάση της G-3-P, G-3-P acylT: ακυλ-τρανσφεράση, CoA: συνένζυμο A, 1-acyl G-3-P acylT: ακυλ-τρανσφεράση, PAP: φωσφατιδική φωσφατάση, DAG acylT: ακυλ-τρανσφεράση. (Ageitos <i>et al.</i> , 2011)	41
Εικόνα 12 Κύτταρα του <i>L. starkeyi</i> (αριστερά) & μικροσκόπιο τύπου Motic B Series (δεξιά).	46
Εικόνα 13 Κεκλιμένοι σωλήνες πληρωμένοι με υπόστρωμα YPD & εμβολιασμένοι με τον μικροοργανισμό.....	46
Εικόνα 14 Υγρό ζύμωσης υπό ανάδευση.....	48
Εικόνα 15 Καλλιέργεια σε βιοαντιδραστήρα.....	49
Εικόνα 16 pH-μετρο τύπου Hanna Instruments 2211 pH/ORP meter.	50
Εικόνα 17 Φυγόκεντρος (αριστερά) & ίζημα βιομάζας μετά τη φυγοκέντρωση (δεξιά).	51
Εικόνα 18 Διαχωρισμός των τριών φάσεων (HCl, βιομάζα, χλωροφόρμιο).....	55
Εικόνα 19 Διήθηση μίγματος βιομάζας-Folch (αριστερά) & συμπυκνωτής κενού (δεξιά). ...	58
Εικόνα 20 Αέριος χρωματογράφος.	62

Εικόνα 21 Αποτύπωμα κλασμάτων λιπιδίων σε πλάκα TLC. 1: Ελαϊκό οξύ 20μL/mL χλωροφορμίου (FFAs), 2: Ελαϊκό οξύ 10μL/mL χλωροφορμίου (FFAs), 3: Συνολικά λιπίδια, 4: Ουδέτερο κλάσμα, 5: Ουδέτερο κλάσμα, 6: Φωσφο-λιπίδια, 7: Working solution (CE: cholesteryl linolate, TAG: glyceryl triolate, CL: cholesterol), 8: Σφιγγο- γλυκο-λιπίδια. 68

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1-ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Με την πάροδο των χρόνων από το 1970 και τη συνεχόμενη εξέλιξη της τεχνολογίας, δόθηκε μεγαλύτερο ενδιαφέρον και στον τομέα της βιοτεχνολογίας. Ο συγκεκριμένος τομέας επηρεάζει θετικά και άλλους βασικούς τομείς μιας χώρας. Απέδειξε ότι μπορεί να προσφέρει σημαντικά στην οικονομία, την υγεία, την παραγωγή και την περαιτέρω επεξεργασία του φαγητού, την προστασία του περιβάλλοντος, την παραγωγή υλικών και χημικών καθώς επίσης και τη γεωργία και δασοκομία. (Buyukgungor, & Gurel, 2009)

Σύμφωνα με τον Οργανισμό Οικονομικής Συνεργασίας και Ανάπτυξης (OECD, 2005) η βιοτεχνολογία ορίζεται ως η «ζύμωση με τη χρήση βιοαντιδραστήρων, βιοδιεργασιών, βιοαπολύμανσης, βιοπολυτοποίησης, βιοαποικοδόμησης, βιοαποθιώσεως, βιοαποκατάστασης, βιοδιήθησης και φυτοκατεργασίας". Οι μέθοδοι αυτές χρησιμοποιούνται με κύριο σκοπό την αποτροπή της περιβαλλοντικής ρύπανσης και την επεξεργασία των αποβλήτων.

Η παρούσα μεταπτυχιακή εργασία έχει ως απώτερο στόχο τη μελέτη της αξιοποίησης του ληγμένου σιροπιού γλυκόζης, ως αποβλήτου της βιομηχανίας τροφίμων, με ή χωρίς προσθήκη αλατιού, από τη ζύμη *Lipomyces starkeyi* DSM 70296 προς παραγωγή μεταβολικών προϊόντων. Τα προϊόντα αυτά συνίστανται στη βιομάζα ως κύριο προϊόν του μεταβολισμού της ζύμης, καθώς επίσης και στο ενδοκυτταρικό λίπος που αποτελεί δευτερογενή μεταβολίτη.

Το θεωρητικό πλαίσιο που έπεται (Κεφάλαιο 2), ακολουθεί η λεπτομερής καταγραφή των υλικών και μεθόδων (Κεφάλαιο 3) που χρησιμοποιήθηκαν για την εξαγωγή των αποτελεσμάτων της πειραματικής διαδικασίας που έλαβε χώρα. Εν συνεχεία, παρουσιάζονται και σχολιάζονται τα αποτελέσματα (Κεφάλαιο 4) με τη βοήθεια πινάκων και διαγραμμάτων για την καλύτερη διατύπωση και κατανόηση του θέματος. Τέλος, συνοψίζονται τα βασικότερα συμπεράσματα (Κεφάλαιο 5) που προέκυψαν τόσο από την εκπόνηση των πειραμάτων, όσο και από τη βιβλιογραφική ανασκόπηση που τα συνόδευσε.

Για την επίτευξη του στόχου της ερευνητικής αυτής μελέτης, πραγματοποιήθηκαν τα εξής πειράματα:

- Αριστοποίηση εκχύλισης μικροβιακού λίπους.
- Ζυμώσεις βυθού σε υπόστρωμα εμπορικής γλυκόζης (40, 60 & 80g/L).
- Ζυμώσεις βυθού σε υπόστρωμα σιροπιού γλυκόζης (40, 60 & 80g/L).
- Ζυμώσεις βυθού σε υπόστρωμα σιροπιού γλυκόζης (80 g/L) με την προσθήκη NaCl (10, 20, 30 & 40 g/L).
- Ζυμώσεις σε βιοαντιδραστήρα σε υπόστρωμα σιροπιού γλυκόζης (50 g/L).

Όλες οι καλλιέργειες πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν.

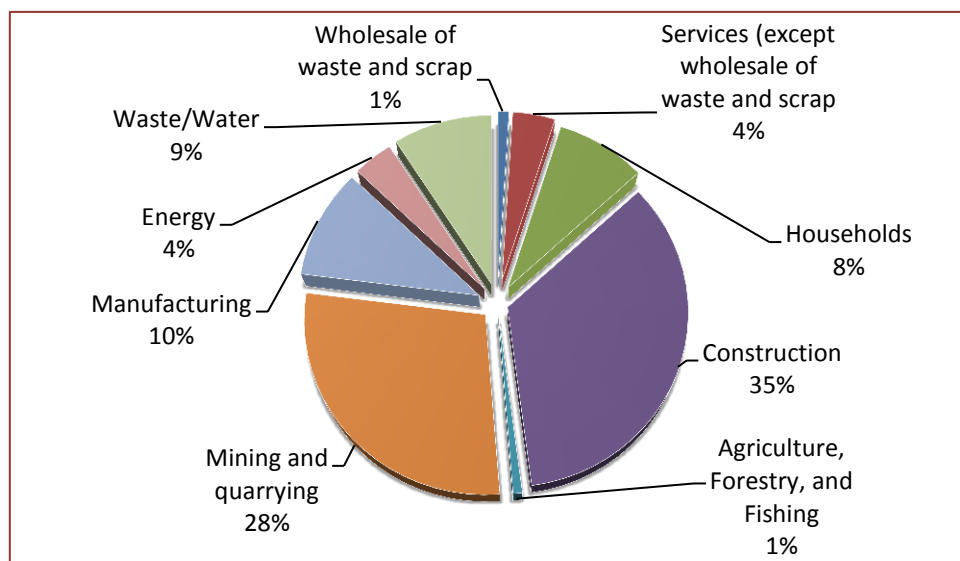
Θεωρείται πως η μελέτη αυτή μπορεί να συμβάλει στον εμπλουτισμό της βιοτεχνολογικής έρευνας γύρω από το ζήτημα των μικροβιακών ζυμώσεων για την αξιοποίηση αποβλήτων και πως θα ανοίξει ορίζοντες για ακόμη περισσότερα ερευνητικά θέματα να μελετηθούν στο μέλλον.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2-ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ

Η διατάραξη του φυσικού οικοσυστήματος και του περιβάλλοντος γενικότερα, προϋπήρχε από την εποχή της βιομηχανικής επανάστασης και αυξανόταν με γοργούς ρυθμούς μετά το δεύτερο παγκόσμιο πόλεμο. Από το 1970 και έπειτα άρχισε να δίδεται ιδιαίτερη βαρύτητα στην αποφυγή, τη μείωση και την αντιμετώπιση της ρύπανσης και των παραγόμενων αποβλήτων (Buyukgungor & Gurel, 2009).

Σύμφωνα με στοιχεία της Ευρωπαϊκής Επιτροπής, 6 τόνοι εκ του συνόλου των 16 τόνων χρησιμοποιούμενων υλικών ανά άτομο, μετατρέπονται σε απόβλητα στην επικράτεια της ΕΕ. Συγκεκριμένα, αναφέρεται πως το 2010 τα παραγόμενα απόβλητα έφτασαν τους 2.5 δισεκατομμύρια τόνους. Το 36% του συνόλου ανακυκλώθηκε, ενώ το υπόλοιπο 64% είτε αποτεφρώθηκε είτε ενσωματώθηκε στο έδαφος.

Διαφαίνεται, συνεπώς, πως προκύπτουν τεράστιες ποσότητες αποβλήτων που μένουν αναξιοποίητες, προκαλώντας ποικίλα προβλήματα τόσο στο περιβάλλον, όσο και στην υγεία του ανθρώπου (European Commission (EC), 2017b). Το 2014 σημειώθηκε η μεγαλύτερη παραγωγή αποβλήτων για το χρονικό διάστημα μεταξύ 2004 και 2014, ανερχόμενη σε 2,503 εκατομμύρια τόνους (Eurostat, 2017). Στην Εικόνα 1 που ακολουθεί, εμφανίζονται τα ποσοστά των παραγόμενων αποβλήτων επί του συνόλου, όλων των οικονομικών δραστηριοτήτων και των νοικοκυριών κατά το έτος 2014 στην επικράτεια της ΕΕ.



Εικόνα 1 Παραγωγή συνολικών αποβλήτων στην ΕΕ-28 το έτος 2014. (Eurostat, 2017)

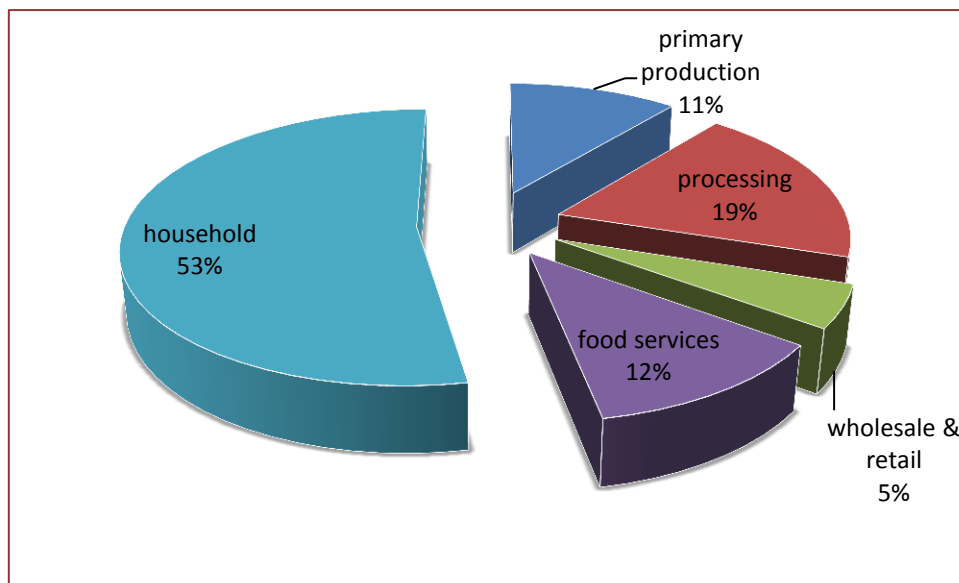
2.1 Απόβλητα τροφίμων

Ο τομέας των τροφίμων και τα απόβλητα που προέρχονται από αυτόν, χρήζουν ιδιαίτερης προσοχής αφού συνδέονται άμεσα με την υγεία του ανθρώπου (ασφάλεια τροφίμων), με το φυσικό περιβάλλον (ενέργεια, νερό, φυσικοί πόροι, κλιματική αλλαγή κ.ά.), αλλά και με το ευρύτερο οικονομικό (τιμολογιακές διακυμάνσεις, διαχείριση αποβλήτων, αποδοτικότητα πόρων, κατανάλωση, αγορές κ.ά.) και κοινωνικό περιβάλλον (υγεία, ισότητα, επάρκεια τροφίμων κ.ά.) (Fusions, 2016).

Το έτος 2012 τα απόβλητα τροφίμων στην ευρωπαϊκή επικράτεια των 28 Κ-Μ ανήλθαν σε περίπου 88 εκατομμύρια τόνους, το κόστος των οποίων έχει εκτιμηθεί στα 143 δισεκατομμύρια ευρώ. Το μέγεθος αυτό ισοδυναμεί με 173 κιλά τροφίμων ανά άτομο. Η ετήσια παραγωγή τροφίμων το 2011 έφτασε τα 865 κιλά ανά άτομο. Προκύπτει, λοιπόν, πως το 20% περίπου των παραγόμενων τροφίμων μετατρέπεται σε απόβλητα (Fusions, 2016). Για την εξαγωγή των στοιχείων αυτών, στα απόβλητα τροφίμων έχουν συμπεριληφθεί τρόφιμα και μη edώδιμα αγαθά σχετικά με τα τρόφιμα των εξής τομέων:

- Πρωτογενής παραγωγή (primary production)
- Δευτερογενής παραγωγή (processing)
- Χονδρική, logistics, μεταπώληση, λιανική (wholesale and logistics combined with retail and markets)
- Υπηρεσίες τροφίμων (food services)
- Νοικοκυριά (household)

Η διάρθρωση των αποβλήτων ανά τομέα για το 2012 φαίνεται στην Εικόνα 2 που ακολουθεί.



Εικόνα 2 Απόβλητα τροφίμων ανά τομέα στην ΕΕ-28 για το έτος 2012. (Fusions, 2016)

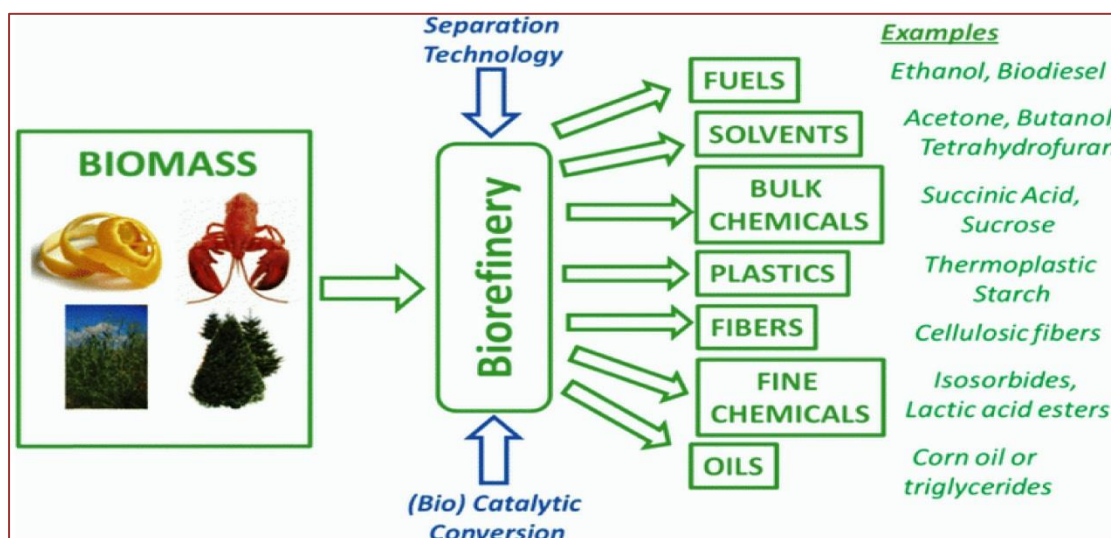
Όπως φαίνεται από την Εικόνα 2 το μεγαλύτερο μέρος των αποβλήτων τροφίμων προέρχεται από τα νοικοκυριά αποτελώντας περισσότερο από το 50% του συνόλου. Ακολουθεί ο τομέας επεξεργασίας και τυποποίησης με 19% και οι υπηρεσίες τροφίμων με 12%. Τέλος, τα απόβλητα που προέρχονται από την παραγωγική διαδικασία και από τις αγορές χονδρικής και λιανικής αποτελούν μόλις το 16% του συνόλου των αποβλήτων τροφίμων.

Στοιχεία του διεθνή οργανισμού τροφίμων (Food and Agricultural Organisation (FAO), 2011), έδειξαν πως σχεδόν το 1/3 των τροφίμων που παράγονται για ανθρώπινη κατανάλωση χάνονται ή μετατρέπονται σε απόβλητα σε παγκόσμια κλίμακα. Αυτομάτως συμπεραίνεται πως μεγάλες ποσότητες φυσικών πόρων χρησιμοποιούνται επί ματαιώ και επίσης τα αντίστοιχα αέρια του θερμοκηπίου που απελευθερώνονται στο περιβάλλον δεν έχουν κάποιο αντίκρισμα.

Σύμφωνα με τους Koester, Empen και Holm (2013), η απώλεια και τα απόβλητα τροφίμων (Food Losses and Wastes, FLW) οφείλονται σε πληθώρα παραγόντων. Οι βασικότεροι είναι η ανεπαρκής τεχνολογία, οι προτιμήσεις των πελατών, τα υψηλά επίπεδα του κόστους ευκαιρίας, η παγκοσμιοποίηση, το μορφωτικό επίπεδο, τα υψηλά κόστη συναλλαγής και άλλοι κοινωνικοί λόγοι.

Είναι, συνεπώς, πασιδήλη η αναγκαιότητα για σωστή διαχείριση και μείωση των αποβλήτων γενικότερα και των αποβλήτων τροφίμων ειδικότερα, προκειμένου να διασφαλιστεί η προστασία της υγείας του ανθρώπου και του περιβάλλοντος, καθώς επίσης και η αειφορία και η επάρκεια των φυσικών πόρων. Ιδιαίτερη προσοχή θα πρέπει να δίνεται σε όλους τους παράγοντες που προαναφέρθηκαν, προκειμένου η αντιμετώπιση του προβλήματος να είναι ουσιαστική και μακροχρόνια.

Ένας τρόπος αξιοποίησης των αποβλήτων είναι η λειτουργία βιοδιυλιστηρίων στα πλαίσια της κυκλικής οικονομίας και της διατήρησης της αειφορίας. Με τη χρήση βιοδιυλιστηρίων, πρώτες ύλες πολύ χαμηλού ή ακόμη και αρνητικού κόστους δύνανται να αξιοποιηθούν προς παραγωγή προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας (Εικόνα 3).



Εικόνα 3 Σχεδιαγραμματική απεικόνιση βιοδιυλιστηρίου. (Gameiro, 2016)

Όπως θα συζητηθεί και παρακάτω, μέσω της αξιοποίησης αποβλήτων και άλλων πρώτων υλών από μικροβιακούς πληθυσμούς, είναι δυνατό να παραχθούν βιομάζα και άλλα μεταβολικά προϊόντα που περαιτέρω επεξεργασία τους δίδει προϊόντα υψηλής προστιθέμενης αξίας. Παραδείγματα τέτοιων προϊόντων, όπως φαίνεται και στην Εικόνα 3, είναι τα βιοκαύσιμα, οι διαλύτες, τα βιοπολυμερή κ.ά.

2.2 Σιρόπι γλυκόζης

Αναφέρεται πως πίσω στο 1870 είχαν ήδη δημιουργηθεί οι πρώτες βιομηχανίες παρασκευής σιροπιών γλυκόζης στην Γαλλία και την Γερμανία. Τα σιρόπια αυτά

χρησιμοποιούνταν κυρίως στην οينو-ζυθοποιεία. Με την πάροδο των χρόνων, επήλθαν βελτιώσεις στην τεχνολογία παραγωγής των σιροπιών, οι οποίες βοήθησαν στην εξέλιξη του κλάδου που έως τα τέλη του 20^{ου} αιώνα μπορούσε να παρέχει σιρόπια γλυκόζης με ιδιαίτερα χαρακτηριστικά, προσαρμοσμένα στις ανάγκες των εκάστοτε πελατών (Wood & O'Rourke, 1995).

Το σιρόπι γλυκόζης προκύπτει από την υδρόλυση του αμύλου προς μίγματα πολυμερών D-γλυκόζης. Η υδρόλυση μπορεί να είναι είτε όξινη, είτε ενζυμική. Η όξινη υδρόλυση μπορεί να δώσει σιρόπια έως περίπου 42 DE¹. Για σιρόπια με 55 DE και άνω πραγματοποιείται ενζυμική υδρόλυση καθώς με την όξινη παράγονται ουσίες που αλλοιώνουν τη γλυκύτητα (π.χ. ισομαλτόζη και τρεχαλόζη). Ο βαθμός DE μπορεί γενικά να κυμαίνεται από 20 έως 95. (Hull, 2010)

Στα σιρόπια γλυκόζης συμπεριλαμβάνονται διάφορα μίγματα με διαφορετικές αναλογίες γλυκόζης/φρουκτόζης. Όσο περισσότερη η ποσότητα της φρουκτόζης, τόσο περισσότερη γλυκύτητα προσδίδεται στη γεύση του σιροπιού. Οι διάφορες συστάσεις σιροπιών περιγράφονται από έναν κοινό όρο, αυτόν της ισογλυκόζης. Η πιο γνωστή είναι η HFS (High Fructose Syrup) 55 (55% φρουκτόζη, 42% γλυκόζη, 3% άλλα σάκχαρα) που χρησιμοποιείται κυρίως στα αναψυκτικά. (National Farming Union (NFU), 2017)

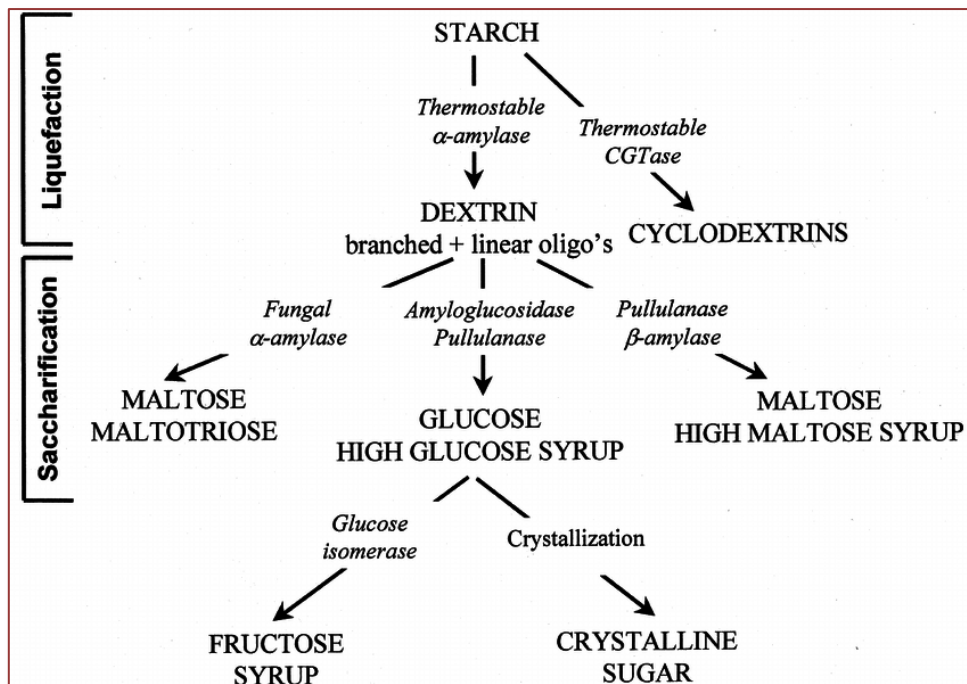
Η σύνθεση της ισογλυκόζης φαίνεται στον Πίνακα 1 που ακολουθεί. (Hobbs, 2009)

¹ DE: Dextrose equivalence. Τα Ισοδύναμα Δεξτρόζης αποτελούν μέτρο των αναγόντων σακχάρων σε μόρια D-γλυκόζης επί ξηρού βάρους. (Hull, 2010)

Πίνακας 1 Σύνθεση γλυκαντικών προερχόμενων από την υδρόλυση του αμύλου. **DP₁**: μονοσακχαρίτες (δεξτρόζη, δεξτρόζη + φρουκτόζη σε **HFS**, φρουκτόζη σε κρυσταλλική φρουκτόζη), **DP₂**: δισακχαρίτες (κυρίως μαλτόζη), **DP₃**: τρισακχαρίτες (κυρίως μαλτοτριόζη), **DP₄₊**: ολιγοσακχαρίτες (μαλτοτερόζη + ανώτερα σάκχαρα), **HM**: High maltose, **(IE)**: Ion-exchanged. (Hobbs, 2009)

Designation	Ash	Saccharides, carbohydrate basis			
		DP ₁	DP ₂	DP ₃	DP ₄₊
28 DE	0.3	8	8	11	73
36 DE	0.3	14	11	10	65
34 HM	0.3	9	34	24	33
43 HM	0.3	9	43	18	30
43 DE	0.3	19	14	12	55
43 DE (IE)	0.03	19	14	12	55
53 DE	0.3	28	18	13	41
63 DE	0.3	36	31	13	20
63 DE (IE)	0.03	36	31	13	20
66 DE	0.3	40	35	8	17
95 DE	0.3	95	3	0.5	1.5
95 DE (IE)	0.03	95	3	0.5	1.5
HFCS 42	0.03	95	3	0.7	1.3
HFCS 55	0.05	95.7	3	0.4	0.9
Crystalline fructose	0.05	100			

Η διαδικασία παραγωγής του σιροπιού γλυκόζης και άλλων προϊόντων που προκύπτουν από την υδρόλυση του αμύλου (κυκλοδεξτρίνες, μαλτοδεξτρίνες, σιρόπι φρουκτόζης και κρυσταλλική ζάχαρη) απεικονίζεται παρακάτω (Εικόνα 4). Η περισσότερο χρησιμοποιούμενη πρώτη ύλη για την παραγωγή σιροπιών είναι ο αραβόσιτος. Μπορούν, ωστόσο, κάλλιστα να χρησιμοποιηθούν κι άλλες πηγές αμύλου όπως τα σιτηρά και οι πατάτες. (Zimmer, 2013)

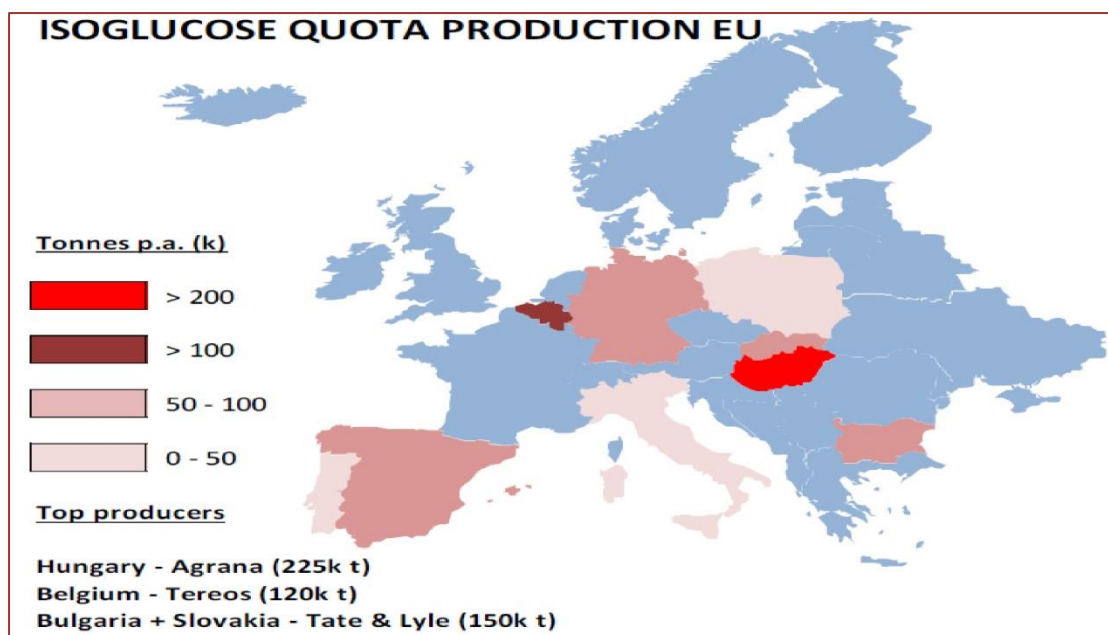


Εικόνα 4 Διαδικασία βιομηχανικής παραγωγής σιροπιού γλυκόζης. (Maarel, Veen, Uitdehaag, Leemhuis, & Dijkhuizen, 2001)

Σύμφωνα με τον Jackson (1995) τα σιρόπια γλυκόζης χρησιμοποιούνται κυρίως ως:

- Βελτιωτικά οργανοληπτικών ιδιοτήτων τροφίμων και ιδιαίτερα ως γλυκαντικές ουσίες
- Συντηρητικά, καθώς μέσω της υψηλής ωσμωτικής πίεσης που προκαλούν, παρεμποδίζουν τις μικροβιακές προσβολές
- Πηγή υδατανθράκων για τη διατροφή του ανθρώπου
- Πηγές ενέργειας

Όπως αναδεικνύεται και στην Εικόνα 5 που ακολουθεί, οι κυριότερες παραγωγές χώρες ισογλυκόζης στην Ευρώπη είναι οι Ουγγαρία, Βουλγαρία και Σλοβακία, ενώ το Βέλγιο αποτελεί τη βασικότερη χώρα που την επεξεργάζεται (NFU, 2017).



Εικόνα 5 Παραγωγή ισογλυκόζης στην Ευρώπη. (NFU, 2017)

Όσον αφορά στο κόστος της ισογλυκόζης, αυτό είναι άρρηκτα συνδεδεμένο με τις τιμές του αραβοσίτου και της ζάχαρης, αλλά και με την ύπαρξη εργοστασίων για την παραγωγή της (NFU, 2017).

Σύμφωνα με την Ευρωπαϊκή Επιτροπή (EC, 2017a) η συνολική παραγωγή της ζάχαρης στην Ευρώπη για το έτος 2014/2015 ανήλθε σε 2.663.245,2 τόνους, ενώ της ισογλυκόζης σε 77.659,0 τόνους. Το επόμενο οικονομικό έτος (2015/2016) παρατηρείται μείωση στην παραγωγή ζάχαρης που έφτασε τους 926.845 τόνους και ταυτόχρονη αύξηση στην παραγόμενη ποσότητα ισογλυκόζης, που ανήλθε σε 119.690 τόνους.

Αξιοσημείωτο είναι επίσης το γεγονός πως η αύξηση της τιμής του αραβόσιτου προκαλεί αύξηση στην τιμή της ισογλυκόζης, η οποία το 2015 έφτασε να είναι υψηλότερη από της ζάχαρης (Πίνακας 2).

Πίνακας 2 Κόστος παραγωγής ισογλυκόζης & σύγκριση τιμών με τον αραβόσιτο και τη ζάχαρη για τα έτη 2013-2016. (NFU, 2017)

ISOGLUCOSE COST CARD 1t Isoglucose	MAIZE PRICE EUR / t			
Maize price (EUR / tonne)	€ 90.00	€ 120.00	€ 150.00	€ 180.00
Raw material cost (net of by-product income)	€ 78.02	€ 109.56	€ 141.10	€ 172.64
Production cost	€ 260.00	€ 260.00	€ 260.00	€ 260.00
Total production cost	€ 354.92	€ 388.04	€ 421.16	€ 454.27
Price (incl 8% mark-up)	€ 383.31	€ 419.08	€ 454.85	€ 490.61
Current EU sugar price	€ 453.00	€ 453.00	€ 453.00	€ 453.00
1.66 tonnes of maize makes 1 tonne of isoglucose				

Παρ' όλο που η ισογλυκόζη φαίνεται να διεκδικεί δυναμικά ένα μερίδιο στην αγορά γλυκαντικών, τίθεται σε σημαντικούς περιορισμούς. Σημειώνεται πως στην Ευρώπη έχει τεθεί ποσόστωση περί τους 700,000 τόνους στην παραγωγή της ισογλυκόζης ή στο 4% περίπου στην Ευρωπαϊκή αγορά σακχάρων/γλυκαντικών. Η θέση της ισογλυκόζης στην Ευρωπαϊκή αγορά δεν είναι ακόμη καθορισμένη (EC, 2015).

Στα πλαίσια της παρούσας μελέτης, εξετάζεται η χρήση του σιροπιού γλυκόζης ως πηγής ενέργειας σε μικροβιακές ζυμώσεις. Σύμφωνα με τον Hull (2010), οι βιομηχανίες ζυμώσεων χρησιμοποιούν κατά κύριο λόγο μελάσσες και σιρόπια γλυκόζης ως πηγές άνθρακα. Οι βασικοί παράγοντες που λαμβάνονται υπόψη για την επιλογή του υποστρώματος της ζύμωσης είναι οι εξής:

- Τι μπορεί ο μικροοργανισμός να καταναλώσει
- Διαθεσιμότητα της πηγής άνθρακα
- Κόστος της πηγής άνθρακα
- Απόδοση
- Ανάκτηση & καθαρισμός του τελικού προϊόντος
- Δυνατότητα απόρριψης παραγόμενων αποβλήτων

Ως προς τις παραμέτρους αυτές, το σιρόπι γλυκόζης αποτελεί μια πολύ καλή πηγή άνθρακα. Αποτελεί ένα ζυμώσιμο προϊόν απαλλαγμένο από ιόντα, χαμηλής περιεκτικότητας σε μεταλλικά στοιχεία και επίσης καλού χρώματος. Τα χαρακτηριστικά του αυτά κάνουν τη μεταχείριση των τελικών προϊόντων της ζύμωσης ευκολότερη και οικονομικότερη σε σχέση με τα αντίστοιχα της μελάσσας (Hull, 2010).

Σύμφωνα με τον Hull (2010) ζυμώσεις που χρησιμοποιούν ως υπόστρωμα σιρόπια γλυκόζης, αφορούν κυρίως στους εξής τομείς:

- Φαρμακευτική (π.χ. αντιβιοτικά)
- Παραγωγή ενζύμων (π.χ. αμυλάσες, πουλουλανάση και ισομεράση)
- Προϊόντα που χρησιμοποιούνται στην παραγωγή τροφίμων (π.χ. μέσα οξίνισης όπως κιτρικό και γαλακτικό οξύ, ζύμες αρτοποιίας και αμινοξέα)
- Παραγωγή βιομηχανικών προϊόντων (π.χ. βιοπολυμερή, κόμμι ξανθάνης και σκόνης ψησίματος)
- Ζυθοποιία

2.3 Βιοκαύσιμα & μικροβιακά έλαια

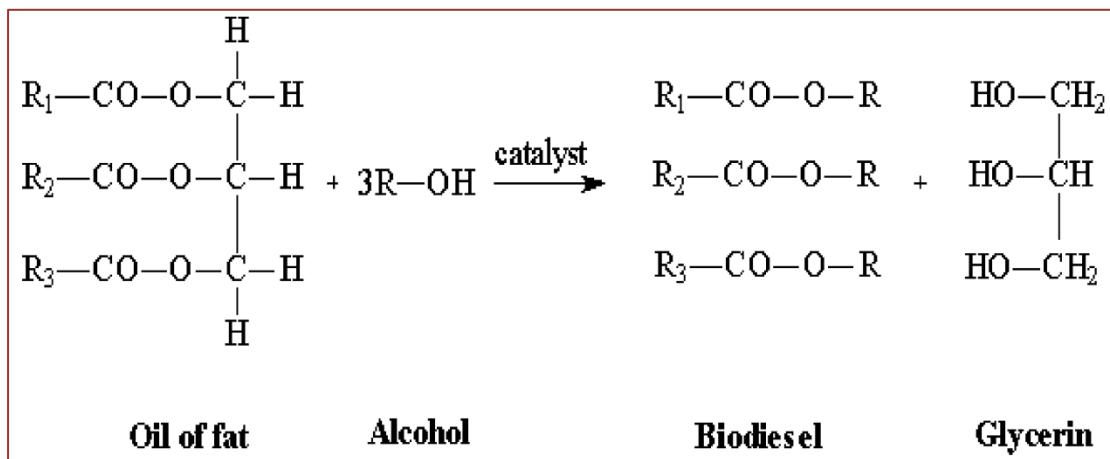
Η πρώτη αναφορά σε χρήση φυτικών ελαίων ως βιοκαύσιμα χρονολογείται πίσω στο 1900, όταν για πρώτη φορά παρουσιάστηκε στην Παγκόσμια Έκθεση Παρισιού (Paris World Exposition) μία μηχανή εσωτερικής καύσης (ντιζελομηχανή) που χρησιμοποιούσε ως καύσιμο το αραχιδέλαιο. Μεγαλύτερο ενδιαφέρον ως προς τη χρήση βιοκαυσίμων άρχισε να εκδηλώνεται μετά το 1920 από κάποιες ευρωπαϊκές χώρες, καθώς επίσης και από χώρες όπως οι Βραζιλία, Κίνα και Ινδία. Οι επερχόμενες ενεργειακές κρίσεις του 1970 και 1980 πυροδότησαν το παγκόσμιο πια ενδιαφέρον για την ανεύρεση ανανεώσιμων πηγών ενέργειας. Με τη βοήθεια συμπληρωματικών ενεργειών πολλών χωρών ως προς τα νομοθετικά πλαίσια για την παραγωγή του βιοντίζελ, η κατάσταση διαμορφώθηκε όπως είναι γνωστή σήμερα (Hou & Shaw, 2008; Knothe, 2001).

Όπως προφητικά δήλωσε ο Rudolf Diesel το 1912 (Knothe, Krahl, & Gerpen, 2010):

“The fact that fat oils from vegetable sources can be used may seem insignificant today, but such oils may perhaps become in course of time of the same importance as some natural mineral oils and the tar products are now.”

(Μετάφρ.: «Το γεγονός πως έλαια φυτικής προελεύσεως μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως καύσιμα μπορεί να φαίνεται ασήμαντο σήμερα, όμως με την πάροδο του χρόνου μπορεί να αποκτήσουν την ίδια σημασία που σήμερα έχουν το πετρέλαιο και το κάρβουνο.»)

Η βιοαιθανόλη και το βιοντίζελ αποτελούν τα δύο κυριότερα βιοκαύσιμα. Η ζήτησή τους καταγράφει ραγδαία ανοδική τάση τα τελευταία χρόνια καθώς παράγονται από ανανεώσιμες πηγές ενέργειας και συνεπώς αποτελούν πιο φιλική προς το περιβάλλον επιλογή σε σύγκριση με τα συμβατικά καύσιμα. Η παραγωγή βιοντίζελ προκύπτει από την μετεστεροποίηση ή εστεροποίηση με μικρού μήκους αλκοολικές αλυσίδες ελαίων φυτικής ή ζωικής προέλευσης, ή ακόμη και ελαίων προερχόμενων από απόβλητα (Εικόνα 6). Καταγράφει δε πολύ μικρότερες ποσότητες εκπομπών αερίου του θερμοκηπίου σε σχέση με τα συμβατικά καύσιμα, ενώ το ισοζύγιο διοξειδίου του άνθρακα και του θείου που προκύπτει είναι μηδενικό (Kitcha & Cheirsilp, 2011; Knothe, 2001; Li, Du, & Liu, 2008; Papanikolaou & Aggelis, 2011a, 2011b).

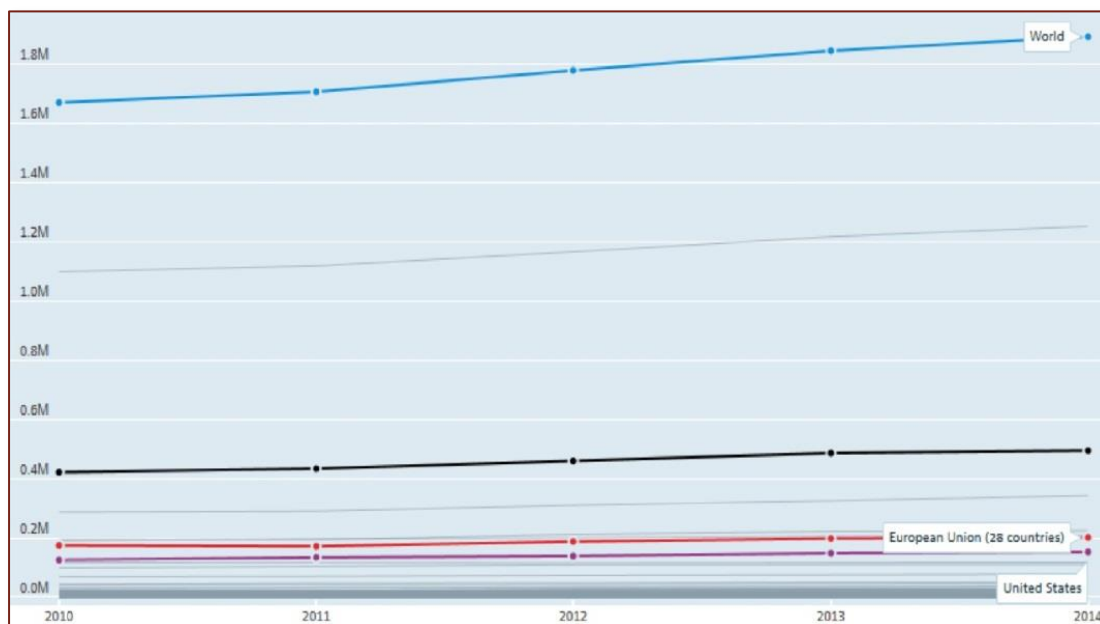


Εικόνα 6 Αντίδραση παραγωγής βιοντίζελ. (Garba, Alhassan, & Kovo, 2006)

Ενδεικτικά, αναφέρεται πως σε βάθος μιας τετραετίας, από το 2010 έως το 2014, η προσφορά ανανεώσιμων πηγών ενέργειας αυξήθηκε από 173,814.872 toe² σε

² toe: tons oil equivalent.

201,282.998 toe στην επικράτεια της Ευρωπαϊκής Ένωσης. Αυξητική ήταν η τάση και για τις ΗΠΑ με 125,256.236 toe το 2010 και 152,314.948 toe το 2014. (Εικόνα 7) (OECD, 2017)



Εικόνα 7 Πορεία προσφοράς ανανεώσιμων πηγών ενέργειας για την περίοδο 2010-2014. (OECD, 2017)

Αυξητικές είναι και οι τάσεις παραγωγής του βιοντίζελ συγκεκριμένα, καθώς προβλέπεται να αυξάνεται κατά 27% περίπου σε σχέση με το 2014, φτάνοντας τα 39 δισεκατομμύρια L μέχρι το 2024 σε παγκόσμια κλίμακα (OECD/FAO, 2015).

Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός πως οι αυξητικές τάσεις της παραγωγής βιοντίζελ παρατηρούνται και σε αναπτυσσόμενες χώρες όπως οι Αργεντινή, Βραζιλία, Ινδονησία, Κίνα και Μαλαισία (Li *et al.*, 2008).

Ο Adrio (2017) αναφέρει πως η συνεχώς αυξανόμενη ζήτηση για βιοντίζελ πρόκειται να προκαλέσει αύξηση έως και 20% της παραγωγής ελαιούχων σπόρων εντός των επόμενων ετών. Υπάρχουν ωστόσο πολλοί ανασταλτικοί παράγοντες, όπως η περιορισμένη γεωργική γη και το συνεχώς μεταβαλλόμενο φυσικό και κανονιστικό περιβάλλον.

Σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη της βιομηχανίας βιοκαυσίμων από τις αρχές του 21^{ου} αιώνα έχουν συντελέσει οι Ευρωπαϊκές νομοθεσίες, οι οποίες προάγουν την

παραγωγή τους θέτοντας στο επίκεντρο θέματα συμμόρφωσης σχετικά με την προστασία του περιβάλλοντος και τη διατήρηση της αειφορίας. Τρεις από τις πιο σημαντικές ευρωπαϊκές οδηγίες με θέμα τις ανανεώσιμες πηγές ενέργειας παρατίθενται στο Γράφημα 1 που ακολουθεί.

Renewable Energy Directive 2009/28/EC (RED)

Παροχή του 20% των ενεργειακών αναγκών της Ε.Ε. μέσω ανανεώσιμων πηγών έως το 2020. τουλάχιστον το 10% της ενέργειας που χρησιμοποιείται για μεταφορές θα πρέπει να καλύπτεται από ανανεώσιμες πηγές ενέργειας σε κάθε κ-μ. (Ισχύς από το 2009)

Fuel Quality Directive 2009/30/EC (FQD)

Μείωση των εκπομπών αερίων του θερμοκηπίου που προέρχονται από τα καύσιμα μεταφορών έως το 2020.

ILUC Directive (EU)2015/1513

Τροποποιεί τις RED και FQD, θίγοντας την πιθανότητα της επιδείνωσης του φαινομένου του θερμοκηπίου λόγω αλλαγής χρήσης της γης (Indirect Land-Use Change). Θέσπισε καπέλο 7% στη χρήση ανανεώσιμων πηγών ενέργειας στους τομείς μεταφοράς, που προέρχονται από αροτραίες καλλιέργειες. (Ισχύς από το 2015)

Γράφημα 1 Ευρωπαϊκές οδηγίες για τη χρήση ανανεώσιμων πηγών ενέργειας έως το 2020. (EC, 2016)

Η χρήση ανανεώσιμων πηγών ενέργειας θα συνεχίσει να καθοδηγείται από νομοθετικά πλαίσια, καθώς τα παρόντα αναμένεται να αντικατασταθούν από νέα με στόχους έως το 2030 για περαιτέρω μείωση των εκπομπών αερίων του θερμοκηπίου (EC, 2016).

Η αυξανόμενη ζήτηση βιοκαυσίμων, θέτει στο επίκεντρο ζητήματα σχετικά με το συνεπακόλουθο αυξανόμενο κόστος ανταγωνιστικών προϊόντων των συμβατικών χρησιμοποιούμενων πρώτων υλών (π.χ. τροφίμων που προκύπτουν από φυτά τα οποία χρησιμοποιούνται και για την παραγωγή βιοντίζελ). Ενέχεται, επιπλέον, και το

ηθικό θέμα του ανταγωνισμού των καλλιεργούμενων εκτάσεων που προορίζονται για παραγωγή βιοντίζελ αντί παραγωγής τροφίμων (Papanikolaou & Aggelis, 2011b; Wang, Wang, Xu, Fang, & Liu, 2014).

Εμφανίζει, λοιπόν, ιδιαίτερο ενδιαφέρον η ανεύρεση νέων ανανεώσιμων πηγών λίπους, το οποίο θα μπορεί να χρησιμοποιηθεί στην παραγωγή 2^{ης} και 3^{ης} γενιάς βιοντίζελ, χωρίς να χρειάζεται να δεσμεύονται αροτραίες εκτάσεις. Ως τέτοιες πηγές μπορούν να χαρακτηριστούν πολυάριθμοι μικροοργανισμοί που έχουν τη δυνατότητα να συνθέτουν λιπίδια διαφόρων δομών. Οι μικροοργανισμοί αυτοί καλούνται ελαιογόνοι, εφόσον παρουσιάζουν λιποσυσσώρευση σε ποσοστό τουλάχιστον 20% επί της ξηρής τους βιομάζας, και αφορούν κυρίως σε ζύμες, μύκητες και μικροάλγη, αλλά και σε βακτήρια σε πολύ μικρότερο εύρος (Papanikolaou & Aggelis, 2011b).

Στον Πίνακα 3 που ακολουθεί παρουσιάζονται κάποιοι από τους σημαντικότερους ελαιογόνους μικροοργανισμούς.

Πίνακας 3 Ελαιογόνοι μικροοργανισμοί (Προσαρμογή από: Αγγελής, 2007; Kitcha & Cheirsilp, 2011; Muniraj et al., 2015)

	Μικροοργανισμοί	Λιποπεριεκτικότητα (% ξ. β.)
Μικροφύκη	<i>Botryococcus braunii</i>	25–75
	<i>Chlorella</i> sp.	28–32
	<i>Cryptocodinium cohnii</i>	20
	<i>Cylindrotheca</i> sp.	16–37
	<i>Dunaliella primolecta</i>	23
	<i>D. salina</i>	47
	<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>Spirulina platensis</i>	20
<i>Tetraselmis suecica</i>	15–23	
Ζύμες	<i>Candida curvata</i>	51-58
	<i>C. paralipolytica</i>	32
	<i>C. spp. 107</i>	42
	<i>Chlorella</i> sp.	28–32
	<i>Cylindrotheca</i> sp.	16–37
	<i>Lipomyces</i> sp.	70
	<i>Rhodospiridium</i> sp.	70
	<i>Rhodotorula glutinis</i>	72
	<i>R. graminis</i>	41
<i>Yarrowia lipolytica</i>	36	
Μύκητες	<i>Absidia spinosa</i>	30
	<i>Aspergillus oryzae</i>	57
	<i>Entomophthora conica</i>	38
	<i>E. coronata</i>	47
	<i>E. obscura</i>	34
	<i>Fusarium oxysporum</i>	51
	<i>Humicola lanuginosa</i>	75
	<i>Mortierella isabellina</i>	86
	<i>M. vinacea</i>	66
	<i>Mucor circinelloides</i>	65-73
	<i>Penicillium spinulosum</i>	64
<i>Rhizopus arrizus</i>	49	
Βακτήρια	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	27–38
	<i>Arthrobacter</i> sp.	>40
	<i>Bacillus alcalophilus</i>	18–24
	<i>Rhodococcus opacus</i>	24–25

Οι ανωτέρω μικροοργανισμοί έχουν την ικανότητα να συσσωρεύουν ενδοκυτταρικά λιπίδια ως τριακυλ-γλυκερόλες (TAGs), τα λεγόμενα μονοκυτταρικά μικροβιακά έλαια (Single Cell Oils, SCO), των οποίων η σύσταση ομοιάζει με εκείνη των φυτικών ελαίων. Τα μικροβιακά λίπη που παράγονται από ετερότροφους μικροοργανισμούς, δύνανται να παράγονται σε πολύ μικρότερους χώρους και χρόνους σε σχέση με τους αντίστοιχους των φυτικής προέλευσης ελαίων. Το βασικό

τους μειονέκτημα είναι το αυξημένο κόστος των πρώτων υλών που απαιτούνται για την παραγωγή τους, καθώς επίσης και η διατήρηση ασηπτικών συνθηκών και το κόστος καθεαυτό της ζύμωσης (Kitcha & Cheirsilp, 2011; Muniraj *et al.*, 2015; Koutinas, Chatzifragkou, Kopsahelis, Papanikolaou, & Kookos, 2014; Ratledge & Cohen, 2008).

Διαφαίνεται συνεπώς η επιτακτική ανάγκη ανεύρεσης νέων πηγών χαμηλότερου ή/και αρνητικού κόστους για την αξιοποίηση αυτής της ικανότητας των εν λόγω μικροοργανισμών. Τέτοια υποστρώματα μπορεί να αποτελέσει πληθώρα παραπροϊόντων ή/και αποβλήτων της βιομηχανίας τροφίμων, τα οποία εμπεριέχουν αμελητέο ή ακόμη και αρνητικό κόστος. Παραδείγματα αποβλήτων που έχουν χρησιμοποιηθεί στη βιβλιογραφία ως πρώτες ύλες με ικανοποιητικά αποτελέσματα ως προς την παραγωγή μικροβιακού λίπους είναι τα εξής:

Πίνακας 4 Πρώτες ύλες για την παραγωγή μονοκυτταρικών λιπιδίων.

Απόβλητο	Πηγή
Υδρολύματα αμύλου	Li <i>et al.</i> , 2008
Άμυλο γλυκοπατάτας	
Υδρολύματα άχυρου ρυζιού	Muniraj <i>et al.</i> , 2015
Τυρόγαλα	
Πίτυρα σίτου	
Λυματολάσπη	
Γλυκερόλη	Wang <i>et al.</i> , 2014
Μελάσες ζαχαροκάλαμου	
Απόνερα γλουταμινικού νατρίου	
Ορός γάλακτος	
Κατσίγαρος	Sarris, Galiotou-Panayotou, Koutinas, Komaitis, & Papanikolaou, 2011; Yousuf, Sannino, Addorisio, & Pirozzi, 2010
Ακατέργαστα λίπη	Zhao, Kong, Hua, Feng, & Zhao, 2008
Έλαια πυρόλυσης	
Υπολείμματα καλλιέργειών	

2.3.1 Δομή & ρόλος των μονοκυτταρικών λιπιδίων

Τα λιπίδια μαζί με τις πρωτεΐνες και τους υδατάνθρακες, είναι οι τρεις σπουδαιότερες μακρομοριακές ενώσεις που απαντώνται στη φύση των μικροοργανισμών. Ο ρόλος των λιπιδίων στο μικροβιακό σύστημα είναι πολυποίκιλος. Αποτελούν τόσο δομικά όσο και λειτουργικά συστατικά των κυτταρικών μεμβρανών, καθώς χρησιμοποιούνται ως διάλυοι επικοινωνίας και ακόμη ως αποθησαυριστικά μέσα (Αγγελής, 2007; Muniraj *et al.*, 2015).

Τα φωσφο-λιπίδια αποτελούν το κύριο δομικό συστατικό των κυτταροπλασματικών μεμβρανών τόσο των προκαρυωτικών, όσο και των ευκαρυωτικών μικροοργανισμών και επιπροσθέτως βοηθούν στη μεταφορά πληροφοριών και ουσιών. Τα σφιγγολιπίδια εκτελούν παρόμοιες λειτουργίες με τα φωσφο-λιπίδια, απαντώνται όμως κυρίως στους ευκαρυώτες. Τέλος, τα γλυκο-λιπίδια λειτουργούν στα βακτηριακά κύτταρα, όπως οι στερόλες στα ευκαρυωτικά, οι οποίες αποτελούν το 25% περίπου των λιπιδίων των μεμβρανών. Όσον αφορά στους ευκαρυωτικούς μικροοργανισμούς, το λίπος τους αποτελείται κυρίως από τριγλυκερίδια που λειτουργούν ως αποθησαυριστικές ουσίες, ενώ τα πολικά λιπίδια μπορεί να αποτελούν λιγότερο από το 10% των συνολικών. (Αγγελής, 2007; Ageitos, Vallejo, Veiga-Crespo, & Villa, 2011)

Τα μονοκυτταρικά λιπίδια θεωρούνται πολύ σημαντικά καθώς αποτελούνται σε μεγάλο ποσοστό από πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (π.χ. γ-λινολενικό, αραχιδονικό και εικοσιπενταενοϊκό), τα οποία βρίσκουν ευρεία εφαρμογή στις βιομηχανίες τροφίμων, φαρμάκων και καλλυντικών. (Αγγελής, 2007; Ageitos *et al.*, 2011)

Ορισμένοι μικροοργανισμοί δύνανται να παράγουν λιπίδια τα οποία εμφανίζουν παρόμοια σύσταση και δομή με κάποιων «εξωτικών» λιπών όπως για παράδειγμα του λίπους του κακάο και της φάλαινας. Παρ' όλα αυτά η παραγωγή αυτού του είδους των λιπών αντιμετωπίζει κάποια εμπόδια. Επί παραδείγματι, το λίπος του κακάο επιτρέπεται να παράγεται από συγκεκριμένες μόνο χώρες. Επιπροσθέτως, κάποια ζωικά είδη που αποτελούν πηγές «εξωτικού» λίπους βρίσκονται υπό εξαφάνιση, καθιστώντας την εκμετάλλευσή τους αδύνατη. (Αγγελής, 2007; Ageitos *et al.*, 2011; Papanikolaou & Aggelis, 2011b)

2.3.2 Ελαιογόνες ζύμες

Οι ελαιογόνες ζύμες θεωρούνται ως οι κατ' εξοχήν ελαιογόνοι μικροοργανισμοί, παρουσιάζοντας ιδιαίτερο ενδιαφέρον και αποτελεσματικότητα ως προς την αξιοποίηση αποβλήτων προς παραγωγή λιπιδίων που μπορούν να αξιοποιηθούν για την παραγωγή 2^{ns} γενιάς βιοντίζελ. Το γεγονός αυτό οφείλεται στο ότι δύνανται να αξιοποιούν ποικίλα υδρόφιλα υποστρώματα για την ανάπτυξή τους, αναπτύσσονται σχετικά γρήγορα και επιπλέον χαρακτηρίζονται ως μη παθογόνοι μικροοργανισμοί (Generally Recognized As Safe, GRAS). Επιπροσθέτως, έχει παρατηρηθεί πως κάποια στελέχη ζυμών παράγουν λιπίδια των οποίων η σύσταση ομοιάζει με εκείνη

του λίπους του κακάο, εάν το μέσο της ζύμωσης ή η διεργασία υποστεί ειδικό «χειρισμό» (manipulation) (Papanikolaou, & Aggelis, 2010; Papanikolaou, & Aggelis 2011b; Ratledge, & Wynn, 2002). Λαμβάνοντας υπόψη την εξάντληση των αποθεμάτων και τη συνεπακόλουθη αύξηση της τιμής του βουτύρου κακάο, οι ζύμες αυτές φαίνεται να έχουν ιδιαίτερη σημασία (Αγγελής, 2007; Papanikolaou & Aggelis, 2011b; Zhu, Zong, & Wu, 2008).

Στα πλαίσια της αξιοποίησης ανανεώσιμων πρώτων υλών χαμηλού κόστους, σημειώνεται πως η απομάκρυνση ενός αποβλήτου της βιομηχανίας τροφίμων που πρόκειται να κομποστοποιηθεί κοστίζει περίπου \$ 0.1-0.3 ανά kg αποβλήτου. Είναι λοιπόν φανερό η συνεισφορά της παράλληλης αξιοποίησης αυτού του αποβλήτου για παραγωγή βιοντίζελ ή βουτύρου του κακάο, τόσο από οικονομικής όσο και από οικολογικής απόψεως (Papanikolaou & Aggelis, 2011b). Σημειώνεται πως προκειμένου τα έλαια των ζυμών να μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως πρώτες ύλες για παραγωγή βιοντίζελ, θα πρέπει να καταλυθούν είτε με τη βοήθεια λιπασών είτε με χημικούς καταλύτες (Li *et al.*, 2008).

Κατά την καλλιέργεια ζυμών για παραγωγή μονοκυτταρικών λιπιδίων, είναι αναγκαίο να λαμβάνονται υπόψη κάποιοι παράγοντες που μπορούν να επηρεάσουν τη λιποσυσσώρευση. Αρχικά αναφέρεται πως τόσο η ποσότητα όσο και το είδος της πηγής αζώτου που χρησιμοποιείται στο μέσο της καλλιέργειας προκαλούν μεταβολές στο παραγόμενο λίπος. Περιορισμός σε άζωτο στο μέσο της καλλιέργειας οδηγεί σε μεγαλύτερες ποσότητες ενδοκυτταρικού λίπους. Ανόργανες πηγές αζώτου ευνοούν την κυτταρική αύξηση αλλά όχι τη λιποσυσσώρευση, ενώ οργανικές πηγές αζώτου ευνοούν την παραγωγή λίπους αλλά όχι την παραγωγή βιομάζας (Li *et al.*, 2008).

Οι βέλτιστες αναλογίες των μεταλλικών ιόντων (Mg^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} και Ca^{2+}) είναι επίσης σημαντικές για την παραγωγή βιομάζας και λίπους. Το διαλυτό οξυγόνο είναι ένας ακόμη παράγοντας που μπορεί να επηρεάσει τη λιποσυσσώρευση και μάλιστα εμφανίζει ανάλογη σχέση με αυτήν. Τέλος, η θερμοκρασία και το pH θα πρέπει να διατηρούνται στις βέλτιστες τιμές τους ανάλογα με το στέλεχος που χρησιμοποιείται, προκειμένου να ευνοούν την κυτταρική αύξηση και την παραγωγή λίπους (Li *et al.*, 2008; Wang *et al.* 2005).

Τα τελευταία χρόνια δίδεται ιδιαίτερη προσοχή στη μελέτη πολλών ελαιογόνων ζυμών με την ταυτόχρονη εφαρμογή ή μη εργαλείων της γενετικής μηχανικής.

Κάποια είδη των γενών *Lipomyces* sp., *Rhodosporidium* sp., *Rhodotorula* sp. και το είδος *Yarrowia lipolytica* έχει δειχθεί πως μπορούν να συσσωρεύουν λίπος έως και 50% επί της ξηρής τους βιομάζας. Από τις πιο μελετημένες ζύμες είναι οι *Lipomyces starkeyi*, *Yarrowia lipolytica* και *Rhodosporidium toruloides* (Adrio, 2017; Papanikolaou & Aggelis, 2011b; Zhao *et al.*, 2008).

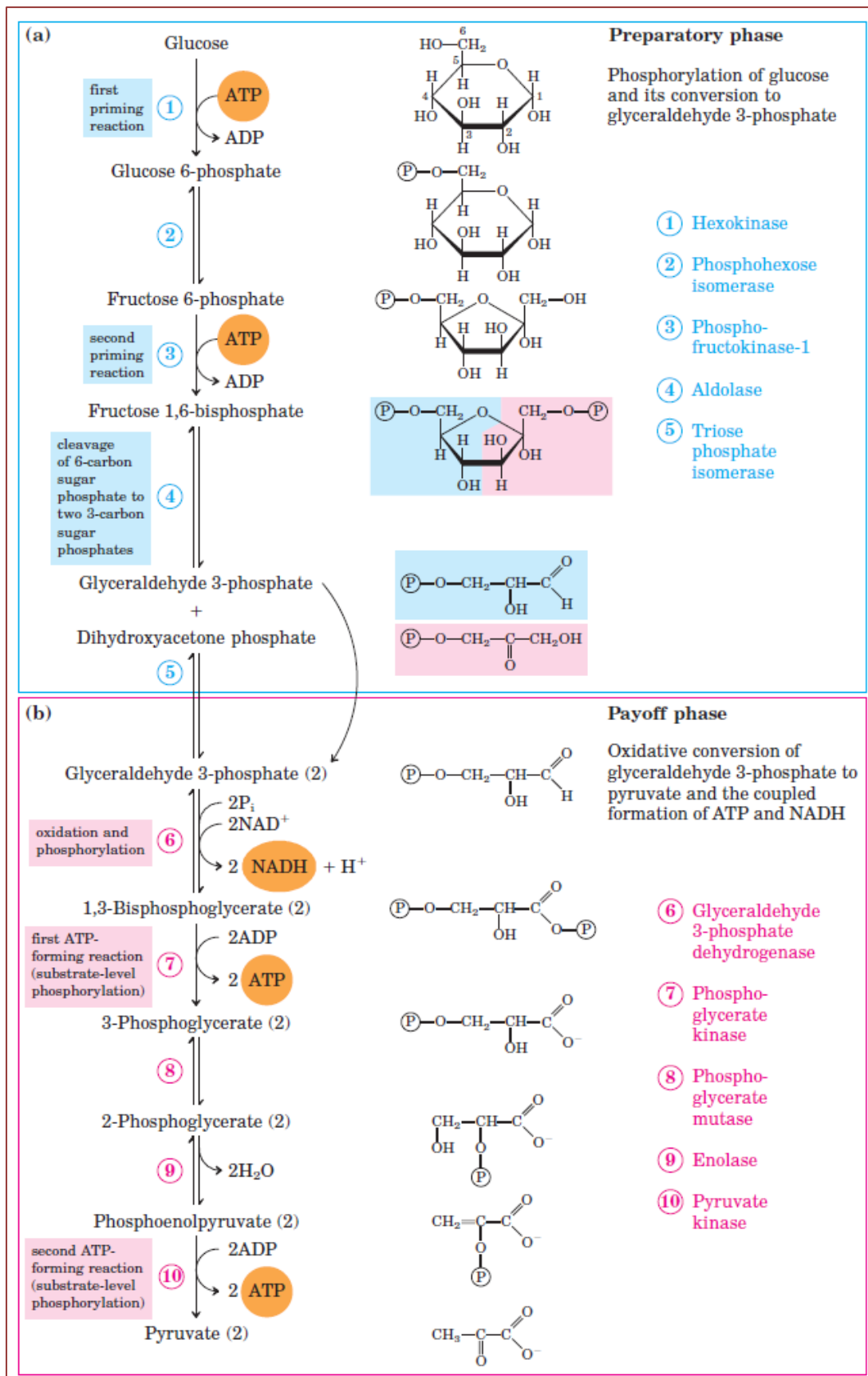
Η παρούσα μελέτη πραγματεύεται το μικροοργανισμό *L.starkeyi*. Τα κύτταρα της ζύμης αυτής είναι στρογγυλά και τα κυτταρικά τους τοιχώματα αποτελούνται κυρίως από μαννόζη, γαλακτόζη και γλυκουρονικό οξύ (Bonturi *et al.*, 2015). Φαίνεται να είναι μια πολλά υποσχόμενη ελαιογόνα ζύμη καθώς δύναται να μετατρέπει σε ενδοκυτταρικό λίπος πληθώρα υδρόφιλων υποστρωμάτων με αξιοσημείωτες αποδόσεις. Ενδεικτικά αναφέρεται πως κάποιες από τις πηγές άνθρακα στις οποίες η ανάπτυξη του *L.starkeyi* έχει μελετηθεί είναι οι γλυκόζη, ξυλόζη, φρουκτόζη, αραβινόζη, σακχαρόζη, γαλακτόζη, μαννόζη, κελλοβιόζη, καθώς και αρκετά απόβλητα της βιομηχανίας τροφίμων και βιοκαυσίμων, όπως μεταξύ άλλων η γλυκερόλη, μελάσες, κατσίγαρος, απόβλητα τυροκομείων και άλευρα, με αποδόσεις που κυμαίνονται περίπου από 20% έως και 70% λιποπεριεκτικότητα επί ξηρής βιομάζας (Angerbauer, Siebenhofer, Mittelbach, & Guebitz, 2008; Oguri, Masaki, Naganuma, & Iefuji, 2012; Tsakona *et al.*, 2014; Vieira, Jenczak, Rossel, Pradella, & Franco, 2014; Zhao *et al.*, 2008).

Οι αποδόσεις της ζύμης αυτής, έχει δειχθεί στη βιβλιογραφία πως εξαρτώνται κυρίως από το λόγο C/N που χρησιμοποιείται στο μέσο. Σύμφωνα με τους Angerbauer *et al.* (2008), κατά την αύξηση της ζύμης σε υπόστρωμα με λόγο C/N ίσο με 60 η λιποπεριεκτικότητα έφτασε στο 40%. Όταν ο λόγος αυξήθηκε στο 150, η ζύμη συσσωρεύσε λίπος σε επίπεδο πολύ υψηλότερο, 68% επί της ξηρής του βιομάζας. Παρατηρήθηκε, ωστόσο, πως με την αύξηση του λόγου C/N η παραγωγή βιομάζας μειωνόταν. Άλλοι παράγοντες όπως το pH και η θερμοκρασία κατά την καλλιέργεια επίσης επηρεάζουν τη λιποσυσσώρευση του *L.starkeyi*. Οι ιδανικές τιμές pH φαίνεται να βρίσκονται μεταξύ 5.0 και 7.5 (Angerbauer *et al.*, 2008). Τέλος, οι βέλτιστες θερμοκρασίες βρίσκονται μεταξύ 25.5 °C και 29.5 °C (Suutari, Rintamäki, & Laakso, 1996).

2.3.3 Μικροβιακός μεταβολισμός: Βιοχημεία λιποσυσσώρευσης

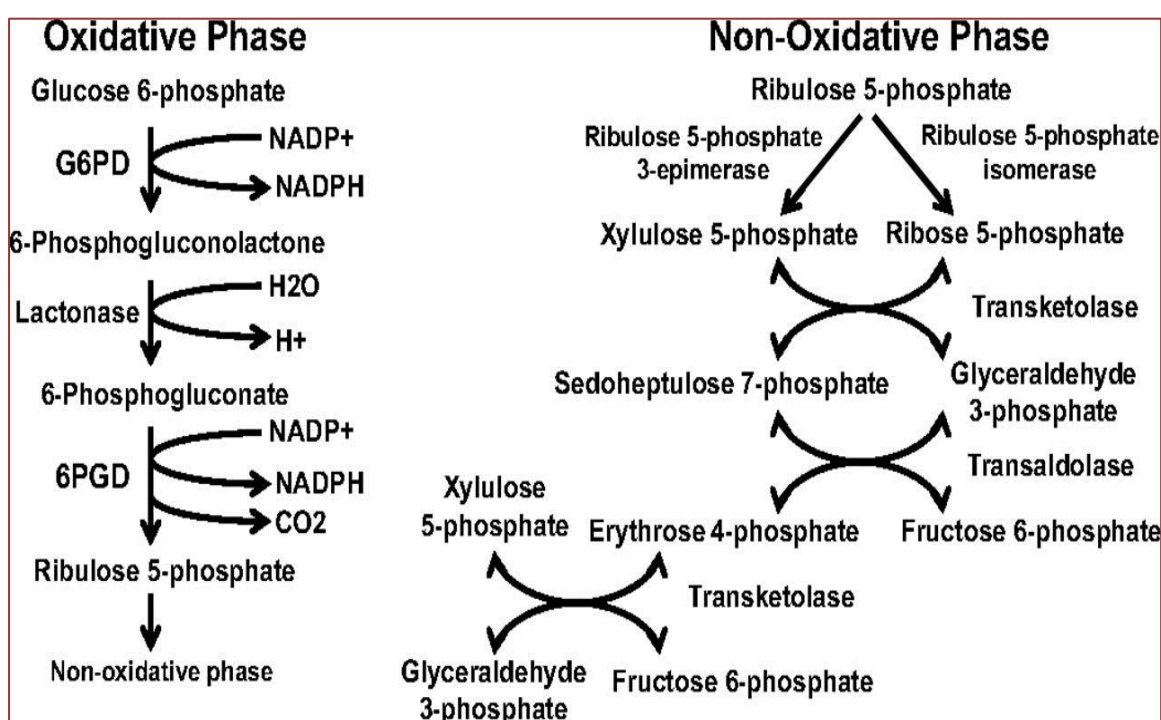
Η διαδικασία κατά την οποία οι μικροοργανισμοί αξιοποιούν τα συστατικά του θρεπτικού μέσου στο οποίο ευρίσκονται προκειμένου να συντηρηθούν και να αναπαραχθούν, συνιστά το μεταβολισμό τους και απαρτίζεται από καταβολικές και αναβολικές διεργασίες. Κατά τον καταβολισμό των θρεπτικών υποστρωμάτων, οι μικροοργανισμοί μετατρέπουν την περιεχόμενη σε αυτά ενέργεια σε μορφές που μπορούν να αφομοιώσουν. Η γλυκόζη αποτελεί τη συνηθέστερη πηγή άνθρακα που οι ετερότροφοι μικροοργανισμοί προτιμούν να μεταβολίζουν. Τα κυριότερα καταβολικά μονοπάτια της γλυκόζης είναι αυτά των Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) και του κύκλου των φωσφορικών πεντοζών, στα οποία συμμετέχουν οι ευκαρυωτικοί μικροοργανισμοί αλλά και αρκετά βακτήρια. Αναφέρεται δε πως συνήθως οι δύο αυτές οδοί επισυμβαίνουν συμπληρωματικά. Το 80% περίπου της διαθέσιμης γλυκόζης καταβολίζεται μέσω της οδού EMP και έπειτα το υπόλοιπο καταβολίζεται μέσω του οξειδωτικού κύκλου των φωσφοροπεντοζών (Αγγελής, 2007).

Κατά τη γλυκόλυση EMP (Εικόνα 8), από ένα μόριο γλυκόζης παράγονται δύο μόρια πυροσταφυλικού οξέος με την ταυτόχρονη συνεισφορά στο μικροβιακό κύτταρο δύο ανηγμένων συνενζύμων NADH και την αναγέννηση δύο μορίων ATP. Κομβικό σημείο του μεταβολικού αυτού σχήματος είναι η φωσφορυλίωση της 6-P-φρουκτόζης προς 1,6-διP-φρουκτόζη που καταλύεται από το ένζυμο φωσφοροφρουκτοκινάση (PFK) και αποτελεί σημείο αλλοστερικού ελέγχου. Σε περίπτωση περίσσειας ενέργειας στο κύτταρο (περίσσεια ATP) πραγματοποιείται αρνητικός αλλοστερισμός και η δραστηριότητα της PFK μειώνεται. Η δραστηριότητα του ενζύμου μπορεί επίσης να μειωθεί λόγω συσσώρευσης κιτρικού οξέος ή/και PEP στο κύτταρο. Εν αντιθέσει, σε περίπτωση αυξημένων αναγκών σε ενέργεια (περίσσεια AMP) η δραστηριότητα της PFK αυξάνει, προκειμένου να επέλθει ισορροπία στο κύτταρο (Αγγελής, 2007; Giri, 2016).



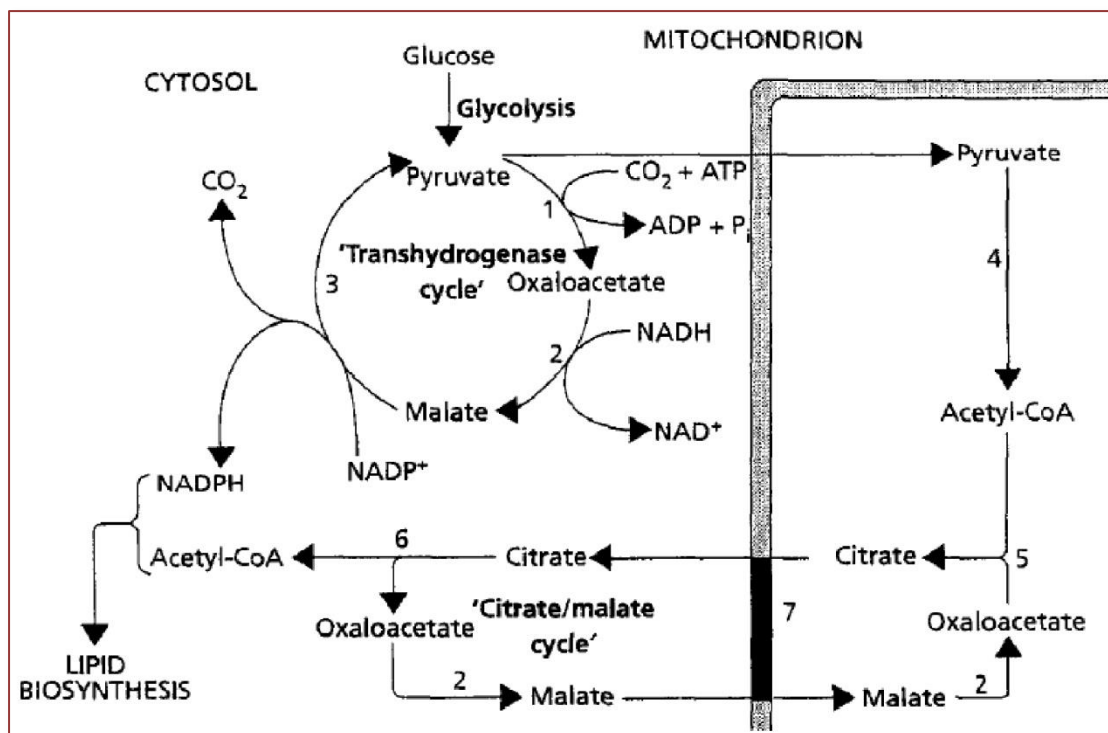
Εικόνα 8 Γλυκολυτικό μονοπάτι EMP. (Giri, 2016)

Όταν η δράση της PFK είναι μειωμένη, ενισχύεται η λειτουργία του κύκλου των φωσφοροπεντοζών. Ο κύκλος αυτός διενεργείται σε δύο φάσεις, την οξειδωτική και τη μη οξειδωτική (Εικόνα 9). Κατά την οξειδωτική φάση η 6-P-γλυκόζη μετατρέπεται προς 5-P-ριβουλόζη. Κατά τη μη οξειδωτική φάση επισυμβαίνουν αντιστρεπτές αντιδράσεις προς παραγωγή μορίων με 3 έως 7 άτομα άνθρακα. Οι πεντόζες που προκύπτουν από τη φάση αυτή αξιοποιούνται στη βιοσύνθεση νουκλεοτιδίων. Το αποτέλεσμα του οξειδωτικού αυτού κύκλου, είναι η μετατροπή της γλυκόζης σε πεντόζη και CO₂ και επίσης η ενεργειακή προσφορά δύο ανηγμένων συνενζύμων NADPH₂ (Αγγελής, 2007; Kruger & Schaewen, 2003).



Εικόνα 9 Οξειδωτικός κύκλος φωσφοροπεντοζών.

Τα μόρια του πυροσταφυλικού οξέος που παράγονται από τον καταβολισμό των σακχάρων, εισέρχονται στη συνέχεια στο μιτοχόνδριο του κυττάρου, όπου μετατρέπονται σε ακετυλο-συνένζυμο-Α (ακετυλο-CoA, Acetyl-CoA) και έπειτα σε κιτρικό οξύ και εισέρχονται στον κύκλο των τρικαρβοξυλικών οξέων (TCA) (Εικόνα 10). Μέσω του κύκλου του Krebs παράγεται ενέργεια για την κάλυψη των αναγκών του κυττάρου (ανηγμένα συνένζυμα NADH και FADH₂), καθώς επίσης και ενδιάμεσοι μεταβολίτες που βοηθούν στη βιοσύνθεση κυτταρικών υλικών (Αγγελής, 2007).



Εικόνα 10 Μεταβολικό μονοπάτι του κύκλου των τρικαρβοξυλικών οξέων (TCA) και του κίτρικού/μηλικού, κατά τη λιποσυσσώρευση σε ελαιογόνους μικροοργανισμούς. Ένζυμα: 1. Αποκαρβοξυλάση του πυροσταφυλικού οξέος, 2. Αφυδρογονάση του μηλικού οξέος, 3. Μηλικό ένζυμο, 4. Αφυδρογονάση του πυροσταφυλικού οξέος, 5. Κίτρική συνθάση, 6. ATP: κίτρική λύαση, 7. Ένζυμο μεταφοράς κίτρικού/μηλικού οξέος. (Ratledge & Wynn, 2002)

Μια σημαντική περίπτωση στην οποία ο TCA συνεισφέρει είναι αυτή της λιποσυσσώρευσης μέσω της παραγωγής του ακετυλο-CoA και μορίων NADPH. Οι ελαιογόνοι μικροοργανισμοί χαρακτηρίζονται από την ικανότητά τους να παράγουν συνεχόμενα ακετυλο-CoA απευθείας στο κυτταρόπλασμα του κυττάρου τους ως πρόδρομο της συνθετάσης των λιπαρών οξέων, καθώς επίσης και μορίων NADPH ως βασικού αναγωγικού μέσου κατά τη βιοσύνθεση λιπαρών οξέων (Ratledge, 2004). Η ικανότητα αυτή των ελαιογόνων μικροοργανισμών να συνθέτουν ακετυλο-CoA οφείλεται στην παρουσία του ενζύμου ATP: κίτρική λύαση, το οποίο απουσιάζει από τους περισσότερους μη ελαιογόνους μικροοργανισμούς. Η αντίδραση της σύνθεσης του ακετυλο-συνενζύμου A είναι η εξής:



Όπως φαίνεται, απαραίτητη προϋπόθεση για τη λιπογένεση είναι η συσσώρευση κίτρικού οξέος στο μιτοχόνδριο, το οποίο στην περίπτωση των ελαιογόνων μικροοργανισμών επισυμβαίνει γιατί η δραστηριότητα του ενζύμου ισοκίτρική

αφυδρογονάση (ICDH) συνδέεται άμεσα με τη δραστηριότητα του AMP. Πιο συγκεκριμένα, η έλλειψη αζώτου από το θρεπτικό μέσο οδηγεί στη μείωση του AMP και συνεπώς στην αύξηση του λόγου ATP/AMP, με αποτέλεσμα τη συσσώρευση ισοκιτρικού και εν συνεχεία κιτρικού οξέος, λόγω της αναστολής της δράσης της ICDH. Όταν το κιτρικό οξύ ξεπεράσει μια κρίσιμη για το μιτοχόνδριο συγκέντρωση, εξέρχεται στο κυτταρόπλασμα και διασπάται προς οξαλοξικό οξύ και ακετυλο-CoA, το οποίο χρησιμοποιείται στη μετέπειτα βιοσύνθεση των λιπαρών οξέων. Στην περίπτωση των μη ελαιογόνων μικροοργανισμών, υπό συνθήκες περιορισμού σε άζωτο ο μικροβιακός μεταβολισμός στρέφεται προς την παραγωγή ενδοπολυσακχαριτών. (Αγγελής, 2007; Ratledge, 2004)

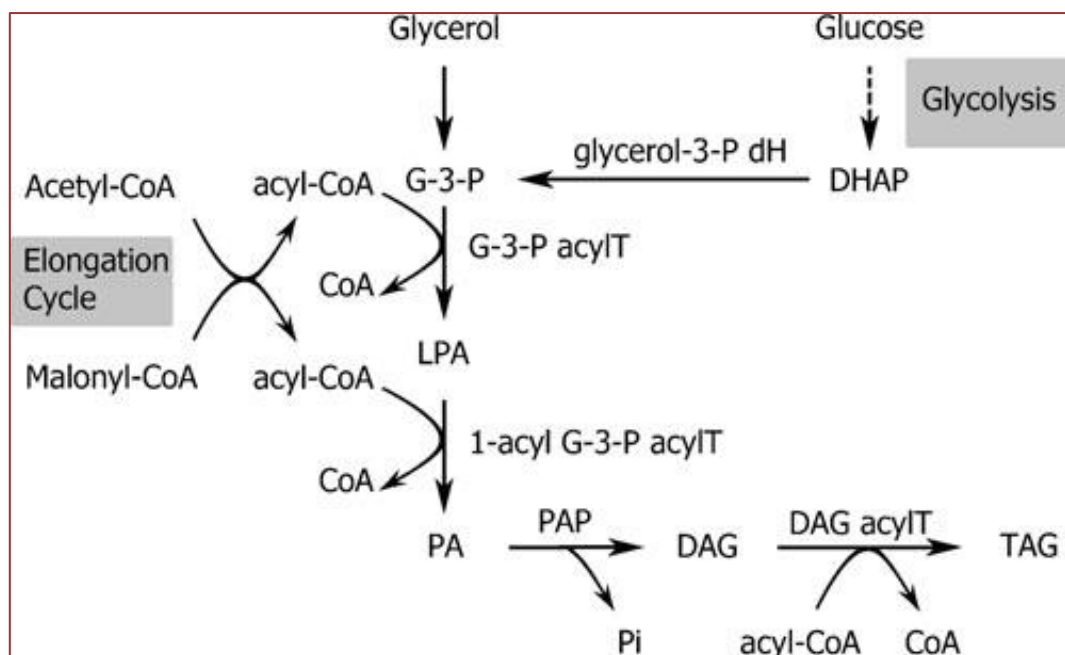
Ο κύκλος του κιτρικού/μηλικού οξέος είναι επίσης πολύ σημαντικός για τη σύνθεση των ενδοκυτταρικών λιπιδίων, καθώς το μηλικό ένζυμο παρέχει τα απαιτούμενα αναγωγικά συνένζυμα NADPH μέσω της εξής αντίδρασης:



Ωστόσο, το μηλικό ένζυμο δεν απαντάται σε όλους τους ελαιογόνους μικροοργανισμούς, όπως για παράδειγμα σε είδη των *Lipomyces* sp. και *Candida* sp., οι οποίοι χρησιμοποιούν άλλα ένζυμα για τη λιπογένεση (Ratledge, 2004).

Αναγκαία, λοιπόν, προϋπόθεση για τη λιπογένεση είναι οι περιοριστικές σε άζωτο συνθήκες και η ταυτόχρονη επάρκεια ή ακόμη και περίσσεια πηγής άνθρακα. Με την εξάντληση της πηγής αζώτου η κυτταρική αύξηση σταματά και ο μικροοργανισμός συνεχίζει να καταβολίζει την πηγή άνθρακα με συνεπακόλουθη την παραγωγή ακετυλο-CoA και τη μετατροπή του σε λιπαρά οξέα. Εν συνεχεία λιπίδια συσσωρεύονται στο κύτταρο ως τριακυλ-γλυκερόλες μέσω της εστεροποίησης των λιπαρών οξέων με γλυκερόλη (Αγγελής, 2007; Ratledge, 2004).

Η *de novo* σύνθεση των τριγλυκεριδίων ξεκινά από την 3-P-γλυκερόλη, η οποία μπορεί να προέλθει είτε από φωσφορυλίωση γλυκερόλης από την κινάση της γλυκερόλης, είτε από τη P-διϋδροξυ-ακετόνη μέσω της δράσης της αφυδρογονάσης της G-3-P. Το μονοπάτι που ακολουθείται από τους ευκαρυωτικούς μικροοργανισμούς για τη βιοσύνθεση των TAGs παρουσιάζεται στην Εικόνα 11 που ακολουθεί (Ageitos *et al.*, 2011; Czabany, Athenstaedt, & Daum, 2006).



Εικόνα 11 Βιοσύνθεση τριγλυκεριδίων. DHAP: P-διϋδροξυ-ακετόνη, G-3-P: 3-P-γλυκερόλη, LPA: λυσοφωσφατιδικό οξύ, PA: φωσφατιδικό οξύ, DAG: διγλυκερίδιο, TAG: τριγλυκερίδιο. Ένζυμα: glycerol-3-P dH: αφυδρογονάση της G-3-P, G-3-P acylIT: ακυλ-τρανσφεράση, CoA: συνένζυμο A, 1-acyl G-3-P acylIT: ακυλ-τρανσφεράση, PAP: φωσφατιδική φωσφατάση, DAG acylIT: ακυλ-τρανσφεράση. (Ageitos *et al.*, 2011)

Η G-3-P εστεροποιείται αρχικά στη θέση 1 (κορεσμένο Λ.Ο.) και έπειτα στη θέση 2 (ακόρεστο Λ.Ο.), με τη βοήθεια ακυλ-τρανσφερασών, προς φωσφατιδικό οξύ. Όπως φαίνεται και από την Εικόνα 12 εν συνεχεία με τη δράση φωσφατάσης το φωσφατιδικό οξύ μετατρέπεται προς διγλυκερίδιο και έπειτα προς τριγλυκερίδιο με δράση ακυλ-τρανσφεράσης (Czabany *et al.*, 2006).

Το μόριο του φωσφατιδικού οξέος μπορεί επίσης να οδηγήσει στη βιοσύνθεση φωσφο-λιπιδίων, εάν ενεργοποιηθεί προς κυτιδινο-διP-διγλυκερίδιο. Τα σφιγγολιπίδια προκύπτουν από μόρια σφιγγοσίνης, η οποία παράγεται μέσω συμπύκνωσης παλμιτοϋλ-CoA και σερίνης. Τέλος, τα γλυκο-λιπίδια προκύπτουν από μονογλυκερίδια ή διγλυκερίδια, αν σε αυτά προστεθεί ένα μόριο σακχάρου (Αγγελής, 2007; Carman & Henry, 1989).

2.4 Εφαρμογές μονοκυτταρικού λίπους

Όπως έχει ήδη προαναφερθεί, πληθώρα μικροοργανισμών δύνανται να παράγουν μεγάλες συγκεντρώσεις πολυακόρεστων λιπιδίων (Polyunsaturated Fatty Acids, PUFAs). Τα λιπίδια αυτά βρίσκουν πολλές εφαρμογές τόσο στη διατροφή του

ανθρώπου, όσο και στην παραγωγή βιοκαυσίμων και χημικών (oleochemicals) που χρησιμοποιούνται στη φαρμακευτική και την κοσμητική (Ochsenreither, Glück, Stressler, Fischer, & Syldatk, 2016).

2.4.1 Μικροβιακά έλαια στη διατροφή του ανθρώπου

Έχειδειχθεί πως τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα έχουν μεγάλη συνεισφορά στη δομή των κυττάρων αλλά και σε πληθώρα φυσιολογικών και χημικών διεργασιών του ανθρώπου, αλλά και όλων γενικότερα των θηλαστικών. Για παράδειγμα, τα ω-3 και ω-6 λιπαρά (π.χ. α-λινολενικό και λινελαϊκό οξύ) συνεισφέρουν στις μεμβράνες φωσφο-λιπιδίων των κυττάρων, ενώ τα εικοσανοειδή παίζουν ρυθμιστικό ρόλο ορμονών βοηθώντας, μεταξύ άλλων, στην ομαλή λειτουργία του καρδιαγγειακού, του νευρικού και του ανοσοποιητικού συστήματος (Bellou *et al.*, 2016; Ganesan, Brothersen, & McMahon, 2014; Ochsenreither *et al.*, 2016).

Οι βιομηχανίες τροφίμων και φαρμάκων παίζουν σπουδαίο ρόλο στην παροχή αναγκαίων λιπαρών οξέων, όπως το λινελαϊκό και α-λινολενικό οξύ. Ο άνθρωπος και γενικότερα τα θηλαστικά, μετατρέπουν αυτά τα λιπαρά οξέα σε πολυακόρεστα. Συχνά όμως δεν μπορούν να συνθέσουν επαρκείς ποσότητες φυσιολογικά και συνεπώς είναι απαραίτητη η λήψη τους εξωγενώς. Έλαια λοιπόν, τα οποία είναι πλούσια σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα, βρίσκουν ευρεία εφαρμογή ως πρόσθετα τροφίμων (π.χ. σε τροφές νεογνών) και συμπληρώματα διατροφής (Bellou *et al.*, 2016; Ochsenreither *et al.*, 2016).

Σύμφωνα με τους Bellou *et al.* (2016), υπάρχουν οι εξής τρεις διαφορετικοί τρόποι για τον εμπλουτισμό των τροφίμων με πολυακόρεστα λιπαρά οξέα:

- Απευθείας προσθήκη PUFAs στα τρόφιμα
- Προσθήκη στα τρόφιμα μικροοργανισμών που δύνανται να παράγουν PUFAs
- Χρήση ζωοτροφών πλούσιων σε PUFAs, που οδηγεί στην παραγωγή ζωικών προϊόντων με υψηλά επίπεδα πολυακόρεστων Λ.Ο.

Η χρήση μονοκυτταρικού λίπους πρωτοεμφανίστηκε στην αγορά τροφίμων το 1985, όταν κυκλοφόρησε μια φόρμουλα ARASCO™ και DHASCO™ για νεογνά σε πολλές χώρες της Ευρώπης, της Άπω Ανατολής, όπως επίσης και στην Αυστραλία. Αρκετά χρόνια αργότερα, το 2001, δόθηκε η άδεια από τον Οργανισμό Τροφίμων και Φαρμάκων (Food and Drug Administration, FDA) για την κυκλοφορία της

φόρμουλας και στις ΗΠΑ. (Ochsenreither *et al.*, 2016) Αναφορές επίσης υπάρχουν για τη χρήση πολυακόρεστων ω -3 Λ.Ο., προερχόμενων από μικροάλγη, ψάρια και ιχθυέλαια ή λιναρόσπορο, σε γαλακτοκομικά είδη και κρέατα (Ganesan *et al.*, 2014; Jiménez-Colmenero, 2007).

Ο Πίνακας 5 που ακολουθεί, παρουσιάζει τα ακόρεστα Λ.Ο. που είναι αναγκαία για τη σωστή λειτουργία του ανθρώπινου οργανισμού.

Πίνακας 5 Κατηγορίες ακόρεστων Λ.Ο. (Ganesan et al., 2014)

Λ.Ο. (IUPAC)	Κοινή ονομασία	Αριθμός C	Τύπος Λ.Ο.	Βαθμός κορεσμού
cis-9-Octadecenoic acid	Ελαϊκό	18	ω -9	1
cis, cis-9,12-Octadecadienoic acid	Λινελαϊκό	18	ω -6	2
all-cis-6,9,12-Octadecatrienoic acid	γ - Λινολενικό	18	ω -6	3
cis,cis,cis-9,12,15-Octadecatrienoic acid	α - Λινολενικό	18	ω -3	3
(6Z,9Z,12Z,15Z)-6,9,12,15-Octadecatetraenoic acid	Στεαριδονικό	18	ω -3	4
all-cis-5,8,11,14-Eicosatetraenoic acid	Αραχιδονικό	20	ω -6	3
all-cis 8,11,14,17-Eicosatetraenoic acid	Εικοσατετραενοϊκό	20	ω -3	4
(5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-Eicosa-5,8,11,14,17-pentenoic acid	Εικοσαπενταενοϊκό	20	ω -3	5
(Z)-Docos-13-enoic acid	Ερουκικό	22	ω -9	1
5Z,8Z,11Z)-Eicosa-5,8,11-trienoic acid	Μελιτικό	20	ω -9	3
(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)-docosa-4,7,10,13,16,19-hexaenoic acid	Δοκοσαεξαενοϊκό	22	ω -3	6

Όπως έχει ήδη προαναφερθεί, έχει παρατηρηθεί, πως υπό ορισμένες συνθήκες, κάποιοι μικροοργανισμοί μπορούν να παράγουν λιπίδια με σύσταση και δομή παρόμοια με εκείνες κάποιων «εξωτικών» λιπών, όπως για παράδειγμα του λίπους του κακάο και της φάλαινας (Αγγελής, 2007; Ageitos *et al.*, 2011; Papanikolaou & Aggelis, 2011b).

Ανοίγονται, λοιπόν, νέοι ορίζοντες για περαιτέρω έρευνα στον τομέα αυτό, που δύνανται να εγκαθιδρύσουν μελλοντικά τις νέες αυτές εφαρμογές των μικροβιακών λιπιδίων.

2.4.2 Μικροβιακά έλαια στην παραγωγή ελαιοχημικών ουσιών

Τα ελαιοχημικά είναι χημικά παράγωγα των φυτικών ή ζωικών τριακυλ-γλυκερολών. Λιπαρά οξέα, λιπαρές αλκοόλες, μεθυλεστέρες και αμίνες είναι κάποια από τα κυριότερα ελαιοχημικά που απαντώνται. Καταγράφεται δε, πως τα οξέα και οι

αλκοόλες αποτελούν την πλειοψηφία, φτάνοντας έως και το 75% περίπου των συνολικών ελαιοχημικών (Adrio, 2017; Ochsenreither *et al.*, 2016).

Όπως αναφέρεται στη βιβλιογραφία, τα ελαιοχημικά βρίσκουν ποικίλες εφαρμογές σε πληθώρα βιομηχανιών για την παραγωγή προϊόντων προστιθέμενης αξίας. Οι κυριότερες αναφέρονται παρακάτω:

- Βιοκαύσιμα (βιοντίζελ και βιοαιθανόλη)
- Επιφανειοδραστικές ουσίες (π.χ. λαουροθειικό νάτριο)
- Βιομηχανία φαρμακευτικής και κοσμητικής (καλλυντικά, αρώματα, σαπούνια, απορρυπαντικά κ.ά.)
- Βιομηχανικά προϊόντα (λιπαντικά, επικαλύψεις επιφανειών, βιοπολυμερή, χρώματα κ.ά.)

(Adrio, 2017; Pflieger, Gossing, & Nielsen, 2015)

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον εμφανίζουν και οι κηροί (εστέρες μεταξύ λιπαρών οξέων και αλκοολών, wax esters), οι οποίοι προκύπτουν είτε μέσω υδρογόνωσης των τριακυλγλυκεριδίων φυτών ή/και ζώων, είτε απευθείας από τα έλαια του φυτού jojoba, είτε μέσω πετροχημικών πρώτων υλών. Χρησιμοποιούνται επίσης για την παραγωγή ποικίλων προϊόντων προστιθέμενης αξίας όπως για παράδειγμα, για την παραγωγή καλλυντικών, βελτιωτικών γεύσης, σαπουνιών και φερομονών. (Ochsenreither *et al.*, 2016) Τελευταία έχουν παραχθεί κηροί χρησιμοποιώντας τριγλυκερίδια μικροβιακής προέλευσης ως τριγλυκερίδια εκκίνησης (Papadaki *et al.*, 2017).

Η σπουδαιότητα των ελαιοχημικών είναι φανερή αν ληφθούν υπόψη όλα τα παραπάνω και επιπλέον η υψηλή τους αξία στην αγορά. Συγκεκριμένα αναφέρεται πως για το 2004, η συνολική αξία αλκοολών, αλδευδών και κηρών ανήλθε σε \$3 δις (Ochsenreither *et al.*, 2016).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3-ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

Στο εδάφιο αυτό αναφέρονται λεπτομερώς στο σύνολό τους τα υλικά και οι μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν για όλες τις απαραίτητες διαδικασίες και αναλυτικές μεθόδους που έλαβαν χώρα για τις ανάγκες των πειραμάτων της παρούσας πτυχιακής.

3.1 Βιολογικό υλικό

Ο μικροοργανισμός που χρησιμοποιήθηκε για την εκτέλεση των πειραμάτων του παρόντος είναι η ελαιογόνα ζύμη *Lipomyces starkeyi* DSM 70296, η οποία ανήκει στη συλλογή του εργαστηρίου Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών. Η ζύμη κατατάσσεται ως κάτωθι:

Πίνακας 6 Επιστημονική ταξινόμηση του *L. starkeyi*.

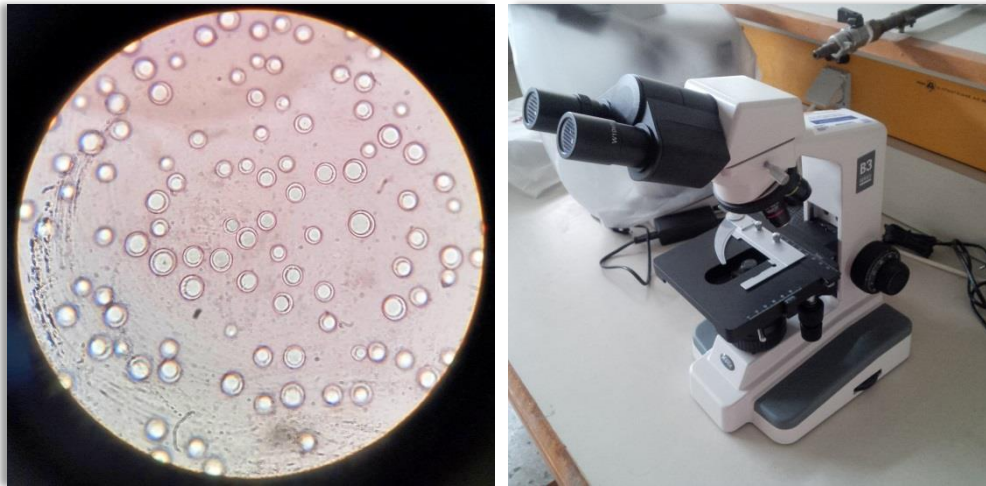
Βασίλειο	Fungi
Φύλο	Ascomycota
Υποφύλο	Saccharomycotina
Κλάση	Saccharomycetes
Τάξη	Saccharomycetales
Οικογένεια	Dipodascaceae
Γένος	<i>Lipomyces</i>
Είδος	<i>starkeyi</i>

Οι μικροοργανισμοί συντηρούνται στο ψυγείο (5 °C) σε κεκλιμένους σωλήνες (slants) ή σε τριβλία, πληρωμένα με υπόστρωμα YPD (Yeast extract, Peptone, D-Glucose) της ακόλουθης σύστασης:

10 g/L εκχύλισμα ζύμης
10 g/L πεπτόνη
10 g/L D-γλυκόζη
20 g/L άγαρ

Ανά τακτά χρονικά διαστήματα και όταν κρίνεται σκόπιμο, γίνεται ανανέωση του μικροοργανισμού προκειμένου να εξασφαλίζεται η ζωτικότητα και η καθαρότητά του, καθώς επίσης και η επαναληψιμότητα των αποτελεσμάτων του.

Στην εικόνα 12 απεικονίζονται τα κύτταρα του *L. starkeyi* όπως αποτυπώθηκαν από μικροσκόπιο τύπου Motic B Series, καθώς επίσης και το μικροσκόπιο, ενώ στην εικόνα 13 εμφανίζονται οι κεκλιμένοι σωλήνες.



Εικόνα 12 Κύτταρα του *L. starkeyi* (αριστερά) & μικροσκόπιο τύπου Motic B Series (δεξιά).



Εικόνα 13 Κεκλιμένοι σωλήνες πληρωμένοι με υπόστρωμα YPD & εμβολιασμένοι με το μικροοργανισμό.

3.2 Υποστρώματα

Σε ένα πρώτο επίπεδο και πριν από τη διενέργεια των ζυμώσεων, ο μικροοργανισμός εμβολιάζεται σε προκαλλιέργεια D-γλυκόζης, ώστε να ξεκινήσει η ανάπτυξή του. Η σύσταση της προκαλλιέργειας φαίνεται στον Πίνακα 7 που ακολουθεί.

Πίνακας 7 Σύσταση προκαλλιέργειας.

Συστατικό	Συγκέντρωση (g/L)
D-γλυκόζη	10
Πεπτόνη	10
Εκχύλισμα ζύμης	10

Ως βασικές πηγές άνθρακα των ζυμώσεων χρησιμοποιήθηκαν D-γλυκόζη και σιρόπι γλυκόζης του οποίου η ημερομηνία λήξης έχει παρέλθει και, συνεπώς, αποτελεί απόβλητο της βιομηχανίας τροφίμων. Το σιρόπι γλυκόζης εμπεριέχει 34.4% ανάγοντα σάκχαρα (24.7% γλυκόζη και 9.7% σουκρόζη). Δοκιμάστηκαν τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις και για τις δύο πηγές άνθρακα, αυτές των 40 g/L, 60 g/L και 80 g/L. Η λεπτομερής σύνθεση των μεταλλικών αλάτων που χρησιμοποιήθηκαν στα υποστρώματα των κύριων καλλιιεργειών των πειραμάτων, εμφανίζεται στον Πίνακα 8 που ακολουθεί.

Πίνακας 8 Σύσταση μεταλλικών αλάτων κύριας καλλιιεργειας. (Paranikolaou *et al.*, 2001)

Άλατα	Συγκέντρωση (g/L)
KH ₂ PO ₄	7.00
Na ₂ HPO ₄ •2H ₂ O	2.50
MgSO ₄ •7H ₂ O	1.50
CaCl ₂ •2H ₂ O	0.15
FeCl ₃ •6H ₂ O	0.15
ZnSO ₄ •7H ₂ O	0.02
MnSO ₄ •H ₂ O	0.06

Το σύνολο των ζυμώσεων έλαβε χώρα σε περιοριστικές σε άζωτο συνθήκες, προκειμένου ο μικροοργανισμός να στρέψει το μεταβολισμό του προς την παραγωγή ενδοκυτταρικών λιπιδίων. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν 1.0 g/L πεπτόνη και 2.0 g/L εκχύλισμα ζύμης ως πηγές αζώτου στην περίπτωση των ζυμώσεων βυθού και 2.0 g/L πεπτόνη και 3.0 g/L εκχύλισμα στην περίπτωση του βιοαντιδραστήρα.

Μετά το πέρας των βασικών ζυμώσεων που προαναφέρθηκαν, έγιναν δοκιμές κύριας καλλιιεργειας σιροπιού γλυκόζης με προσθήκη άλατος (NaCl) σε συγκεντρώσεις 10 g/L, 20 g/L, 30 g/L και 40 g/L, ώστε να διερευνηθούν πιθανές μεταβολές στην παραγωγή βιομάζας και λιπιδίων.

Στην εικόνα 14 που ακολουθεί, φαίνεται το υγρό υπόστρωμα της ζύμωσης υπό ανάδευση σε αναδευτήρα τύπου VELP Scientifica AGE magnetic stirrer.



Εικόνα 14 Υγρό ζύμωσης υπό ανάδευση.

3.3 Συνθήκες καλλιέργειας

3.3.1 Καλλιέργειες βυθού

Οι ζυμώσεις βυθού έλαβαν χώρα σε κωνικές φιάλες των 250 mL (Erlenmeyer) με τρόπο αερόβιο και ασυνεχή. Αρχικά, γίνεται εμβολιασμός του *L. starkeyi* σε αποστειρωμένη³ προκαλλιέργεια, υπό ασηπτικές συνθήκες και αφήνεται να αναπτυχθεί για 48 h σε ανακινούμενο επωαστή (shaker) σε θερμοκρασία 30 °C, υπό συνεχή ανάδευση 180 rpm.

Στη συνέχεια, η αποστειρωμένη κύρια καλλιέργεια εμβολιάζεται με 1 mL προκαλλιέργειας υπό ασηπτικές συνθήκες και αφήνεται επίσης να αναπτυχθεί σε ανακινούμενο επωαστικό θάλαμο στις ίδιες συνθήκες (30 °C, 180 rpm).

Το ιδανικό pH για την ανάπτυξη του *L. starkeyi* είναι το 6.0 και επομένως, σε κάθε δείγμα ελέγχεται και αν υπάρχει απόκλιση μεγαλύτερη του ± 0.5 τότε διορθώνεται αναλόγως, όπως αναφέρεται και στο κεφάλαιο προσδιορισμού του pH που ακολουθεί.

³ Η αποστείρωση γίνεται στο αυτόκαυστο, στους 121 °C για 20 min.

3.3.2 Καλλιέργειες σε βιοαντιδραστήρα

Οι ζυμώσεις στο βιοαντιδραστήρα διεξήχθησαν με τρόπο ημι-συνεχή (fed-batch) και ήταν τύπου “cascade”, με συγκέντρωση διαλυτού οξυγόνου (DOT) ορισμένη πάντα στο 20% (v/v) και ανάδευση σε εύρος 200-500 rpm. Η θερμοκρασία ορίστηκε στους 30 °C, το pH στο 6.0 και η εισαγωγή αέρα στο 1.5 vvm. Ο ενεργός όγκος ήταν 1000 mL και το εμβόλιο 10% του όγκου. Η αρχική συγκέντρωση σακχάρων ήταν στα 50 g/L. Όταν η συγκέντρωση σακχάρων έφτανε περίπου τα 12 g/L ξεκινούσε η εξωτερική τροφοδοσία σακχάρων ώστε να διατηρεί την τιμή σταθερή κατά το δυνατόν. Η τροφοδοσία γινόταν με πυκνό διάλυμα γλυκόζης 300 g/L. Παρακάτω απεικονίζεται ο βιοαντιδραστήρας τύπου Labfors 4, Infors HT (Εικόνα 15).



Εικόνα 15 Καλλιέργεια σε βιοαντιδραστήρα.

3.4 Προσδιορισμός pH

Η μέτρηση του pH γίνεται στο εκάστοτε λαμβανόμενο σημείο της καλλιέργειας. Αν η απόκλιση της τιμής του από το 6.0, που είναι το επιθυμητό, υπερβαίνει τις ± 0.5 μονάδες, τότε πραγματοποιείται διόρθωση pH και στα υπόλοιπα σημεία της κλειστής

καλλιέργειας υπό ασηπτικές συνθήκες, με υδροχλώριο 5 M (HCl) ή καυστικό νάτριο 5 M (NaOH), αντιστοίχως. Το pH-μετρο που χρησιμοποιήθηκε είναι τύπου Hanna Instruments 2211 pH/ORP meter και απεικονίζεται στην Εικόνα 16.



Εικόνα 16 pH-μετρο τύπου Hanna Instruments 2211 pH/ORP meter.

3.5 Παραλαβή βιομάζας

3.5.1 Ξήρανση

Προκειμένου να παραληφθεί η βιομάζα, γίνεται αρχικά διαχωρισμός και παραλαβή της μέσω φυγοκέντρωσης, σε φυγόκεντρο τύπου Universal 320R Hettich Zentrifugen, και έπειτα έκπλυσή της με απιονισμένο νερό (H₂O). Για τη λήψη της βιομάζας στα συγκεκριμένα πειράματα, γίνονταν 3 διαδοχικές εκπλύσεις-φυγοκεντρήσεις. Εν συνεχεία, η νωπή βιομάζα μεταφέρεται σε προζυγισμένα φιαλίδια McCartney και αυτά τοποθετούνται σε φούρνο τύπου Gallenkamp oven BS OV-160 προς ξήρανση, στους 60 °C για 48 h. Μετά την ξήρανση η βιομάζα αφήνεται να επανέλθει σε θερμοκρασία δωματίου και προσδιορίζεται βαρυμετρικά, μετρώντας τη διαφορά βάρους του φιαλιδίου McCartney. Η μέτρηση του βάρους έγινε σε αναλυτικό ζυγό τύπου KERN EW 420-3NM.

Στην Εικόνα 17 παρακάτω εμφανίζεται αριστερά η φυγόκεντρος που χρησιμοποιήθηκε και δεξιά ο διαχωρισμός της βιομάζας (ίζημα) από το υπερκείμενο διάλυμα του δείγματος.



Εικόνα 17 Φυγόκεντρος (αριστερά) & ίζημα βιομάζας μετά τη φυγοκέντρωση (δεξιά).

3.5.2 Λυοφιλίωση

Η μέθοδος της λυοφιλίωσης ή κρυοξηράνσης (Freeze drying) είναι καταλληλότερη για ξήρανση δειγμάτων τα οποία αλλοιώνονται από την παραμονή τους σε υψηλή θερμοκρασία.

Ο διαχωρισμός και η έκπλυση της βιομάζας γίνεται ομοιοτρόπως με τη μέθοδο ξήρανσης που προαναφέρθηκε. Στη συνέχεια, η νωπή βιομάζα καταψύχεται και μεταφέρεται σε συμπυκνωτή κενού, όπου πραγματοποιείται ξήρανση υπό κενό.

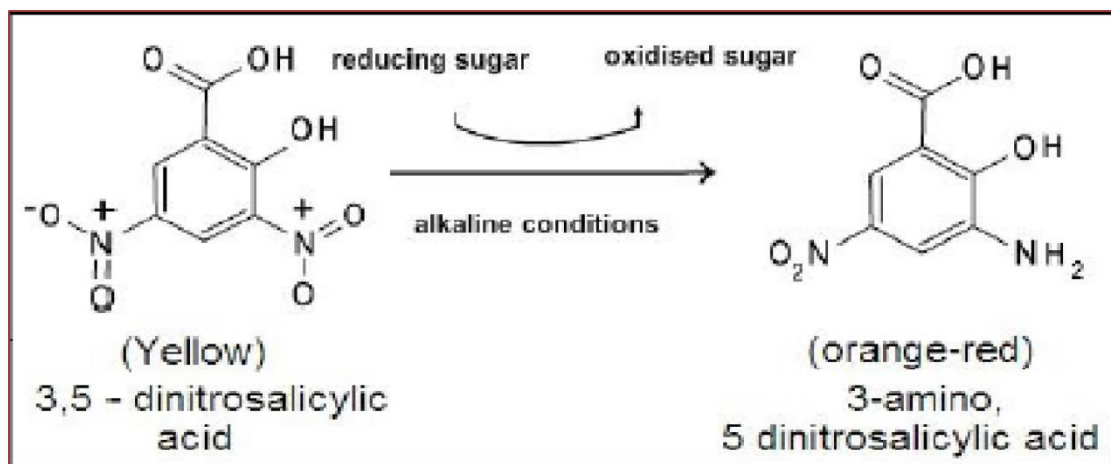
3.6 Προσδιορισμός σακχάρων

3.6.1 Ανάγοντα σάκχαρα

Ο ποσοτικός προσδιορισμός των αναγωγικών σακχάρων έγινε με τη μέθοδο του 3,5-δινιτροσαλικυλικού οξέος (DNS) (Miller, 1959).

Αρχή της μεθόδου:

Η μέθοδος στηρίζεται στην αναγωγή του 3,5-δινιτροσαλικυλικού οξέος προς 3-αμινο-5-νιτροσαλικυλικό οξύ παρουσία NaOH, και στην ταυτόχρονη οξειδωση της γλυκόζης προς γλυκονικό οξύ (Miller, 1959).



Αντιδραστήρια:

- DNS (Τριγλυκό καλιονάτριο + Καυστικό νάτριο)
- Πρότυπο διάλυμα γλυκόζης 2g/L

Εκτέλεση:

Σε μεγάλους δοκιμαστικούς σωλήνες τοποθετούνται 500 μL δείγματος και 500 μL αντιδραστηρίου DNS. Κατόπιν, το μίγμα αναδεύεται σε κυκλοαναμικτήρα (vortex) και τοποθετείται σε υδατόλουτρο στους 100 $^{\circ}\text{C}$ για 5 min. Εν συνεχεία, οι σωλήνες ψύχονται με νερό βρύσης και προστίθενται 5 mL απιονισμένου H_2O . Τέλος, μετράται η απορρόφηση των μιγμάτων σε φασματοφωτόμετρο στα 540 nm. Το φωτόμετρο μηδενίζεται με τον μάρτυρα της αντίδρασης, δηλαδή μίγμα 500 μL απιονισμένου H_2O και 500 μL αντιδραστηρίου DNS που έχει ακολουθήσει την ίδια κατά τα άλλα διαδικασία. Σημειώνεται πως το φασματοφωτόμετρο που χρησιμοποιήθηκε είναι του τύπου Hitachi U-2000 Spectrophotometer.

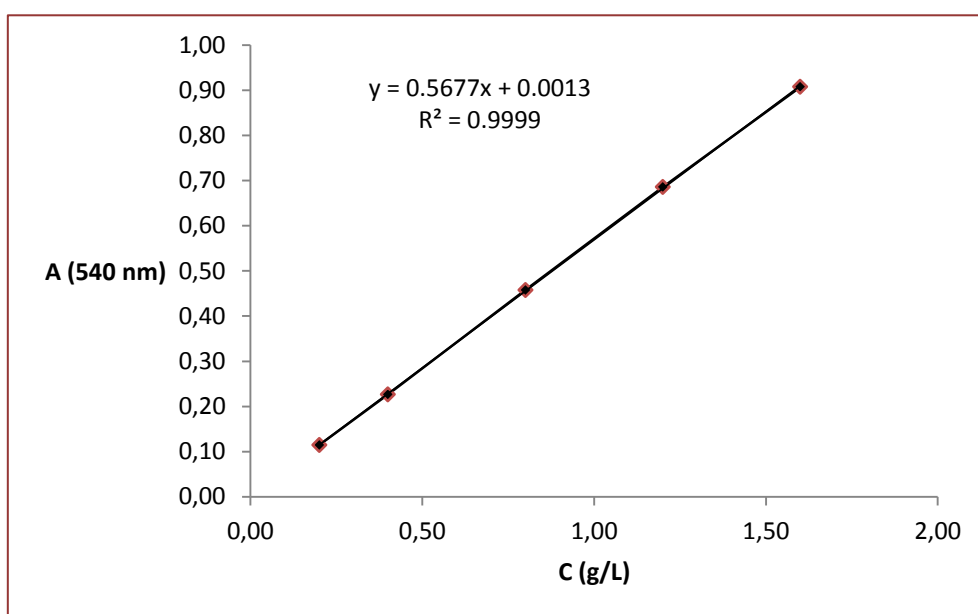
Πρότυπη καμπύλη αναφοράς:

Προκειμένου να κατασκευαστεί η πρότυπη καμπύλη αναφοράς, ακολουθήθηκε η διαδικασία που περιγράφηκε παραπάνω για το εξής σετ δεδομένων:

Πίνακας 9 Δεδομένα για την κατασκευή πρότυπης καμπύλης D-γλυκόζης.

Συγκέντρωση γλυκόζης (g/L)	Πρότυπο διάλυμα γλυκόζης (μL)	H ₂ O (μL)
0.2	50	450
0.4	100	400
0.8	200	300
1.2	300	200
1.6	400	100

Η καμπύλη αναφοράς γλυκόζης που προέκυψε είναι η εξής:



Γράφημα 2 Πρότυπη καμπύλη αναφοράς γλυκόζης.

3.6.2 Ολικά σάκχαρα

Τα ολικά σάκχαρα μετρώνται με τη μέθοδο DNS όπως περιγράφηκε παραπάνω, αφού προηγηθεί υδρόλυση του δείγματος. Συγκεκριμένα, σε 1 mL δείγματος προστίθενται 4.5 mL HCl 1 M και το μίγμα τοποθετείται σε υδατόλουτρο στους 100 °C για 30 min. Έπειτα, προστίθενται 4.5 mL καυστικού καλίου (KOH) 1 M και ακολουθεί η διαδικασία της μεθόδου DNS.

3.6.3 Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC)

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης των σακχάρων στην περίπτωση της καλλιέργειας σε βιοαντιδραστήρα πραγματοποιήθηκε μέσω Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) σε υγρό

χρωματογράφο τύπου Shimadzu (Japan). Ο χρωματογράφος ήταν εξοπλισμένος με ανιχνευτή διαφορικού διαθλασίμετρου τύπου RID-10A, Shimadzu. Η χρησιμοποιούμενη στήλη για τον διαχωρισμό του μίγματος ήταν τύπου ROA-Organic Acid H⁺ (Phenomenex). Υδατικό διάλυμα H₂SO₄ (10 mM) με ροή στα 0.6 mL/min χρησιμοποιήθηκε ως κινητή φάση του χρωματογράφου. Τέλος, η ταυτοποίηση των σακχάρων που εμπεριέχονται στα δείγματα πραγματοποιείται βάσει σύγκρισης των χρόνων κατακράτησης των ουσιών των δειγμάτων με αντίστοιχους χρόνους κατακράτησης γνωστών προτύπων.

3.7 Αναλύσεις ενδοκυτταρικών λιπιδίων

3.7.1 Μέθοδοι εκχύλισης λίπους

Εκχύλιση με αντιδραστήριο Folch:

Αντιδραστήρια:

- Folch [2:1 χλωροφόρμιο (CHCl₃)/μεθανόλη (CH₃OH) (v/v)] (Folch, Lees & Sloane-Stanley, 1957)

Εκτέλεση:

Σε γυάλινα φιαλίδια McCartney, τα οποία περιέχουν την ξηρή βιομάζα που έχει ληφθεί μετά τις φυγοκεντρήσεις και την ξήρανση, προστίθεται αντιδραστήριο Folch και αφήνεται σε ηρεμία για τουλάχιστον 72 h, προκειμένου να διαρρήξει τα κύτταρα της βιομάζας και να ενσωματώσει το ενδοκυτταρικό λίπος.

Εκχύλιση με Folch/ HCl:

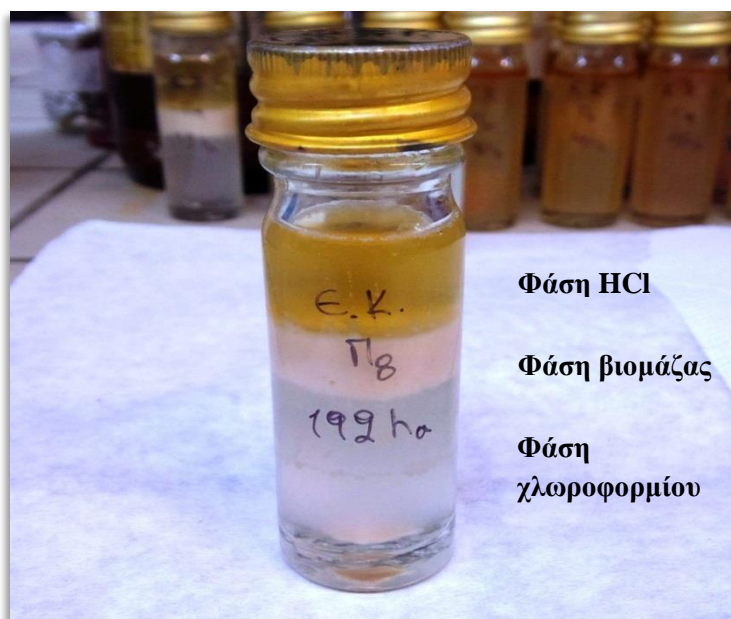
Αντιδραστήρια:

- Folch (CHCl₃/CH₃OH σε αναλογία 2:1 (v/v))
- HCl

Εκτέλεση:

Σε πρώτη φάση γίνεται εκχύλιση με αντιδραστήριο Folch όπως περιγράφηκε προηγουμένως. Έπειτα, σε γυάλινα φιαλίδια McCartney ζυγίζονται 0.3 g ξηρής βιομάζας και προστίθενται 4 mL HCl 2 M. Το μίγμα τοποθετείται σε υδατόλουτρο

στους 80°C για 45-60 min (μέχρις ότου η βιομάζα μετατραπεί σε σκόνη). Στη συνέχεια, το μίγμα απομακρύνεται από το υδατόλουτρο και αφού έρθει σε θερμοκρασία δωματίου προστίθεται σε αυτό αντιδραστήριο Folch μέχρι πλήρωσης του φιαλιδίου. Το μίγμα αφήνεται σε ηρεμία για 24 h (overnight) ώστε να διαχωριστούν οι 3 φάσεις (HCL, βιομάζα, Folch), όπως αυτές απεικονίζονται και στην Εικόνα 18 που ακολουθεί. Έπειτα, λαμβάνεται η φάση του χλωροφορμίου και εξατμίζεται σε ειδικό περιστροφικό συμπυκνωτή κενού (evaporator), αφού προηγηθεί διήθηση.



Εικόνα 18 Διαχωρισμός των τριών φάσεων (HCl, βιομάζα, χλωροφόρμιο).

Εκχύλιση με HCl/Folch:

Αντιδραστήρια:

- Folch (CHCl₃/CH₃OH σε αναλογία 2:1 (v/v))
- HCl

Εκτέλεση:

Η εκχύλιση λίπους με HCl/Folch ακολουθεί ακριβώς την ίδια διαδικασία με την προηγούμενη μέθοδο (Folch/ HCl), με τη διαφορά πως το μίγμα αφήνεται σε ηρεμία για 3 h (αντί των 24 h της προηγούμενης μεθόδου) ώστε να διαχωριστούν οι 3 φάσεις

(HCL, βιομάζα, Folch) και επίσης δεν προηγείται εκχύλιση του λίπους με αντιδραστήριο Folch.

Εκχύλιση με Folch και βρασμό:

Αντιδραστήρια:

- Folch (CHCl₃/CH₃OH σε αναλογία 2:1 (v/v))

Εκτέλεση:

Σε φιάλη εξάτμισης ζυγίζονται 0.5 g λυοφιλωμένης βιομάζας και προστίθεται αντιδραστήριο Folch. Η φιάλη τοποθετείται σε σύστημα μανδύα βρασμού-συμπυκνωτή και αφήνεται να βράσει για 1 h.

Εκχύλιση με «πράσινους διαλύτες» (green solvents):

Αντιδραστήρια:

- οξικός αιθυλεστέρας (C₄H₈O₂)/αιθανόλη (CH₃CH₂OH) σε αναλογία 2:1 (v/v))

Εκτέλεση:

Η εκχύλιση αυτή ακολουθεί ακριβώς την ίδια διαδικασία με τη μέθοδο εκχύλισης με Folch, αντικαθιστώντας το αντιδραστήριο Folch με άλλο μίγμα αντιδραστηρίων πιο φιλικό προς την υγεία του ανθρώπου και το περιβάλλον. Η αναλογία CHCl₃/CH₃OH (2:1 (v/v)) αντικαθίσταται με C₄H₈O₂/ CH₃CH₂OH (2:1 (v/v)).

Εκχύλιση με Soxhlet:

Η συσκευή Soxhlet αποτελείται από έναν μανδύα βρασμού (υποδοχέα), έναν εκχυλιστήρα και έναν συμπυκνωτή.

Αρχή της μεθόδου:

Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην αρχή Bernoulli, η οποία αποτελεί έκφραση της αρχής διατήρησης της ενέργειας στη ροή των ρευστών. Πιο συγκεκριμένα, η πίεση ενός ρευστού μέσα σε ένα σωλήνα είναι, εν γένει, διαφορετική μεταξύ δύο σημείων με υψομετρική διαφορά. Λόγω του φαινομένου αυτού, η κατασκευή του εκχυλιστήρα επιτρέπει τη δίοδο του ζέοντος διαλύτη από τον έναν μόνο εκ των δύο πλευρικών σωλήνων, όπως εξηγείται και παρακάτω.

Αντιδραστήρια:

- Folch ($\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ σε αναλογία 2:1 (v/v))

Εκτέλεση:

Η προς εκχύλιση βιομάζα τοποθετείται στο ειδικό φυσίγγιο (καρτούσα) στον εκχυλιστήρα της συσκευής και ο οργανικός διαλύτης προστίθεται στη χρησιμοποιούμενη φιάλη εξάτμισης. Καθώς ο διαλύτης βράζει και εξατμίζεται, οι ατμοί του διέρχονται από τον πλευρικό σωλήνα του εκχυλιστήρα, συμπυκνώνονται στην ψυκτική στήλη και επαναρρέουν μέσα στον εκχυλιστήρα όπου βρίσκεται η καρτούσα με τη βιομάζα μέχρις πλήρωσής του έως το ύψος του κεκκαμένου πλευρικού απαγωγού σωλήνα, οπότε και πραγματοποιείται αυτόματος σιφωνισμός με το εκχύλισμα να επαναρρέει στη φιάλη εξάτμισης. Ο κύκλος της εκχύλισης που περιγράφηκε επαναλαμβάνεται για το χρονικό διάστημα που η συσκευή παραμένει σε λειτουργία, εν προκειμένω για 4 h.

Η μέθοδος αυτή παρέχει τη δυνατότητα να οριστεί σχετικώς παρατεταμένη λειτουργία της συσκευής, ούτως ώστε να μειώνεται σχετικά ο χρόνος ενός κύκλου εκχύλισης και κατ' επέκταση να αυξάνεται ο αριθμός των εκχυλίσεων, παραλαμβάνοντας έτσι κατά το μέγιστο δυνατό τις διαλυτές ουσίες, εν προκειμένω τα λιπίδια.

3.7.2 Εξάτμιση διαλυτών & ποσοτικός προσδιορισμός λιποπεριεκτικότητας



Εικόνα 19 Διήθηση μίγματος βιομάζας-Folch (αριστερά) & συμπυκνωτής κενού (δεξιά).

Προκειμένου να υπολογιστεί η ποσότητα του λίπους που παρήχθη, γίνεται αρχικά διήθηση του μίγματος που προκύπτει από την εκάστοτε μέθοδο εκχύλισης σε φιάλη εξάτμισης και εξατμίζεται σε ειδικό συμπυκνωτή κενού (evaporator) (Εικόνα 19). Ο υπολογισμός της λιποπεριεκτικότητας γίνεται σταθμικά, υπολογίζοντας τη διαφορά του βάρους της προζυγισμένης κενής φιάλης εξάτμισης από αυτό της ίδιας φιάλης μετά την εξάτμιση.

Στην περίπτωση της εκχύλισης με τη χρήση της συσκευής Soxhlet, υπάρχει και ένας δεύτερος τρόπος προσδιορισμού της λιποπεριεκτικότητας, υπολογίζοντας τη διαφορά του βάρους του προζυγισμένου μικτού βάρους της καρτούσας που περιέχει τη βιομάζα από αυτό της καρτούσας μετά την εκχύλιση. Η διαφορά αυτή αποτελεί το βάρος του λίπους που έχει απομακρυνθεί από τη βιομάζα.

3.7.3 Προσδιορισμός κλασμάτων λιπιδίων

Προκειμένου να προσδιοριστούν ποσοτικά τα κλάσματα των λιπιδίων από τα οποία αποτελείται το συνολικό παραγόμενο λίπος, γίνεται η λεγόμενη κλασμάτωσή του.

Αντιδραστήρια:

- Χλωριούχο κάλιο (KCl) 0.88 % (w/v)

- Άνυδρο θειικό νάτριο (Na_2SO_4)
- Πυριτικό οξύ (H_4SiO_4)
- Διχλωρομεθάνιο (CH_2Cl_2)
- CHCl_3
- Ακετόνη ($\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$)
- CH_3OH

Εκτέλεση:

Κατ' αρχάς, λαμβάνεται μια ποσότητα συνολικών λιπιδίων διαλυμένων σε μίγμα διαλυτών χλωροφορμίου/μεθανόλης 2:1 και γίνεται έκπλυσή τους με KCl . Διαχωρίζονται με αυτόν τον τρόπο δύο φάσεις, εκ των οποίων παραλαμβάνεται η κάτω και προστίθεται σε αυτήν άνυδρο Na_2SO_4 για προσρόφηση της υπάρχουσας υγρασίας. Στη συνέχεια, γίνεται συμπύκνωση του «πλυμένου» με διάλυμα KCl λίπους (από το οποίο συνεπώς θα είχαν απαχθεί λιποπρωτεΐνες και λοιπές λιπόφιλες «ακαθαρσίες») σε συμπυκνωτή κενού και ποσοτικός προσδιορισμός του σταθμικά, όπως αναλύθηκε προηγουμένως. Έπειτα ζυγίζεται ποσότητα H_4SiO_4 10πλάσια του βάρους του λίπους που μετρήθηκε και ξηραίνεται σε φούρνο στους 110°C για διάρκεια 24 h. (Fakas, Papanikolaou, Galiotou-Panayotou, Komaitis & Aggelis, 2006)

Η διαδικασία συνεχίζεται με το πακετάρισμα της στήλης με CH_2Cl_2 . Το προς κλασμάτωση λίπος διαλύεται σε ποσότητα 1-2 mL CHCl_3 ή CH_2Cl_2 . Εν συνεχεία, το λίπος προστίθεται στην πακεταρισμένη στήλη με τη χρήση πιπέτας Pasteur. Προκειμένου να διαχωριστεί το ουδέτερο κλάσμα λιπιδίων (N), προστίθενται αρχικά 100 mL CHCl_3 στη στήλη και έτσι λαμβάνεται το πρώτο κλάσμα σε προζυγισμένη σφαιρική φιάλη εξάτμισης. (Fakas *et al.*, 2006). Κατά την ίδια διαδικασία προστίθενται στη συνέχεια στη στήλη 100 mL $\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$ και παραλαμβάνεται το δεύτερο κλάσμα των σφιγγο- και γλυκο-λιπιδίων (S+G). Τέλος, γίνεται η λήψη του τρίτου κλάσματος που περιέχει τα φωσφο-λιπίδια (P) με την προσθήκη στη στήλη 100 mL CH_3OH .

Τα παραπάνω κλάσματα προσδιορίζονται ποσοτικά μέσω εξάτμισης σε συμπυκνωτή κενού. Στη συνέχεια μετατρέπονται σε μεθυλεστέρες λιπαρών οξέων ώστε να

προσδιοριστεί και η σύστασή τους σε λιπαρά οξέα σε αέριο χρωματογράφο, όπως εξηγείται παρακάτω.

3.7.4 Χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας

Ο ποιοτικός προσδιορισμός των κλασμάτων γίνεται με τη μέθοδο χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδας (Thin Layer Chromatography, TLC).

Αρχή της μεθόδου:

Η μέθοδος TLC βασίζεται στις διαφορετικές πολικότητες των προς ανάλυση συστατικών. Με τη βοήθεια μιας στατικής και μιας κινητής φάσης, τα συστατικά μετακινούνται πάνω στη χρωματογραφική πλάκα βάσει της πολικότητάς τους.

Αντιδραστήρια:

α. Σύστημα διαλυτών σε αναλογία 90:10:1 (v/v/v)

- n-εξάνιο (C_6H_{14})
- διεθλαιθέρας ($C_4H_{10}O$)
- οξικό οξύ (CH_3COOH)

β. Working solution

- monononadecanoïn (MAG)
- cholesteryl linolate (CE)
- glyceryl triolate (TAG)
- cholesterol (CL)

Εκτέλεση:

Αρχικά το σύστημα διαλυτών τοποθετείται στο γυάλινο θάλαμο για 30 min, ώστε το περιβάλλον του θαλάμου να κορεστεί. Εν συνεχεία, τα επιθυμητά συστατικά εναποτίθενται στη χρωματογραφική πλάκα και αφήνονται να στεγνώσουν. Η πλάκα τοποθετείται στον κορεσμένο θάλαμο για περίπου 10 min για να ανέβει ο διαλύτης μέχρι τη χαραγή (ξυσμένη επιφάνεια). Κατόπιν η πλάκα τοποθετείται σε απαγωγό εστία για να στεγνώσει για περίπου 30 min. Η εμφάνιση γίνεται σε θάλαμο ιωδίου.

Η χρωματογραφική πλάκα (Sigma Silica gel 10*20cm) αφέθηκε να αναπτυχθεί στο σύστημα διαλυτών για 10 λεπτά. Έπειτα η πλάκα ενεργοποιήθηκε για 30 λεπτά στους 100 °C.

3.7.5 Προσδιορισμός της σύστασης των λιπαρών οξέων του μικροβιακού λίπους

Μετεστεροποίηση λιπιδίων (Fatty Acid Methyl Esters, FAMES)

Σκοπός της μεθόδου είναι η παραλαβή μεθυλεστέρων λιπαρών οξέων από τα δείγματα λιπιδίων, που είναι ενώσεις με μεγαλύτερη πτητικότητα και συνεπώς μπορούν να αναλυθούν μέσω αέριας χρωματογραφίας ώστε να γίνει ο προσδιορισμός της σύστασης των λιπαρών οξέων του δείγματος.

Αρχή της μεθόδου:

Η μέθοδος βασίζεται στη διαφορετική πολικότητα των συστατικών του μίγματος, ώστε να μετατρέψει τα λιπίδια αρχικά σε σάπωνες, γλυκερόλη και ιόντα νατρίου (Na^+) (βασική κατάλυση) και εν συνεχεία σε αλάτι (NaCl) και μεθυλεστέρες (όξινη κατάλυση).

Αντιδραστήρια:

- Μεθοξείδιο του νατρίου (MeONa)
- Υδροχλωρική μεθανόλη (HCl/MeOH)
- C_6H_{14}

Εκτέλεση:

Αρχικά, στο δείγμα λίπους προστίθενται 10 mL MeO^-Na^+ και αφήνεται να βράσει στον μανδύα για 20 min, ώστε να πραγματοποιηθεί βασική κατάλυση προς σάπωνες, γλυκερόλη και ιόντα Na^+ . Έπειτα, προστίθεται στο μίγμα το αντιδραστήριο HCl/MeOH μέχρις ότου αποχρωματιστεί τελείως και αφήνεται να βράσει για 20 min επιπλέον. Στη συνέχεια, προστίθεται στο μίγμα απιονισμένο H_2O για να σταματήσει η αντίδραση. Το μίγμα απομακρύνεται από το μανδύα και προστίθενται σε αυτό 6 mL C_6H_{14} . Τέλος, το μίγμα μεταφέρεται σε διαχωριστική χοάνη ούτως ώστε να διαχωριστούν οι δύο φάσεις, από τις οποίες παραλαμβάνεται η άνω φάση (οργανική)

που εμπεριέχει του εστέρες των λιπαρών οξέων και το C₆H₁₄, ενώ η κάτω φάση (υδατική) απορρίπτεται. Οι συλλεγόμενοι μεθυλεστέρες οδηγούνται προς ανάλυση στον αέριο χρωματογράφο όπως περιγράφεται παρακάτω, ή συντηρούνται στην κατάψυξη (-20 °C).

Προσδιορισμός της σύστασης των Λ.Ο.

Για τον ποιοτικό προσδιορισμό της σύστασης των Λ.Ο. που εμπεριέχονται στο μικροβιακό λίπος χρησιμοποιείται αέριος χρωματογράφος (GC) των εξής αναλυτικών συνθηκών:

Πίνακας 10 Αναλυτικές συνθήκες αεριοχρωματογράφου.

Όργανο	Αέριος χρωματογράφος Fisons GC8000
Ανιχνευτής	FID (Flame Ionization Detector)
Στήλη χρωματογραφίας	CPWAX 52CB, 30 m × 0.32 mm, df 0.25 μm
Φέρον αέριο	He
Αναλογία διαμοιρασμού (split ratio)	1:50
Πίεση φέροντος αερίου	90 kPa
Ροή φέροντος αερίου	2 mL/min (25 °C)
Θερμοκρασία εισαγωγέα	250 °C
Θερμοκρασία ανιχνευτή	270 °C
Θερμοκρασιακό πρόγραμμα	100 °C (1 min)-25 °C/min-200 °C (1 min)-3 °C/min-230 °C (6 min)-30 °C/min-250 °C (2.5 min)

Ο αεριοχρωματογράφος που χρησιμοποιήθηκε απεικονίζεται παρακάτω (Εικόνα 20).



Εικόνα 20 Αέριος χρωματογράφος.

Αρχή της μεθόδου:

Η μέθοδος της αέριας χρωματογραφίας στηρίζεται στη δυνατότητα διαχωρισμού δύο συστατικών μέσα στη στήλη χρωματογραφίας, στην οποία υπάρχουν δύο φάσεις, η στατική και η κινητή. Αν υποθεθεί πως το δείγμα αποτελείται από δύο μόνο συστατικά A και B, η στατική φάση αποτελείται από ένα υμένιο (φίλμ) πολυμερούς υλικού, επιλεγμένου για να αλληλεπιδρά μόνο με το ένα συστατικό, έστω το A. Η κινητή φάση (φέρον αέριο) συμπαρασύρει το μίγμα, όμως το συστατικό A κατανέμεται μεταξύ σταθερής και κινητής φάσης και κινείται με μικρότερη ταχύτητα μέσα στη στήλη σε σχέση με το συστατικό B που δεν αλληλεπιδρά με τη στατική φάση και συνεπώς κινείται μέσα στη στήλη με την ταχύτητα του φέροντος αερίου και εκλύεται πρώτο. Έτσι, το μίγμα ξεκινά να διαχωρίζεται σε δύο κορυφές.

Αντιδραστήρια:

- C_6H_{14}

Εκτέλεση:

Παραλαμβάνεται 1 μL δείγματος με μικροσύριγγα Hamilton (10 μL), αφού έχει προηγηθεί έκπλυσή της με C_6H_{14} , και γίνεται έγχυση αυτού στον εισαγωγέα του αεριοχρωματογράφου. Τέλος, το χρωματογράφημα παραλαμβάνεται από τον υπολογιστή του αεριοχρωματογράφου και είναι έτοιμο προς ανάλυση των αποτελεσμάτων. Με τη βοήθεια πρότυπων μεθυλεστέρων γνωστών λιπαρών οξέων, ταυτοποιούνται οι κορυφές του χρωματογραφήματος αντιστοιχίζοντας τους χρόνους κατακράτησης των μεθυλεστέρων στα αντίστοιχα λιπαρά οξέα.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4-ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Στο εδάφιο αυτό παρουσιάζονται και σχολιάζονται τα αποτελέσματα που ελήφθησαν από τη διεξαγωγή της πειραματικής διαδικασίας για τους σκοπούς της παρούσας μεταπτυχιακής μελέτης.

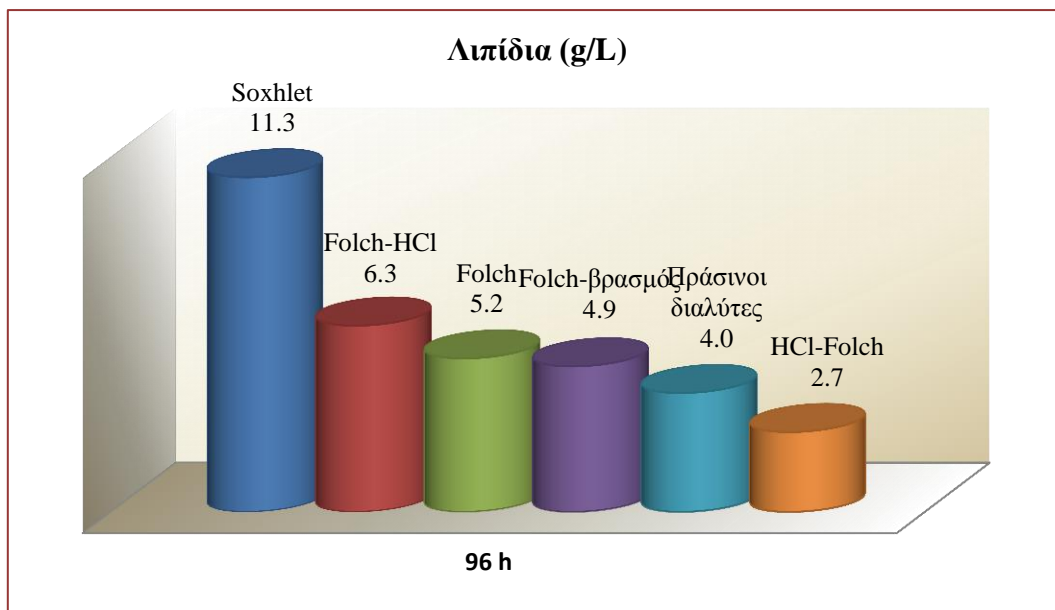
4.1 Αριστοποίηση εκχύλισης μικροβιακού λίπους

Για τους σκοπούς της αριστοποίησης της εκχύλισης του μικροβιακού λίπους, απομονώθηκε βιομάζα του μικροοργανισμού *L. starkeyi*, ο οποίος καλλιεργήθηκε μέσω ζύμωσης τύπου βυθού σε υπόστρωμα εμπορικής γλυκόζης αρχικής συγκέντρωσης σακχάρων 80 g/L. Η βιομάζα συλλέχθηκε έπειτα από 96 h ζύμωσης και διαχωρίστηκε από το υγρό της ζύμωσης όπως περιγράφηκε στη μέθοδο της λυοφιλίωσης. Το συνολικό βάρος της ξηρής μάζας ανήλθε σε 15.2 g/L.

Οι μέθοδοι εκχύλισης που επιλέχθηκαν χρησιμοποιήθηκαν όπως περιγράφηκε στο προηγούμενο εδάφιο και είναι οι εξής:

- Συσκευή Soxhlet
- Folch
- HCl-Folch: Υδρόλυση του δείγματος με HCl, προσθήκη αντιδραστηρίου Folch και εξάτμισή του εντός τριών ωρών
- Folch-HCl: Παραμονή του αντιδραστηρίου Folch στο δείγμα για 72h, εξάτμισή του και εν συνεχεία υδρόλυση της βιομάζας και παραμονή της με το μίγμα των αντιδραστηρίων για 24 h
- Folch-βρασμός
- Πράσινοι διαλύτες

Το Γράφημα 3 που ακολουθεί, απεικονίζει τη λιποσυσσώρευση που μετρήθηκε για όλες τις διαφορετικές μεθόδους εκχύλισης εκφρασμένη σε g/L, ενώ στον Πίνακα 11 εμφανίζονται και τα αντίστοιχα ποσοστά % επί του ξηρού βάρους.



Γράφημα 3 Συγκέντρωση ενδοκυτταρικών λιπιδίων.

Πίνακας 11 Αποτελέσματα αριστοποίησης εκχύλισης μικροβιακών λιπιδίων.

Μέθοδος Εκχύλισης	Συγκέντρωση (g/L)	Λιποπεριεκτικότητα (% ξ.β.)
Soxhlet	11.3	74.5
Folch-HCl	6.3	41.4
Folch	5.2	34.1
Folch-βρασμός	4.9	32.4
Πράσινοι διαλύτες	4.0	26.5
HCl-Folch	2.7	17.8

Είναι φανερό πως τόσο οι απόλυτες τιμές όσο και τα ποσοστά επί του ξηρού βάρους συνάδουν, υποδεικνύοντας πως η πιο αποδοτική μέθοδος είναι εκείνη της εκχύλισης με συσκευή Soxhlet, η οποία έδωσε σχεδόν 11 g/L λίπος (75%). Ωστόσο, η μέθοδος αυτή είναι δύσκολο να εφαρμοστεί στην πράξη σε εργαστηριακή κλίμακα καθώς σε περιπτώσεις συλλογής πολλαπλών δειγμάτων θα απαιτούταν η χρήση πολλών συσκευών ταυτόχρονα ώστε ο χρόνος των αναλύσεων να ομοιάζει με τον αντίστοιχο των υπόλοιπων μεθόδων.

Η δεύτερη σε σειρά καλύτερη μέθοδος εκχύλισης φαίνεται να είναι η χρήση του αντιδραστηρίου Folch σε συνδυασμό με την επακόλουθη υδρόλυση της βιομάζας με HCl και παραμονή της με το μίγμα των αντιδραστηρίων για 24 h. Με απόδοση περίπου 6 g/L λιπιδίων (41%) υπερβαίνει ελάχιστα τις δύο επόμενες μεθόδους, εκείνη με τη χρήση Folch και εκείνη με τη χρήση συνδυασμού Folch και βρασμού του

μίγματος που αποδίδουν περίπου 5g/L ενδοκυτταρικών λιπιδίων (41% και 34% αντιστοίχως). Από την άλλη πλευρά, τα αποτελέσματα της μεθόδου της άμεσης υδρόλυσης και εκχύλισης με Folch (HCl-Folch) εμφανίζονται να απέχουν κατά πολύ, μειωμένα σε λιγότερο από 3 g/L λιπιδίων (18%), καθιστώντας τη μέθοδο τελευταία κατά φθίνουσα σειρά σε αποτελεσματικότητα.

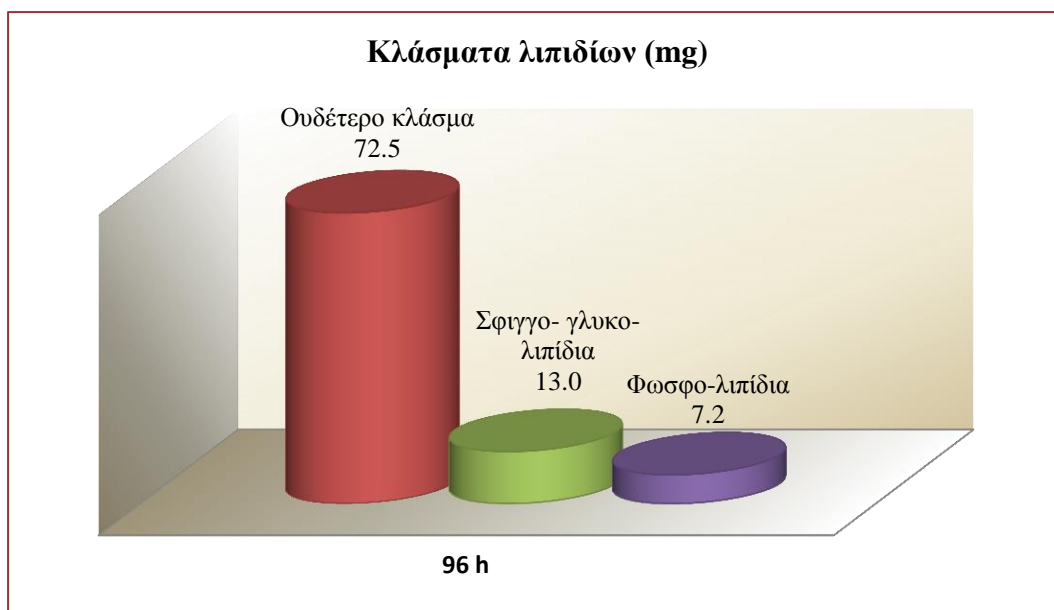
Τέλος, η μέθοδος εκχύλισης με πράσινους διαλύτες αντί του Folch, εμφανίζεται πολλά υποσχόμενη αφού υπολείπεται μόλις 1 g/L από εκείνη με τη χρήση Folch. Λαμβάνοντας, λοιπόν, υπόψη το σπουδαίο προτέρημα των πράσινων διαλυτών να μην επιβαρύνουν τόσο το περιβάλλον όσο και την υγεία του ανθρώπου θα μπορούσαν να αποτελέσουν μια πολύ ενδιαφέρουσα εναλλακτική πρόταση έπειτα από περαιτέρω μελέτη.

Συμπερασματικά, η μέθοδος που επιλέχθηκε να χρησιμοποιηθεί για την εκπόνηση της παρούσας μεταπτυχιακής μελέτης, είναι αυτή της χρησιμοποίησης Folch-HCl. Η μέθοδος αυτή συνδυάζει υψηλές αποδόσεις (δεύτερη κατά σειρά φθίνουσας αποτελεσματικότητας) και χαμηλότερο κόστος από τη χρήση της συσκευής Soxhlet. Ενδεικτικά αναφέρεται πως για την εκχύλιση της ίδιας ποσότητας δείγματος η μέθοδος Folch-HCl απαιτεί περίπου 50 mL διαλυτών, ενώ η μέθοδος Soxhlet χρειάζεται τη δαπάνη 400 mL περίπου. Επιπροσθέτως, οι χρόνοι εκχύλισης με τη μέθοδο Folch-HCl είναι αρκετά μικρότεροι από εκείνους της μεθόδου Soxhlet και ομοιάζουν με τους αντίστοιχους όλων των υπόλοιπων μεθόδων.

4.1.1. Κλασμάτωση λιπιδίων-TLC

Έπειτα από τον ποσοτικό προσδιορισμό των λιπιδίων με τις προαναφερθείσες μεθόδους, ακολούθησε η κλασμάτωσή τους σε ουδέτερα (N), σφιγγο- και γλυκο-λιπίδια (S & G), και φωσφο-λιπίδια (P), ακολουθώντας τη μέθοδο που περιγράφηκε στο προηγούμενο κεφάλαιο.

Για την κλασμάτωση χρησιμοποιήθηκαν 100 mg λίπους. Τα λιπίδια εκχυλίστηκαν με αντιδραστήριο Folch, το οποίο έδωσε τα ακόλουθα αποτελέσματα σε απόλυτες τιμές mg (Γράφημα 4) και σε ποσοστό % επί του συνολικού λιπιδιακού κλάσματος (Πίνακας 12).



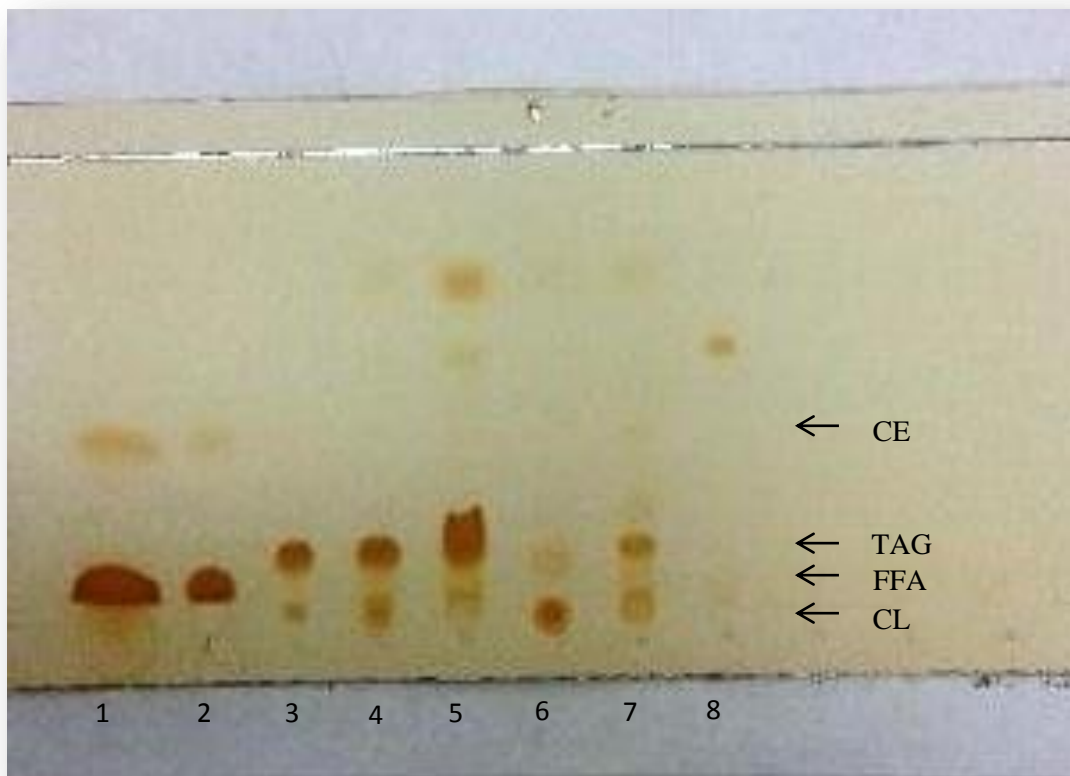
Γράφημα 4 Συγκεντρώσεις κλασμάτων λιπιδίων σε απόλυτες τιμές.

Πίνακας 12 Αποτελέσματα λιποσυσσώρευσης κλασμάτων % επί του συνολικού λίπους.

Κλάσματα λιπιδίων (% συνολικού λίπους)	
Ουδέτερο κλάσμα	71.8
Κλάσμα σφιγγο- γλυκο-λιπιδίων	12.9
Κλάσμα φωσφο-λιπιδίων	7.1
Συνολική ανάκτηση	91.8

Το ουδέτερο κλάσμα είναι αρκετά μεγαλύτερο από τα κλάσματα των σφιγγο- γλυκο- λιπιδίων και φωσφο-λιπιδίων, αποτελώντας το 72% περίπου του συνολικού κλάσματος. Η ανάκτηση των λιπιδίων ανήλθε σε 92% περίπου, πολύ ικανοποιητικό ποσοστό.

Η Εικόνα 21 που ακολουθεί απεικονίζει την πλάκα που προέκυψε από την ανάλυση TLC των ανωτέρω κλασμάτων.



Εικόνα 21 Αποτύπωμα κλασμάτων λιπιδίων σε πλάκα TLC. 1: Ελαϊκό οξύ 20μL/mL χλωροφορμίου (FFAs), 2: Ελαϊκό οξύ 10μL/mL χλωροφορμίου (FFAs), 3: Συνολικά λιπίδια, 4: Ουδέτερο κλάσμα, 5: Ουδέτερο κλάσμα, 6: Φωσφο-λιπίδια, 7: Working solution (CE: cholesteryl linolate, TAG: glyceryl triolate, CL: cholesterol), 8: Σφιγγο- γλυκο-λιπίδια.

Παρατηρείται πως έγινε σαφής διαχωρισμός σε τριγλυκερίδια των συνολικών και των ουδέτερων λιπιδίων. Το κλάσμα των φωσφο-λιπιδίων, ως πιο πολικό διαχωρίστηκε ως προς το πρότυπο της χοληστερόλης, με μικρότερο αποτύπωμα τριγλυκεριδίων.

4.2 Καλλιέργειες βυθού της ζύμης *L. starkeyi*

Σε πρώτο στάδιο πραγματοποιήθηκαν ασυνεχείς καλλιέργειες του μικροοργανισμού *L. starkeyi* DSM 70296 σε σακχαρούχα υποστρώματα και συγκεκριμένα σε υπόστρωμα εμπορικής γλυκόζης και σιροπιού γλυκόζης του οποίου η ημερομηνία λήξεως είχε παρέλθει. Οι ζυμώσεις αυτές δοκιμάστηκαν με αρχικές συγκεντρώσεις αναγόντων σακχάρων 40, 60 και 80 g/L.

Εν συνεχεία, πραγματοποιήθηκαν ζυμώσεις σε υπόστρωμα σιροπιού γλυκόζης με αρχική συγκέντρωση σακχάρων 80 g/L (βέλτιστη), με την προσθήκη άλατος (NaCl) σε αρχικές συγκεντρώσεις 10, 20, 30 και 40 g/L, προκειμένου να διαπιστωθούν οι

επιδράσεις του NaCl στις κινητικές κατανάλησης υποστρώματος και παραγωγής βιομάζας, μικροβιακού λίπους και ενδοπολυσακχαριτών.

Όπως έχει ήδη προαναφερθεί, οι πηγές αζώτου που χρησιμοποιήθηκαν ήταν η πεπτόνη και το εκχύλισμα ζύμης σε συγκεντρώσεις 1 και 2 g/L, αντίστοιχα. Στο θρεπτικό μέσο επικρατούσε περιορισμός σε άζωτο προκειμένου ο μεταβολισμός της ζύμης να στραφεί προς την παραγωγή δευτερογενών μεταβολιτών, ξεκινώντας με λόγο άνθρακα προς άζωτο (C/N) ίσο με 53 mol/mol.

4.2.1 Κινητική της κυτταρικής αύξησης, της κατανάλησης υποστρώματος και της παραγωγής ενδοκυτταρικών λιπιδίων του *L. starkeyi* σε υπόστρωμα εμπορικής γλυκόζης

Οι Πίνακες 13-15 που ακολουθούν, περιέχουν τα αποτελέσματα της παραγωγής βιομάζας και λιπιδίων σε συνάρτηση με το χρόνο. Εμφανίζουν, επίσης, τους συντελεστές απόδοσης των λιπιδίων ($Y_{L/X}$) σε σχέση με την παραγόμενη βιομάζα, καθώς επίσης και την καταναλωθείσα πηγή άνθρακα. Οι καλλιέργειες αφορούν σε πηγή άνθρακα γλυκόζης σε αρχικές συγκεντρώσεις 40, 60 και 80 g/L αντιστοίχως.

Αρχικά, ο Πίνακας 13 που ακολουθεί, αφορά στα αποτελέσματα της ζύμωσης αρχικής συγκέντρωσης σακχάρων 40 g/L.

Πίνακας 13 Αποτελέσματα κινητικής του *L. starkeyi* σε υπόστρωμα με πηγή άνθρακα εμπορική γλυκόζη αρχικής συγκέντρωσης σακχάρων 40 g/L. a: $Y_{L/Xmax}$, b: L_{max} , c: X_{max} .

Time (h)	Biomass (g/L)	Lipids (g/L)	Sugars consumed (g/L)	$Y_{L/X}$ (%)
^a 48	5.3	1.7	10.8	31.7
^b 72	13.8	3.7	33.9	26.4
^c 168	17.4	2.5	40.7	14.5

Παρατηρείται πως η ζύμη εμφανίζει ανάπτυξη με παραγωγή βιομάζας που φτάνει τα 17.4 g/L στις 168 h καλλιέργειας. Στο σημείο αυτό η απόδοση ανέρχεται σε περίπου 43% (0.43 g βιομάζας ανά g καταναλωθέντος υποστρώματος). Η κατανάληση σακχάρων ξεκινά λίγες ώρες μετά τον εμβολιασμό και φτάνουν να εξαντληθούν από τις 120 h. Από τις 144 h έως τις 168 h ο μικροοργανισμός φαίνεται να βρίσκεται στη στάσιμη φάση του, καθώς η βιομάζα και τα λιπίδια παραμένουν σχεδόν σταθερά, ενώ από τις 192 h εισέρχεται στη φάση θανάτου. Από τις 120 h έως τις 168 h καλλιέργειας η βιομάζα παρουσιάζει μια μικρή αύξηση παρ' όλο που τα σάκχαρα

έχουν καταναλωθεί. Το γεγονός αυτό αποδίδεται σε μικρή αύξηση των λιπιδίων που επισυμβαίνει ταυτόχρονα, εξαιτίας ίσως ανακατανάλωσης ενδοπολυσακχαριτών.

Η παραγωγή λίπους ξεκινά από τις 48 h που έχει προβλεφθεί να εξαντλείται η πηγή αζώτου στο θρεπτικό μέσο, ούτως ώστε η ζύμη να στρέφει το μεταβολισμό της προς την παραγωγή ενδοκυτταρικού λίπους. Περί τις 72 h ζύμωσης, οπότε ο μικροοργανισμός βρίσκεται στην εκθετική του φάση, εμφανίζεται η μέγιστη παραγωγή ενδοκυτταρικών λιπιδίων (3.7 g/L) με συντελεστή απόδοσης 26.4% (0.26 g λίπους ανά g παραγόμενης βιομάζας). Η μέγιστη παραγωγικότητα της ζύμης συμπίπτει με τη μέγιστη παραγωγή λίπους και ανέρχεται σε 0.05 g/L/h, όπως επίσης και η μέγιστη ταχύτητα κατανάλωσης υποστρώματος που ανέρχεται σχεδόν σε 0.47 g/L/h.

Ο Πίνακας 14 στη συνέχεια, αναφέρεται στην καλλιέργεια της ζύμης σε αρχική συγκέντρωση γλυκόζης 60 g/L.

Πίνακας 14 Αποτελέσματα κινητικής του *L. starkeyi* σε υπόστρωμα με πηγή άνθρακα εμπορική γλυκόζη αρχικής συγκέντρωσης σακχάρων 60 g/L. a: $Y_{L/X}$ max, b: L_{max} , c: X_{max} .

Time (h)	Biomass (g/L)	Lipids (g/L)	Sugars consumed (g/L)	$Y_{L/X}$ (%)
^{a, b} 72	11.6	4.3	27.9	36.8
^c 168	25.0	3.5	62.6	14.0

Κατά την καλλιέργεια του στελέχους *L. starkeyi* DSM 70296 σε 60 g/L αρχική συγκέντρωση σακχάρων, η βιομάζα ανήλθε στα 25.0 g/L στις 168 h. Η απόδοση στο σημείο αυτό έφτασε περίπου στο 40%, σε παρόμοιο δηλαδή επίπεδο με την αντίστοιχη της ζύμωσης σε αρχική συγκέντρωση σακχάρων 40 g/L. Τα σάκχαρα εξαντλήθηκαν από τις 144 h ζύμωσης.

Η μέγιστη παραγωγή λίπους εντοπίζεται και εδώ στις 72 h και ανέρχεται σε 4.3 g/L με συντελεστή απόδοσης 36.8% και παραγωγικότητα 0.06 g/L/h. Η μέγιστη ταχύτητα κατανάλωσης υποστρώματος σε αυτήν την περίπτωση φτάνει περίπου το 0.51 g/L/h στις 120 h ζύμωσης.

Τέλος, στον Πίνακα 15 παρακάτω φαίνονται τα αποτελέσματα των κινητικών για την περίπτωση της καλλιέργειας σε αρχική συγκέντρωση σακχάρων 80 g/L.

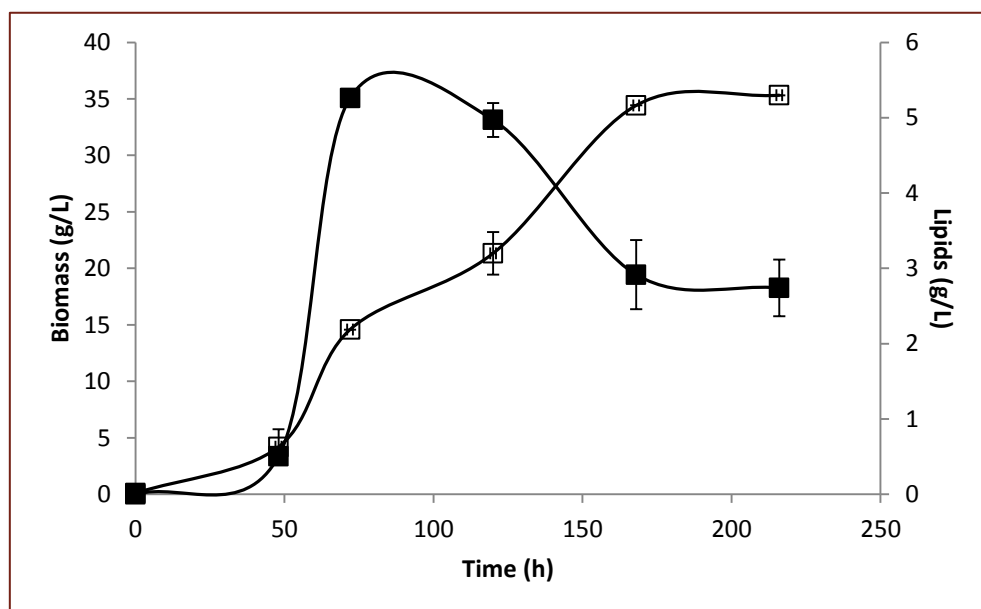
Πίνακας 15 Αποτελέσματα κινητικής του *L. starkeyi* σε υπόστρωμα με πηγή άνθρακα εμπορική γλυκόζη αρχικής συγκέντρωσης σακχάρων 80 g/L. a: YL/Xmax, b: Lmax, c: Xmax.

Time (h)	Biomass (g/L)	Lipids (g/L)	Sugars consumed (g/L)	Y _{LX} (%)
^{a, b} 72	14.6	5.3	57.5	36.1
^c 216	35.3	2.7	85.0	7.8

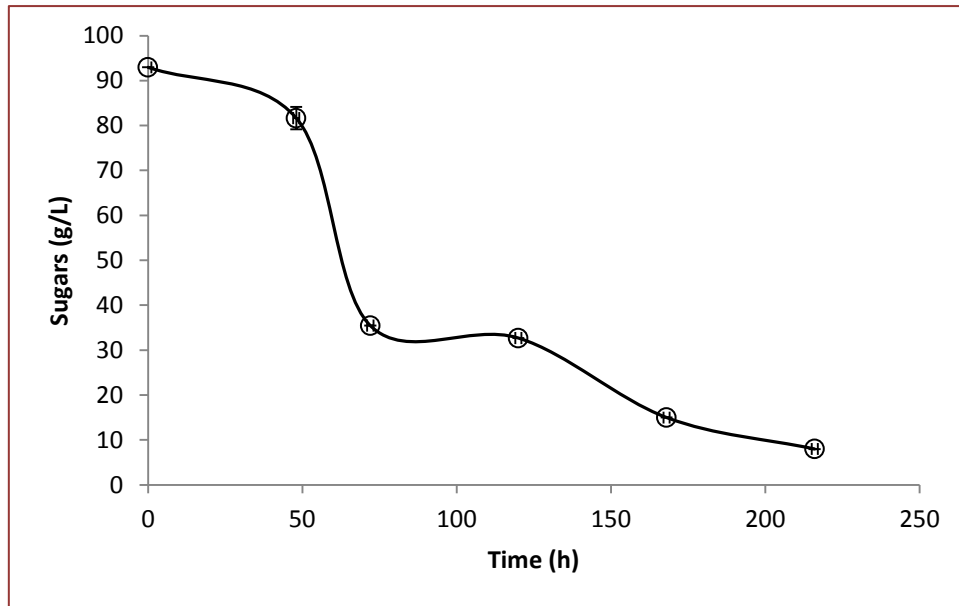
Φαίνεται πως στην περίπτωση της καλλιέργειας αυτής η βιομάζα ανήλθε στα 35.3 g/L στις 216 h, ενώ τα σάκχαρα δείχνουν να εξαντλήθηκαν από τις 216 h ζύμωσης. Η απόδοση της βιομάζας ως προς το καταναλωθέν υπόστρωμα κυμαίνεται γύρω στο 35-42%. Από τις 168 h ζύμωσης, η ζύμη φαίνεται να βρίσκεται στη στάσιμη φάση της αφού από εκεί και έπειτα τα λιπίδια και η βιομάζα παραμένουν σε σχετικά σταθερά επίπεδα.

Η μέγιστη παραγωγή λίπους για μια ακόμη φορά εμφανίζεται στις 72 h και ανέρχεται σε 5.3 g/L με συντελεστή απόδοσης 36.1% και παραγωγικότητα 0.07 g/L/h. Η ταχύτητα κατανάλωσης υποστρώματος κυμάνθηκε από 0.24 g/L/h έως 0.80 g/L/h.

Στο Γράφημα 5 που ακολουθεί εμφανίζονται οι κινητικές παραγωγής βιομάζας και ενδοκυτταρικών λιπιδίων, ενώ στο Γράφημα 6 η κατανάλωση υποστρώματος της καλλιέργειας σε αρχική συγκέντρωση σακχάρων 80 g/L.

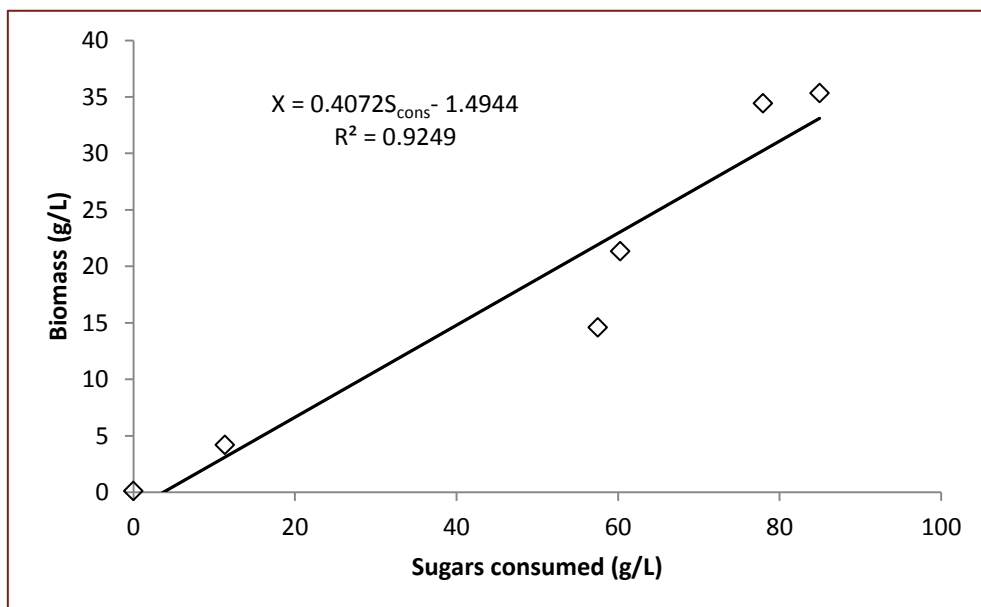


Γράφημα 5 Κινητική παραγωγής βιομάζας και μικροβιακού λίπους κατά την καλλιέργεια του στελέχους *L. starkeyi* DSM 70296 σε υπόστρωμα με πηγή άνθρακα εμπορική γλυκόζη αρχικής συγκέντρωσης σακχάρων 80 g/L. (□) Βιομάζα (g/L), (■) Λιπίδια (g/L).



Γράφημα 6 Κινητική κατανάλωσης υποστρώματος κατά την καλλιέργεια του στελέχους *L. starkeyi* DSM 70296 σε υπόστρωμα με πηγή άνθρακα εμπορική γλυκόζη αρχικής συγκέντρωσης σακχάρων 80 g/L. (○) Σάκχαρο (g/L).

Στο Γράφημα 7 που ακολουθεί φαίνεται πως το καταναλωθέν υπόστρωμα εξηγεί κατά πολύ μεγάλο ποσοστό (92.5%) τις μεταβολές της βιομάζας και μάλιστα οι δύο αυτές μεταβλητές έχουν θετική σχέση.



Γράφημα 7 Σχέση βιομάζας-καταναλωθέντος υποστρώματος κατά την καλλιέργεια της ζύμης *L. starkeyi* σε 80 g/L αρχική συγκέντρωση σακχάρων. Πηγή άνθρακα: Εμπορική γλυκόζη.

Οι καλλιέργειες στις τρεις προαναφερθείσες συγκεντρώσεις εμπορικής γλυκόζης εμφάνισαν σταθερές αποδόσεις βιομάζας και ταχύτητες κατανάλωσης υποστρώματος, γεγονός που υποδεικνύει πως δεν υπήρξε παρεμπόδιση εκ του υποστρώματος.

4.2.2 Κινητική της κυτταρικής αύξησης, της κατανάλωσης υποστρώματος και της παραγωγής ενδοκυτταρικών λιπιδίων του *L. starkeyi* σε υπόστρωμα σιροπιού γλυκόζης

Οι Πίνακες 16-18 που ακολουθούν, περιέχουν τα αποτελέσματα της παραγωγής βιομάζας και λιπιδίων, καθώς επίσης και της κατανάλωσης της πηγής άνθρακα σε συνάρτηση με το χρόνο. Εμφανίζουν, επίσης, τους συντελεστές απόδοσης των λιπιδίων ($Y_{L/X}$) σε σχέση με την παραγόμενη βιομάζα. Οι καλλιέργειες αφορούν σε πηγή άνθρακα σιροπιού γλυκόζης σε αρχικές συγκεντρώσεις σακχάρων 40, 60 και 80 g/L αντιστοίχως.

Πίνακας 16 Αποτελέσματα κινητικής του *L. starkeyi* σε υπόστρωμα με πηγή άνθρακα σιρόπι γλυκόζης αρχικής συγκέντρωσης σακχάρων 40 g/L. a: $Y_{L/Xmax}$, b: L_{max} , c: X_{max} .

Time (h)	Biomass (g/L)	Lipids (g/L)	Sugars consumed (g/L)	$Y_{L/X}$ (%)
^{a, b} 144	20.0	4.1	38.1	20.5
^c 168	22.1	1.3	38.1	5.7

Τα σάκχαρα καταναλώθηκαν από τις 144 h, στις οποίες εμφανίζεται και η μέγιστη παραγωγή ενδοκυτταρικού λίπους (4.1 g/L) με μέγιστο συντελεστή απόδοσης 20.5% και μέγιστη παραγωγικότητα 0.03 g/L/h. Από τις 168 h και έπειτα, ο μικροοργανισμός φαίνεται να διανύει τη φάση θανάτου του, καθώς τόσο η βιομάζα όσο και η λιποπεριεκτικότητα μειώνονται. Η μέγιστη παραγόμενη βιομάζα εμφανίζεται στις 168 h και ανέρχεται σε 22.1 g/L, με μέγιστη απόδοση 58%. Τέλος, η μέγιστη ταχύτητα κατανάλωσης υποστρώματος φτάνει τα 0.38 g/L/h, λίγο χαμηλότερο επίπεδο από την αντίστοιχη ζύμωση σε εμπορική γλυκόζη.

Ενδιαφέρον εμφανίζει το γεγονός ότι η μέγιστη λιποπεριεκτικότητα, επιτυγχάνεται σε μεταγενέστερο χρόνο (144 h) σε σχέση με την καλλιέργεια ίδιας αρχικής συγκέντρωσης σακχάρων υποστρώματος εμπορικής γλυκόζης (72 h). Ωστόσο, τόσο η τιμή των λιπιδίων όσο και η μέγιστη τιμή βιομάζας, είναι μεγαλύτερες στην περίπτωση του υποστρώματος σιροπιού γλυκόζης. Εκ πρώτης όψεως, λοιπόν, η αντικατάσταση της γλυκόζης από σιρόπι φαίνεται να καθυστερεί τρόπον τινά το

μεταβολισμό του μικροοργανισμού, δίνοντας παρ' όλα αυτά καλύτερα αποτελέσματα στην παραγωγή βιομάζας και ενδοκυτταρικών λιπιδίων.

Ακολουθούν τα αποτελέσματα της καλλιέργειας σε αρχική συγκέντρωση σακχάρων 60 g/L (Πίνακας 17).

Πίνακας 17 Αποτελέσματα κινητικής του *L. starkeyi* σε υπόστρωμα με πηγή άνθρακα σιρόπι γλυκόζης αρχικής συγκέντρωσης σακχάρων 60 g/L. a: YL/Xmax, b: Lmax, c: Xmax.

Time (h)	Biomass (g/L)	Lipids (g/L)	Sugars consumed (g/L)	Y _{LX} (%)
^{a, b, c} 192	29.5	7.3	55.8	24.7

Στην περίπτωση της αρχικής συγκέντρωσης σακχάρων 60 g/L αυτά καταναλώθηκαν στις 192 h, συνάδοντας με την παραγωγή τόσο της μέγιστης βιομάζας (29.5 g/L) όσο και του λίπους (7.3 g/L) με επίσης μέγιστο συντελεστή απόδοσης 24.7% και παραγωγικότητα 0.04 g/L/h. Ωστόσο, η μέγιστη παραγωγικότητα ανέρχεται σε 0.05 g/L/h και εντοπίζεται στις 48 h της καλλιέργειας. Ο συντελεστής απόδοσης βιομάζας στο σημείο των 192 h ανέρχεται σε 53%. Η ταχύτητα κατανάλωσης υποστρώματος κυμαίνεται μεταξύ 0.30 και 0.43 g/L/h.

Συγκρίνοντας την παρούσα καλλιέργεια με της αντίστοιχης αρχικής συγκέντρωσης σακχάρων υποστρώματος γλυκόζης, προκύπτει ξανά το συμπέρασμα πως το σιρόπι δίδει μεγαλύτερη παραγωγή προϊόντων, καθυστερώντας όμως ελαφρώς το μεταβολισμό της ζύμης.

Εν συνεχεία, στο Γράφημα 10 και στον Πίνακα 18 απεικονίζονται τα αποτελέσματα κινητικής του *L. starkeyi* σε 80 g/L αρχική συγκέντρωση σακχάρων.

Πίνακας 18 Αποτελέσματα κινητικής του *L. starkeyi* σε υπόστρωμα με πηγή άνθρακα σιρόπι γλυκόζης αρχικής συγκέντρωσης σακχάρων 80 g/L. a: YL/Xmax, b: Lmax, c: Xmax.

Time (h)	Biomass (g/L)	Lipids (g/L)	Sugars consumed (g/L)	Y _{LX} (%)
^a 72	8.3	2.6	11.8	31.2
^b 120	16.1	4.2	29.3	25.9
^c 240	39.4	2.2	60.4	5.5

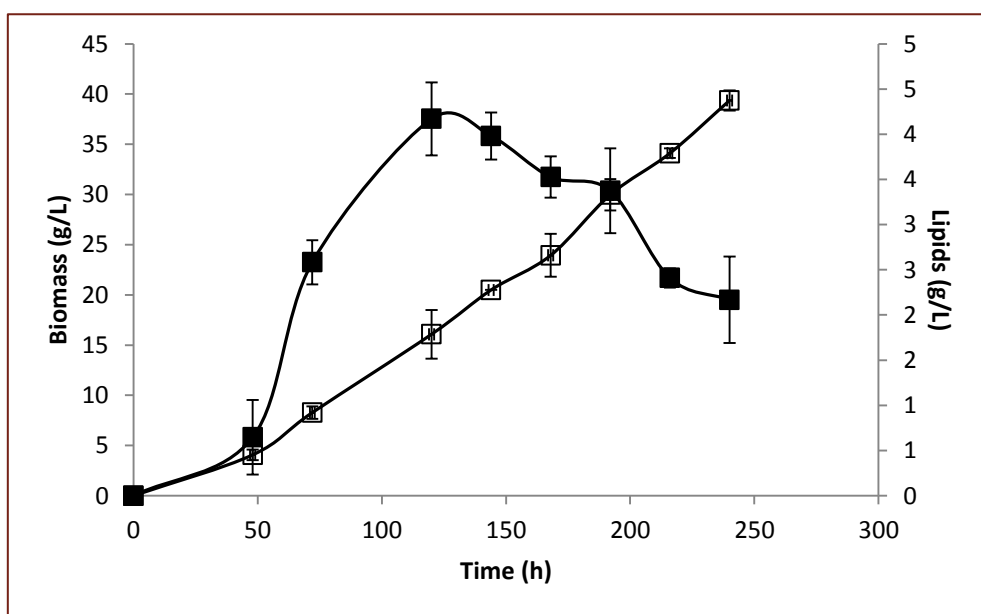
Η μέγιστη παραγωγή βιομάζας εντοπίζεται στις 240 h καλλιέργειας και ανέρχεται σε 39.4 g/L, ενώ ο συντελεστής απόδοσης σε αυτό το σημείο ανέρχεται σε 65%. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός πως καθ' όλη τη διάρκεια της ζύμωσης ο συντελεστής

απόδοσης της βιομάζας κυμαίνεται σε πολύ υψηλά επίπεδα σε σχέση με όλες τις προηγούμενες καλλιέργειες και συγκεκριμένα μεταξύ 55 και 65%.

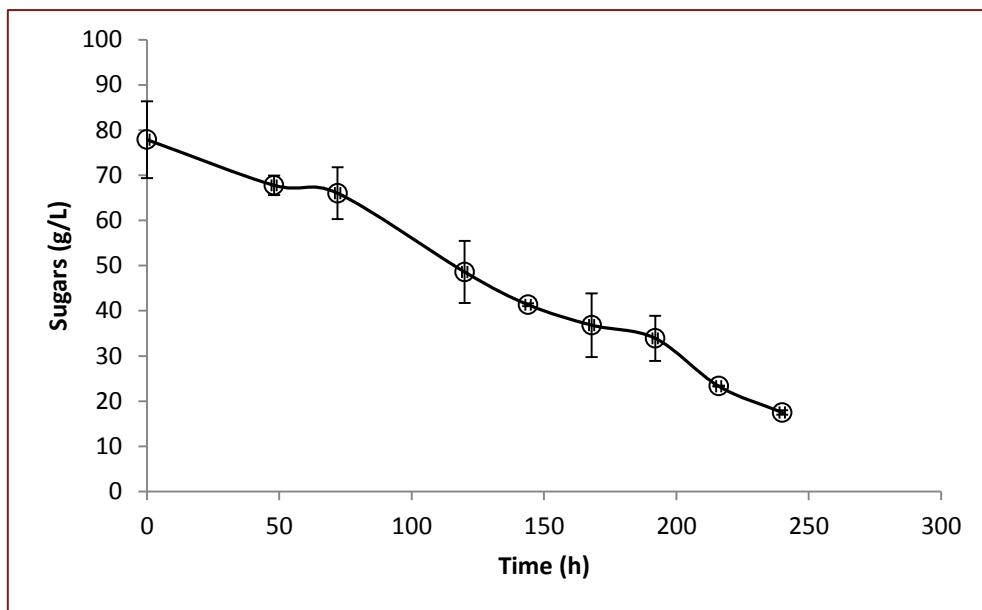
Η μέγιστη παραγωγή λιπιδίων γίνεται στις 120 h και φτάνει τα 4.2 g/L με συντελεστή απόδοσης 25.9% και παραγωγικότητα 0.03 g/L/h. Η παραγωγικότητα φτάνει το μέγιστό της στις 72 h της ζύμωσης, οπότε ανέρχεται σε 0.04 g/L/h. Μέχρι τις 240 h που λήφθηκε το τελευταίο δείγμα της ζύμωσης, τα σάκχαρα έφτασαν στο επίπεδο των 17.5 g/L, με ταχύτητα κατανάλωσης 0.25 g/L/h.

Παρ' όλο που η λήψη δειγμάτων σταμάτησε πριν την επιβραδυνόμενη φάση της ζύμης, επιβεβαιώνεται το συμπέρασμα πως το σιρόπι γλυκόζης δύναται να καθυστερήσει χρονικά την απόδοση του στελέχους *L. starkeyi* DSM 70296. Μπορεί επίσης να προκαλέσει αυξημένες αποδόσεις σε σχέση με την εμπορική γλυκόζη τόσο στη βιομάζα όσο και στην παραγωγή δευτερογενών μεταβολιτών όπως το λίπος και οι ενδοπολυσακχαρίτες.

Στα Γραφήματα 8 και 9 που ακολουθούν, παρουσιάζονται οι κινητικές παραγωγής βιομάζας και λιπιδίων και η κινητική κατανάλωσης σακχάρων, αντίστοιχα, για αρχική συγκέντρωση 80 g/L σε υπόστρωμα σιροπιού γλυκόζης.

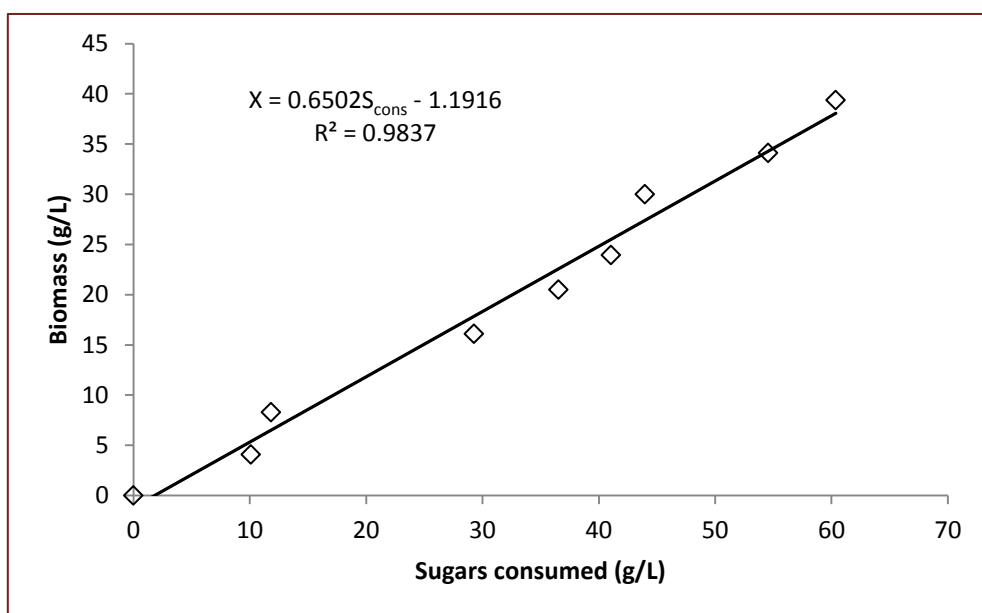


Γράφημα 8 Κινητική παραγωγής βιομάζας και μικροβιακού λίπους κατά την καλλιέργεια του στελέχους *L. starkeyi* DSM 70296 σε υπόστρωμα με πηγή άνθρακα σιρόπι γλυκόζης αρχικής συγκέντρωσης σακχάρων 80 g/L. (□) Βιομάζα (g/L), (■) Λιπίδια (g/L).



Γράφημα 9 Κινητική κατανάλωσης υποστρώματος κατά την καλλιέργεια του στελέχους *L. starkeyi* DSM 70296 σε υπόστρωμα με πηγή άνθρακα σιρόπι γλυκόζης αρχικής συγκέντρωσης σακχάρων 80 g/L. (○) Σάκχαρα (g/L).

Στο Γράφημα 10 απεικονίζεται η θετική συσχέτιση παραγόμενης βιομάζας και καταναλωθέντος υποστρώματος. Όπως έχει ήδη προαναφερθεί και φαίνεται επίσης από την εξίσωση της γραμμής τάσης παρακάτω, ο συντελεστής απόδοσης βιομάζας ανέρχεται σε περίπου 65%.



Γράφημα 10 Σχέση βιομάζας-καταναλωθέντος υποστρώματος κατά την καλλιέργεια της ζύμης *L. starkeyi* σε 80 g/L αρχική συγκέντρωση σακχάρων. Πηγή άνθρακα: Σιρόπι γλυκόζης.

4.2.3 Κινητική της κυτταρικής αύξησης, της κατανάλωσης υποστρώματος και της παραγωγής ενδοκυτταρικών λιπιδίων του *L. starkeyi* σε υπόστρωμα σιροπιού γλυκόζης με προσθήκη άλατος

Στο εδάφιο αυτό παρουσιάζονται τα αποτελέσματα ενός σετ ζυμώσεων σε σιρόπι γλυκόζης με την προσθήκη διαφορετικών συγκεντρώσεων αλατιού, ώστε να διαπιστωθεί η επιρροή του στην κινητική του *L. starkeyi*. Η αρχική συγκέντρωση σακχάρων που χρησιμοποιήθηκε ήταν 80 g/L καθώς έδωσε τα καλύτερα αποτελέσματα σε λιποσυσσώρευση σε σχέση με τις υπόλοιπες ζυμώσεις βυθού που έλαβαν χώρα και αναλύθηκαν προηγουμένως. Οι συγκεντρώσεις NaCl που χρησιμοποιήθηκαν ήταν 10, 20, 30 και 40 g/L.

Αρχικά παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των κινητικών για την συγκέντρωση NaCl των 10 g/L στον Πίνακα 19 που ακολουθεί.

Πίνακας 19 Αποτελέσματα κινητικής του *L. starkeyi* σε υπόστρωμα με πηγή άνθρακα σιρόπι γλυκόζης αρχικής συγκέντρωσης σακχάρων 80 g/L και προσθήκη NaCl 10 g/L. a: Y_{LX} , b: L_{max} , c: X_{max} .

Time (h)	Biomass (g/L)	Lipids (g/L)	Sugars consumed (g/L)	Y_{LX} (%)
^a 144	13.2	4.7	38.0	35.4
^b 192	31.4	9.3	55.5	29.7
^c 264	41.3	4.9	62.7	11.8

Όπως φαίνεται, η ζύμη παράγαγε βιομάζα που έφτασε την μέγιστη τιμή των 41.3 g/L στις 264 h ζύμωσης, οπότε έγινε λήψη του τελευταίου σημείου της καλλιέργειας. Ο συντελεστής απόδοσης στο σημείο αυτό ανήλθε σε σχεδόν 66%.

Στο σημείο των 264 h έχει μείνει μια ποσότητα ακατανάλωτων σακχάρων (13.0 g/L). Η μέγιστη παραγωγή λιπιδίων επιτυγχάνεται στις 192 h καλλιέργειας και ανέρχεται στο επίπεδο των 9.3 g/L, με απόδοση 29.7 % και ταυτόχρονη μέγιστη παραγωγικότητα 0.05 g/L/h. Ωστόσο, η μέγιστη λιποπεριεκτικότητα φτάνει το 35.4% και επιτυγχάνεται στις 144 h. Η ταχύτητα κατανάλωσης του υποστρώματος κυμαίνεται από περίπου 0.20 έως 0.34 g/L/h.

Κατά τη σύγκριση μεταξύ της ζύμωσης σε σιρόπι γλυκόζης αρχικής συγκέντρωσης σακχάρων 80 g/L και της παρούσας καλλιέργειας με ίδια πηγή άνθρακα και ίδια αρχική συγκέντρωση σακχάρων με επιπλέον την προσθήκη 10 g/L NaCl γίνεται

αντιληπτό πως παρ' όλο που η βιομάζα κυμαίνεται σε παρόμοια επίπεδα και στις δύο ζυμώσεις του *L. starkeyi* (39.4 g/L και 41.3 g/L αντίστοιχα) η παραγωγή λιπιδίων κυμαίνεται σε αισθητά μεγαλύτερα επίπεδα στην καλλιέργεια με την προσθήκη NaCl (9.3 g/L έναντι 4.2 g/L κατά την καλλιέργεια χωρίς αλάτι). Το αυτό ισχύει και στην περίπτωση της λιποπεριεκτικότητας. Επομένως, η προσθήκη αλατιού σε συγκέντρωση 10 g/L φαίνεται να ευνοεί την παραγωγή λίπους.

Εν συνεχεία, παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των κινητικών για την συγκέντρωση NaCl των 20 g/L στον Πίνακα 20 που ακολουθεί.

Πίνακας 20 Αποτελέσματα κινητικής του *L. starkeyi* σε υπόστρωμα με πηγή άνθρακα σιρόπι γλυκόζης αρχικής συγκέντρωσης σακχάρων 80 g/L και προσθήκη NaCl 20 g/L. a: $Y_{L/X}$ max, b: L_{max} , c: X_{max} .

Time (h)	Biomass (g/L)	Lipids (g/L)	Sugars consumed (g/L)	$Y_{L/X}$ (%)
^a 144	11.0	4.4	49.2	40.4
^b 216	29.8	10.0	62.4	33.4
^c 264	31.6	4.7	63.5	15.0

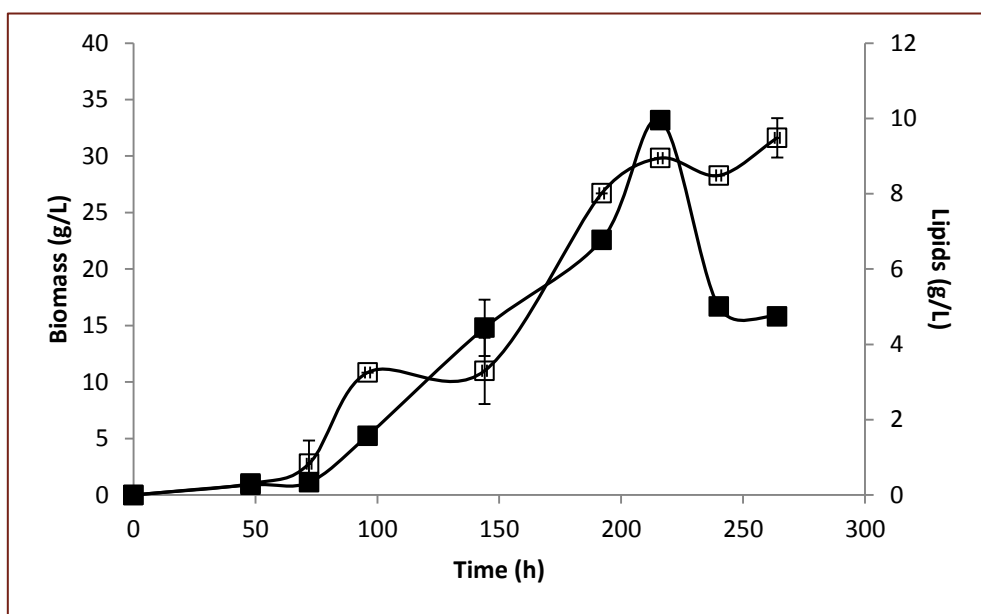
Η βιομάζα εμφανίζει αυξητική τάση φτάνοντας τα 31.6 g/L-περίπου 10 g/L λιγότερο σε σχέση με την προηγούμενη περίπτωση-στις 264 h ζύμωσης, οπότε και λήφθηκε το τελευταίο σημείο. Ο συντελεστής απόδοσης της βιομάζας ανέρχεται στο 50% περίπου για αυτό το σημείο, εμφανώς μειωμένος σε σχέση με την προηγούμενη καλλιέργεια, όμως σε υψηλό γενικά επίπεδο.

Όπως και στην προηγούμενη περίπτωση, έτσι και σε αυτήν υπολείπονται ακατανάλωτα σάκχαρα που ανέρχονται σε 15.1 g/L. Η μέγιστη παραγωγή λίπους εντοπίζεται στις 216 h καλλιέργειας και ανέρχεται σε 10.0 g/L-περίπου 1 g/L περισσότερο σε σχέση με την προηγούμενη περίπτωση-με απόδοση 33.4 % και μέγιστη παραγωγικότητα 0.05 g/L/h. Παρατηρείται πως η μέγιστη λιποσυσσώρευση εμφανίζεται αρκετά νωρίτερα στις 144 h και φτάνει στο 40.4 %. Η ταχύτητα κατανάλωσης υποστρώματος κυμαίνεται σε παρόμοια επίπεδα με της προηγούμενης καλλιέργειας, μεταξύ περίπου 0.20 και 0.40 g/L/h.

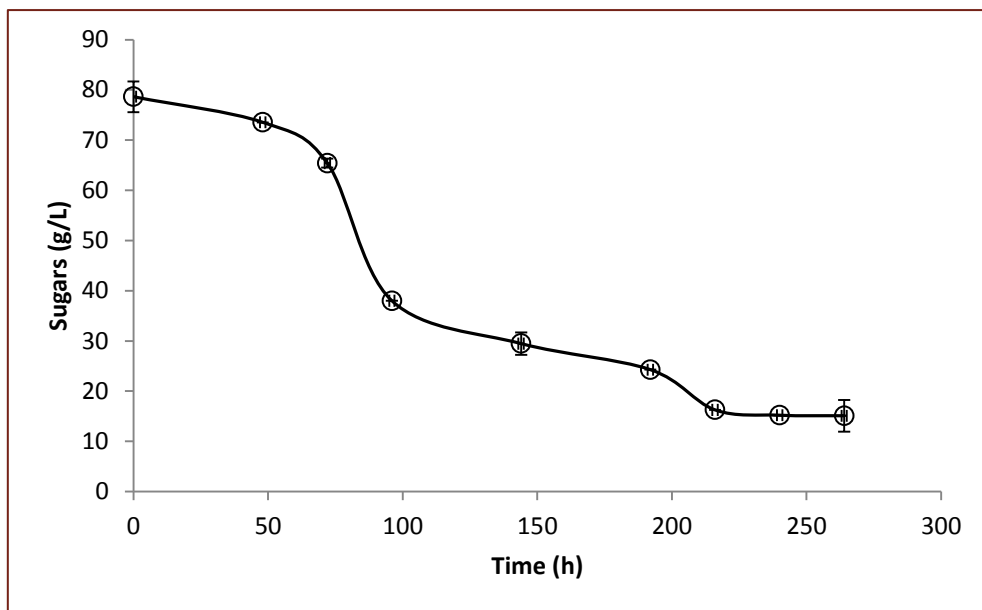
Παρατηρείται πως η προσθήκη αλατιού σε συγκέντρωση 20 g/L προκάλεσε τη μείωση της παραγωγής βιομάζας καθώς επίσης και την καθυστέρησή της. Ωστόσο, και σε αυτήν την περίπτωση το αλάτι φαίνεται να ευνοεί τη λιποσυσσώρευση καθώς από τις 144 h και μετά το παραγόμενο λίπους και η λιποπεριεκτικότητα της

καλλιέργειας με τα 20 g/L πρόσθετο αλάτι υπερβαίνουν εκείνης που δεν περιέχει πρόσθετο αλάτι αλλά και εκείνης με προσθήκη 10 g/L NaCl.

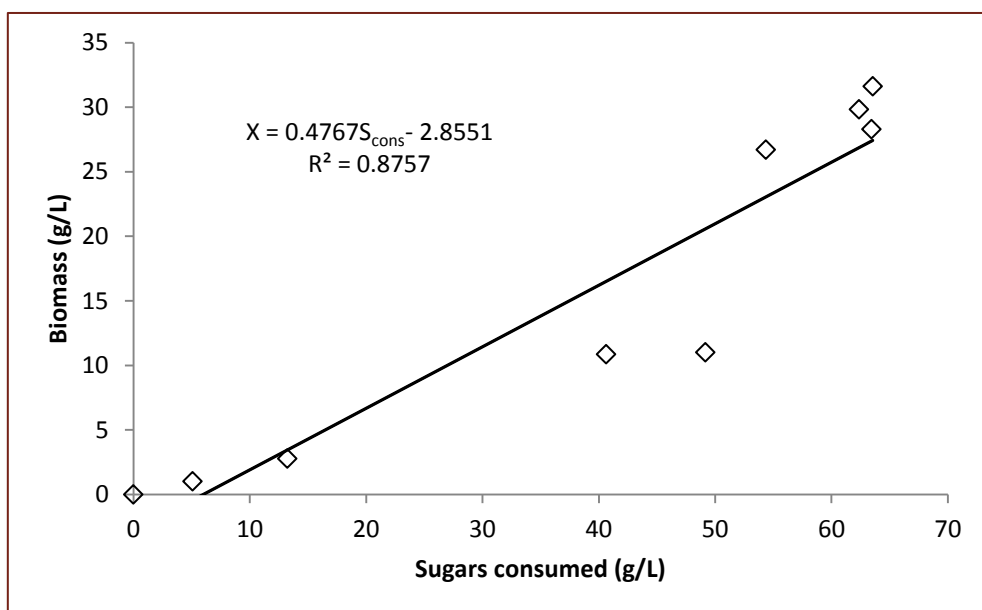
Το Γράφημα 11 απεικονίζει την παραγωγή βιομάζας και ενδοκυτταρικών λιπιδίων για τα 80 g/L αρχικών αναγόντων σακχάρων σιροπιού γλυκόζης με προσθήκη 20 g/L NaCl. Το Γράφημα 12 παρουσιάζει την αντίστοιχη κατανάλωση υποστρώματος.



Γράφημα 11 Κινητική παραγωγής βιομάζας και μικροβιακού λίπους κατά την καλλιέργεια του στελέχους *L. starkeyi* DSM 70296 σε υπόστρωμα με πηγή άνθρακα σιρόπι γλυκόζης αρχικής συγκέντρωσης σακχάρων 80 g/L και προσθήκη 20 g/L NaCl. (□) Βιομάζα (g/L), (■) Λιπίδια (g/L).



Γράφημα 12 Κινητική κατανάλωσης υποστρώματος κατά την καλλιέργεια του στελέχους *L. starkeyi* DSM 70296 σε υπόστρωμα με πηγή άνθρακα σιρόπι γλυκόζης αρχικής συγκέντρωσης σακχάρων 80 g/L και προσθήκη 20 g/L NaCl. (○) Σάκχαρα (g/L).



Γράφημα 13 Σχέση βιομάζας-καταναλωθέντος υποστρώματος κατά την καλλιέργεια της ζύμης *L. starkeyi* σε 80 g/L αρχική συγκέντρωση σακχάρων. Πηγή άνθρακα: Σιρόπι γλυκόζης & 20 g/L NaCl.

Ακολουθεί η ανάλυση των αποτελεσμάτων της καλλιέργειας με προσθήκη 30 g/L NaCl, όπως εμφανίζονται στον Πίνακα 21 που έπεται.

Πίνακας 21 Αποτελέσματα κινητικής του *L. starkeyi* σε υπόστρωμα με πηγή άνθρακα σιρόπι γλυκόζης αρχικής συγκέντρωσης σακχάρων 80 g/L και προσθήκη NaCl 30 g/L. a: $Y_{L/X}$, b: L_{max} , c: X_{max} .

Time (h)	Biomass (g/L)	Lipids (g/L)	Sugars consumed (g/L)	$Y_{L/X}$ (%)
^a 192	6.1	4.5	27.0	73.3
^{b, c} 264	21.5	10.6	43.4	49.4

Στο τελευταίο σημείο που λήφθηκε για την καλλιέργεια αυτήν, υπάρχουν 35.2 g/L σάκχαρα που δεν έχουν καταναλωθεί από τον μικροοργανισμό και επίσης παρατηρείται μεγάλη μείωση της ποσότητας της παραγόμενης βιομάζας.

Η μέγιστη παραγωγή βιομάζας και λιπιδίων εμφανίζονται στις 264 h καλλιέργειας με τιμές 21.5 g/L και 10.6 g/L, αντιστοίχως. Ο συντελεστής απόδοσης βιομάζας στο σημείο αυτό ανέρχεται σε 49%. Επιπλέον, η ταχύτητα κατανάλωσης του υποστρώματος φτάνει μόλις τα 0.16 g/L/h για το εν λόγω σημείο, ενώ γενικότερα κυμαίνεται μεταξύ 0.11 και 0.18 g/L/h, αισθητά χαμηλότερα σε σύγκριση με τις προηγούμενες καλλιέργειες. Συμπεραίνεται, λοιπόν, πως με την αύξηση της συγκέντρωσης του αλατιού στο μέσο της καλλιέργειας, επισυμβαίνει αισθητή μείωση της απόδοσης και της ταχύτητας κατανάλωσης υποστρώματος, υποδεικνύοντας παρεμπόδιση εκ του υποστρώματος.

Συνεπώς, τα 30 g/L NaCl άρχισαν να δρουν παρεμποδιστικά στις κινητικές του *L. starkeyi*, καθυστερώντας κατά πολύ την εκκίνηση και εν συνεχεία τη λειτουργία του μεταβολισμού του και προκαλώντας το τέλος της ζύμωσης με σχεδόν το 50% της ποσότητας των αρχικών σακχάρων ακατανάλωτη. Η παρεμπόδιση αυτή οφείλεται σε οσμωτικά φαινόμενα, όπως θα συζητηθεί και παρακάτω.

Ο Πίνακας 22 που έχει σειρά, οδηγεί στα ίδια ακριβώς συμπεράσματα με την προηγούμενη περίπτωση, και για την προσθήκη των 40 g/L NaCl στο μέσο της καλλιέργειας.

Πίνακας 22 Αποτελέσματα κινητικής του *L. starkeyi* σε υπόστρωμα με πηγή άνθρακα σιρόπι γλυκόζης αρχικής συγκέντρωσης σακχάρων 80 g/L και προσθήκη NaCl 40 g/L. a: $Y_{L/X}$, b: L_{max} , c: X_{max} .

Time (h)	Biomass (g/L)	Lipids (g/L)	Sugars consumed (g/L)	$Y_{L/X}$ (%)
^a 96	0.5	0.3	10.0	58.3
^{b, c} 240	10.7	3.5	28.4	33.1

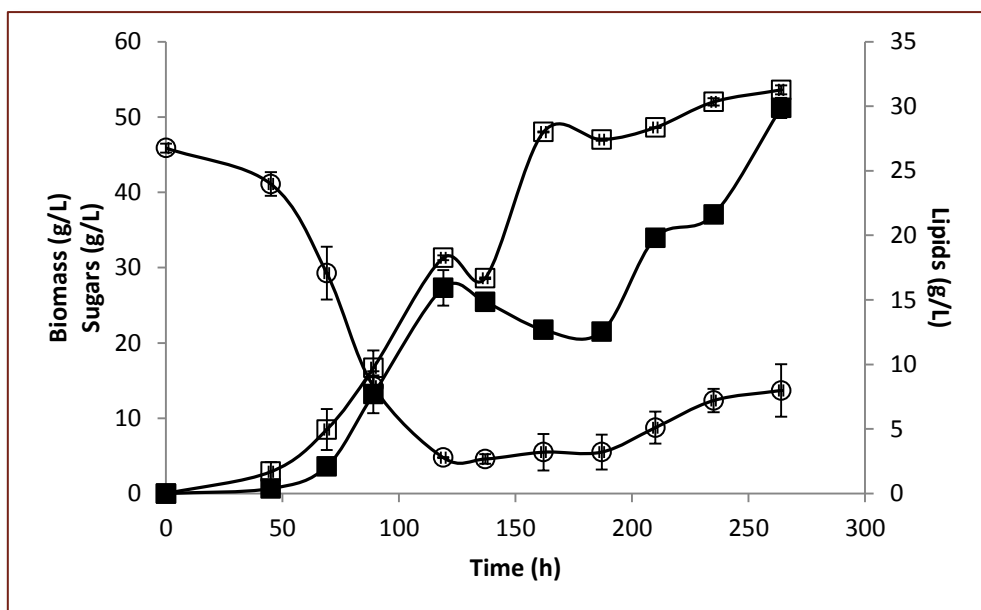
Πιο συγκεκριμένα, οι μέγιστες τιμές της βιομάζας και των λιπιδίων εντοπίζονται και εδώ στις 240 h της ζύμωσης, φτάνοντας μόλις τα 10.7 g/L και 3.5 g/L αντίστοιχα. Τα σάκχαρα στο τελευταίο σημείο της καλλιέργειας ανέρχονται σε 55.1 g/L, πολύ περισσότερο από το 50 % της αρχικής τους συγκέντρωσης (83.6 g/L). Η ταχύτητα κατανάλωσης υποστρώματος είναι αισθητά μειωμένη, ξεκινώντας από 0.03 g/L/h και φτάνοντας στα 0.12 g/L/h.

Κατά συνέπεια, τα ωσμωτικά φαινόμενα που προκαλούνται από την προσθήκη αλατιού φαίνεται να επηρεάζουν σημαντικά το στέλεχος *L. starkeyi* DSM 70296, που δεν φαίνεται να είναι ωσμωανθεκτικό, από τα 30 g/L και πάνω, δίδοντας αποτελέσματα παραγωγής βιομάζας και δευτερογενών μεταβολιτών που δεν είναι ικανοποιητικά.

4.3 Κινητική της κυτταρικής αύξησης, της κατανάλωσης υποστρώματος και της παραγωγής ενδοκυτταρικών λιπιδίων του *L. starkeyi* σε υπόστρωμα σιροπιού γλυκόζης, σε βιοαντιδραστήρα ημι-συνεχούς λειτουργίας

Στο κεφάλαιο αυτό αναλύονται τα αποτελέσματα που λήφθηκαν από τις ζυμώσεις σε βιοαντιδραστήρα ημι-συνεχούς λειτουργίας (fed-batch). Ως πηγή άνθρακα χρησιμοποιήθηκε το σιρόπι γλυκόζης, που αποτελεί το απόβλητο της βιομηχανίας τροφίμων που πραγματεύεται η παρούσα μελέτη. Όπως έχει ήδη προαναφερθεί, η αρχική συγκέντρωση σακχάρων ορίστηκε στα 50 g/L και στις 95 h που η συγκέντρωση έφτασε περίπου τα 12 g/L ξεκίνησε η εξωτερική τροφοδοσία σακχάρων ώστε η τιμή να διατηρείται όσο το δυνατόν πιο σταθερή γύρω από αυτό το επίπεδο. Η τροφοδοσία που πραγματοποιήθηκε ήταν συνεχούς ροής.

Το Γράφημα 14 και ο Πίνακας 23 που ακολουθούν, παρουσιάζουν τα αποτελέσματα της κινητικής που λήφθηκαν από την ημι-συνεχή καλλιέργεια του στελέχους *L. starkeyi* στο βιοαντιδραστήρα.



Γράφημα 14 Κινητική παραγωγής βιομάζας και μικροβιακού λίπους, καθώς επίσης και κατανάλωσης σακχάρων, κατά την καλλιέργεια του στελέχους *L. starkeyi* DSM 70296 σε υπόστρωμα με πηγή άνθρακα σιρόπι γλυκόζης αρχικής συγκέντρωσης σακχάρων 50 g/L σε βιοαντιδραστήρα ημι-συνεχούς λειτουργίας. (□) Βιομάζα (g/L), (○) Σάκχαρα (g/L), (■) Λιπίδια (g/L).

Πίνακας 23 Αποτελέσματα κινητικής του *L. starkeyi* σε υπόστρωμα με πηγή άνθρακα σιρόπι γλυκόζης, σε βιοαντιδραστήρα ημι-συνεχούς λειτουργίας. a: $Y_{L/X}$, b: L_{max} , c: X_{max} .

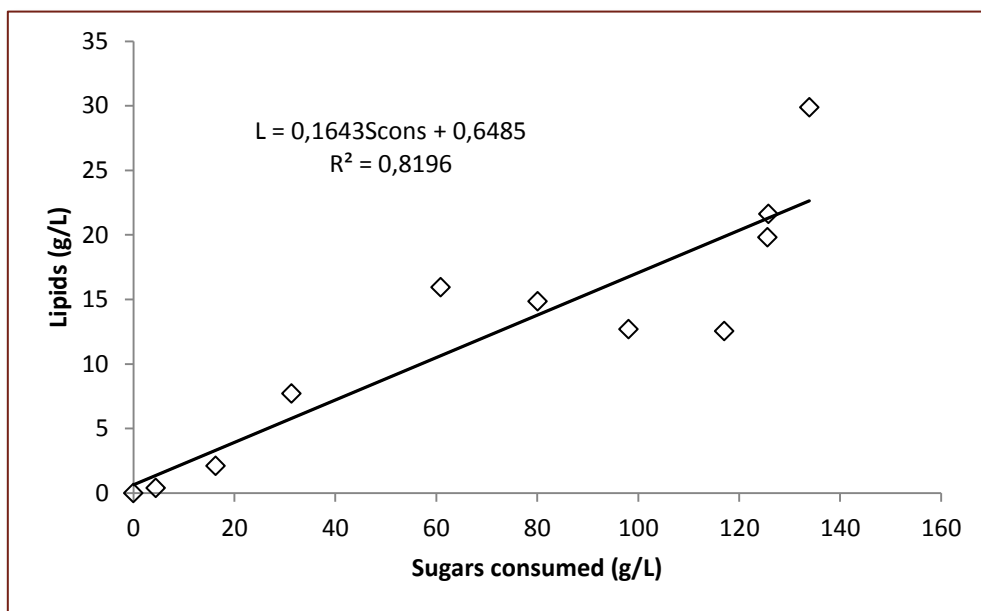
Time (h)	Biomass (g/L)	Lipids (g/L)	Sugars consumed (g/L)	$Y_{L/X}$ (%)	Lipid Yield (g/L/h)
0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.00
45	2.9	0.4	4.4	13.4	0.01
69	8.5	2.1	16.3	24.8	0.03
89	16.7	7.7	31.3	46.1	0.09
119	31.3	15.9	60.9	50.9	0.13
137	28.6	14.8	80.1	51.9	0.11
162	48.0	12.7	98.1	26.4	0.08
187	47.0	12.5	117.0	26.7	0.07
210	48.6	19.8	125.6	40.8	0.09
235	52.0	21.6	125.8	41.5	0.09
a, b, c 264	53.6	29.9	133.9	55.7	0.11

Παρατηρώντας τα παραπάνω αποτελέσματα προκύπτει πως από τις 119 h έως τις 137 h παρατηρείται μια μικρή μείωση στην παραγόμενη βιομάζα και στα λιπίδια. Μέχρι και τις 210 h εμφανίζονται κάποιες αυξομειώσεις τόσο στην παραγόμενη βιομάζα όσο και στα λιπίδια εξαιτίας του ότι ο ρυθμός του μεταβολισμού του

μικροοργανισμού αυξανόταν ραγδαία, με αποτέλεσμα η υπολογιζόμενη τροφοδοσία να μην αρκεί και τα επίπεδα των σακχάρων να πέφτουν σε μη επιθυμητά επίπεδα μεταξύ παρατεταμένων διαστημάτων δειγματοληψίας. Το γεγονός αυτό προφανώς οδηγούσε στο θάνατο κάποιων κυττάρων, τα οποία αναπληρώνονταν αμέσως μόλις τα επίπεδα των σακχάρων αυξάνονταν ξανά στο μέσο.

Από τις 210 h έως τις 264 h εμφανίζεται αύξηση βιομάζας και λίπους. Έπειτα από 264 h ημι-συνεχούς καλλιέργειας η ζύμη επιτυγχάνει τη μέγιστη παραγωγή βιομάζας, η οποία ανέρχεται σε 53.6 g/L. Ο συντελεστής απόδοσης βιομάζας ανήλθε σε 40% στο σημείο αυτό, ενώ καθ' όλη τη διάρκεια της ζύμωσης κυμάνθηκε από 40-65% περίπου. Ταυτόχρονα εντοπίζεται και η μέγιστη συσσώρευση λίπους ανερχόμενη σε 29.9 g/L, με επίσης μέγιστη απόδοση 55.7 % και παραγωγικότητα 0.11 g/L/h. Ωστόσο, η μέγιστη παραγωγικότητα έφτασε στα 0.13 g/L/h στις 119 h καλλιέργειας. Ο συντελεστής απόδοσης λίπους στο ίδιο σημείο ανήλθε σε 0.22 g/g.

Το Γράφημα 15 που ακολουθεί επιδεικνύει τη θετική συσχέτιση που υπάρχει μεταξύ των καταναλωθέντων σακχάρων και των παραγόμενων λιπιδίων. Ο συντελεστής συσχέτισης ανέρχεται στο 82% περίπου, που είναι αρκετά ικανοποιητικό επίπεδο.



Γράφημα 15 Σχέση λιπιδίων-καταναλωθέντος υποστρώματος κατά την καλλιέργεια της ζύμης *L. starkeyi* σε βιοαντιδραστήρα ημι-συνεχούς λειτουργίας. Πηγή άνθρακα: Σιρόπι γλυκόζης.

Λαμβάνοντας υπόψη όλα τα παραπάνω, προκύπτει πως η ημι-συνεχής καλλιέργεια σε βιοαντιδραστήρα καταλήγει σε πολύ καλύτερα αποτελέσματα συγκριτικά με τις ασυνεχείς ζυμώσεις βυθού.

4.4 Ανάλυση της σύστασης των λιπαρών οξέων του μικροβιακού λίπους

Ο Πίνακας 24 περιέχει την ανάλυση της σύστασης των λιπαρών οξέων (Λ.Ο.) τόσο του συνολικού λίπους, όσο και των τριών διαφορετικών κλασμάτων του (ουδέτερα, σφιγγο- και γλυκο-λιπίδια και φωσφο-λιπίδια) που προέκυψαν από τη βιομάζα που παρήχθη για τους σκοπούς της βελτιστοποίησης της εκχύλισης του λίπους. Εν συνεχεία, Στους Πίνακες 25-27 παρουσιάζεται η σύσταση των Λ.Ο. του λίπους που παρήχθη από τις ζυμώσεις τύπου βυθού σε υπόστρωμα εμπορικής γλυκόζης, σιροπιού γλυκόζης, καθώς επίσης και στις ζυμώσεις με προσθήκη αλατιού, αντιστοίχως. Τέλος, ο Πίνακας 28 απεικονίζει τα αποτελέσματα των Λ.Ο. που λήφθηκαν από το παραγόμενο λίπος της καλλιέργειας σε βιοαντιδραστήρα.

Τα Λ.Ο. είναι εκφρασμένα σε ποσοστά % του συνόλου. Τα Λ.Ο. που βρέθηκαν σε μεγαλύτερες ποσότητες και εμφανίζονται αναλυτικά είναι τα παλμιτικό (C 16:0, κορεσμένο), παλμιτελαϊκό (C 16:1, μονοακόρεστο), στεατικό (C 18:0, κορεσμένο), ελαϊκό (C 18:1, μονοακόρεστο) και λινελαϊκό (C 18:2, πολυακόρεστο). Σε πολύ μικρότερες ποσότητες βρέθηκαν τα καπριλικό (C 8:0), λαυρικό (C 12:0), μυριστικό (C 14:0), μυριστελαϊκό (C 14:1), πενταδεκανοϊκό (C 15:0), μαργαρικό (C 17:0), επταδεκανοϊκό (C 17:1), λινολενικό (C 18:3) και εικοσενικό (C 20:1).

Πίνακας 24 Σύσταση Λ.Ο. των τριών λιπιδιακών κλασμάτων από ζύμωση τύπου βυθού σε υπόστρωμα εμπορικής γλυκόζης.

Κλάσματα								
(%)	C 16:0	^{Δ9} C 16:1	C 18:0	^{Δ9} C 18:1	^{Δ9,12} C 18:2	Άλλα	UFA ⁴	SFA ⁵
Συνολικό	35.46	4.55	6.14	52.53	-	1.32	57.09	40.00
N	42.08	4.16	5.31	47.76	-	0.70	51.92	47.39
S & G	39.85	4.98	7.57	47.60	-	-	52.58	47.42
P	25.84	8.64	5.57	59.94	-	-	68.58	31.41

Είναι φανερό πως τόσο το συνολικό λίπος, όσο και τα τρία επιμέρους κλάσματά του, χαρακτηρίζονται από ακόρεστα Λ.Ο. Σε όλες τις περιπτώσεις φαίνεται πως το ελαϊκό

⁴ UFA: Unsaturated Fatty Acids.

⁵ SFA: Saturated Fatty Acids.

οξύ είναι το κυριότερο, ακολουθούμενο από το παλμιτικό. Επίσης, το παλμιτελαϊκό και το στεατικό οξύ είναι τα επόμενα δύο κυριότερα Λ.Ο. που ευρίσκονται σε αξιοσημείωτα ποσοστά στο μικροβιακό λίπος του *L. starkeyi*.

Πίνακας 25 Σύσταση Λ.Ο. μικροβιακού λίπους από ζυμώσεις τύπου βυθού σε υπόστρωμα εμπορικής γλυκόζης.

Γλυκόζη									
(%)	Χρόνος (h)	C 16:0	^{Δ9} C 16:1	C 18:0	^{Δ9} C 18:1	^{Δ9,12} C 18:2	Άλλα	UFA	SFA
40 g/L	48	27.70	4.40	5.00	54.88	6.14	1.87	65.42	32.71
	144	37.09	5.56	4.75	49.81	1.81	0.98	57.18	41.84
60 g/L	48	29.00	6.20	10.27	46.04	6.19	2.30	58.43	39.27
	120	32.67	4.81	5.23	52.86	1.96	2.48	59.63	37.89
	144	38.28	4.63	5.29	50.22	1.29	0.29	56.14	43.57
	168	36.89	5.00	5.47	51.70	-	0.94	56.70	42.36
80 g/L	48	39.74	4.84	5.79	49.63	-	-	54.47	45.53
	168	40.47	3.96	4.95	50.62	-	-	54.58	45.42
	264	38.77	4.69	5.81	50.73	-	-	55.42	44.58

Το ελαϊκό οξύ αποτελεί το μεγαλύτερο ποσοστό σε όλες τις παραπάνω περιπτώσεις (Πίνακας 25), κυμαινόμενο από 46% έως 55% σε όλη τη διάρκεια της ζύμωσης. Δεύτερο σε σειρά έρχεται το παλμιτικό με ποσοστά από 28% έως και 40.5% περίπου. Ακολουθούν τα οξέα παλμιτελαϊκό και στεατικό σε αρκετά μικρότερα ποσοστά που κυμαίνονται από 4% έως 11% περίπου. Τέλος, το λινελαϊκό οξύ κυμαίνεται ως επί το πλείστον σε πολύ μικρότερα ποσοστά κοντά στο 2%. Το μικροβιακό λίπος που παρήχθη από τις παραπάνω ζυμώσεις χαρακτηρίζεται ως ακόρεστο λίπος, καθώς το κλάσμα των ακόρεστων Λ.Ο. παλμιτελαϊκού, ελαϊκού και λινελαϊκού, υπερβαίνει σε όλες τις περιπτώσεις το 50%.

Πίνακας 26 Σύσταση Λ.Ο. μικροβιακού λίπους από ζυμώσεις τύπου βυθού σε υπόστρωμα σιροπιού γλυκόζης.

Σιρόπι γλυκόζης									
(%)	Χρόνος (h)	C 16:0	^{Δ9} C 16:1	C 18:0	^{Δ9} C 18:1	^{Δ9,12} C 18:2	Άλλα	UFA	SFA
40 g/L	48	34.04	7.35	10.30	39.81	2.17	6.33	49.33	44.34
	72	29.34	4.95	1.64	45.49	10.90	7.68	61.34	30.98
	144	25.33	2.66	6.30	50.93	9.78	4.99	63.38	31.63
	168	36.60	3.45	5.45	50.86	-	3.64	54.31	42.05
	264	33.06	4.22	5.72	53.98	-	3.02	58.20	38.78
60 g/L	48	17.04	3.19	3.11	62.31	13.84	0.52	79.34	20.14
	72	35.74	4.18	8.23	37.86	8.03	5.95	50.07	43.98
	120	35.51	3.91	7.73	52.85	-	-	56.76	43.24
	144	35.54	4.65	5.45	54.04	-	0.33	58.69	40.99
	168	33.73	2.82	6.61	56.85	-	-	59.66	40.34
80 g/L	48	34.86	5.21	6.33	46.50	6.44	0.65	58.16	41.19
	72	37.92	2.52	11.96	47.60	-	-	50.12	49.88
	168	40.83	4.58	7.48	47.11	-	-	51.68	48.32
	192	41.36	4.55	2.84	51.24	-	-	55.80	44.20

Όπως και στην προηγούμενη περίπτωση, έτσι και στην περίπτωση των ζυμώσεων σε σιρόπι γλυκόζης, τα δύο κυριότερα Λ.Ο. φαίνεται να είναι τα ελαϊκό και παλμιτικό με ποσοστά από 38% έως 62% και μεταξύ 17% και 41% αντιστοίχως. Ακολουθούν και σε αυτήν την περίπτωση σε μικρότερα ποσοστά τα παλμιτελαϊκό, στεατικό και λινελαϊκό οξέα. Το κλάσμα των ακόρεστων Λ.Ο. υπερέχει σε κάθε δείγμα του κλάσματος των κορεσμένων Λ.Ο., με αποτέλεσμα το μικροβιακό λίπος από την καλλιέργεια του *L. starkeyi* σε σιρόπι γλυκόζης να χαρακτηρίζεται ως ακόρεστο.

Είναι, λοιπόν, φανερό πως τα προφίλ της σύστασης του λίπους σε Λ.Ο. προερχόμενου τόσο από εμπορική γλυκόζη και όσο και από σιρόπι γλυκόζης δεν εμφανίζουν διαφορές.

Πίνακας 27 Σύσταση Λ.Ο. μικροβιακού λίπους από ζυμώσεις τύπου βουθού σε υπόστρωμα σιροπιού γλυκόζης με προσθήκη NaCl.

Σιρόπι γλυκόζης (80 g/L) με προσθήκη NaCl									
(%)	Χρόνος (h)	C 16:0	^{Δ9} C 16:1	C 18:0	^{Δ9} C 18:1	^{Δ9,12} C 18:2	Άλλα	UFA	SFA
10 g/L	72	38.43	5.38	8.37	47.82	-	-	53.20	46.80
	264	38.06	3.29	7.66	50.99	-	-	54.28	45.72
20 g/L	72	36.06	3.78	8.43	41.82	-	9.91	45.60	44.49
	144	43.65	4.00	7.57	44.79	-	-	48.78	51.22
	264	40.69	3.62	7.33	48.36	-	-	51.99	48.01
30 g/L	96	33.50	3.84	23.92	38.49	-	0.25	42.33	57.42
	264	37.57	3.91	11.45	47.06	-	-	50.97	49.03
	360	33.74	4.04	5.77	53.42	2.48	0.55	59.94	39.52
40 g/L	72	37.67	3.25	13.33	43.69	2.06	-	49.00	51.00
	264	33.28	3.14	11.28	39.18	3.24	9.88	45.56	44.56

Ο Πίνακας 27 φανερώνει για ακόμη μια φορά το ελαϊκό και το παλμιτικό οξύ ως τα δύο κυριότερα Λ.Ο. του μικροβιακού λίπους που λήφθηκε από τις ζυμώσεις με την προσθήκη αλατιού. Αυτή τη φορά, ωστόσο, οι διαφορές μεταξύ των ποσοστών των δύο οξέων αμβλύνεται. Πιο συγκεκριμένα, το ελαϊκό κυμαίνεται από 38.5% έως 51% περίπου. Το παλμιτικό οξύ κυμαίνεται σε παρόμοια επίπεδα, από 33% έως 44% περίπου. Προκύπτει, λοιπόν, πως το αλάτι επηρεάζει ελαφρώς τα επίπεδα στα οποία κυμαίνονται τα Λ.Ο. με άμεσο αποτέλεσμα την ταυτόχρονη μεταβολή του κορεσμένου και ακόρεστου κλάσματος του λίπους.

Στην περίπτωση προσθήκης 10 g/L NaCl το λίπος χαρακτηρίζεται ως ακόρεστο καθώς το ακόρεστο κλάσμα υπερβαίνει το 50% καθ' όλη τη διάρκεια της ζύμωσης. Στη συνέχεια, φαίνεται πως με την αύξηση της συγκέντρωσης του προστιθέμενου αλατιού δεν είναι δυνατός ο σαφής προσδιορισμός του λίπους ως κορεσμένου ή ακόρεστου, αφού κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας κάποιες φορές υπερέχει το κορεσμένο και κάποιες το ακόρεστο κλάσμα του λίπους.

Στον Πίνακα 28 που ακολουθεί απεικονίζεται η σύσταση των Λ.Ο. που προέκυψαν από την καλλιέργεια το *L. starkeyi* σε βιοαντιδραστήρα.

Πίνακας 28 Σύσταση Λ.Ο. μικροβιακού λίπους της καλλιέργεια σε βιοαντιδραστήρα σε υπόστρωμα σιροπιού γλυκόζης με προσθήκη NaCl.

Ημι-συνεχής καλλιέργεια σε βιοαντιδραστήρα (Λ.Ο. %)								
Χρόνος (h)	C 16:0	^{Δ9} C 16:1	C 18:0	^{Δ9} C 18:1	^{Δ9,12} C 18:2	Άλλα	UFA	SFA
69	43.39	6.63	4.82	45.15	-	-	51.78	48.21
119	40.55	4.30	6.92	48.23	-	-	52.53	47.47
287	44.91	9.32	2.51	43.27	-	-	52.59	47.42

Παρατηρείται πως σε όλη τη διάρκεια της ζύμωσης η σύσταση παραμένει σταθερή αποτελούμενη μόνο από ελαϊκό, παλμιτικό, παλμιτελαϊκό και στεατικό οξύ. Το λίπος και σε αυτήν την περίπτωση, όπως ήταν αναμενόμενο, χαρακτηρίζεται ως ακόρεστο καθώς το ποσοστό των ακόρεστων Λ.Ο. υπερβαίνει εκείνο των κορεσμένων καθ' όλη τη διάρκεια της καλλιέργειας, κυμαινόμενο από 51.78% έως και 52.59%.

4.5 Συζήτηση

Το πρώτο ζήτημα της παρούσας μεταπτυχιακής μελέτης αποτέλεσε η αριστοποίηση της εκχύλισης του μικροβιακού λίπους, από τη ζύμη *L. starkeyi*. Για την επίτευξη του πρώτου αυτού στόχου, χρησιμοποιήθηκαν έξι διαφορετικές μέθοδοι εκχύλισης (συσκευή Soxhlet, Folch, HCl-Folch, Folch-HCl, Folch-βρασμός και πράσινοι διαλύτες).

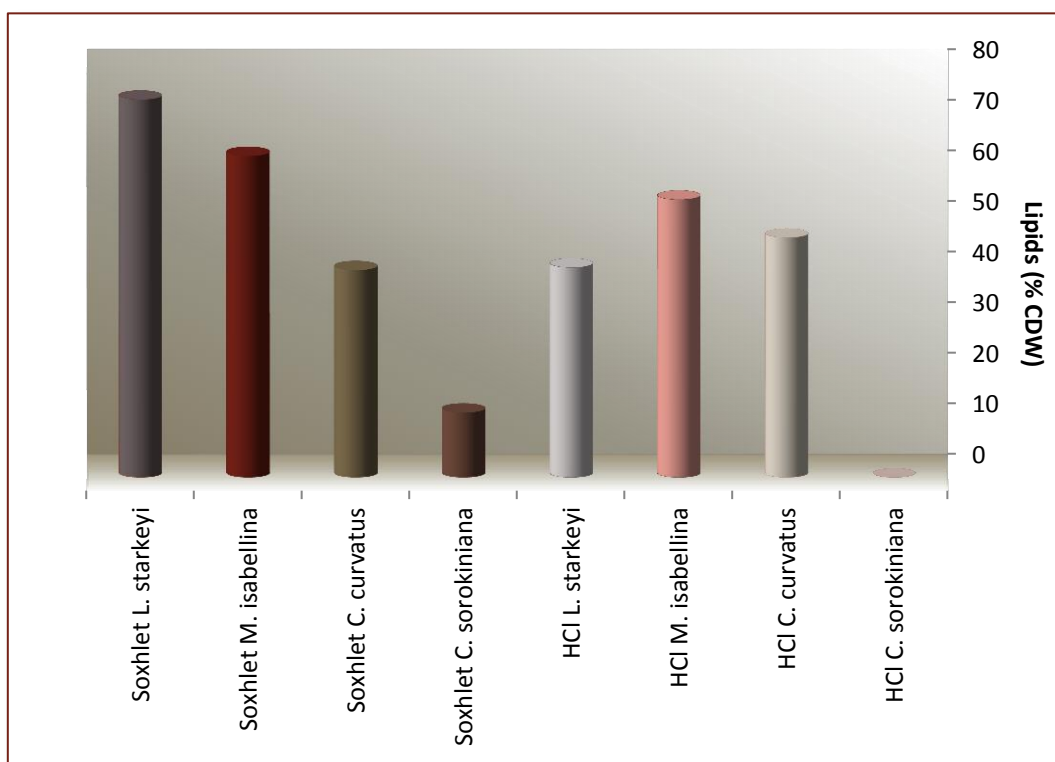
Η εκχύλιση με τη συσκευή Soxhlet ήταν η πιο αποδοτική μέθοδος, δίδοντας 11.3 g/L λιπιδίων (74.5% επί ξ.β.). Ωστόσο, για την εκπόνηση των πειραμάτων που ακολούθησαν επιλέχθηκε η δεύτερη πιο αποδοτική μέθοδος, εκείνη της εκχύλισης με Folch-HCl (41.4% επί ξ.β.), καθώς θεωρείται πως είναι αρκετά φθηνότερη και πιο πρακτική σε σχέση με τη Soxhlet. Όπως έχει ήδη προαναφερθεί στην αντίστοιχη ενότητα (3.1), για την εκχύλιση λίπους ισοδύναμων δειγμάτων η μέθοδος Soxhlet χρειάζεται οκταπλάσια δαπάνη ποσότητας διαλυτών και επιπλέον χαρακτηρίζεται από μεγαλύτερους χρόνους εκχύλισης.

Κατά τη διαδικασία της αριστοποίησης ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσίασε η εκχύλιση με πράσινους διαλύτες (C₄H₈O₂/CH₃CH₂OH σε αναλογία 2:1 (v/v)), η οποία δύναται να αποτελέσει μια μέθοδο φιλική προς την υγεία του ανθρώπου και το περιβάλλον, δίδοντας αποτελέσματα σχεδόν εφάμιλλα με εκείνα των συμβατικών μεθόδων. Η εκχύλιση με τη μέθοδο αυτή έδωσε λιποπεριεκτικότητα της τάξεως του 26.5% επί ξ.β. Δοκιμές των Breil, Vian, Zemb, Kunz και Chemat (2017) στο στέλεχος *Yarrowia*

lipolytica IFP29 έδειξαν πως το σύστημα διαλυτών οξικός αιθυλεστέρας/αιθανόλη/νερό εμφανίζει παρόμοια επιλεκτικότητα ως προς το λιπιδιακό και μη κλάσμα της βιομάζας και επίσης δίδει παρόμοια αποτελέσματα σε απόδοση λιπιδίων, σε σύγκριση με τις μεθόδους εκχύλισης των Bligh and Dyer ή/και του Folch.

Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα με εκείνα του Yu, Dong, Zheng, Miao και Chen (2015), προκύπτει πως αφενός η ζύμη *L. starkeyi* έδωσε πολύ καλά αποτελέσματα λιποπεριεκτικότητας με τις μεθόδους Soxhlet και HCl, και αφετέρου η αποτελεσματικότητα διαφορετικών μεθόδων εκχύλισης του λίπους διαφέρει από μικροοργανισμό σε μικροοργανισμό.

Τα αποτελέσματα της λιποπεριεκτικότητας που προέκυψαν από τη μέθοδο Soxhlet και από τη μέθοδο υδρόλυσης με HCl συνοψίζονται παρακάτω στο Γράφημα 16. Η ζύμη *L. starkeyi* αφορά στην παρούσα μελέτη, ενώ ο μύκητας *Mortierella isabellina*, η ζύμη *Cryptococcus curvatus* και το μικροφύκος *Chlorella sorokiniana* αφορούν στη μελέτη των Yu *et al.* (2015).



Γράφημα 16 Λιποπεριεκτικότητα από διαφορετικές μεθόδους εκχύλισης (% ξ.β.).

Όπως φαίνεται η μέθοδος Soxhlet έδωσε καλύτερα αποτελέσματα σε σχέση με τη μέθοδο του HCl για όλους τους μικροοργανισμούς εκτός από τη ζύμη *C. curvatus*. Ο *M. isabellina* απέδωσε λιποπεριεκτικότητα 63.4% μέσω της εκχύλισης Soxhlet και 54.8% μέσω της υδρόλυσης με HCl. Ακολούθησαν κατά σειρά φθίνουσας προτεραιότητας οι μέθοδοι της μηχανικής καταπόνησης (bead-beating), της εκχύλισης με υπερήχους (sonication), με μικροκύματα (microwave) και τέλος με αυτόκαυστο (autoclaving). Ακριβώς την ίδια σειρά αποτελεσματικότητας ακολούθησαν οι μέθοδοι και στην περίπτωση του *C. sorokiniana*. Διαφορές εντοπίστηκαν μόνο στη ζύμη *C. curvatus*, για την οποία πιο αποτελεσματικές φάνηκε να είναι οι μέθοδοι του HCl, της μηχανικής καταπόνησης, των υπερήχων και έπειτα της Soxhlet, ακολουθούμενες τελικά από τα μικροκύματα και το αυτόκαυστο.

Εν συνεχεία έλαβε χώρα η κλασμάτωση του λίπους της αριστοποίησης και ο ποιοτικός προσδιορισμός του μέσω χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδας. Η ανάκτηση των λιπιδίων υπήρξε ικανοποιητική αφού ανήλθε στο 92% περίπου επί του συνολικού λίπους. Δείχθηκε πως το ουδέτερο κλάσμα του λίπους του *L. starkeyi* είναι αρκετά μεγαλύτερο από τα κλάσματα των σφιγγο- γλυκο-λιπιδίων και φωσφο-λιπιδίων, αποτελώντας το 72% περίπου του συνολικού. Επιπλέον, η ανάλυση TLC επιβεβαίωσε πως το λίπος της ζύμης *L. starkeyi*, όπως και όλων σχεδόν των ευκαρυωτικών μικροοργανισμών, αποτελείται ως επί το πλείστον από τριγλυκερίδια (TAGs).

Ακολούθησαν οι κλειστές ζυμώσεις βυθού σε υπόστρωμα εμπορικής γλυκόζης και σιροπιού γλυκόζης, καθώς επίσης και οι ημι-συνεχείς καλλιέργειες σε βιοαντιδραστήρα. Στον Πίνακα 29 που ακολουθεί, παρουσιάζονται τα συγκεντρωτικά αποτελέσματα των ανωτέρω ζυμώσεων, για τα σημεία στα οποία εμφανίστηκαν οι μέγιστες τιμές παραγωγής βιομάζας, λιπιδίων και λιποπεριεκτικότητας.

Πίνακας 29 Συγκεντρωτικά αποτελέσματα κινητικών όλων των ζυμώσεων που έλαβαν χώρα. S_0 : Αρχική συγκέντρωση σακχάρων (g/L), S_t : Συγκέντρωση σακχάρων σε χρόνο t (g/L), $S_{0/NaCl}$: Αρχική συγκέντρωση αλατιού (g/L), t : Χρόνος (h), S_{cons} : Συγκέντρωση καταναλωθέντος σακχάρου (g/L), X : Συγκέντρωση βιομάζας (g/L), L : Συγκέντρωση ενδοκυτταρικών λιπιδίων (g/L), $Y_{L/X}$: Συντελεστής απόδοσης λιπιδίων ως προς τη βιομάζα (%), $Y_{L/Scons}$: Συντελεστής απόδοσης λιπιδίων ως προς το καταναλωθέν υπόστρωμα (g/L/h), **Lipid yield**: Παραγωγικότητα λιπιδίων (g/L/h), a: Μέγιστη λιποπεριεκτικότητα (%), b: Μέγιστη παραγωγή λιπιδίων (g/L), c: Μέγιστη παραγωγή βιομάζας (g/L).

Fermentation mode	Substrate	S_0 (g/L)	S_t (g/L)	$S_{0/NaCl}$ (g/L)	t (h)	S_{cons} (g/L)	X (g/L)	L (g/L)	$Y_{L/X}$ (%)	$Y_{L/Scons}$ (g/L/h)	Lipid yield (g/L/h)
Batch (Shake flasks)	Glucose	41.1	30.2	-	48 ^a	10.8	5.3	1.7	31.7	0.2	0.04
		41.1	7.2	-	72 ^b	33.9	13.8	3.7	26.4	0.1	0.05
		41.1	0.4	-	168 ^c	40.7	17.4	2.5	14.5	0.1	0.01
	Glucose	63.3	35.5	-	72 ^{a, b}	27.9	11.6	4.3	36.8	0.2	0.06
		63.3	0.7	-	168 ^c	62.6	25.0	3.5	14.0	0.1	0.02
	Glucose	93.0	35.5	-	72 ^{a, b}	57.5	14.6	5.3	36.1	0.1	0.07
		93.0	8.0	-	216 ^c	85.0	35.3	2.7	7.8	0.0	0.01
	Glucose syrup	38.6	0.5	-	144 ^{a, b}	38.1	20.0	4.1	20.5	0.1	0.03
		38.6	0.4	-	168 ^c	38.1	22.1	1.3	5.7	0.0	0.01
	Glucose syrup	56.9	1.1	-	192 ^{a, b, c}	55.8	29.5	7.3	24.7	0.1	0.04
	Glucose syrup	77.9	66.0	-	72 ^a	11.8	8.3	2.6	31.7	0.2	0.04
		77.9	48.6	-	120 ^b	29.3	16.1	4.2	26.4	0.1	0.03
		77.9	17.5	-	240 ^c	60.4	39.4	2.2	14.5	0.0	0.01
	Glucose syrup	75.7	37.7	10	144 ^a	38.0	13.2	4.7	35.4	0.1	0.03
		75.7	20.2	10	192 ^b	55.5	31.4	9.3	29.7	0.2	0.05
		75.7	13.0	10	264 ^c	62.7	41.3	4.9	11.8	0.1	0.02
	Glucose syrup	78.6	29.5	20	144 ^a	49.2	11.0	4.4	40.4	0.1	0.03
		78.6	16.3	20	216 ^b	62.4	29.8	10.0	33.4	0.2	0.05
		78.6	15.1	20	264 ^c	63.5	31.6	4.7	15.0	0.1	0.02
	Glucose syrup	78.7	51.7	30	192 ^a	27.0	6.1	4.5	73.3	0.2	0.02
78.7		35.2	30	264 ^{b, c}	43.4	21.5	10.6	49.4	0.2	0.04	
Glucose syrup	83.6	73.6	40	96 ^a	10.0	0.5	0.3	58.3	0.0	0.00	
	83.6	55.2	40	240 ^{b, c}	28.4	10.7	3.5	33.1	0.1	0.01	
Fed-batch (bioreactor)	Glucose syrup	45.9	13.7	-	264 ^{a, b, c}	217.6	53.6	29.9	55.7	0.2	0.11

Όπως φαίνεται, στην περίπτωση της γλυκόζης ως πηγή άνθρακα τόσο η μέγιστη βιομάζα (35.3 g/L) όσο και η μέγιστη παραγωγή λίπους (5.3 g/L), εμφανίζονται σε αρχική συγκέντρωση σακχάρων 80 g/L. Ωστόσο, η μέγιστη απόδοση παραγωγής λιπιδίων εμφανίστηκε σε αρχική συγκέντρωση σακχάρων 60 g/L και ανήλθε σε 36.8%.

Όσον αφορά στις ζυμώσεις σε υπόστρωμα σιροπιού γλυκόζης, η μέγιστη παραγωγή βιομάζας έφτασε στα 39.4 g/L σε αρχική συγκέντρωση σακχάρων 80 g/L και η μέγιστη παραγωγή λίπους τα 7.3 g/L και απόδοση 24.7%, σε αρχική συγκέντρωση σακχάρων 60 g/L. Η μέγιστη λιποπεριεκτικότητα εντοπίζεται σε αρχική συγκέντρωση σακχάρων 80 g/L. Επίσης ο συντελεστής απόδοσης βιομάζας εμφάνισε μεγαλύτερες τιμές στα 80 g/L. Για τους λόγους αυτούς επιλέχθηκε η αρχική συγκέντρωση των 80 g/L ως η βέλτιστη για τη συνέχιση των πειραμάτων με προσθήκη αλατιού. Στη συγκέντρωση αυτή ο *L. starkeyi* απέδωσε σχεδόν 32% λίπος επί ξηράς βιομάζας.

Η συνέχεια των πειραμάτων με προσθήκη αλατιού σε διαφορετικές συγκεντρώσεις, έδειξε πως ο *L. starkeyi* μπορεί να αντέξει έως 20 g/L, καθώς στα 30 και 40 g/L ο μεταβολισμός του παρεμποδιζόταν με αποτέλεσμα να μην καταναλώνονται τα σάκχαρα του υποστρώματος και επίσης να μην επιτυγχάνονται ικανοποιητικές αποδόσεις βιομάζας ή ταχύτητες κατανάλωσης σακχάρων. Ωστόσο, τα 10 g/L προώθησαν τόσο την παραγωγή βιομάζας η οποία έφτασε τα 41.3 g/L, όσο και τη λιποσυσσώρευση που ανήλθε σε 9.3 g/L με απόδοση επί ξηράς βιομάζας περίπου 35.4%. Εντυπωσιακά αποτελέσματα έδωσε και η προσθήκη 20 g/L NaCl. Η μέγιστη βιομάζα ανήλθε σε 31.6 g/L, η μέγιστη λιποσυσσώρευση σε 10.0 g/L και η μέγιστη λιποπεριεκτικότητα σε 40.4% επί ξ.β. Σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις αλατιού, παρατηρήθηκε αισθητή μείωση τόσο του συντελεστή απόδοσης βιομάζας, όσο και της ταχύτητας κατανάλωσης των σακχάρων.

Σύμφωνα με τους Margesin και Schinner (2001) οι μικροοργανισμοί που μπορούν να αναπτυχθούν τόσο παρουσία, όσο και απουσία αλατιού, χαρακτηρίζονται ως αλατοανθεκτικοί (halotolerant). Υπάρχει επίσης περαιτέρω κατηγοριοποίησή τους σε μη ανεκτικούς (αντέχουν έως περίπου 1% w/v αλάτι), λίγο ανεκτικούς (αντέχουν έως 6-8% w/v αλάτι), μέτρια ανεκτικούς (αντέχουν έως 18-20% w/v αλάτι) και εξαιρετικά ανεκτικούς (αντέχουν και σε ποσότητες μεγαλύτερες του 20% w/v αλάτι) (Larsen, 1986). Ακολουθώντας λοιπόν την κατηγοριοποίηση αυτή, ο *L. starkeyi* θα μπορούσε να χαρακτηριστεί ως λίγο αλατοανθεκτικός.

Σύμφωνα με τους Tchakouteu *et al.* (2016), η ζύμη *Rhodospiridium toruloides* εμφάνισε την ικανότητα να αναπτύσσεται σε θρεπτικό μέσο με την προσθήκη NaCl έως και 6.0% w/v. Η δοκιμή αυτή έγινε για πρώτη φορά στη διεθνή βιβλιογραφία, δίδοντας αξιοσημείωτα αποτελέσματα. Αναφέρεται πως μέχρις μιας ορισμένης

συγκέντρωσης άλατος (4.0% w/v), όσο αυτό αυξανόταν, τόσο αυξανόταν και η συσσώρευση μικροβιακών λιπιδίων. Παρατηρήθηκε, δε, λιποσυσσώρευση ανερχόμενη στο 71.3% w/w επί ξηρής βιομάζας για συγκέντρωση 4.0% w/v.

Πίνακας 30 Σύγκριση αποτελεσμάτων των ζυμώσεων με προσθήκη NaCl με τη βιβλιογραφία.

Strain	S ₀ (g/L)	NaCl (% w/v)	Time (h)	Biomass (g/L)	Lipids (g/L)	Y _{L/X} (% w/w)	S cons (g/L)	Reference
<i>R. toruloides</i>	50	1.0	144	8.2	5.1	62.2	48.7	Tchakouteu <i>et al.</i> , 2016
		1.5	144	8.5	5.3	62.4	44.5	
		2.5	120	8.9	5.4	60.6	47.9	
		4.0	192	9.4	6.7	71.3	48.6	
<i>L. starkeyi</i>	80	1.0	192	31.4	9.3	29.7	55.5	Present study
		2.0	216	29.8	10.0	33.4	62.4	
		3.0	264	21.5	10.6	49.4	43.4	
		4.0	240	10.7	3.5	33.1	28.4	

Όπως παρατηρείται στον Πίνακα 30, η ζύμη *R. toruloides* εμφανίζει μεγαλύτερη αλατοανθεκτικότητα σε σχέση με τη ζύμη *L. starkeyi*, αφού ακόμα και σε συγκέντρωση NaCl 4.0 % δύναται να καταναλώνει τα διαθέσιμα σάκχαρα. Εν αντιθέσει, η ζύμη *L. starkeyi* παρεμποδίζεται ακόμη και από συγκέντρωση NaCl 3.0%, αφήνοντας ακατανάλωτα τα μισά περίπου σάκχαρα που ευρίσκονται διαθέσιμα στο μέσο. Παρ' όλα αυτά φαίνεται και στις δύο ανωτέρω περιπτώσεις πως η αύξηση της συγκέντρωσης NaCl στο μέσο της καλλιέργειας μέχρι ενός ορισμένου σημείου, μπορεί να προωθήσει τις ποσότητες των παραγόμενων προϊόντων.

Ο απώτερος στόχος των δοκιμών καλλιέργειας σε υπόστρωμα πλούσιο σε NaCl, ήταν η επίτευξη διεξαγωγής ζυμώσεων σε παστεριωμένες συνθήκες. Η αξιοποίηση αλατούχων λυμάτων, προερχόμενων για παράδειγμα από ιχθυοτροφεία ή παραγωγή επιτραπέζιων ελιών, θα μπορούσε να μειώσει σημαντικά το κόστος των ζυμώσεων για παραγωγή μονοκυτταρικών ελαίων. Σε συνδυασμό μάλιστα με παστερίωση αντί αποστείρωσης, το οικονομικό όφελος θα ήταν ακόμη μεγαλύτερο. Κάτι τέτοιο δε στάθηκε επιτυχές στην προκειμένη περίπτωση, καθώς οι συγκεντρώσεις των 10 και 20 g/L NaCl οι οποίες προάγουν την παραγωγή βιομάζας και ενδοκυτταρικών λιπιδίων της ζύμης *L. starkeyi*, είναι πολύ μικρές για να προσδώσουν βακτηριοστατικές ιδιότητες στο μέσο της καλλιέργειας.

Ωστόσο, σύμφωνα με τους Tchakouteu *et al.* (2016), το στέλεχος *R. toruloides* DSM 4444 καλλιιεργήθηκε αποτελεσματικά υπό συνθήκες παστερίωσης και υψηλής συγκέντρωσης σακχάρων. Η βακτηριακή δραστηριότητα αξιολογήθηκε ως λιγότερο από το 5% του συνολικού μικροβιακού πληθυσμού και επίσης δεν φάνηκε να επηρεάζει σημαντικά την αύξηση της ζύμης και τη λιποσυσσώρευση.

Τέλος, η καλλιέργεια της ζύμης σε βιοαντιδραστήρα ημι-συνεχούς λειτουργίας έδωσε πολύ καλύτερα αποτελέσματα σε σχέση με τις ασυνεχείς ζυμώσεις βυθού. Πιο συγκεκριμένα, η μέγιστη παραγωγή βιομάζας ανήλθε στα 53.6 g/L και η μέγιστη λιποσυσσώρευση έφτασε στα 29.9 g/L. Η απόδοση λιπιδίων του μικροοργανισμού ως ποσοστού επί της ξηρής βιομάζας του ανήλθε στο 55.7% και η παραγωγικότητά του σε 0.11 g/L/h.

Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης με τη βιβλιογραφία, προκύπτει εκ πρώτης όψεως το συμπέρασμα πως το σιρόπι γλυκόζης αποτελεί ένα απόβλητο της βιομηχανίας τροφίμων που δεν έχει μελετηθεί. Όπως φαίνεται και στον Πίνακα 30 παρακάτω, σύμφωνα με τους El-Naggar, El-Hersh, El-Fadaly και Saber (2011) ασυνεχής καλλιέργεια του *L. starkeyi* σε σιρόπι γλυκόζης, δίδει ίδια παραγωγικότητα (σχεδόν 0.03 g/L/h) με την αντίστοιχη ζύμωση της παρούσας μελέτης, όμως πολύ μικρότερες απόλυτες τιμές παραγόμενων λιπιδίων (1.4 έναντι 4.2 g/L της παρούσας μελέτης) και βιομάζας (8.5 έναντι 16.1 g/L της παρούσας μελέτης), όπως επίσης και απόδοσης λιπιδίων ως προς την ξηρή βιομάζα (16.5% έναντι 26.4% της παρούσας μελέτης) του μικροοργανισμού. Αν ληφθεί, μάλιστα, υπόψη η ζύμωση της παρούσας μελέτης σε σιρόπι γλυκόζης με την προσθήκη αλατιού, τα αποτελέσματα διαφέρουν ακόμη περισσότερο από εκείνα των El-Naggar *et al.* (2011).

Αξιοσημείωτο είναι επίσης το γεγονός πως οι ασυνεχείς καλλιέργειες της παρούσας μελέτης σε σιρόπι γλυκόζης με ή χωρίς την προσθήκη άλατος, εμφανίζουν εφάμιλλα ή ακόμη και καλύτερα αποτελέσματα από καλλιέργειες της ζύμης σε άλλα απόβλητα της βιομηχανίας τροφίμων. Οι μόνες περιπτώσεις κατά τις οποίες η λιποπερικτικότητα εμφανίζεται να έχει αξιοσημείωτη διαφορά από της παρούσας μελέτης, είναι εκείνη της καλλιέργειας σε απόβλητα άλευρα της βιομηχανίας τροφίμων, που σύμφωνα με την Tsakona *et al.* (2014) απέδωσαν 40.4% λιπίδια επί ξηρής βιομάζας και του Wild *et al.* (2010) σε άμυλο με απόδοση σε λιποπερικτικότητα 40.3%. Επιπροσθέτως, σύμφωνα με τους Angerbauer *et al.*

(2008) καλλιέργεια του *L. starkeyi* σε υπόστρωμα λυματολάσπης, απέδωσε 68.0% λιποπεριεκτικότητα. Ωστόσο, η βιομάζα και το λίπος σε απόλυτες τιμές ήταν αρκετά χαμηλότερα από της παρούσας μελέτης.

Η ημι-συνεχής καλλιέργεια σε βιοαντιδραστήρα που πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια της παρούσας μελέτης, έδωσε μια από τις υψηλότερες αποδόσεις ενδοκυτταρικών λιπιδίων (55.7%) συγκρινόμενη με τις ημι-συνεχείς καλλιέργειες της βιβλιογραφίας τόσο σε εμπορική γλυκόζη, όσο και σε πληθώρα αποβλήτων της βιομηχανίας τροφίμων. Εμφανίζει επίσης και αρκετά ικανοποιητική παραγωγικότητα (0.11 g/L/h) σε σχέση με τις υπόλοιπες ζυμώσεις, εκτός εκείνης της ζύμωσης σε υπόστρωμα αλεύρων που έφτασε τα 0.4 g/L/h (Tsakona *et al.*, 2014). Τέλος, και οι απόλυτες τιμές της βιομάζας και των παραγόμενων ενδοκυτταρικών λιπιδίων είναι συγκρίσιμες με τις αντίστοιχες της βιβλιογραφίας. Και σε αυτήν την περίπτωση εμφανίζεται αξιοσημείωτη διαφορά σε σχέση με την καλλιέργεια σε άλευρα που απέδωσε 109.8 g/L βιομάζας, αρκετά μεγαλύτερη από τα 53.6 g/L της παρούσας μελέτης.

Πίνακας 31 Βιβλιογραφική ανασκόπηση αποτελεσμάτων της καλλιέργειας της ζύμης *L. starkeyi* σε υδρόφιλα υποστρώματα.

Strain	Culture mode	Substrate	X (g/L)	L (g/L)	$Y_{L/X}$ (%)	Lipid yield (g/L/h)	Reference
NRRL Y11557	Batch shake flasks	Γλυκόζη	-	-	30	0.10	Wild <i>et al.</i> , 2010
AS 2.1560	Batch shake flasks	Γλυκόζη	23.8	-	53	0.18	Gong <i>et al.</i> , 2012
NRRL Y11557	Batch shake flasks	Σιρόπι γλυκόζης	8.5	1.4	16.47	0.029	El-Naggar <i>et al.</i> , 2011
ATCC 56304	Fed-batch bioreactor	Γλυκόζη	81.6	-	41.8	0.06	Probst & Vadlani, 2017
NRRL Y11557	Fed-batch bioreactor	Γλυκόζη	-	-	27	0.08	Wild <i>et al.</i> , 2010
3440	Fed-batch shake flasks	Γλυκόζη	21	-	40	-	Salunke, Manglekar, Gadre, Nene, & Harsulkar, 2015
NRRL Y11557	Batch bioreactor	Άμυλο	-	-	40.3	0.16	Wild <i>et al.</i> , 2010
DSM 70295	Batch shake flasks	Λυματολόαση	9.4	6.4	68.0	-	Angerbauer <i>et al.</i> , 2008
NRRL Y11557	Batch shake flasks	Μελάσα	8.4	1.2	14.63	0.025	El-Naggar <i>et al.</i> , 2011
ATCC 12659	Batch shake flask	Άχυρο σίτου	14.7	4.6	31.2	-	Yu <i>et al.</i> , 2011
DSM 70296	Batch shake flasks	Άλευρα (βιομηχανικά απόβλητα)	30.5	-	40.4	0.06	Tsakona <i>et al.</i> , 2014
GIM2.142	Batch shake flasks	Γλυκόζη+από νερα γλουταμινικού νατρίου	4.61	1.14	24.73	0.01	Liu <i>et al.</i> , 2012
DSM 70296	Fed-batch bioreactor	Μελάσα	21.27	-	32	0.13	Vieira <i>et al.</i> , 2014
DSM 70296	Fed-batch bioreactor	Μπαγκάσα ζαχαροκάλαμου	85.4	41.8	49	0.176	Anschau <i>et al.</i> , 2014
DSM 70296	Fed-batch bioreactor	Άλευρα (βιομηχανικά απόβλητα)	109.8	-	57.8	0.4	Tsakona <i>et al.</i> , 2014
DSM 70296	Batch Shake flasks	Γλυκόζη	14.6	5.3	36.1	0.07	Present study
	Batch Shake flasks	Σιρόπι γλυκόζης	16.1	4.2	26.4	0.03	
	Batch Shake flasks	Σιρόπι γλυκόζης (με 20 g/L NaCl)	29.8	10.0	33.4	0.05	
	Fed-batch bioreactor	Σιρόπι γλυκόζης	53.6	29.9	55.7	0.11	

Στον Πίνακα 31 που ακολουθεί παρουσιάζονται αποτελέσματα της σύστασης των μικροβιακών λιπιδίων του *L. starkeyi* σε λιπαρά οξέα σύμφωνα με τη βιβλιογραφία,

προκειμένου να διευκολυνθεί η σύγκρισή του με τα αντίστοιχα της παρούσας μελέτης.

Πίνακας 32 Βιβλιογραφική ανασκόπηση της σύστασης του μονοκυτταρικού λίπους της ζύμης *L. starkeyi*.

Στέλεχος	C 16:0	^{Δ9} C 16:1	C 18:0	^{Δ9} C 18:1	^{Δ9,12} C 18:2	Reference
Γλυκόζη	34.1	3.2	4.3	55.7	-	Gong <i>et al.</i> , 2012
Γλυκόζη	18.9	4.0	5.0	67.9	-	Probst & Vadlani, 2017
Λυματολάσπη	56	2	14	26	-	Angerbauer <i>et al.</i> , 2008
Άχυρο σίτου	36.2	-	4.5	46.3	3.4	Yu <i>et al.</i> , 2011
Άμυλο	39	3	3	55	-	Wild <i>et al.</i> , 2010
Γλυκόζη+απόνερα γλουταμινικού νατρίου	19.91	17.65	-	35.85	-	Liu <i>et al.</i> , 2012
Μελάσα	21.3	5.2	5.2	50	15.7	Vieira, Ienczak, Rossel, Pradella, & Franco, 2014

Παρατηρείται πως η βιβλιογραφία συνάδει με τα αποτελέσματα της παρούσας μεταπτυχιακής μελέτης όσον αφορά στη σύσταση του μικροβιακού λίπους σε λιπαρά οξέα. Τα κυριότερα Λ.Ο. που εμφανίζονται, τόσο στη βιβλιογραφία όσο και στην παρούσα μελέτη είναι τα παλμιτικό, παλμιτελαϊκό, στεατικό και ελαϊκό. Ως επί το πλείστον, σε μεγαλύτερα ποσοστά εμφανίζονται τα ελαϊκό και παλμιτικό, σύσταση ομοιάζουσα με εκείνη του κραμβελαίου και σε κάποιες περιπτώσεις του φοινικελαίου (Tsakona *et al.*, 2014).

Οι ποσοστιαίες διακυμάνσεις μπορεί να οφείλονται σε διάφορους παράγοντες, όπως μεταξύ άλλων, στο μέσο, το είδος και τις συνθήκες της καλλιέργειας. Για παράδειγμα, σύμφωνα με τους El-Naggar *et al.* (2011), με την αύξηση της θερμοκρασίας από τους 15 °C στους 30 °C κατά την καλλιέργεια του *L. starkeyi* σε σιρόπι γλυκόζης εμφανίζονται ποσοτικές διαφορές στα λιπαρά οξέα του μικροβιακού λίπους. Πιο συγκεκριμένα το παλμιτικό οξύ μειώνεται από 23.98 mg/g σε 11.53 mg/g, και το ελαϊκό από 37.40 mg/g σε 14.03 mg/g. Ταυτόχρονα φαίνεται να αυξάνεται κατά πολύ το ερουκικό οξύ (C22:0).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5-ΕΠΙΛΟΓΟΣ

Η παραγωγή μεγάλων ποσοτήτων αποβλήτων αποτελεί καίριο ζήτημα σε παγκόσμια κλίμακα, καθώς υποβαθμίζει το φυσικό περιβάλλον και την υγεία του ανθρώπου. Κρίνεται συνεπώς αναγκαία η αξιοποίηση των αποβλήτων αυτών στα πλαίσια της κυκλικής οικονομίας και της αειφορίας των φυσικών πόρων. Από την άλλη πλευρά, η συνεχώς αυξανόμενη ζήτηση για βιοκαύσιμα θέτει στο επίκεντρο ζητήματα όπως το αυξανόμενο κόστος τους και ο ανταγωνισμός αροτραίων εκτάσεων με εκείνες που χρησιμοποιούνται για παραγωγή πρώτων υλών βιοκαυσίμων.

Η έννοια του βιοδιύλιστηρίου θα μπορούσε να αποτελέσει μια εναλλακτική πρόταση για τη διευθέτηση των παραπάνω ζητημάτων. Πιο συγκεκριμένα, αγροτο-βιομηχανικά απόβλητα δύνανται να χρησιμοποιηθούν ως πρώτες ύλες για την παραγωγή μονοκυτταρικών λιπιδίων, μέσω μικροβιακών ζυμώσεων, παρόμοιας σύστασης με των ελαίων φυτικής ή ζωικής προέλευσης. Πρόκειται συνεπώς για μια εξαιρετική πηγή ελαίων για παραγωγή 2^{ης} και 3^{ης} γενιάς βιοκαυσίμων.

Εκτός των βιοκαυσίμων, τα μονοκυτταρικά λιπίδια βρίσκουν ευρεία εφαρμογή στην παραγωγή πληθώρας άλλων προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας όπως, μεταξύ άλλων, πρόσθετα τροφίμων, συμπληρώματα διατροφής, βιολιπαντικά, σαπούνια, βιοπολυμερή, καλλυντικά, επιφανειοδραστικές ουσίες και κηροί. Έχει μάλιστα δειχθεί πως υπό ορισμένους χειρισμούς, κάποιοι μικροοργανισμοί δύνανται να παράγουν λιπίδια με σύσταση και δομή παρόμοια με κάποιων «εξωτικών» λιπών, όπως το λίπος του κακάο και της φάλαινας.

Όπως έχει ήδη προαναφερθεί, η παρούσα μεταπτυχιακή μελέτη είχε ως στόχο τη βελτιστοποίηση της μεθόδου εκχύλισης μονοκυτταρικού λίπους της ζύμης *L. starkeyi* και επίσης τη μελέτη ανάπτυξής της σε ληγμένο σιρόπι γλυκόζης, υπό την παρουσία ή μη διαφορετικών συγκεντρώσεων NaCl. Τα κυριότερα συμπεράσματα που προέκυψαν από την πειραματική διαδικασία της μελέτης αυτής, συνοψίζονται στα εξής:

- Η αποτελεσματικότερη μέθοδος εκχύλισης μικροβιακού λίπους είναι η Soxhlet, η οποία έδωσε λιποπεριεκτικότητα 74.5% επί ξ.β.. Αποτελεί, ωστόσο, ακριβή και χρονοβόρα εναλλακτική σε σύγκριση με τις υπόλοιπες μεθόδους που δοκιμάστηκαν.

- Η μέθοδος εκχύλισης με Folch-HCl απέδωσε λιποπεριεκτικότητα 41.4% επί ξ.β. και επιλέχθηκε ως η ιδανικότερη για εφαρμογή σε εργαστηριακή κλίμακα.
- Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσίασε η εκχύλιση του λίπους με πράσινους διαλύτες, η οποία έδωσε λιποπεριεκτικότητα 26.5%, αποτελώντας ένα νέο ορίζοντα έρευνας.
- Ανάλυση χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδας έδειξε πως το λίπος του *L. starkeyi* DSM 70296 αποτελείται κυρίως από τριγλυκερίδια, όπως ήταν αναμενόμενο.
- Το στέλεχος *L. starkeyi* αποτελεί μια πολλά υποσχόμενη ελαιογόνα ζύμη. Δύναται, δε, να αναπτύσσεται ικανοποιητικά σε υπόστρωμα σιροπιού γλυκόζης. Η μέγιστη λιποπεριεκτικότητα και παραγωγή βιομάζας επιτεύχθηκαν σε καλλιέργεια της ζύμης σε αρχική συγκέντρωση αναγόντων σακχάρων 80 g/L, φτάνοντας το 31.2% και τα 39.4 g/L αντίστοιχα.
- Προσθήκη αυξανόμενων συγκεντρώσεων NaCl στο μέσο της καλλιέργειας έως τα 20 g/L ευνόησαν τη λιποσυσσώρευση, φτάνοντας το μέγιστο των 10.0 g/L (40.4% επί ξ.β.).
- Συγκεντρώσεις NaCl άνω των 30 g/L έδρασαν παρεμποδιστικά στην κατανάλωση των σακχάρων και την ανάπτυξη της ζύμης. Συνεπώς το στέλεχος *L. starkeyi* DSM 70296 χαρακτηρίστηκε ως λίγο αλατοανθεκτικό.
- Ημι-συνεχής καλλιέργεια της ζύμης σε βιοαντιδραστήρα έδωσε αρκετά βελτιωμένα αποτελέσματα, τόσο ως προς την παραγωγή βιομάζας που έφτασε τα 53.6 g/L, όσο και ως προς τη λιποσυσσώρευση και τη λιποπεριεκτικότητα που ανήλθαν σε 29.9 g/L και 55.7% επί ξ.β., αντιστοίχως. Μάλιστα, η παραγωγικότητα των λιπιδίων σε αυτήν την περίπτωση έφτασε τα 0.11 g/L/h, αρκετά ικανοποιητική σε σύγκριση με τις τιμές της διεθνούς βιβλιογραφίας.
- Τα λιπίδια της ζύμης αποτελούνταν κυρίως από ελαϊκό και παλμιτικό οξύ και σε μικρότερη έκταση παλμιτελαϊκό και στεατικό, καθιστώντας το εξαιρετική πηγή για παραγωγή βιοντίζελ.

5.1 Προτάσεις για περαιτέρω μελέτη

Υπάρχει η ελπίδα πως η παρούσα μεταπτυχιακή μελέτη θα λειτουργήσει ως «εναρκτήριο λάκτισμα» για τη μελλοντική έρευνα άλλων συναφών θεμάτων τόσο από την ακαδημαϊκή, όσο και από την ευρύτερη επιστημονική κοινότητα.

Ένα ζήτημα που σίγουρα αξίζει περαιτέρω έρευνα είναι η χρήση πράσινων διαλυτών για την εκχύλιση του μικροβιακού λίπους. Η αριστοποίηση της μεθόδου αλλά και της σύνθεσης των διαλυτών θα αποτελούσε ένα πολύ ενδιαφέρον θέμα.

Ένα επίσης πολύ σημαντικό θέμα θα μπορούσε να αποτελέσει η χρήση γενετικώς τροποποιημένων στελεχών του *L. starkeyi* που να αντέχουν περισσότερο σε οσμωτικά φαινόμενα που προκαλούνται από την προσθήκη αλατιού στο μέσο. Κάτι τέτοιο ίσως έδινε τη δυνατότητα αξιοποίησης αλατούχων αποβλήτων προς παραγωγή λιπιδίων με αυξημένες αποδόσεις υπό παστεριωμένες συνθήκες. Αντίστοιχες μελέτες θα μπορούσαν να διεξαχθούν και για καλλιέργειες άλλων μικροοργανισμών προς παραγωγή και άλλων μεταβολικών προϊόντων, όπως για παράδειγμα αιθανόλης, πολυολών και πολυσακχαριτών.

Ενδιαφέρον θα παρουσίαζε και καλλιέργεια της ζύμης σε βιοαντιδραστήρα με εξωτερική τροφοδοσία αλατιού για καλύτερη προσαρμογή του μικροοργανισμού και ακόμη μεγαλύτερες αποδόσεις λιποσυσσώρευσης.

Το στέλεχος *L. starkeyi* αποτελεί καλή υποψήφια ελαιογόνα ζύμη για παραγωγή λιπιδίων προς χρήση για παραγωγή βιοντίζελ. Ενδιαφέρον θα ήταν συνεπώς να μελετηθεί η συμπεριφορά της και σε συνεχείς καλλιέργειες υποστρώματος σιροπιού γλυκόζης και επίσης να γίνουν προσπάθειες απομόνωσης και καθαρισμού του τελικού προϊόντος.

Τέλος, αναπόσπαστο κομμάτι όλων των διεργασιών αποτελεί το κόστος, και συνεπώς θα ήταν ιδιαίτερος χρήσιμη η εκπόνηση οικονομοτεχνικών μελετών όλων των ανωτέρω, τόσο σε εργαστηριακή, όσο και σε βιομηχανική κλίμακα.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

ΕΛΛΗΝΙΚΗ

Αγγελής, Γ. (2007). Μικροβιολογία και μικροβιακή τεχνολογία. Αθήνα: Εκδόσεις Σταμούλη.

ΞΕΝΟΓΛΩΣΣΗ

Adrio, J. L. (2017). Oleaginous yeasts: Promising platforms for the production of oleochemicals and biofuels. *Biotechnology and Bioengineering*, Doi: [10.1002/bit.26337]

Ageitos, J. M., Vallejo, J. A., Veiga-Crespo, P., & Villa, T. G. (2011). Oily yeasts as oleaginous cell factories. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 90, 1219-1227. Doi: 10.1007/s00253-011-3200-z

Angerbauer, C., Siebenhofer, M., Mittelbach, M., & Guebitz, G. M. (2008). Conversion of sewage sludge into lipids by *Lipomyces starkeyi* for biodiesel production. *Bioresource Technology*, 99, 3051-3056. Doi: 10.1016/j.biortech.2007.06.045

Anschau, A., Xavier, M. C. A., Hernalsteens, S., & Franco, T. T. (2014). Effect of feeding strategies on lipid production by *Lipomyces starkeyi*. *Bioresource Technol.*, 157, 214–222.

Bellou, S., Triantaphyllidou, I. E., Aggeli, D., Elazzazy, A. M., Baeshen, M. N., & Aggelis, G. (2016). Microbial oils as food additives: recent approaches for improving microbial oil production and its polyunsaturated fatty acid content.

Current Opinion in Biotechnology, 37, 24-35. Doi:
10.1016/j.copbio.2015.09.005

Bonturi, N., Matsakas, L., Nilsson, R., Christakopoulos, P., Everson, A. M., Berglund, K. A., & Rova, U. (2015). Single Cell Oil producing yeasts *Lipomyces starkeyi* and *Rhodospiridium toruloides*: Selection of extraction strategies and biodiesel property prediction. *Energies*, 8, 5040-5052. Doi:
10.3390/en8065040

Breil, C., Vian, A. M., Zemb, T., Kunz, W., & Chemat, F. (2017). “Bligh and Dyer” and Folch Methods for Solid–Liquid–Liquid Extraction of Lipids from Microorganisms. Comprehension of Solvation Mechanisms and towards Substitution with Alternative Solvents. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(708), 1-21. Doi: 10.3390/ijms18040708

Buyukgungor, H., & Gurel, L. (2009). The role of biotechnology on the treatment of wastes. *African Journal of Biotechnology*, 8(25), 7253-7262. Doi:
10.4314/ajb.v8i25

Carman, M. G., & Henry, A. S. (1989). Phospholipid biosynthesis in yeast. *Annu. Rev. Die-chern.*, 58, 635-669.

Czabany, T., Athenstaedt, K., & Daum, G. (2006). Synthesis, storage and degradation of neutral lipids in yeast. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1771, 299-309. Doi:
10.1016/j.bbalip.2006.07.001

El-Naggar, N. El-Hersh, S. M., El-Fadaly, A. H. & Saber, I. A. W. (2011). Bioconversion of some agro-industrial by-products into Single Cell Oil using

Candida albicans NRRL Y-12983 and *Lipomyces starkeyi* NRRL Y-11557.
Research Journal of Microbiology, 6(11), 784-795.

European Commission. (2015). *EU Agricultural outlook: Prospects for EU agricultural markets and income 2015-2025*. Retrieved from https://ec.europa.eu/agriculture/sites/agriculture/files/markets-and-prices/medium-term-outlook/2015/fullrep_en.pdf

European Commission. (2016). *EU Agricultural outlook: Prospect for the EU agricultural markets and income 2016-2026*. Retrieved from https://ec.europa.eu/agriculture/sites/agriculture/files/markets-and-prices/medium-term-outlook/2016/2016-fullrep_en.pdf

European Commission. (2017a). *EU sugar balance*. Retrieved from https://ec.europa.eu/agriculture/sites/agriculture/files/market-observatory/sugar/doc/presentation_en.pdf

European Commission. (2017b). *Waste*. Retrieved from <http://ec.europa.eu/environment/waste/index.htm>

Eurostat. (2017). *Waste statistics*. Retrieved from http://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/index.php/Waste_statistics

Fakas, S., Papanikolaou, S., Galiotou-Panayotou, M., Komaitis, M., & Aggelis, G. (2006). Lipids of *Cunninghamella echinulata* with emphasis to γ -linolenic acid distribution among lipid classes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 73, 676-683.

FAO. (2011). *Global Food Losses and Food Waste*. Retrieved from <http://www.fao.org/docrep/014/mb060e/mb060e00.pdf>

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

Fusions. (2016). *Estimates of European food waste levels*. Retrieved from <http://www.fusions.org/phocadownload/Publications/Estimates%20of%20European%20food%20waste%20levels.pdf>

Gameiro, N. D. (2016). *Green waste is biotech's new black gold: A review of biorefineries*. Retrieved September 10, 2017 from <https://labiotech.eu/biorefinery-review-europe-biobased/>

Ganesan B., Brothersen C., McMahon D. J. (2014). Fortification of foods with omega-3 polyunsaturated fatty acids. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 54, 98–114. Doi: 10.1080/10408398.2011.578221

Garba, U. M., Alhassan, M., & Kovo, S. A. (2006). A Review of advances and quality assessment of biofuels. *Leonardo Journal of Sciences*, 9, 167-178. Retrieved from <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.577.9951&rep=rep1&type=pdf>

Giri, D. (2016). Glycolysis: All steps with diagram, enzymes, products, energy yield and significance. Retrieved September 9, 2017, from <http://laboratoryinfo.com/glycolysis-steps-diagram-energy-yield-and-significance/#prettyPhoto>

- Gong, Z., Wang, Q., Shen, H., Hu, C., Jin, G., & Zhao, K. Z. (2012). Co-fermentation of cellobiose and xylose by *Lipomyces starkeyi* for lipid production. *Bioresource Technology*, *117*, 20–24.
- Hobbs, L. (2009). Sweeteners from starch: Production, properties and uses. In J. BeMiller & R. Whistler (Eds.), *Starch: Chemistry and Technology* (3rd ed., pp. 797- 832). Retrieved from <http://197.14.51.10:81/pmb/AGROALIMENTAIRE/Starch.pdf>
- Hou, C. T., & Shaw, J. F. (2008). *Biocatalysis and bioenergy*. New Jersey: Wiley.
- Hull, P. (2010). *Glucose syrups: Technology and applications*. Retrieved from <https://books.google.gr/books?id=ry2E-9y-AkQC&printsec=frontcover&hl=el#v=onepage&q&f=false>
- Jackson, E. B. (1995). Use of glucose syrups in the food industry. In M. W. Kearsley, & S. Z. Dziejic (Eds.), *Handbook of Starch Hydrolysis Products and their Derivatives* (pp. 245-268). Surrey: Chapman & Hall.
- Jiménez-Colmenero F. (2007). Healthier lipid formulation approaches in meat-based functional foods. Technological options for replacement of meat fats by non-meat fats. *Trends in Food Science & Technology*, *18*, 567–578. Doi: 10.1016/j.tifs.2007.05.006
- Kitcha S., & Cheirsilp B. (2011). Screening of oleaginous yeasts and optimization for lipid production using crude glycerol as a carbon source. *Energy Procedia*, *9*, 274-282.
- Knothe, G. (2001). Historical perspectives on vegetable oil-based diesel fuels. *Inform*, *12*, 1103-1107.

- Knothe, G., Krahl, J., & Gerpen, J. (Eds.). (2010). *The biodiesel handbook* (2nd ed.). Illinois: AOCS Press.
- Koester, U., Empen, J., & Holm, T. (2013). *Food Losses and Waste in Europe and Central Asia*. Retrieved from http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/Europe/documents/Publications/FLW/synthesis_draft_en.pdf
- Koutinas, A. A., Chatzifragkou, A., Kopsahelis, N., Papanikolaou, S., & Kookos, I. K. (2014). Design and techno-economic evaluation of microbial oil production as a renewable resource for biodiesel and oleochemical production. *Fuel*, *116*, 566-577. Doi: 10.1016/j.fuel.2013.08.045
- Kruger, N. J., & Schaewen, A. (2003). The oxidative pentose phosphate pathway: structure and organisation. *Current Opinion in Plant Biology*, *6*, 236-246. Doi: 10.1016/S1369-5266(03)00039-6
- Li, Q., Du, W., & Liu, D. (2008). Perspectives of microbial oils for biodiesel production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, *80*, 749-756.
- Liu, J. X., Yue, Q. Y., Gao, B. Y., Ma, Z. H., & Zhang, P. D. (2012). Microbial treatment of the monosodium glutamate wastewater by *Lipomyces starkeyi* to produce microbial lipid. *Bioresour. Technol.*, *106*, 69-73.
- Maarel, M. J. E.C., Veen, B., Uitdehaag, J. C. M., Leemhuis, H., & Dijkhuizen, L. (2001). Properties and applications of starch-converting enzymes of the α -amylase family. *Journal of Biotechnology*, *94*, 137-155. Retrieved from https://www.researchgate.net/publication/11562967_Properties_and_applications_of_starch-converting_enzymes_of_the_-amylase_family

- Margesin, R., & Schinner, F. (2001). Biodegradation and bioremediation of hydrocarbons in extreme environments. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, *56*, 650-663. Doi: 10.1007/s002530100701
- Miller, G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, *31*(3), 426-428.
- 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*, *4*(1), 1-16.
- National Farming Union. (2017). *Isoglucose*. Retrieved September 15, 2017 from <https://www.nfuonline.com/home/>
- Ochsenreither, K., Glück, C., Stressler, T., Fischer, L., & Syldatk, C. (2016). Production strategies and applications of microbial Single Cell Oils. *Front. Microbiol.*, *7*, 1539. Doi: 10.3389/fmicb.2016.01539
- OECD. (2005). *A Framework for Biotechnology Statistics*. OECD Publications.
- OECD/Food and Agriculture Organisation of the United Nations. (2015). OECD-FAO agricultural outlook 2015. *OECD Publishing*. Retrieved from http://www.fao.org/fileadmin/templates/est/COMM_MARKETS_MONITORING/Oilcrops/Documents/OECD_Reports/OECD_biofuels2015_2024.pdf
- Oguri, E., Masaki, K., Naganuma, T., & Iefuji, H. (2012). Phylogenetic and biochemical characterization of the oil-producing yeast *Lipomyces starkeyi*. *Antonie van Leeuwenhoek*, *101*, 359-368. Doi: 10.1007/s10482-011-9641-7

- Papadaki, A., Mallouchos, A., Efthymiou, M-N., Gardeli, C., Kopsahelis, N., Aguiéiras, 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., Chevalot, I., Komaitis, M., Aggelis, G., & Marc, I. (2001). Kinetic profile of the cellular lipid composition in an oleaginous *Yarrowia lipolytica* capable of producing a cocoa-butter substitute from industrial fats. *Antonie van Leeuwenhoek*, 80, 215-224.
- Papanikolaou S., & Aggelis, G. (2011a). Lipids of oleaginous yeasts. Part I: Biochemistry of single cell oil production. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 113, 1031–1051.
- Papanikolaou, S., & Aggelis, G. (2011b). Lipids of oleaginous yeasts. Part II: Technology and potential applications. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 113(8), 1052–1073.
- Pfleger, B. F., Gossing, M., & Nielsen, J. (2015). Metabolic engineering strategies for microbial synthesis of oleochemicals. *Metabolic Engineering*. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ymben.2015.01.009>
- Probst, V. K., & Vadlanib, V. P. (2017). Single cell oil production by *Lipomyces starkeyi*: Biphase fed-batch fermentation strategy providing glucose for growth and xylose for oil production. *Biochemical Engineering Journal*, 121, 49–58.
- Ratledge, C. (2004). Fatty acid biosynthesis in microorganisms being used for Single Cell Oil production. *Biochimie*, 86, 807-815.

- Ratledge, C., & Cohen, Z. (2008). Microbial and algal oils: Do they have a future for biodiesel or as commodity oils? *Lipid Technology*, 20(7), 155-160. Doi: 10.1002/lite.200800044
- Ratledge, C., & Wynn, P. J. (2002). The biochemistry and molecular biology of lipid accumulation in oleaginous microorganisms. *Advances in Applied Microbiology*, 51, 1-51.
- Salunke, D., Manglekar, R., Gadre, R., Nene, S., & Harsulkar, M. A. (2015). Production of polyunsaturated fatty acids in recombinant *Lipomyces starkeyi* through submerged fermentation. *Bioprocess Biosyst. Eng.* Doi: 10.1007/s00449-015-1382-y
- Sarris, D., Galiotou-Panayotou, M., Koutinas, A. A., Komaitis, M., & Papanikolaou, S. (2011). Citric acid, biomass and cellular lipid production by *Yarrowia lipolytica* strains cultivated on olive mill wastewater-based media. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 86, 1439-1448. Doi: 10.1002/jctb.2658
- Suutari, M., Rintamäki, A., & Laakso, S. (1996). The effect of temperature on lipid classes and their fatty acid profiles in *Lipomyces starkeyi*. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 73(8), 1071-1073.
- Tchakouteu, S. S., Kopsahelis, N., Chatzifragkou, A., Kalantzi, O., Stoforos, N. G., Koutinas, A. A., Aggelis, G., & Papanikolaou, S. (2016). *Rhodospiridium toruloides* cultivated in NaCl-enriched glucose-based media: Adaptation dynamics and lipid production. *Eng. Life Sci.*, 00, 1-12. Doi: 10.1002/elsc.201500125

- 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.
- Vieira, J. P. F., Ienczak, J. L., Rossel, C. E. V., Pradella, J. G. C., & Franco, T. T. (2014). Microbial lipid production: screening with yeasts grown on Brazilian molasses. *Biotechnol Lett.* Doi: 10.1007/s10529-014-1624-0
- Yu, X., Zheng, Y., Dorgan, K. M., & Chen, S. (2011). Oil production by oleaginous yeasts using the hydrolysate from pretreatment of wheat straw with dilute sulfuric acid. *Bioresour. Technol.*, 102, 6134–40.
- Wang, R., Wang, J., Xu, R., Fang, Z., & Liu, A. (2014). Oil production by the oleaginous yeast *Lipomyces starkeyi* using diverse carbon sources. *BioResources*, 9(4), 7027-7040.
- Wild, R., Patil, S., Popovic, M., Zappi, M., Dufreche, S., & Bajpai, R. (2010). Lipids from *Lipomyces starkeyi*. *Food Technol. Biotechnol.*, 48(3), 329–335.
- Wood, D., & O'Rourke, T. (1995). *Glucose syrups in the fermentation industries*. In M. W. Kearsley, & S. Z. Dziejczak (eds.), *Handbook of starch hydrolysis products and their derivatives* (pp. 230-231). Surrey: Chapman & Hall.
- Yousuf, A., Sannino, F., Addorisio, V., & Pirozzi, D. (2010). Microbial conversion of Olive Oil Mill Wastewaters into lipids suitable for biodiesel production. *J. Agric. Food Chem.*, 58, 8630-8635.
- Yu, X., Dong, T., Zheng, Y., Miao, C., & Chen, S. (2015). Investigations on cell disruption of oleaginous microorganisms: Hydrochloric acid digestion is an

effective method for lipid extraction. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 117, 730-737.

Yu, X., Zheng, Y., Dorgan, M. K., & Chen, S. (2011). Oil production by oleaginous yeasts using the hydrolysate from pretreatment of wheat straw with dilute sulfuric acid. *Bioresource Technology*, 102, 6134-6140. Doi: 10.1016/j.biortech.2011.02.081

Zhao, X., Kong, X., Hua, Y., Feng, B., & Zhao, Z. (2008). Medium optimization for lipid production through co-fermentation of glucose and xylose by the oleaginous yeast *Lipomyces starkeyi*. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 110, 405-412. Doi: 10.1002/ejlt.200700224

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.

Zimmer, Y. (2013). Isoglucose – How significant is the threat to the EU sugar industry? *Sugar Industry*, 138(12), 770-777.