

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

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



ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

ΘΕΜΑ: «Μελέτη της προσθήκης παραπροϊόντων της διεργασίας παραγωγής χάρτου στη φυσιολογική συμπεριφορά στελεχών του μικροοργανισμού *Rhodosporidium toruloides* κατά την αύξηση τους σε υποστρώματα με βάση τη ξυλόζη»

Σαββούλα Π. Μίχου

Επιβλέπων καθηγητής: Σεραφείμ Παπανικολάου

ΑΘΗΝΑ 2018

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

ΠΜΣ: ΒΙΟΔΙΕΡΓΑΣΙΕΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΒΙΟΔΥΛΙΣΤΗΡΙΑ



ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

ΘΕΜΑ: «Μελέτη της προσθήκης παραπροϊόντων της διεργασίας παραγωγής χάρτου στη φυσιολογική συμπεριφορά στελεχών του μικροοργανισμού *Rhodospiridium toruloides* κατά την αύξηση τους σε υποστρώματα με βάση τη ξυλόζη»

Σαββούλα Π. Μίχου

Επιβλέπων καθηγητής: Σεραφείμ Παπανικολάου

ΑΘΗΝΑ 2018

ΠΜΣ: ΒΙΟΔΙΕΡΓΑΣΙΕΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΒΙΟΔΙΥΛΙΣΤΗΡΙΑ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

ΘΕΜΑ: «Μελέτη της προσθήκης παραπροϊόντων της διεργασίας παραγωγής χάρτου στη φυσιολογική συμπεριφορά στελεχών του μικροοργανισμού *Rhodospiridium toruloides* κατά την αύξηση τους σε υποστρώματα με βάση τη ξυλόζη»

Εξεταστική επιτροπή:

Σεραφείμ Παπανικολάου, Αναπληρωτής Καθηγητής Γ.Π.Α.

Απόστολος Κουτίνας, Επίκουρος Καθηγητής Γ.Π.Α.

Αθανάσιος Μαλλούχος, Λέκτορας Γ.Π.Α.

Σαββούλα Π. Μίχου

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα ερευνητική μελέτη διεξήχθη στο εργαστήριο Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών. Πριν την παρουσίαση των αποτελεσμάτων της, αισθάνομαι την υποχρέωση να ευχαριστήσω ορισμένους από τους ανθρώπους που γνώρισα, συνεργάστηκα μαζί τους και έπαιξαν πολύ σημαντικό ρόλο στην πραγματοποίησή της.

Θα ήθελα αρχικά να ευχαριστήσω τον καθηγητή μου κ. Παπανικολάου Σεραφείμ για τις συμβουλές του καθ'όλη την διάρκεια της μελέτης αυτής, καθώς και για την άριστη συνεργασία μας. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους: Ουρανία Καλαντζή, Δημήτρη Σαρρή, Βαγγέλη Ξερόπουλο, Κατερίνα Παπαδάκη, Έρη Τσούκο και Δημήτρη Λαδάκη για τις επιστημονικές τους συμβουλές.

Στη συνέχεια, θα ήθελα να ευχαριστήσω από καρδιάς τους φίλους και συμφοιτητές μου για όλη την υποστήριξη τους και τις πολύ όμορφες στιγμές που μοιραστήκαμε αυτά τα δύο χρόνια.

Τέλος, χρωστάω ένα τεράστιο ευχαριστώ στην οικογένειά μου και τον Κωνσταντίνο Σημαιοφορίδη που βρίσκονται συνεχώς στο πλευρό μου και πρόσφεραν την απαραίτητη ηθική συμπαράσταση για την ολοκλήρωση της μεταπτυχιακής μου μελέτης.

Σαββούλα Μίχου

Αθήνα, 2018

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Περίληψη.....	5
Abstract	7
Κεφάλαιο 1: Εισαγωγή.....	9
1.1. Γενικά Χαρακτηριστικά	10
1.2. Ξυλόζη.....	11
1.3. Μικροβιακά Λιπίδια	12
1.3.1 Βιοσυσσώρευση ενδοκυτταρικού λίπους.....	13
1.4. Ενδοπολυσακχαρίτες.....	16
1.4.1 Βιοσύνθεση ενδοπολυσακχαριτών (IPS)	17
1.5. Βιοντήζελ- Μεθυλεστέρες Λιπαρών Οξέων.....	18
1.6. Spent Sulfite Liquor (SSL)	22
1.7. Λιγνοσουλφονικά Αλατα (LS).....	23
1.8. Επίδραση του λιγνοσουλφονικού νατρίου (SL) στην καλλιέργεια του μ.ο R.toruloides	25
Κεφάλαιο 2: Υλικά και Μέθοδοι.....	29
2.1. Βιολογικό Υλικό.....	30
2.2. Θρεπτικά Υποστρώματα	30
2.2.1 Παρασκευή προκαλλιέργειας	30
2.2.2 Παρασκευή κυρίως καλλιέργειας.....	30
2.3. Αναλύσεις	32
2.3.1 Προσδιορισμός βιομάζας.....	32
2.3.2 Προσδιορισμός ενδοπολυσακχαριτών (IPS)	32
2.3.3 Ποσοτικός προσδιορισμός ενδοπολυσακχαριτών και ξυλόζης.....	33
2.3.4 Ποσοτικός προσδιορισμός ενδοκυτταρικού λίπους.....	33
2.3.5 Μεθυλεστεροποίηση	34
2.3.6 Ανάλυση στον αέριο χρωματογράφο (GC)	34
2.4. Σκοπός Ερευνητικής Μελέτης.....	36
Κεφαλαίο 3: Αποτελέσματα.....	37
Κεφάλαιο 4: Συζήτηση-Συμπεράσματα	55
Βιβλιογραφία.....	65

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός της παρούσας ερευνητικής εργασίας είναι η μελέτη της επίδρασης του λιγνοσουλφονικού νατρίου, το οποίο ανήκει στο ρεύμα παραπροϊόντων της βιομηχανίας χάρτου, στην κυτταρική ανάπτυξη και την παραγωγή δευτερογενών μεταβολιτών (μικροβιακό λίπος και ενδοπολυσακχαρίτες) της ελαιογόνου ζύμης *Rhodosporidium toruloides*. Τα μικροβιακά λιπίδια και ειδικότερα αυτά που παράγονται από ελαιογόνους ζύμες, έχουν λάβει μεγάλη προσοχή ως πιθανές εναλλακτικές πηγές για παραγωγή 2^{ης} γενιάς βιοντήζελ. Απώτερος σκοπός της μελέτης είναι να διαπιστωθεί αν η προσθήκη λιγνοσουλφονικού νατρίου οδηγεί σε ενίσχυση της βιοσυσσώρευσης μικροβιακού λίπους, κατά τρόπο ώστε τα υγρά απόβλητα της βιομηχανίας παραγωγής χάρτου (spent sulfite liquor) να μπορούσαν να αξιοποιηθούν ως υπόστρωμα για την καλλιέργεια της ζύμης *R.toruloides*.

Στα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιήθηκαν δύο στελέχη της ζύμης *Rhodosporidium toruloides* (*R.toruloides*), το DSM 444 και το NRRL Y-27012. Όλες οι ζυμώσεις περιείχαν σαν μοναδική πηγή άνθρακα την ξυλόζη και έλαβαν χώρα σε περιοριστικές σε άζωτο συνθήκες. Αρχικά, πραγματοποιήθηκαν καλλιέργειες βυθού σε κωνικές φιάλες Erlenmeyer των 250 ml, χρησιμοποιώντας ως πηγή άνθρακα ξυλόζη, με αρχική συγκέντρωση 50 g/L. Σε πρώτο επίπεδο δεν προστέθηκε στις καλλιέργειες λιγνοσουλφονικό νάτριο. Αυτές οι ζυμώσεις αποτέλεσαν τις ζυμώσεις αναφοράς. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκαν ζυμώσεις, στις οποίες επικράτησαν οι ίδιες συνθήκες με τις ζυμώσεις αναφοράς (pH=6,0±0,2, ανάδευση: 180±5 rpm, T=28±1°C). Επίσης, η σύσταση του θρεπτικού υλικού ήταν ίδια με αυτή των ζυμώσεων αναφοράς με την μόνη διαφορά ότι προστέθηκαν 10g/L, 20g/L και 40g/L λιγνοσουλφονικού νατρίου, αντίστοιχα. Τέλος, πραγματοποιήθηκε ημι-συνεχής τροφοδοτούμενη ζύμωση του στελέχους NRRL Y-27012 σε βιοαντιδραστήρα όγκου 3L και ενεργού όγκου 1,5 L στις προηγούμενες αριστοποιημένες συνθήκες.

Σε όλες τις προαναφερθείσες ζυμώσεις πραγματοποιήθηκε ο ποσοτικός προσδιορισμός της ξηρής βιομάζας, καθώς και του παραγόμενου μικροβιακού λίπους. Επίσης, πραγματοποιήθηκε ο προσδιορισμός των ενδοπολυσακχαριτών. Το παραγόμενο λίπος ύστερα από μεθυλεστεροποίηση που πραγματοποιήθηκε οδηγήθηκε για ανάλυση στον αέριο χρωματογράφο.

Στις ζυμώσεις βυθού, που πραγματοποιήθηκαν για το στελέχος DSM 4444, βρέθηκε ότι η μεγαλύτερη παραγωγή βιομάζας παρατηρήθηκε στη ζύμωση με την προσθήκη 40 g/L SL, η οποία έφθασε τα 18,6 g/L. Η μεγαλύτερη παραγωγή λίπους παρατηρήθηκε στη ζύμωση με την προσθήκη 20 g/L SL, η οποία έφθασε τα 4,77 g/L, ενώ το μέγιστο ποσοστό ενδοπολυσακχαριτών επί ξηράς ουσίας παρατηρήθηκε στη ζύμωση, στην οποία δεν υπήρξε προσθήκη SL και είχε τιμή 0,31 g/g. Στις ζυμώσεις του στελέχους NRRL Y-27012, η μεγαλύτερη παραγωγή λίπους παρατηρήθηκε στη ζύμωση με την προσθήκη 10 g/L SL, η οποία έφθασε τα 5,30 g/L. Η μέγιστη τιμή βιομάζας παρατηρήθηκε στη ζύμωση με την προσθήκη 40 g/L SL, η οποία έφθασε τα 15,2 g/L, ενώ το μέγιστο ποσοστό ενδοπολυσακχαριτών επί ξηράς ουσίας παρατηρήθηκε στη ζύμωση, στην οποία δεν υπήρξε προσθήκη SL και είχε τιμή 0,30 g/g. Στη ζύμωση, που έλαβε χώρα στο βιοαντιδραστήρα, το λίπος έφτασε τα 17,00 g/L, η βιομάζα έφτασε τα 29,7 g/L και το μέγιστο ποσοστό ενδοπολυσακχαριτών επί ξηράς ουσίας ήταν 0,19 g/g. Με την βοήθεια της αέριας χρωματογραφίας βρέθηκε ότι το μικροβιακό λίπος που παράχθηκε και από τα δύο στελέχη DSM 4444 και NRRL Y-27012 αποτελούταν από τα ακόλουθα λιπαρά οξέα: παλμιτικό οξύ (C16:0), στεατικό οξύ (C18:0), ελαϊκό οξύ (Δ^9 C18:1), λινελαϊκό οξύ ($\Delta^{9,12}$ C18:2) και αλινολενικό οξύ ($\Delta^{9,12,15}$ C18:3), με κυρίαρχο λιπαρό οξύ σε όλες τις ζυμώσεις να αποτελεί το ελαϊκό οξύ (Δ^9 C18:1).

Λέξεις κλειδιά: *Rhodospiridium toruloides*, λιγνοσουλφονικό νάτριο, μικροβιακό λίπος, ελαιογόνος ζύμη.

ABSTRACT

The aim of this study is to explore the effect of sodium lignosulfonate, which belongs to the paper industry's by-products, on the cell growth and production of secondary metabolites (microbial fat and intracellular polysaccharides) of the yeast *Rhodospiridium toruloides* (*R.toruloides*). Microbial oil, and particularly the one produced by oleaginous yeasts, is drawing increasing interest all over the world as an alternative non-food feedstock for biodiesel production. The ultimate aim of the study is to determine whether the addition of sodium lignosulfonate enhances the lipid accumulation, in order that spent sulfite liquor could be used as substrate for cultivation of yeast *R.toruloides*.

In the experiments conducted, two strains of *Rhodospiridium toruloides*, namely DSM 444 and NRRL Y-27012, were used. All cultures contained xylose as nominal sole source of carbon and nitrogen-limiting conditions prevailed. Firstly, submerged fermentations were conducted in Erlenmeyer flasks 250 ml, using xylose as a carbon source at initial concentration of 50 g/L. At the first level, sodium lignosulfonate was not added to the cultures. The aforementioned cultures formed the reference point for the subsequent cultures (i.e. controls). Then, fermentations were carried out in the same conditions as the controls (pH = 6,0 ± 0,2, (180 ± 5 rpm), T = 28 ± 1 °C), with the exception that sodium lignosulphonate at concentration of 10 g/L, 20 g/L and 40 g/L, was added. Finally, a fed-batch fermentation of NRRL Y-27012 strain was carried out in a 3L bioreactor, with working volume of 1,5 L.

In all the above-mentioned fermentations carried out, the weight of the dry biomass was determined and the produced microbial fat was quantified. Furthermore, the intracellular polysaccharides were determined. The produced fat, after the methyl esterification conducted, was analysed by using gas chromatograph.

In the case of submerged fermentations carried out for DSM 4444 stain, the largest biomass production was observed in the fermentation by adding 40 g/L SL, reaching 18,6 g/L. The maximum fat production was identified in the fermentation by the addition of 20 g/L SL, which reached 4,77 g/L, and the maximum $Y_{IPS/X}$ (i.e. g of intracellular polysaccharides formed per g of biomass formed) was observed in the fermentation in which there was no addition of SL and had a value of 0,31 g/g. In the case of fermentations of the NRRL Y-27012 strain, the maximum fat production was

detected in the fermentation with the addition of 10 g/L SL, which reached 5,30 g/L. The maximum biomass value was observed in the fermentation by the addition of 40 g/L SL, which reached 15,2 g/L, and the maximum $Y_{\text{IPS/X}}$ was observed in the control fermentation and had a value of 0,30 g/g. In the case of fed-batch fermentation, the fat reached 17,00 g/L, the biomass reached 29,7 g/L and the maximum $Y_{\text{IPS/X}}$ was 0,19 g/g. With the help of gas chromatography, it was found that the microbial fat produced by both DSM 4444 and NRRL Y-27012 strains, consisted of the following fatty acids: palmitic acid (C16:0), stearic acid (C18:0), oleic acid (Δ^9 C18:1), linoleic acid ($\Delta^{9,12}$ C18:2) and α -linolenic acid ($\Delta^{9,12,15}$ C18:3) with the dominant fatty acid in all the fermentations being oleic acid (Δ^9 C18:1).

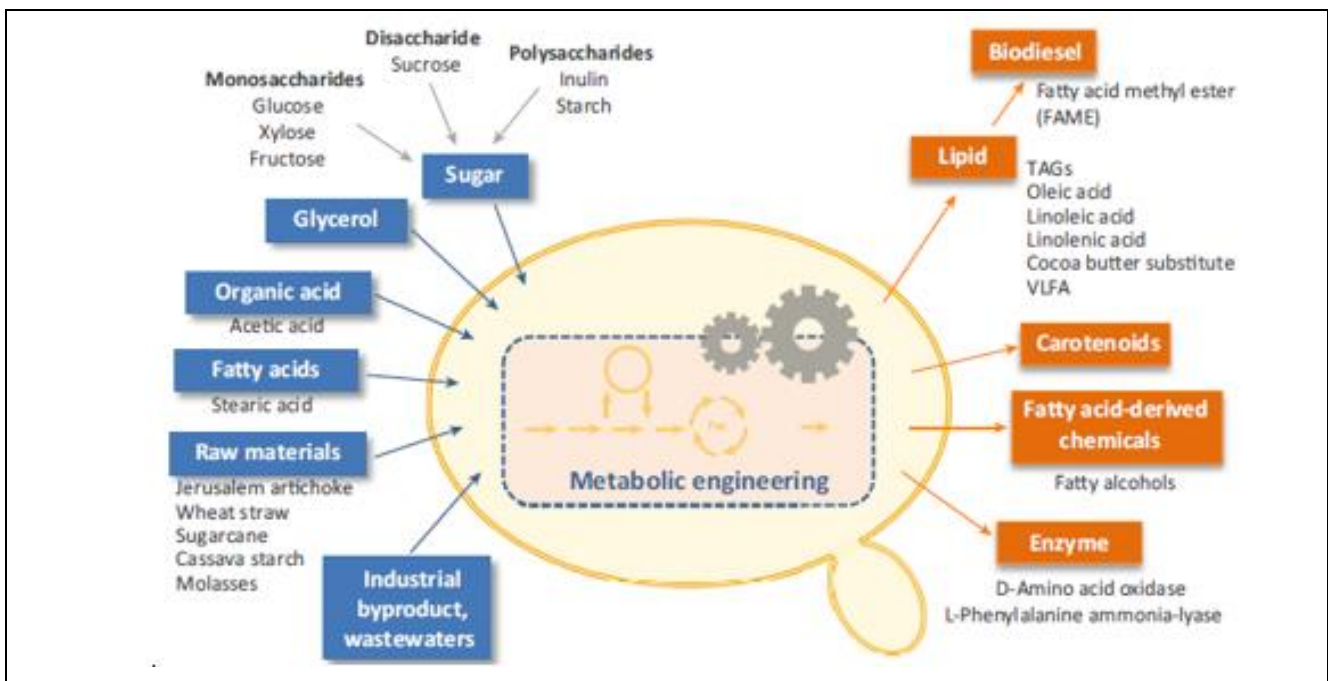
Keywords: *Rhodospiridium toruloides*, sodium lignosulphonate, microbial fat, oleaginous yeast.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. ΓΕΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ

Η ζύμη *Rhodospiridium toruloides* είναι μία κόκκινη ελαιογόνος, μη παθογόνος ζύμη, που ανήκει στην οικογένεια των Βασιδιομυκήτων (Akada et al., 1989; Zhu et al., 2012). Στην ταυτοποίησή της συνέβαλε η απομόνωση της από τον ξυλοπολτό κωνοφόρων δέντρων.

Η εν λόγω ζύμη έχει πολλές βιοτεχνολογικές εφαρμογές, αφού είναι παραγωγός ουδέτερων λιπιδίων, καροτενοειδών ουσιών (στις οποίες οφείλεται το κόκκινο χρώμα), καθώς και σημαντικών ενζύμων, όπως διαφαίνεται παρακάτω από την Εικόνα 1.1 (Passoth et al., 2017). Φυσιολογικές μελέτες έχουν δείξει την ικανότητά της να αναπτύσσεται σε ένα ευρύ φάσμα πηγών άνθρακα και αζώτου με αποτέλεσμα την παραγωγή προϊόντων υψηλής αξίας από υποστρώματα χαμηλού κόστους (Xu, and Liu, 2017). Ως εκ τούτου, η συγκεκριμένη ζύμη έχει μελετηθεί από το 1950 ως δυνητικός μικροοργανισμός, σε πληθώρα βιοτεχνολογικών εφαρμογών.



Εικόνα 1.1: Ο μ.ο *R.toruloides* έχει την ικανότητα να παράγει σημαντικές χημικές ενώσεις (πορτοκαλί κουτιά) καταναλώνοντας διάφορες πηγές άνθρακα (μπλε κουτιά).

Στη φύση εντοπίζονται ορισμένοι μικροοργανισμοί, οι οποίοι έχουν τη δυνατότητα να παράγουν λίπος ενδοκυτταρικά. Συγκεκριμένα, ως ελαιογόνοι μικροοργανισμοί ορίζονται οι μικροοργανισμοί εκείνοι, οι οποίοι αναπτυσσόμενοι σε συγκεκριμένες συνθήκες περιβάλλοντος δύνανται να συσσωρεύσουν ενδοκυτταρικό λίπος, σε ποσοστό μεγαλύτερο από 20% (w/w) επί της ξηράς ουσίας (Papanikolaou and Aggelis, 2011; Ageitos et al., 2011). Ο μικροοργανισμός *R.toruloides* είναι ικανός να συσσωρεύει λιπίδια σε ποσοστό πάνω από 70% (w/w) επί της ξηράς ουσίας (Ratledge and Wynn, 2002; Li et al., 2007). Ο Soccol και η ερευνητική του ομάδα πρότειναν μια επιτυχημένη

πιλοτική διαδικασία για την παραγωγή βιοντήζελ από τα μικροβιακά λιπίδια της ζύμης *R.toruloides* (Soccol et al., 2016), ενώ τεχνοοικονομική μελέτη παραγωγής μικροβιακών λιπιδίων έλαβε χώρα από τους Koutinas et al., (2014) με βάση αποτελέσματα που προέκυψαν από ημι-συνεχή τροφοδοτούμενη καλλιέργεια του μ.ο *R.toruloides*.

Ορισμένες μελέτες υποστηρίζουν ότι η παραγωγή ενδοκυτταρικών λιπιδίων από τον ζυμομύκητα *R.toruloides* ίσως να συνδέεται με τον περιορισμό και άλλων θρεπτικών στοιχείων στο υπόστρωμα καλλιέργειας, εκτός του αζώτου. Πιο συγκεκριμένα, ο περιορισμός σε θείο και φώσφορο στο μέσο της καλλιέργειας έχει δείξει ότι επηρεάζει θετικά τη συσσώρευση λίπους στα κύτταρα της συγκεκριμένης ζύμης (Li et al., 2006; Wu et al., 2010; Wu et al., 2011).

Συνυπολογίζοντας όλα τα παραπάνω, είναι λογικό η παρούσα ελαιογόνος ζύμη να θεωρείται ένας μικροοργανισμός με υψηλές βιοτεχνολογικές δυνατότητες στον τομέα της αειφόρου ανάπτυξης.

1.2. ΞΥΛΟΖΗ

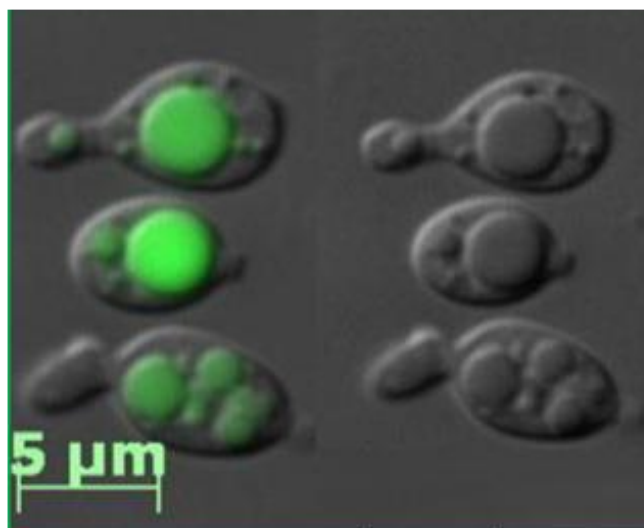
Η ξυλόζη είναι ένας μονοσακχαρίτης με μοριακό τύπο $C_5H_{10}O_5$, μία αλδοπεντόζη που αποτελείται από πέντε άτομα άνθρακα και μία λειτουργική ομάδα αλδεϋδης. Είναι ένα αναγωγικό σάκχαρο εξαιτίας της ελεύθερης αλδεϋδομάδας που διαθέτει. Η ξυλόζη απομονώθηκε από το ξύλο (από όπου προέκυψε και το όνομά της) αρχικά από τον Φιλανδό επιστήμονα Koch το 1881 και έγινε εμπορικά βιώσιμη με τιμή παρόμοια της σακχαρόζης το 1930 (Hudson and Cantor, 1950).

Παρόλο που η παραγωγή μικροβιακών λιπιδίων από ελαιογόνες ζύμες, που χρησιμοποιούν ως πηγή άνθρακα την γλυκόζη, έχει μελετηθεί ευρέως (Paranikolaou et al., 2011 ; Tanimura et al., 2014), λιγότερα είναι γνωστά για την παραγωγή λιπιδίων από ζύμες που χρησιμοποιούν την ξυλόζη ως πηγή άνθρακα. Αρκετοί ελαιογόνοι ζυμομύκητες, όπως ο *Rhodospiridium toruloides* (Zhao et al., 2012), και ο *Lipomyces starkeyi* (Gong et al., 2012) έχουν αναφερθεί ότι είναι σε θέση να χρησιμοποιούν την ξυλόζη ως πηγή άνθρακα.

Τα γονίδια που σχετίζονται με τον μεταβολισμό της ξυλόζης από την ζύμη *R.toruloides* , καθώς και αυτά που σχετίζονται με τη βιοσύνθεση λιπιδίων φαίνονται στην Εικόνα 1.2. Ο Wiebe και η ερευνητική του ομάδα (2012) έδειξε πειραματικά ότι υπήρξε μεγαλύτερη παραγωγή λίπους στην γλυκόζη απ' ό τι στην ξυλόζη.

μπορούν να συλλεχθούν πιο εύκολα λόγω του μεγάλου μεγέθους τους σε σχέση με τα κύτταρα των βακτηρίων (Santos and Reis, 2014; Shen et al., 2013).

Ο μ.ο *R.toruloides* είναι γνωστό ότι συσσωρεύει μεγάλες ποσότητες λιπιδίων (μέχρι και 65% επί της ξηρής βιομάζας του), με την μορφή τριγλυκεριδίων κάτω από περιοριστικές σε άζωτο συνθήκες. Τα τριγλυκερίδια από μικροοργανισμούς ή φυτά μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την παραγωγή 2^{ης} γενιάς βιοντήζελ. Η σύνθεση λιπαρών οξέων από την συγκεκριμένη ζύμη εξαρτάται από το στέλεχος, την αναλογία άνθρακα/αζώτου στο υπόστρωμα, τη σύσταση του μέσου ανάπτυξης και τις περιβαλλοντολογικές συνθήκες (Xu, and Liu, 2017). Τα κύρια λιπαρά οξέα του μ.ο *R.toruloides* είναι το παλμιτικό οξύ (C16:0), στεατικό οξύ (C18:0), ελαϊκό οξύ (^Δ9C18:1) και λινελαϊκό οξύ (^Δ9,12C18:2).



Εικόνα 1.3: Απεικόνιση του συσσωρευμένου λίπους στα κύτταρα της ζύμης *R.toruloides* (το οποίο με την βοήθεια της μικροσκοπίας φθορισμού χρωματίζεται με πράσινο χρώμα).

1.3.1 Βιοσυσσώρευση ενδοκυτταρικού λίπους

Οι ελαιογόνοι μικροοργανισμοί, όταν καλλιεργηθούν σε θρεπτικά μέσα στα οποία υπάρχει περίσσεια πηγή άνθρακα και περιοριστικές σε άζωτο συνθήκες, αρχικά εξαντλούν την πηγή αζώτου, ενώ συνεχίζουν να αφομοιώνουν την πηγή άνθρακα. Με την έλλειψη του αζώτου σταματά η κυτταρική αύξηση, καθώς αυτό είναι απαραίτητο για την παραγωγή πρωτεϊνών, που είναι ζωτικής σημασίας για την δημιουργία νέων κυττάρων. Η συνεχής κατανάλωση της πηγής άνθρακα έχει ως αποτέλεσμα την μετατροπή της σε ενδοκυτταρικό λίπος. Η συσσώρευση ενδοκυτταρικού λίπους συνεχίζεται μέχρι ενός ορίου, το οποίο είναι γενετικά προκαθορισμένο για κάθε μικροοργανισμό

(Ratledge and Wynn, 2006). Η φάση αυτή διαρκεί μέχρι την εξάντληση της πηγής άνθρακα ή κάποιου άλλου θρεπτικού συστατικού, που είναι απαραίτητο για τη διεργασία. Τέλος, ακολουθεί η φάση αποδόμησης λιπιδίων, κατά την οποία πολλοί ελαιογόνοι ετερότροφοι μικροοργανισμοί συνήθως αποδομούν και καταναλώνουν τα συσσωρευμένα λιπίδια (Holdsworth and Ratledge, 1988; Aggelis and Sourdis, 1997; Alvarez et al., 2000; Papanikolaou and Aggelis, 2003a, 2003b; Papanikolaou et al., 2004b; Papanikolaou and Aggelis, 2011).

Οι μη ελαιογόνοι μικροοργανισμοί δεν έχουν την ικανότητα να συσσωρεύουν λίπος σε ποσοστό πάνω από 10% επί της ξηρής βιομάζας τους. Επομένως, όταν καλλιεργηθούν σε θρεπτικό μέσο με περιοριστικές σε άζωτο συνθήκες, συνεχίζουν να καταναλώνουν την πηγή άνθρακα είτε για την ανάπτυξη των κυττάρων τους, είτε για την ενδοκυτταρική συσσώρευση οργανικών ενώσεων, όπως για παράδειγμα διαφόρων οργανικών οξέων.

Με την εξάντληση του αζώτου στο θρεπτικό μέσο από τον μικροοργανισμό ξεκινά μια σειρά αντιδράσεων, που οδηγούν στο σχηματισμό του ακετυλοσυνενζύμου Α (Acetyl-CoA ή ακέτυλο-CoA). Το ακέτυλο-CoA, το οποίο δημιουργείται μέσω της οξειδωτικής αποκαρβοξυλίωσης του πυροσταφυλικού οξέος, είτε θα αποτελέσει το υλικό εκκίνησης του κύκλου των τρικαρβοξυλικών οξέων (TCA), είτε το υλικό δόμησης των ενδοκυτταρικών λιπιδίων. Η σύνθεση των ενδοκυτταρικών λιπιδιακών δομών δεν πραγματοποιείται στο μιτοχόνδριο, αλλά στο κυτταρόπλασμα και ως εκ τούτου το ακέτυλο-CoA θα πρέπει εκ νέου να μεταφερθεί στο κυτταρόπλασμα. Η μεμβράνη των μιτοχονδρίων δεν είναι περατή από το ακέτυλο-CoA, το οποίο εξέρχεται από τα μιτοχόνδρια σε σχετικά μικρά ποσά υπό την μορφή της ακέτυλο-καρνιτίνης και μόνο για τους μη-ελαιογόνους μικροοργανισμούς (Ratledge και Gilbert, 1985; Davies και Holdsworth, 1992). Έτσι, κατά την κατανάλωση του αζώτου ενεργοποιείται το ένζυμο AMP απαμινάση, με αποτέλεσμα την πολύ γρήγορη πτώση της περιεκτικότητας της μονο-φωσφορικής αδενοσίνης (AMP) προκειμένου να παραχθεί άζωτο σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση:



Η πτώση της συγκέντρωσης της AMP οδηγεί στην παρεμπόδιση της δράσης του ενζύμου ισοκιτρική αφυδραγονάση (ICDH). Με αυτό τον τρόπο, το κιτρικό οξύ δεν μπορεί να μεταβολιστεί και συσσωρεύεται στο μιτοχόνδριο του μικροοργανισμού. Έπειτα, το κιτρικό οξύ εισέρχεται στο κυτταρόπλασμα και διασπάται από το ένζυμο ATP-κιτρική λυάση (ACL) σε ακετυλοσυνένζυμο Α και οξαλοξικό οξύ. Το ακετυλοσυνένζυμο Α χρησιμοποιείται ως προάγγελος για την βιοσύνθεση των λιπαρών οξέων, ενώ το οξαλοξικό οξύ μετατρέπεται σε μηλικό οξύ, το οποίο στη συνέχεια

χρησιμοποιείται στον κύκλο κιτρικού/μηλικού οξέος (Ratledge , 2002;2004). Πραγματοποιείται η παρακάτω αντίδραση:



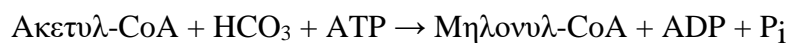
Για τη βιοσύνθεση των λιπαρών οξέων είναι απαραίτητη η παροχή επαρκούς ποσότητας NADPH. Το μηλικό ένζυμο λειτουργεί ως προμηθευτής NADPH σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση:



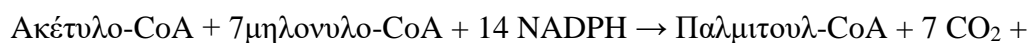
Τα λιπαρά οξέα, που βιοσυντίθενται, εστεροποιούνται με την γλυκερόλη σε τριγλυκερίδια και ενσωματώνονται μέσω του ενδοπλασματικού δικτύου σε σταγονίδια λιπαρών οξέων.

Συνοψίζοντας, τα δύο ένζυμα κλειδιά για την βιοσύνθεση ενδοκυτταρικού λίπους στους ελαιογόνους μικροοργανισμούς είναι η ATP-κιτρική λυάση (ACL) και το μηλικό ένζυμο. Ωστόσο, η παρουσία του ενζύμου ACL σε κάποιες ζύμες δεν οδήγησε στην παραγωγή μικροβιακού λίπους, γεγονός που δείχνει ότι απαιτείται και η δράση άλλων ενζύμων, για να οδηγηθεί ο μικροοργανισμός σε παραγωγή μικροβιακού λίπους (Ratledge and Wynn, 2002). Μελέτες έχουν δείξει ότι υπάρχουν ελαιογόνες ζύμες (*Lipomyces sp.* και *Candida sp.*), οι οποίες δύναται να βιοσυνθέσουν λίπος παρά το γεγονός ότι δεν διαθέτουν το μηλικό ένζυμο. Πιθανόν αυτές οι ζύμες να διαθέτουν κάποιο ένζυμο υπεύθυνο για την παραγωγή NADPH (Ratledge, 2004).

Η βιοσύνθεση των λιπαρών οξέων ξεκινά με την καρβοξυλίωση του ακετύλο-CoA προς μηλονυλο-CoA από την καρβοξυλάση του ακετύλο-CoA (Acetyl-CoA carboxylase-ACC). Η αντίδραση αυτή δεν είναι αντιστρεπτή και αποτελεί το καθοριστικό βήμα της βιοσυνθετικής οδού (Ratledge, 1994; Papanikolaou και Aggelis, 2011α):



Στη συνέχεια, οι ακυλο-μεταφοράσες μεταφέρουν ακετυλο-ομάδες (CH₃CO-) και μηλονυλο-ομάδες (HOOC-CH₂-CO-) σε μια ακυλο-φέρουσα πρωτεΐνη (Acyl carrier protein-ACP). Έπειτα, το ενζυμικό σύστημα της συνθετάσης των λιπαρών οξέων (Fatty acid synthetase-FAS) προσθέτει διαδοχικά δυο άτομα άνθρακα στη μηλονυλο-ACP, έως ότου το μήκος της αλυσίδας φτάσει τα 16 άτομα άνθρακα.. Η στοιχειομετρία της σύνθεσης των λιπαρών οξέων είναι η εξής (Papanikolaou και Aggelis, 2011α):



Λιπαρά οξέα, που περιέχουν παραπάνω από 16 άτομα άνθρακα, συντίθενται από το παλμιτικό οξύ (C16:0) με προσθήκη δύο ατόμων άνθρακα με την βοήθεια ειδικών ενζύμων, τα οποία βρίσκονται στην κυτταροπλασματική πλευρά του λείου ενδοπλασματικού δικτύου

1.4. ΕΝΔΟΠΟΛΥΣΑΚΧΑΡΙΤΕΣ

Οι ενδοπολυσακχαρίτες είναι πολυμερή, τα οποία αποτελούνται από μονοσακχαρίτες και έχουν γενικό χημικό τύπο $(C_6H_{10}O_5)_n$ με $n > 100$ τις περισσότερες φορές. Ο αριθμός των μονάδων μονοσακχαρίτη σε έναν πολυσακχαρίτη ονομάζεται βαθμός πολυμερισμού. Μόνο λίγοι πολυσακχαρίτες έχουν βαθμό πολυμερισμού μικρότερο από 100. Οι περισσότεροι έχουν μεταξύ 200-3000. Πολυμερή, που έχουν μικρό μοριακό βάρος και αποτελούνται από δύο έως εννιά μονοσακχαρίτες, ονομάζονται ολιγοσακχαρίτες. Οι πολυσακχαρίτες, των οποίων ο γενικός επιστημονικός όρος είναι γλυκάνες (Belitz et al., 2009), διακρίνονται σε διάφορες κατηγορίες ανάλογα με το είδος των σακχάρων από τα οποία αποτελούνται. Έτσι, πολυσακχαρίτες, όπως το άμυλο και η κυτταρίνη, καλούνται ομοπολυσακχαρίτες, ενώ οι πηκτίνες καλούνται ετεροπολυσακχαρίτες.

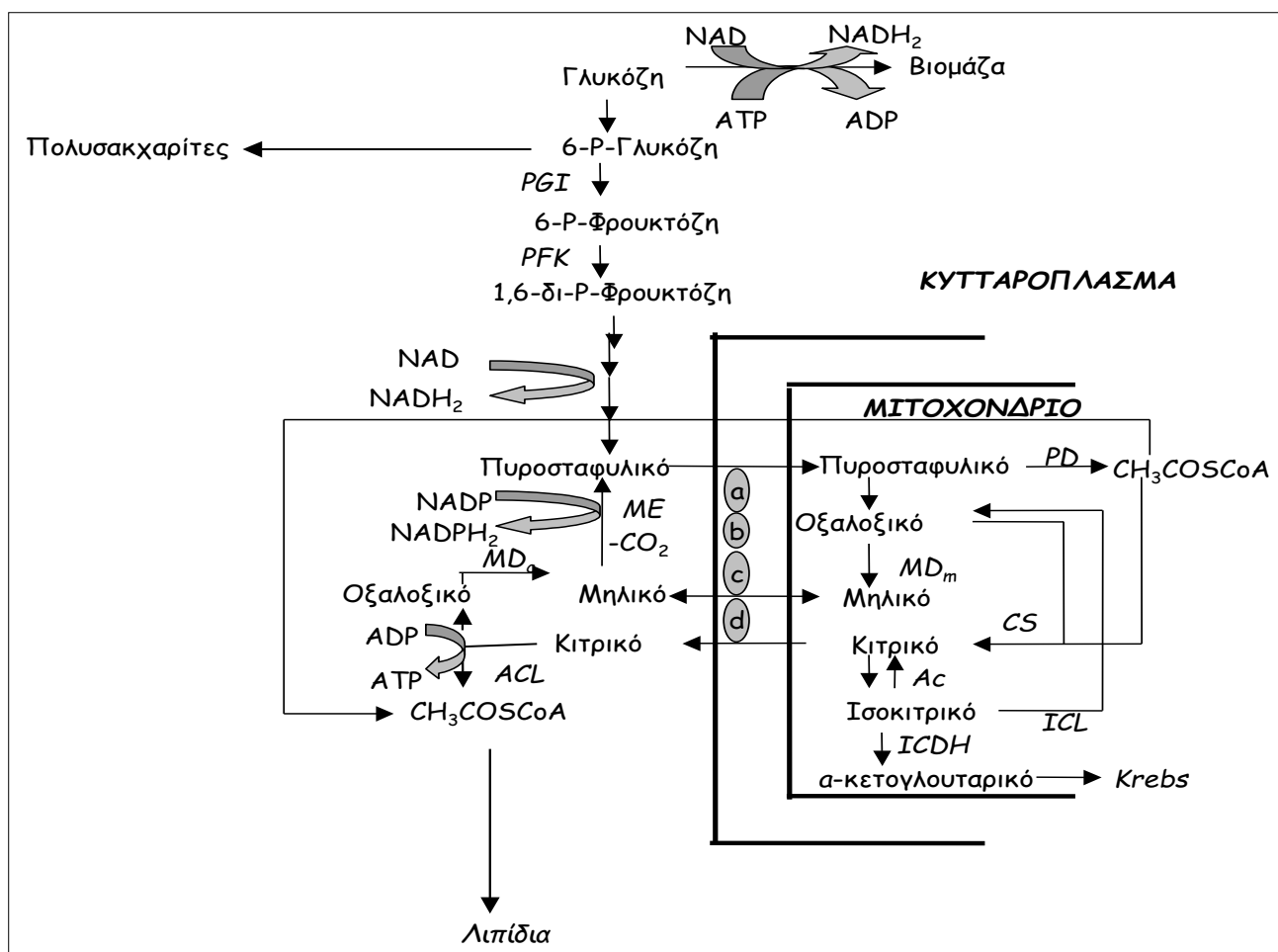
Επιπρόσθετα, οι ενδοπολυσακχαρίτες χρησιμεύουν ως αποταμιευτικές και δομικές ύλες σε ζώα και φυτά. Εκτιμάται ότι περίπου το 90% της μάζας υδατάνθρακα στη φύση είναι στη μορφή των πολυσακχαριτών.

Οι πολυσακχαρίτες, που παράγουν οι μύκητες, είναι γνωστό ότι προέρχονται από υγρές καλλιέργειες βυθού και καλλιέργειες στερεής κατάστασης. Η βίოსυνθεσή τους επηρεάζεται σημαντικά από τις συνθήκες στις οποίες πραγματοποιείται η ζύμωση και πιο ειδικά από την σύσταση του θρεπτικού μέσου (Wu et al., 2006). Η γνώση των παραπάνω είναι απαραίτητη, ώστε να οδηγηθεί ο μεταβολισμός των μυκήτων προς την παραγωγή των επιθυμητών μεταβολιτών. Έχει αναφερθεί ότι η βίοςύνθεση των πολυσακχαριτών ευνοείται από πηγές άνθρακα, όπως η γλυκόζη και από οργανικές πηγές αζώτου (πεπτόνη, yeast extract) (Gern et al., 2008 ; Fang and Zhong, 2002). Επίσης, παράγοντες, όπως η αρχική τιμή του pH, η θερμοκρασία της ζύμωσης και ο αερισμός, παίζουν σημαντικό ρόλο στην βίοςύνθεση των πολυσακχαριδίων. Ωστόσο, οι συνθήκες καλλιέργειας, που ευνοούν την παραγωγή βιομάζας, μπορεί να μην ευνοούν την συσσώρευση των πολυσακχαριτών (κυρίως των έξωπολυσακχαριτών) και αντιστρόφως (Tang and Zhong, 2002; Diamantopoulou et al., 2012a; 2012b; 2014).

Οι ενδοπολυσακχαρίτες παράγονται από ανώτερους μύκητες και αποτελούνται από απλά σάκχαρα (π.χ. η γλυκόζη), δισακχαρίτες και πολυόλες (π.χ. η μαννιτόλη). Κυρίως, όμως, αποτελούνται από πολυσακχαρίτες, όπως γλυκογόνο και β-γλυκάνες (Fang and Zhong, 2002; Tang and Zhong, 2002; Galiotou-Panayotou et al., 1998; Seviour et al., 1992). Οι πολυσακχαρίτες των μυκήτων μπορούν δυνητικά να εμφανίσουν αντικαρκινικές και ανοσολογικές ιδιότητες (Fazenda et al., 2008). Μερικοί από τους μύκητες, που είναι γνωστό πως παράγουν ενδοπολυσακχαρίτες, είναι οι *Agaricus bisporus*, *Pleurotus ostreatus*, *Ganoderma lucidum* και *Tuber sinense*.

1.4.1 Βιοσύνθεση ενδοπολυσακχαριτών (IPS)

Υπάρχουν πολλές βιβλιογραφικές αναφορές, που υποστηρίζουν πως η εξάντληση του αζώτου στο μέσο της καλλιέργειας, ευνοεί την βιοσυσσώρευση των συγκεκριμένων ενώσεων λόγω της υποχρεωτικής διάσπασης της AMP, ώστε να εξασφαλιστούν από τα κύτταρα οι απαιτήσεις τους σε άζωτο. Το ένζυμο 6-φωσφορο φρουκτοκινάση (6 PFK) ενεργοποιείται αλλοστερικά από το κυτταρικό AMP και έτσι η ελάττωση της συγκέντρωσης της AMP οδηγεί στην αναστολή της δράσης της 6 PFK (Galiotou-Panayotou et al., 1998; Ratledge and Wynn, 2002; Papanikolaou and Aggelis, 2011a). Η προαναφερθείσα κατάσταση μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα την συσσώρευση των ενδοπολυσακχαριτών. Το υποθετικό σενάριο της συσσώρευσης των ενδοκυτταρικών πολυσακχαριτών και λιπιδίων απεικονίζεται στην Εικόνα 1.4. Παρόλα αυτά έχει δειχθεί σε τελευταίες εργασίες ότι σύνθεση ενδοπολυσακχαριτών δύναται να πραγματοποιηθεί και κατά την ισόρροπη φάση αυξήσεως των ελαιογόνων ζυμών (Tchakouteu et al., 2014; Gardeli et al., 2017).



Εικόνα 1.4: Υποθετικό σενάριο διάμεσου μεταβολισμού στα μυκήλια. Η ροή άνθρακα με το ισομερές πάχος των βελών φαίνεται ισοσκελισμένη τόσο προς τα ενδοκυτταρικά λιπίδια, όσο και προς τα ενδοκυτταρικά πολυσακχαρίδια, όσο και προς τον κύκλο του Krebs. Ένζυμα: ACL: ATP-κιτρική λύση, PGI: Ισομεράση της φωσφορογλυκόζης, PFK: Φωσφοροφρουκτοκινάση, ICDH: Ισοκιτρική αφυδρογονάση, PD: Πυροσταφυλική αποκαρβοξυλάση, CS: Κιτρική συνθάση, ICL: Ισοκιτρική λύση (προσαρμογή σχημάτων από τους Zhong and Tang, 2004; Papanikolaou and Aggelis, 2011α)

1.5. ΒΙΟΝΤΗΖΕΛ- ΜΕΘΥΛΕΣΤΕΡΕΣ ΛΙΠΑΡΩΝ ΟΞΕΩΝ

Το βιοντήζελ από χημική άποψη αποτελείται από αλκυλεστέρες καρβοξυλικών οξέων με μακριά ανθρακική αλυσίδα, οι οποίοι παράγονται από την μετεστεροποίηση και /ή εστεροποίηση φυτικών ελαίων και ζωικών λιπών (Siteru et al., 2014a). Το βιοντήζελ έχει προσελκύσει αυξανόμενο ενδιαφέρον ως εναλλακτική πηγή ενέργειας έναντι των ορυκτών καυσίμων, καθώς είναι ανανεώσιμο και φιλικό προς το περιβάλλον (Leiva-Candia et al., 2014). Τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του είναι όμοια με εκείνα του πετρελαίου κίνησης. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε πετρελαιοκινητήρες, είτε σε μείγμα με το πετρέλαιο κίνησης σε διάφορα ποσοστά, είτε αυτούσιο. Για την χρήση αυτούσιου βιοντήζελ απαιτείται σε ορισμένους πετρελαιοκινητήρες, κυρίως κατασκευασμένους πριν το 1990, μικροαλλαγές, όπως αντικατάσταση ελαστομερών. (σωληνάκια κλπ).

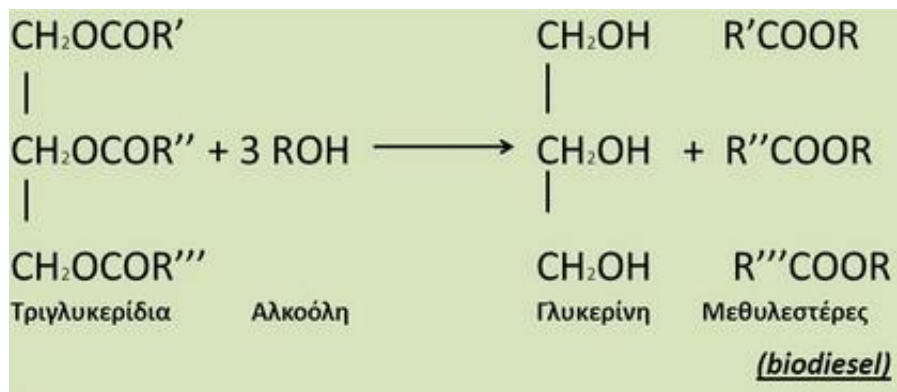
Η σχέση μεταξύ του φαινομένου του θερμοκηπίου, που οδηγεί στην υπερθέρμανση του πλανήτη και της καύσης ορυκτών καυσίμων, είναι πλέον αδιαμφισβήτητη. Όλα τα στοιχειωδώς σοβαρά προγνωστικά μοντέλα διαφέρουν μεταξύ τους μόνον ως προς την ταχύτητα εξέλιξης της κλιματικής αλλαγής και επιδείνωσης των κλιματικών συνθηκών. Η χρήση βιοντίζελ στους πετρελαιοκινητήρες έχει σημαντικά περιβαλλοντικά οφέλη, όπως ελάττωση των συνεπειών του φαινομένου του θερμοκηπίου και μείωση των εκπομπών καυσαερίων. Επίσης, συμβάλλει ουσιαστικά στην βελτίωση της ενεργειακής ανεξαρτησίας και την ανάπτυξη της γεωργίας. Διάφορα ερευνητικά προγράμματα της Ευρωπαϊκής Επιτροπής (E.E.), αλλά και έρευνες ανεξάρτητων ιδρυμάτων παγκοσμίως, έχουν καταδείξει ότι η κατανάλωση ενός kg βιοντίζελ σε αντικατάσταση συμβατικού πετρελαίου, έχει σαν συνέπεια την μείωση του διοξειδίου του άνθρακα, (CO₂), κατά τουλάχιστον 1 kg, ενώ στην περίπτωση εξελιγμένων βιοκαυσίμων, όπως το βιοντίζελ από απόβλητα, (τηγανέλαια, ζωικά λίπη), η μείωση ξεπερνάει τα 3 kg. Επιπλέον, το βιοντίζελ έχει σχεδόν μηδενική περιεκτικότητα σε θείο ενώ είναι ταχέως βιοαποικοδομήσιμο. Η εκτεταμένη χρήση βιοντίζελ στην E.E. αποτελεί ένα από τα βασικά μέσα για την επίτευξη των στόχων μείωσης των αερίων του θερμοκηπίου που έχουν συμφωνηθεί με την συνθήκη του Κιότο. Για τον λόγο αυτόν, η E.E. έχει ορίσει δεσμευτικά ποσοστά χρήσης βιοκαυσίμων στα καύσιμα κίνησης στα κράτη – μέλη.

Οι χώρες με την μεγαλύτερη παραγωγή βιοντίζελ είναι οι Η.Π.Α (60 δισεκατομυρια λίτρα), η Βραζιλία (29.9 δισεκατομυρια λίτρα), η Γερμανία (4.3 δισεκατομύρια λίτρα) και η Κίνα (3.9 δισεκατομύρια λίτρα) (Abomohra et al., 2016). Τα τελευταία χρόνια στην Ελλάδα, το βιοντίζελ είναι προαναμεμειγμένο σε ένα μικρό ποσοστό σε όλες ανεξαιρέτα τις ποσότητες του διατιθέμενου στη χώρα πετρελαίου κίνησης. Οι απαιτούμενες ετήσια ποσότητες προέρχονται κατά προτεραιότητα από ελληνικές ενεργειακές καλλιέργειες και πρώτες ύλες, οι οποίες απορροφούνται στο σύνολό τους και μετατρέπονται σε βιοντίζελ στις μεταποιητικές μονάδες που λειτουργούν στη χώρα. Οι επιπλέον αυτών ποσότητες παράγονται είτε από εισαγόμενες πρώτες ύλες σε εγχώριες μονάδες, είτε εισάγονται ως έτοιμο τελικό προϊόν από άλλα Κράτη Μέλη (www.ypeka.gr).

Μπορεί να παραχθεί από εδώδιμα φυτικά έλαια (συνήθως από ηλιέλαιο, σογιέλαιο, κραμβέλαιο, φοινικέλαιο), ζωικά λίπη, τηγανέλαια και μικροβιακά λίπη, τα οποία μοιάζουν με τα φυτικά έλαια (Pinzi et al., 2014). Το συνεχώς αυξανόμενο κόστος των εδωδιμων φυτικών ελαίων, καθώς και το παγκόσμιο δίλλημα “τρόφιμα εναντίον καυσίμων”, ενθάρρυνε την ανάπτυξη του βιοντίζελ “2^{ης} γενιάς” από μη εδώδιμα φυτικά έλαια: έλαιο τζοτζόμπα (jojoba oil) και έλαιο της γιατρόφας (jatropha oil), ζωικά λίπη και τηγανέλαια. Εναλλακτικές πηγές για την παραγωγή του βιοντίζελ “2^{ης} γενιάς” τελεί υπό έρευνα χρησιμοποιώντας μικροβιακά λιπίδια. Τα μικροβιακά λιπίδια εμφανίζουν πολλά πλεονεκτήματα, όπως το γεγονός ότι η περίοδος παραγωγής τους είναι σύντομη, δεν απαιτούν

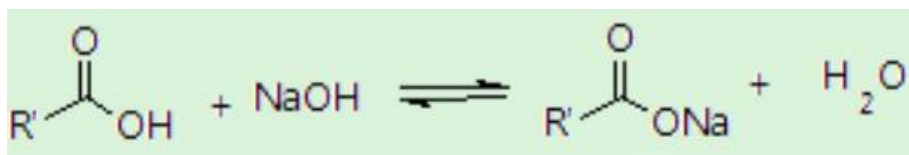
την δέσμευση γεωργικής έκτασης και δεν επηρεάζονται από τις κλιματικές συνθήκες (Fei et al., 2011). Βέβαια, το κόστος παραγωγής μικροβιακών λιπιδίων είναι υψηλότερο από εκείνο των φυτικών ελαίων (Koutinas et al., 2014), αλλά υπάρχουν πολλές μέθοδοι για να βελτιώσουν τα τεχνο-οικονομικά ζητήματα της παραγωγής των μικροβιακών λιπιδίων. Αρκετές ελαιογόνες ζύμες (*Cryptococcus curvatus*, *Lipomyces starkeyi*, *Yarrowia lipolytica* και *Rhodospiridium toruloides*) χρησιμοποιούν γλυκόζη, ολιγοσακχαρίτες (Gong et al., 2014) και γλυκερόλη (Thiru et al., 2011) ως πηγή άνθρακα για την παραγωγή μικροβιακών λιπιδίων. Μεταξύ των παραπάνω, η γλυκόζη μπορεί να χρησιμοποιηθεί ευκολότερα, επειδή όμως είναι ακριβή, θεωρείται σκόπιμο να διερευνηθεί η χρήση πιο φθηνών πηγών άνθρακα. Πρόσφατες μελέτες έχουν επικεντρωθεί στην αναζήτηση φθηνότερων θρεπτικών μέσων, όπως γεωργικά απόβλητα (Ma et al., 2014; Yu et al., 2011), βιομηχανικά απόβλητα (Thiru et al., 2011) και αστικά στερεά απόβλητα (Seo et al., 2013). Όπως προαναφέρθηκε, ο Soccol και η ερευνητική του ομάδα, πρότειναν μια επιτυχημένη πιλοτική διαδικασία για την παραγωγή βιοντήζελ από τα μικροβιακά λιπίδια της ζύμης *R.toruloides*, χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα ζαχαροκάλαμο (Soccol et al., 2015).

Το βιοντήζελ παράγεται με την μέθοδο της μετεστεροποίησης των τριγλυκεριδίων (TAGs), τα οποία αποτελούν το κύριο συστατικό σε ποσοστό έως 98% κ.β. των φυτικών ελαίων και ζωικών λιπών, με αλκοόλες μικρού μοριακού βάρους. Συνήθως χρησιμοποιείται η μεθανόλη λόγω του χαμηλού κόστους και των φυσικών και χημικών πλεονεκτημάτων που διαθέτει. Στην όλη διεργασία απαραίτητη είναι η χρήση καταλύτη που θα ξεκινήσει την αντίδραση μεταξύ των TAGs και της αλκοόλης. Οι δυο κυριότεροι καταλύτες, που χρησιμοποιούνται, είναι το υδροξείδιο του νατρίου (NaOH) και το υδροξείδιο του καλίου (KOH). Συνήθως, επιλέγεται το υδροξείδιο του καλίου γιατί διαλύεται στη μεθανόλη πολύ καλύτερα από το υδροξείδιο του νατρίου. Χρησιμοποιείται κυρίως η βασικά καταλυόμενη μετεστεροποίηση, αφού είναι έως και 400 φορές γρηγορότερη από την όξινα καταλυόμενη μετεστεροποίηση (χρήση π. θειικού οξέος H_2SO_4) και οι βασικοί καταλύτες είναι λιγότερο διαβρωτικοί από τους όξινους (www.agroenergy.gr).

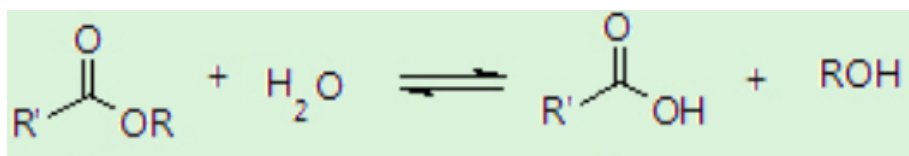


Εικόνα 1.5: Αντίδραση μετεστεροποίησης τριγλυκεριδίου.

Ένα πρόβλημα, που προκύπτει από την χρήση των καταλυτών στην διεργασία, είναι η αντίδραση αυτών με τα ελεύθερα λιπαρά οξέα (FFAs), τα οποία περιέχονται κυρίως σε έλαια χαμηλής ποιότητας (όπως είναι τα απόβλητα έλαια βιομηχανιών ραφινάρισματος λαδιών και τα τηγανέλαια) ή δημιουργούνται από την υδρόλυση των τριγλυκεριδίων λόγω του νερού που περιέχεται στα έλαια αυτά με αποτέλεσμα να δημιουργούνται σάπωνες (Εικόνα 1.6). Η παραγωγή σαπώνων προκαλεί το σχηματισμό τζελ, αύξηση του ιξώδους του προϊόντος και σημαντική αύξηση του κόστους διαχωρισμού και καθαρισμού. Η περιεχόμενη υγρασία στα έλαια και τα λίπη, καθώς και εκείνη που παράγεται κατά τη σαπωνοποίηση, υδρολύει τους παραγόμενους εστέρες προς σχηματισμό ελεύθερων λιπαρών οξέων (Εικόνα 1.7) (www.agroenergy.gr).



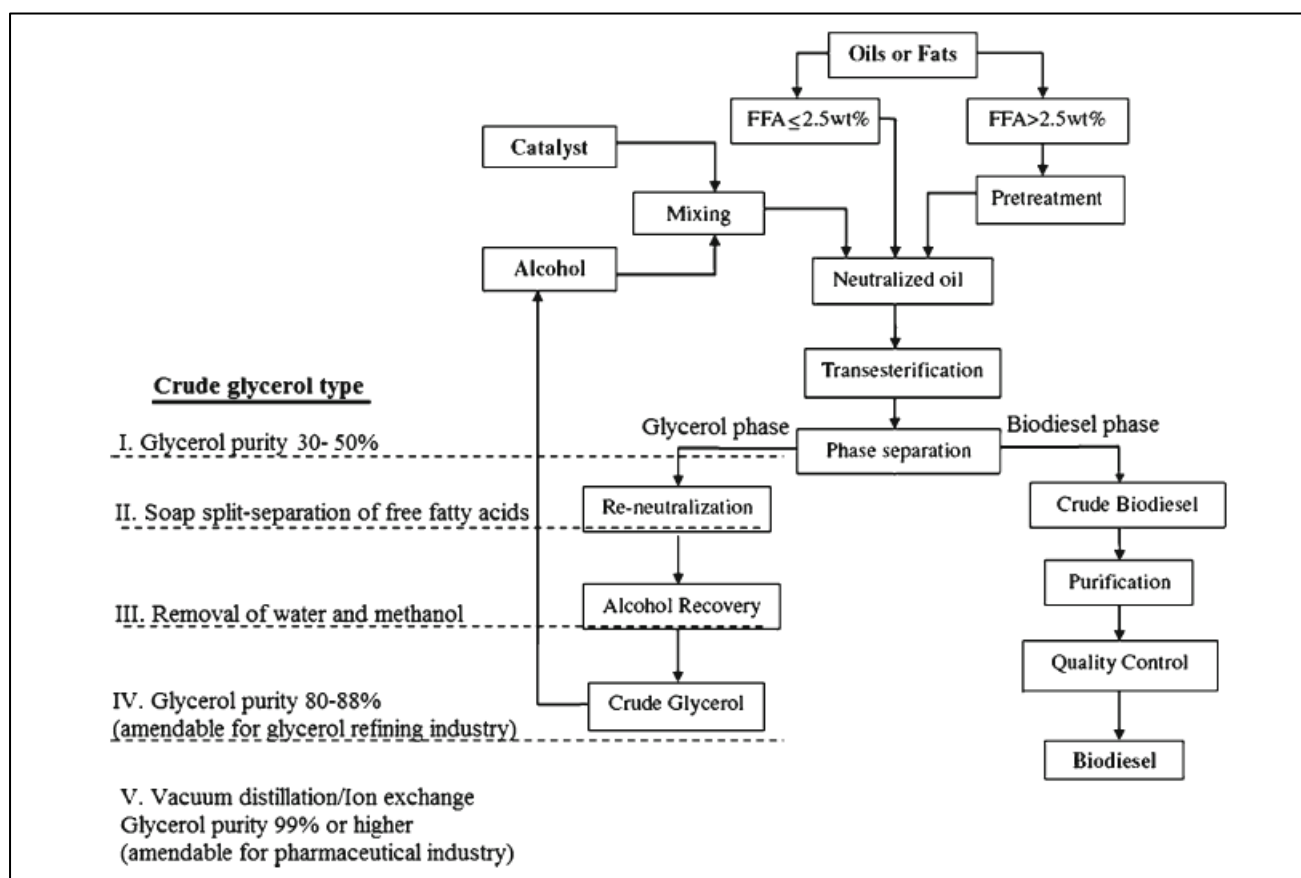
Εικόνα 1.6: Σαπωνοποίηση των ελεύθερων λιπαρών οξέων με NaOH.



Εικόνα 1.7: Υδρόλυση εστέρων σε ελεύθερα λιπαρά οξέα.

Έτσι απαιτείται εξευγενισμός των ελαιούχων αυτών υλών, με σκοπό την απομάκρυνση της περιεχόμενης υγρασίας και την απομάκρυνση ή την όξινη εστεροποίηση των FFAs, πριν οδηγηθούν

στην βασική μέθοδο παραγωγής βιοντήζελ. Στο τέλος της διεργασίας, το παραγόμενο βιοντήζελ υπόκειται σε καθαρισμό ώστε να απομακρυνθούν ίχνη αλκοόλης, καταλύτη και γλυκερίνης.



Εικόνα 1.8: Διεργασία παραγωγής βιοντήζελ (προσαρμογή σχημάτων από τους Leung et al., 2010; Xatzifragkou and Papanikolaou, 2012).

1.6. SPENT SULFITE LIQUOR (SSL)

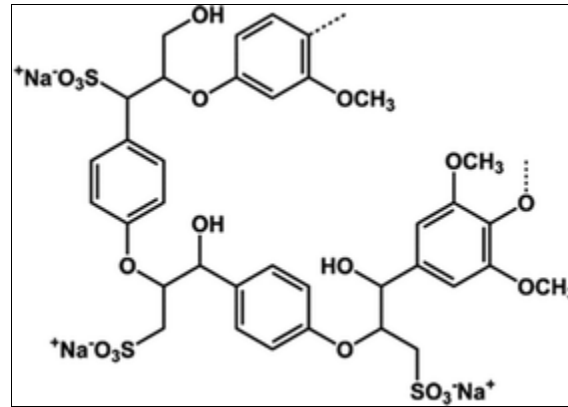
Το “spent sulfite liquor” αποτελεί το ρεύμα παραπροϊόντων, που παράγεται κατά την διάρκεια της διαδικασίας πολτοποίησης ξύλων με άλατα θειώδους οξέος, στην βιομηχανία χαρτοπολτού και χαρτιού. Το SSL είναι πλούσιο σε C5 σάκχαρα (ξυλόζη, αραβινόζη) και C6 σάκχαρα (γλυκόζη, μανόζη, γαλακτόζη), λιγνοσουλφονικά (LS), περιέχει φαινολικά και μικρές συγκεντρώσεις οξικού οξέος. Κατά τη θειώδη πολτοποίηση, η παραγωγή πολτού κυτταρίνης επιτυγχάνεται σε υψηλές θερμοκρασίες (135°C-145°C), χρησιμοποιώντας υδατικά διαλύματα διοξειδίου του θείου και θειωδών αλάτων. Τα κατιόντα των αλάτων μπορεί να είναι νάτριο, ασβέστιο, κάλιο, μαγνήσιο και αμμώνιο (Marques et al., 2009). Η λιγνίνη με την παραπάνω διαδικασία απομακρύνεται με την μορφή λιγνοσουλφονικών αλάτων (LS). Η ημικυτταρίνη επίσης υδρολύεται με αποτέλεσμα να προκύπτουν μονομερή C5 και C6 σάκχαρα, με κυρίαρχο μονομερές την ξυλόζη. Ο πολτός

κυτταρίνης, που παράγεται με όξινη θειώδη πολτοποίηση, αποτελεί το 6 % της συνολικής παραγωγής χαρτοπολτού, αφού η θειική πολτοποίηση (Kraft) αποτελεί την πιο διαδεδομένη μέθοδο παραγωγής χαρτοπολτού (Pereira et al., 2013).

Ο παραγόμενος χαρτοπολτός πλένεται και στη συνέχεια επεξεργάζεται περαιτέρω για να ληφθεί το τελικό προϊόν (χαρτί υψηλής ποιότητας). Το νερό από το στάδιο πλύσης μαζί με τα υπόλοιπα υπολείμματα της διαδικασίας (λιγνοσουλφονικά, σάκχαρα) ονομάζεται “thin SSL” και υποβάλλεται σε πολλαπλές εξατμίσεις, προκειμένου να μειωθεί ο όγκος του. Οι περισσότερες βιομηχανίες χάρτου καίνε το SSL, προκειμένου να παραχθεί η ενέργεια που απαιτείται για την λειτουργία του εργοστασίου, καθώς επίσης και να ανακτηθεί ένα ποσοστό των χημικών, που χρησιμοποιήθηκαν κατά την πολτοποίηση του ξύλου. Κάποιες βιομηχανίες παραγωγής χάρτου διαχωρίζουν και ανακτούν τα λιγνοσουλφονικά άλατα, καθώς έχουν εμπορική αξία (Varanasi et al., 2013). Είναι γνωστό ότι το SSL αποτελεί σημαντικό ρεύμα βιομηχανικών παραπροϊόντων, καθώς η ετήσια παραγωγή του υπερβαίνει τους ενενήντα δις τόνους (Lowford, 1993).

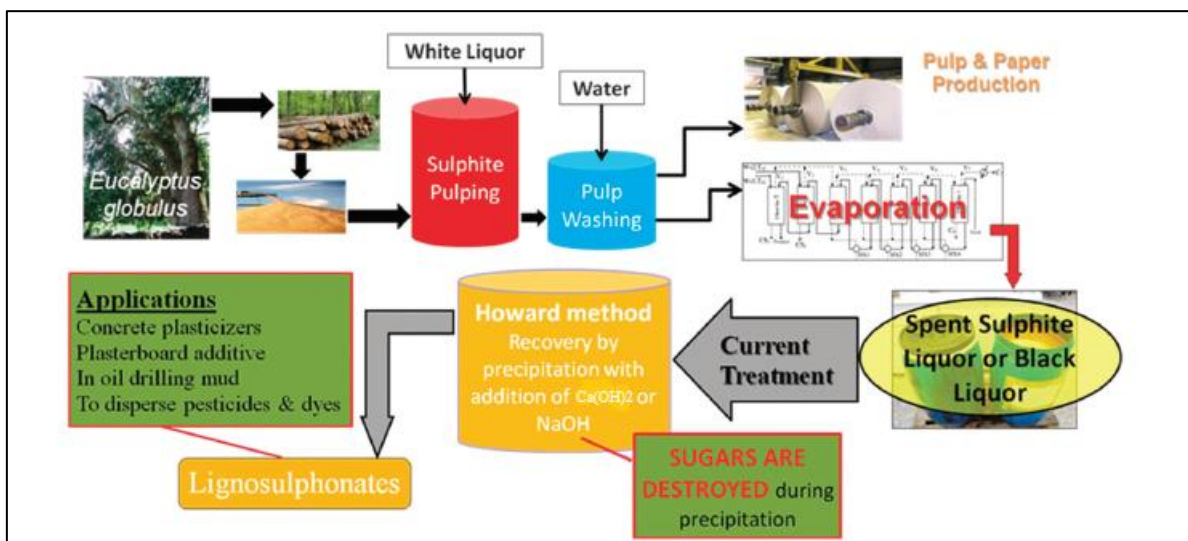
1.7. ΛΙΓΝΟΣΟΥΛΦΟΝΙΚΑ ΑΛΑΤΑ (LS)

Τα λιγνοσουλφονικά άλατα είναι φυσικά ανιοντικά πολυμερή, τα οποία σχηματίζονται κατά την μετατροπή του ξύλου σε χαρτοπολτό (Fišerová et al., 2013; Feria et al., 2013), με ετήσια παραγωγή περίπου 1,8 εκατομμύρια τόνους. Κατά την θειώδη πολτοποίηση πραγματοποιείται σουλφόνωση της λιγνίνης. Έτσι, η λιγνίνη καθίσταται υδατοδιαλυτή και απομακρύνεται από τις ίνες της κυτταρίνης. Οι ιδιότητές τους οφείλονται στις υδρόφιλες ομάδες που περιέχουν (σουλφονικές ομάδες), καθώς και τις υδρόφοβες περιοχές, που αποτελούνται από τους αρωματικούς δακτυλίους και τις αλειφατικές αλυσίδες (Chakrabarty et al., 2009; Doherty et al., 2011).



Εικόνα 1.9: Χημική δομή λιγνοσουλφονικού νατρίου.

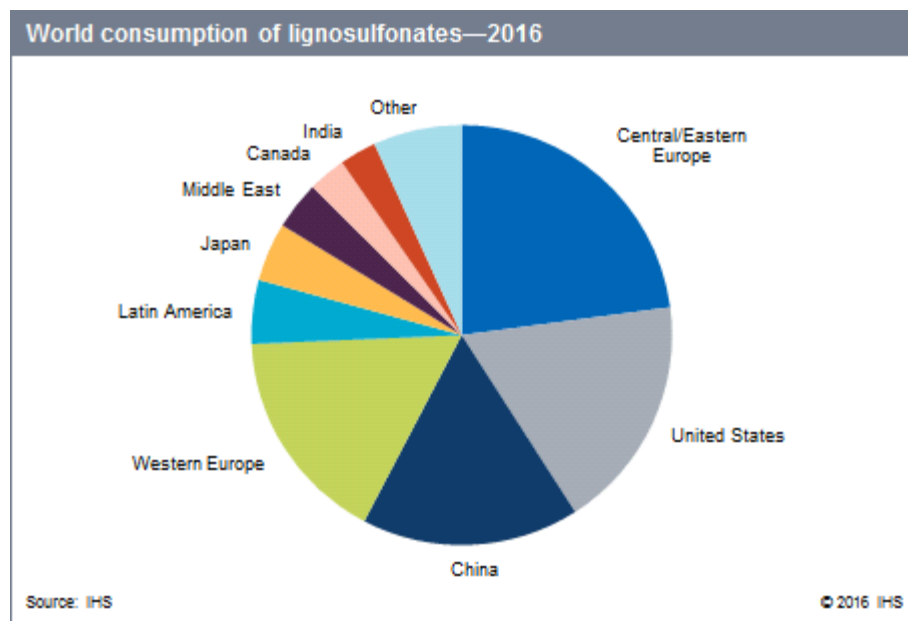
Το LS ανακτάται μετά την συμπύκνωση του SSL. Η διαδικασία που χρησιμοποιείται κυρίως από τις βιομηχανίες ονομάζεται διαδικασία Howard, κατά την οποία το LS μπορεί να ανακτηθεί με απόδοση 90-95%, μέσω καθίζησης με υδροξείδιο του νατρίου ή ασβεστίου. Συγχρόνως καταστρέφονται τα σάκχαρα που υπάρχουν στο υγρό παραπροϊόν λόγω της αποικοδόμησης της ημικυτταρίνης, εξυπηρετώντας την αποφυγή μόλυνσης του τελικού προϊόντος. Τέλος, τα λιγνοσουλφονικά άλατα είναι διαθέσιμα στο εμπόριο σε διάφορες μορφές, όπως λιγνοσουλφονικό νάτριο, λιγνοσουλφονικό ασβέστιο και μαγνήσιο, ανάλογα με την βάση που χρησιμοποιήθηκε (Santos et al., 2011).



Εικόνα 1.10: Διεργασία παραγωγής χαρτιού και χαρτοπολτού (Koutinas et al., 2014).

Το χαμηλό κόστος, η φιλική προς το περιβάλλον φύση τους και η θερμική τους αντοχή τα έχουν κάνει ιδιαίτερα δημοφιλή σε πολλές βιομηχανικές εφαρμογές. Τα λιγνοσουλφονικά άλατα χρησιμοποιούνται κυρίως από τις τσιμεντοβιομηχανίες. Η χρήση τους στις τσιμεντοβιομηχανίες έχει μειωθεί στην δυτική Ευρώπη, στις Η.Π.Α και στην Ιαπωνία ως αποτέλεσμα ανταγωνισμού από

προϊόντα με καλύτερες προδιαγραφές. Μια ακόμη σημαντική εφαρμογή τους είναι στην λάσπη γεώτρησης πετρελαίου, αλλά και σε βαφές και φυτοφάρμακα. Η πιο σημαντική χημική ουσία, που προέρχεται από την οξειδωση και υδρόλυση των λιγνοσουλφονικών αλάτων, είναι η βανιλίνη, η οποία χρησιμοποιείται ως αρωματική ουσία στα τρόφιμα και τα καλλυντικά (Bjørsvik and Liquori, 2002). Μακροπρόθεσμα, η βιομηχανία ελπίζει ότι η ζήτηση λιγνοσουλφονικών αλάτων θα αυξηθεί λόγω του “πράσινου” χαρακτήρα τους, αφού προέρχονται από ανανεώσιμες πρώτες ύλες. Η παγκόσμια αγορά λιγνοσουλφονικών ενώσεων προβλέπεται να αναπτυχθεί αργά, με μέσο ετήσιο ρυθμό περίπου 1%.



Εικόνα 1.11: Παγκόσμια κατανάλωση λιγνοσουλφονικών αλάτων για το 2016.

1.8. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΛΙΓΝΟΣΟΥΛΦΟΝΙΚΟΥ ΝΑΤΡΙΟΥ (SL) ΣΤΗΝ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΤΟΥ μ.ο *R.toruloides*

Σύμφωνα με μελέτη των Xu et al., (2015) το SL (sodium lignosulphonate) είχε θετική επίδραση στην καλλιέργεια του μ.ο *R.toruloides*, αυξάνοντας την παραγωγή της βιομάζας. Μελετήθηκε ο πιθανός μηχανισμός του λιγνοσουλφονικού νατρίου στην παραγωγή λιπιδίων στον μ.ο *R.toruloides*, θεωρώντας την πιθανότητα το λιγνοσουλφονικό νάτριο να χρησιμοποιείται από την ζύμη ως πηγή άνθρακα, την επίδραση του στην μορφολογία της κυτταρικής μεμβράνης των κυττάρων και την επιρροή του LS στην μεταφορά οξυγόνου κατά την παραγωγή λιπιδίων (Xu et al., 2015).

Προσθήκη 1-6 g/L SL οδήγησε σε αύξηση της βιομάζας και της παραγωγής λίπους. Η πιο σημαντική βελτίωση παρατηρήθηκε με την προσθήκη 2-4 g/L SL. Είναι πιθανόν το SL, σαν άλας

που είναι, να μεταβάλλει την ιοντική ισχύ του υγρού ζύμωσης, επηρεάζοντας έτσι την παραγωγή λιπιδίων. Σε παλιότερα πειράματα των Xu et al., μελετήθηκε η επίδραση του χλωριούχου νατρίου (NaCl) στην ανάπτυξη και την παραγωγή λιπιδίων από την ζύμη *R.toruloides*. Καμία σημαντική επίδραση δεν παρατηρήθηκε με την προσθήκη NaCl σε συγκεντρώσεις μικρότερες των 4 g/L. Έτσι, η προσθήκη SL 2-4 g/L οδηγεί σε συγκέντρωση νατρίου πολύ μικρότερη των 4 g/L. Επομένως, η θετική επίδραση του SL δεν οφείλεται στο νάτριο.

Βρέθηκε ότι η συγκέντρωση του SL δεν μεταβλήθηκε καθόλου κατά την διάρκεια της ζύμωσης, συμπεραίνοντας ότι το λιγνοσουλφονικό νάτριο δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί από την ζύμη. Σύμφωνα με αυτό το αποτέλεσμα, ο Xu et al., (2015) υπόδειξαν και άλλες πιθανές επιδράσεις του SL πάνω στην συγκεκριμένη ζύμη. Για παράδειγμα, το SL μπορεί να παρεμβαίνει στην κυτταρική μεμβράνη, ενισχύοντας την πρόσληψη ορισμένων βασικών θρεπτικών συστατικών.

Κάποιοι ερευνητές επισήμαναν ότι οι επιφανειοδραστικές ουσίες θα μπορούσαν να επηρεάσουν την διαπερατότητα της κυτταρικής μεμβράνης κάνοντας ευκολότερη την πρόσληψη ορισμένων συστατικών ή την αποβολή κάποιων ενδοκυτταρικών ουσιών από το εσωτερικό του κυττάρου. Με αυτό τον τρόπο, η παραγωγή κυττάρων ζύμης μπορεί να προωθηθεί με αυξημένη πρόσληψη θρεπτικών συστατικών (Clements et al., 2007; Wu et al., 2009). Ωστόσο, η προσθήκη λιγνοσουλφονικών αλάτων πρέπει να είναι ελεγχόμενη, γιατί διαφορετικά μπορεί να διαλύσουν την κυτταρική μεμβράνη των κυττάρων και να οδηγήσουν σε απώλεια της αναπαραγωγικής τους ικανότητας (Riemersma, 1966; Wei et al., 2003). Πειράματα που διεξάχθηκαν από τον Galabova et al., (1996) έδειξαν ότι με προσθήκη του Triton X-100, μιας άλλης επιφανειοδραστικής ουσίας, παρατηρήθηκε αλλαγή στην μορφολογία της κυτταρικής μεμβράνης του μικροοργανισμού *Yarrowia lipolytica*. Με προσθήκη του Triton X-100 σε συγκέντρωση έως 0,1% (w/v) παρατηρήθηκε μεταβολή του σχήματος των κυττάρων. Πιο συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε διάτρηση του κυτταρικού τοιχώματος σε ορισμένες ζώνες, και εξαιτίας αυτού μέρη του κυτταρικού τοιχώματος αναδιπλώθηκαν, ενώ οι κυτταρικές μεμβράνες λέπτυναν σε σχέση με τα κύτταρα στα οποία δεν είχε προστεθεί η παραπάνω ουσία (Galabova et al., 1996). Κάτι αντίστοιχο δεν παρατηρήθηκε από τον Xu et al., (2015) όπου με την προσθήκη διαφορετικών συγκεντρώσεων λιγνοσουλφονικού νατρίου που κυμαίνονταν από 1-6 g/L, δεν παρατηρήθηκε κάποια σημαντική αλλαγή στην μορφολογία του μ.ο *Rhodospiridium toruloides*.

Περαιτέρω ανάλυση στα λιπαρά οξέα πραγματοποιήθηκε από τους Xu et al., (2015) για να ερευνηθεί αν το λιγνοσουλφονικό νάτριο επηρεάζει το προφίλ των λιπαρών οξέων. Η σύνθεση των λιπαρών οξέων διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στα βιοφυσικά χαρακτηριστικά των κυτταρικών μεμβρανών.

Η εξάρτηση της ρευστότητας της κυτταρικής μεμβράνης από τον βαθμό ακορεστότητας των λιπαρών οξέων είναι ένα φαινόμενο, που έχει παρατηρηθεί σε ζώα, μύκητες, ζύμες, βακτήρια και φυτά (Los et al., 2013; Rodriguez-Vargas et al., 2007). Ο μ.ο *Rhodosporidium toruloides* βρέθηκε ότι έχει την ικανότητα να μεταβάλλει τον βαθμό ακορεστότητας στη βιοσύνθεση των λιπιδίων του, γεγονός που βοηθά τα κύτταρα να εγκλιματίζονται στις διάφορες περιβαλλοντικές συνθήκες. Εάν υπάρχει σημαντική αλλαγή στην ρευστότητα της κυτταρικής μεμβράνης, η σύνθεση των λιπαρών οξέων θα παρουσιάσει μία διαφορά. Στην παρούσα μελέτη των Xu et al., (2015) τα κυρίαρχα λιπαρά οξέα του μ.ο *Rhodosporidium toruloides* είναι το παλμιτικό οξύ, το στεατικό, ελαϊκό και το λινολενικό οξύ, με το παλμιτικό και το ελαϊκό οξύ να αντιπροσωπεύουν το 70% της συνολικής σύνθεσης λιπαρών οξέων. Δεν παρουσιάστηκε, όμως, κάποια σημαντική μεταβολή στην σύνθεση των λιπαρών οξέων με την προσθήκη λιγνοσουλφονικού νατρίου, γεγονός που υποδηλώνει ότι το SL δεν επηρέασε το προφίλ των λιπαρών οξέων.

Η κυτταρική καλλιέργεια είναι ένα τυπικό πολυφασικό σύστημα που περιλαμβάνει την αέρια φάση (οξυγόνο και διοξείδιο του άνθρακα), τη στερεή φάση (κύτταρα) και την υγρή φάση (υγρό ζύμωσης), όπου η διαδικασία μεταφοράς μάζας μεταξύ των διαφορετικών φάσεων μπορεί να είναι ένας περιοριστικός παράγοντας για την μικροβιακή αντίδραση. Η μεταφορά οξυγόνου είναι μία από τις σημαντικότερες διεργασίες μεταφοράς μάζας στις ζυμώσεις. Έχει διαπιστωθεί ότι η παροχή οξυγόνου στο υγρό ζύμωσης συσχετίζεται με την κυτταρική ανάπτυξη. Η βελτιστοποίηση της παροχής οξυγόνου στο μέσο καλλιέργειας θα μπορούσε να ενισχύσει την κυτταρική ανάπτυξη και την βιοσυσσώρευση λιπιδίων από την ζύμη *R.toruloides*. Διαφορετικά, τόσο η κυτταρική ανάπτυξη όσο και η συσσώρευση λιπιδίων θα αναστέλλονταν. Η σημασία του αερισμού έχει αναφερθεί σε πολλές βιβλιογραφίες. Ο Yen et al., (2011) ανέφεραν την ανασταλμένη κυτταρική ανάπτυξη του *R. glutinis* υπό συνθήκες κακής οξυγόνωσης. Ως αερόβια ελαιογόνα ζύμη, ο *R.toruloides* χρησιμοποιεί το οξυγόνο τόσο για την κυτταρική ανάπτυξη όσο και για την παραγωγή λιπιδίων. Έχει αναφερθεί ότι μερικές επιφανειοδραστικές ουσίες θα μπορούσαν να μειώσουν την διάμετρο των φυσαλίδων του αέρα, αυξάνοντας την περιοχή της διεπιφάνειας αερίου-υγρού και ενισχύοντας την μεταφορά οξυγόνου μεταξύ αέρας και υγρής φάσης (Lin et al., 2005). Για να συζητηθεί ο τρόπος με τον οποίο το λιγνοσουλφονικό νάτριο επηρεάζει την κυτταρική ανάπτυξη και την συσσώρευση λιπιδίων του μ.ο *R.toruloides*, ο Xu et al., (2015) ερεύνησαν την επίδραση του λιγνοσουλφονικού νατρίου στη μεταφορά οξυγόνου στο σύστημα παραγωγής λιπιδίων. Από τα πειράματα φάνηκε ότι με την προσθήκη λιγνοσουλφονικού νατρίου αυξήθηκε η συνολική κατανάλωση οξυγόνου σε σχέση με τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν χωρίς την προσθήκη του λιγνοσουλφονικού άλατος. Όμως, η κατανάλωση οξυγόνου ανά γραμμάριο βιομάζας ήταν περίπου ίδια και για τα δύο πειράματα.

Επιπλέον, αποδείχθηκε ότι το άλας είχε θετική επίδραση στον συντελεστή μεταφοράς οξυγόνου (K_{La}) και στον ρυθμό μεταφοράς οξυγόνου (OTR). Η τιμή του K_{La} αυξήθηκε κατά περίπου 15%.

Το παραπάνω αποτέλεσμα υποδεικνύει ότι το λιγνοσουλφονικό νάτριο θα μπορούσε πράγματι να ενισχύσει την κυτταρική ανάπτυξη και την συσσώρευση λιπιδίων του μ.ο *R.toruloides* προάγοντας την διαδικασία της μεταφοράς οξυγόνου. Αυτό μπορεί να σχετίζεται με τις φυσικοχημικές ιδιότητες του άλατος και την συμπεριφορά του στο μέσο ζύμωσης. Το λιγνοσουλφονικό νάτριο έχει κάποια ειδικά χαρακτηριστικά, όπως η υδροφιλικότητα και η λιποφιλικότητα (Qiu et al., 2010; Rana et al., 2002; Xiang et al., 2010). Πιθανόν, η διάμετρος της φυσαλίδας του αέρα μικραίνει λόγω του SL, αυξάνοντας έτσι την διεπιφάνεια μεταξύ της αέριας και της υγρής φάσης.

Ωστόσο, σε μια ζύμωση το μέσο αυτής περιέχει διαφορετικά στοιχεία, συμπεριλαμβανομένων των ανόργανων ενώσεων, των οργανικών και των κυττάρων του μικροοργανισμού, τα οποία ανταλλάσσουν συνεχώς ουσίες με το μέσο της ζύμωσης. Σε ένα τόσο πολύπλοκο σύστημα, η συμπεριφορά των λιγνοσουλφονικών αλάτων αξίζει περεταίρω έρευνα.

Βέβαια, έχει δειχθεί ότι τα λιγνοσουλφονικά άλατα έδρασαν παρεμποδιστικά στην κυτταρική ανάπτυξη των βακτηρίων *Actinobacillus succinogenes* και *Basfia succiniciproducens* για την παραγωγή ηλεκτρικού οξέος (Alexandri et al., 2016).

Στα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν σε αυτή την ερευνητική μελέτη χρησιμοποιήθηκε λιγνοσουλφονικό νάτριο, το οποίο προμηθευτήκαμε από την ισπανική εταιρεία LignoTech Iberica. Πρόκειται για μία καφετί σκόνη (Εικόνα 1.10) διαλυτή στο νερό.



Εικόνα 1.12: Λιγνοσουλφονικό νάτριο.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. ΒΙΟΛΟΓΙΚΟ ΥΛΙΚΟ

Στη παρούσα ερευνητική μελέτη χρησιμοποιήθηκαν δύο στελέχη της ζύμης *Rhodosporidium toruloides*. Το στέλεχος *Rhodosporidium toruloides* DSM 4444, το οποίο ανήκει στην συλλογή DSMZ (Leibniz, Germany) και το στέλεχος *Rhodosporidium toruloides* NRRL Y-27012 της συλλογής NRRL (Peoria, USA).

Η διατήρηση των στελεχών γινόταν σε κεκλιμένους σωλήνες πληρωμένους με θρεπτικό μέσο YPDA (Yeast Peptone Dextrose Agar) στους 4°C. Το θρεπτικό υλικό περιείχε 10 g/L γλυκόζη, 10 g/L yeast extract, 10 g/L πεπτόνη και 20 g/L άγαρ. Προκειμένου να διατηρηθεί η ζωτικότητα τους πραγματοποιούνταν ανανεώσεις σε τακτά χρονικά διαστήματα, ενώ πριν από κάθε εμβολιασμό του θρεπτικού μέσου τα στελέχη ανανεώνονταν προκειμένου να είναι ηλικίας περίπου 3 ημερών.

2.2. ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ

2.2.1 Παρασκευή προκαλλιέργειας

Πριν την έναρξη κάθε πειράματος, παρασκευαζόταν υγρή προκαλλιέργεια. Αυτή αποτελείται από υγρό θρεπτικό υπόστρωμα YPD, το οποίο προστίθεται σε κωνικές φιάλες των 250ml πληρωμένες κατά το 1/5 του όγκου τους (50 ± 1 ml), με ογκομετρικό κύλινδρο. Αφού τοποθετηθεί βαμβάκι και αλουμινόχαρτο στο στόμιο της κωνικής, ακολουθεί αποστείρωση σε θερμοκρασία 121°C για 20 λεπτά. Οι κωνικές αφήνονται να κρυώσουν και εμβολιάζονται υπό ασηπτικές συνθήκες με τα κύτταρα της ζύμης, προερχόμενα από καλλιέργεια ηλικίας 3 ημερών. Τέλος, η προκαλλιέργεια τοποθετείται σε ανακινούμενο επωαστικό θάλαμο για επώαση σε σταθερές συνθήκες ανάδευσης 180 ± 5 rpm και θερμοκρασία στους 28 ± 1 °C. Μετά από 48 ώρες χρησιμοποιείται κάποια ποσότητα της προκαλλιέργειας, η οποία αποτελεί το εμβόλιο της ζύμης για τον εμβολιασμό της κύριας καλλιέργειας.

2.2.2 Παρασκευή κυρίως καλλιέργειας

Το θρεπτικό μέσο της κυρίως καλλιέργειας περιείχε ως μοναδική πηγή άνθρακα ξυλόζη (Sigma-Aldrich, 99%) σε συγκέντρωση 50 g/L. Όλες οι ζυμώσεις πραγματοποιήθηκαν υπό περιοριστικές σε άζωτο συνθήκες (Papanikolaou et al., 2001). Ως πηγές αζώτου χρησιμοποιήθηκαν πεπτόνη 1 g/L και yeast extract σε συγκέντρωση 2 g/L. Τέλος, προστέθηκαν τα παρακάτω άλατα:

Πίνακας 2.1: Σύσταση μεταλλικών αλάτων (Papanikolaou et al., 2001).

ΕΝΩΣΗ	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ (g/L)
MnSO ₄ *H ₂ O	0,06
MgSO ₄ *7H ₂ O	1,5
ZnSO ₄ *7H ₂ O	0,02
CaCl ₂ *2H ₂ O	0,15
FeCl ₃ *6H ₂ O	0,15
KH ₂ PO ₄	7
Na ₂ HPO ₄	2,5

Στο πείραμα αναφοράς (blanc) δεν προστέθηκε ποσότητα λιγνосуλφονικού νατρίου. Στα επόμενα πειράματα προστέθηκε SL σε συγκεντρώσεις 10 g/L, 20 g/L και 40 g/L αντίστοιχα. Στο πείραμα με τον βιοαντιδραστήρα προστέθηκε λιγνосуλφονικό νάτριο σε συγκέντρωση 10 g/L.

Αφού παρασκευάστηκε η κυρίως καλλιέργεια προσθέτοντας όλα τα συστατικά και το απιονισμένο νερό, μοιράστηκε σε κωνικές φιάλες των 250 ml, ακολούθησε αποστείρωση και στη συνέχεια οι κωνικές ενοφθαλμίζονταν με 1 ml εμβολίου υπό ασηπτικές συνθήκες. Τέλος, οι κωνικές τοποθετούνται σε ανακινούμενο επωαστικό θάλαμο, για επώαση σε σταθερές συνθήκες ανάδευσης 180±5 rpm και θερμοκρασία στους 28±1 °C.

Εκτός από τις ζυμώσεις βυθού σε κωνικές φιάλες, πραγματοποιήθηκε μία ζύμωση (fed-batch) σε βιοαντιδραστήρα (New Brunswick Scientific, USA) όγκου 3L και ενεργού όγκου 1,5 L. Το θρεπτικό υπόστρωμα, που παρασκευάστηκε προστέθηκε στο βιοαντιδραστήρα, ο οποίος τοποθετήθηκε στο αυτόκαυστο για αποστείρωση. Το εμβόλιο προστέθηκε στο αποστειρωμένο πλέον υγρό θρεπτικό μέσο ασηπτικά μέσω αντλίας. Η ποσότητα του εμβολίου ήταν 150 ml (10% v/v). Έπειτα, ο βιοαντιδραστήρας τέθηκε σε λειτουργία με ταχύτητα ανάδευσης 300 rpm και αερισμό 1,5 vvm. Η θερμοκρασία, στην οποία τελέστηκε η ζύμωση, ήταν 28±1 °C.

Για την ημισυνεχή τροφοδοτούμενη ζύμωση (fed-batch), επιλέχθηκε να χρησιμοποιηθεί το στέλεχος NRRL Y-27012, γιατί συγκριτικά με το στέλεχος DSM 4444 παρήγαγε περισσότερο λίπος σε όλα τα πειράματα που προηγήθηκαν και για όλες τις συγκεντρώσεις LS (10 g/L, 20 g/L, 40 g/L). Η αρχική συγκέντρωση της ξυλόζης ήταν 41,7 g/L και, μόλις έφθασε περίπου τα 5 g/L, ξεκίνησε η εξωτερική τροφοδοσία ξυλόζης, η οποία έγινε με πυκνό διάλυμα ξυλόζης 350 g/L. Η συγκέντρωση της ξυλόζης βρέθηκε να είναι 58 g/L μετά την τροφοδοσία. Η συγκέντρωση των λιγνοσουλφονικών αλάτων για το συγκεκριμένο πείραμα, όπως προαναφέρθηκε, ήταν 10 g/L.

Το pH κατά την διάρκεια των ζυμώσεων παρέμενε σταθερό και είχε τιμή γύρω στο $6\pm 0,2$.

2.3. ΑΝΑΛΥΣΕΙΣ

2.3.1 Προσδιορισμός βιομάζας

Έπειτα από παραλαβή του υγρού ζύμωσης σε falcon tube φυγοκεντρείται σε τύπου Universal 320R Hettich Zentrifugen για 10 λεπτά, στις 9000 στροφές και στους 4°C, προκειμένου να διαχωριστεί η βιομάζα από το υπερκείμενο υγρό. Μετά από έκπλυση με απιονισμένο νερό, ακολούθησε δεύτερη φυγοκέντρωση στις ίδιες συνθήκες. Στη συνέχεια, η νωπή βιομάζα μεταφέρεται σε προζυγισμένα φιαλίδια McCartney, τα οποία τοποθετούνται σε φούρνο τύπου Gallenkamp oven BS OV-160 προς ξήρανση στους 70°C για 72 ώρες. Τέλος, μετά την ξήρανση, το φιαλίδιο ζυγίζεται σε αναλυτικό ζυγό τύπου KERN EW 420-3NM και από την διαφορά του βάρους υπολογιζόταν η παραγόμενη βιομάζα εκφραζόμενη σε g/L.

2.3.2 Προσδιορισμός ενδοπολυσακχαριτών (IPS)

Σε όλες τις ζυμώσεις που πραγματοποιήθηκαν, μετρήθηκαν ποσοτικά οι παραγόμενοι ενδοπολυσακχαρίτες, με μία διαδικασία βασισμένη σε ένα τροποποιημένο πρωτόκολλο μεθόδου, το οποίο προτάθηκε από τους Liang et al κατά το 2009.

Αρχικά, παραλαμβάνονται 0.05 g ξηρής βιομάζας, τα οποία τοποθετούνται σε δοκιμαστικό σωλήνα. Γίνεται προσθήκη 10 ml υδροχλωρικού οξέος συγκέντρωσης (HCl, 2M) και ακολουθεί υδρόλυση του διαλύματος στους 100°C για 30 λεπτά. Στη συνέχεια, προστίθενται 10 ml υδροξειδίου του νατρίου (NaOH 2M), προκειμένου να γίνει εξουδετέρωση και ακολουθεί διήθηση με διπλό διηθητικό χαρτί με στόχο να απομακρυνθεί η βιομάζα και το διήθημα να καταστεί διαυγές.

Τέλος, για τον ποσοτικό προσδιορισμό των ενδοπολυσακχαριτών εφαρμόστηκε η μέθοδος για τον προσδιορισμό των αναγόντων σακχάρων με χρήση του 3,5-δινιτροσαλικυλικού οξέος (DNS) (Miller, 1959).

2.3.3 Ποσοτικός προσδιορισμός ενδοπολυσακχαριτών και ξυλόζης

Ο ποσοτικός προσδιορισμός τόσο των ενδοπολυσακχαριτών όσο και της ξυλόζης έγινε με την φασματοφωτομετρική μέθοδο του 3,5-δινιτροσαλικυλικού οξέος (DNS) (Miller, 1959). Σε δοκιμαστικούς σωλήνες προστίθεται 0,5 ml αντιδραστήριου DNS και 0,5 ml δείγματος, ακολουθεί ανάδευση του διαλύματος σε κυκλοαναμικτήρα (vortex) και τοποθετείται σε υδατόλουτρο στους 100°C για 5 λεπτά ακριβώς. Έπειτα, οι δοκιμαστικοί σωλήνες αφήνονται να κρυσώσουν και προστίθενται 5 ml απιονισμένου νερού και μετά από ανάδευση του διαλύματος ακολουθεί μέτρηση της απορρόφησης στα 540 nm με την βοήθεια φασματοφωτόμετρου τύπου Hitachi U-2000 Spectrophotometer.

Για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης των αναγόντων σακχάρων (γλυκόζης και ξυλόζης) στα δείγματα χρησιμοποιήθηκαν πρότυπες καμπύλες αναφοράς και τα αποτελέσματα εκφράστηκαν σε ισοδύναμα γλυκόζης (g/L) για τους ενδοπολυσακχαρίτες.

2.3.4 Ποσοτικός προσδιορισμός ενδοκυτταρικού λίπους

Για την εκχύλιση και τον ποσοτικό προσδιορισμό του ενδοκυτταρικού λίπους ακολουθήθηκαν τα παρακάτω πειραματικά βήματα:

1. Το φιαλίδιο McCartney μέσα στο οποίο βρίσκεται η ξηρή βιομάζα συμπληρώνεται μέχρι επάνω με μίγμα διαλυτών χλωροφορμίου/μεθανόλης σε αναλογία $\text{CHCl}_3 / \text{CH}_3\text{OH}$ 2:1. (Folch et al., 1957; Papanikolaou et al., 2001). Το φιαλίδιο McCartney φυλάσσεται κλεισμένο αεροστεγώς στο σκοτάδι, προκειμένου να αποφευχθεί η οξείδωση των λιπαρών οξέων του λίπους για 72 ώρες με στόχο την εκχύλιση του λίπους.
2. Διήθηση του περιεχόμενου του φιαλιδίου σε προζυγισμένη σφαιρική φιάλη για απομάκρυνση της βιομάζας.
3. Εξάτμιση υπό κενό του διηθήματος στους 40°C με την βοήθεια περιστροφικού εξατμιστήρα τύπου Flash Evaporator- Rotavapor R -114, έτσι ώστε να απομακρυνθούν οι διαλύτες και να παραμείνει στην σφαιρική φιάλη μόνο το μικροβιακό λίπος.

4. Τέλος, η σφαιρική φιάλη ζυγίζεται με την βοήθεια ζυγού ακριβείας και από την διαφορά μάζας υπολογίζεται το παραγόμενο ενδοκυτταρικό λίπος σε g/L.

2.3.5 Μεθυλεστεροποίηση

Λόγω του ότι τα λιπαρά οξέα δεν είναι ιδιαίτερα πτητικά, είναι απαραίτητη η μετατροπή τους στους αντίστοιχους πτητικούς μεθυλικούς εστέρες (FAMES), προκειμένου να αναλυθούν μέσω αέριας χρωματογραφίας (GC), ώστε να γίνει ο προσδιορισμός της σύστασης των λιπαρών οξέων με τη μέθοδο AFNOR (AFNOR, 1984). Η εστεροποίηση, σε πρώτο στάδιο, τελείται σε αλκαλικό περιβάλλον και σε δεύτερο στάδιο, σε όξινο. Κατά το πρώτο στάδιο, τελείται η πυρηνόφιλη υποκατάσταση στο μόριο των τριγλυκεριδίων με τελικό προϊόν τους αντίστοιχους μεθυλεστέρες των λιπαρών οξέων. Ταυτόχρονα, τα ήδη υπάρχοντα ελεύθερα λιπαρά οξέα αντιδρούν με το διάλυμα μεθοξειδίου του νατρίου και προκύπτουν οι αντίστοιχοι σάπωνες. Στο δεύτερο στάδιο, πραγματοποιείται η μετατροπή των σαπώνων των λιπαρών οξέων προς τους αντίστοιχους μεθυλεστέρες.

Στις σφαιρικές φιάλες που έχουν παραληφθεί από την ανάλυση του ποσοτικού προσδιορισμού του ενδοκυτταρικού λίπους, προστίθενται 1-2 πέτρες βρασμού και 10 ml μεθοξειδίου του νατρίου. Το δείγμα φέρεται σε βρασμό για 20 λεπτά, ενώ έχει τοποθετηθεί κάθετος ψυκτήρας. Μετά το πέρας των 20 λεπτών προστίθεται υδροχλωρική μεθανόλη μέχρι να αποχρωματιστεί το δείγμα και ακολουθεί βρασμός για 20 λεπτά. Έπειτα, προστίθεται νερό για να τερματιστεί η αντίδραση και το δείγμα μεταφέρεται σε διαχωριστική χοάνη. Προστίθενται 6 ml εξανίου και, αφού το δείγμα αναδευτεί έντονα, αφήνεται σε ηρεμία προκειμένου να επιτευχθεί διαχωρισμός των δύο φάσεων. Η κάτω φάση, που είναι η υδατική, πετάγεται και συλλέγεται η πάνω φάση, η οποία περιλαμβάνει τους μεθυλεστέρες σε φιαλίδιο, στο οποίο προστίθεται άνυδρο θειικό νάτριο (Na_2SO_4) για απορρόφηση της υγρασίας. Τέλος, το δείγμα οδηγείται στον αέριο χρωματογράφο για ανάλυση.

2.3.6 Ανάλυση στον αέριο χρωματογράφο (GC)

Για τον ποιοτικό προσδιορισμό της σύστασης του μικροβιακού λίπους στα επιμέρους λιπαρά οξέα χρησιμοποιήθηκε αέριο χρωματογράφος Fisons GC8000 εξοπλισμένο με τριχοειδή στήλη CPWAX 52 CB μήκους 30 m και με ανιχνευτή FID (Flame Ionization Detector). Το φέρον αέριο ήταν το He, του οποίου η ροή ήταν 2 ml/min (25°C). Στον εισαγωγέα του αέριου χρωματογράφου με την βοήθεια σύριγγας εγχύεται 1 μL δείγματος.

Η ταυτοποίηση των λιπαρών οξέων έγινε την βοήθεια πρότυπων μεθυλεστέρων των βασικότερων λιπαρών οξέων αντιστοιχίζοντας τους χρόνους κατακράτησης τους (t_R). Το % ποσοστό κάθε λιπαρού οξέος υπολογίστηκε με βάση το εμβαδό της κάθε κορυφής στα χρωματογραφήματα με την βοήθεια του τύπου:

$$\% \Lambda. O = \left(\frac{\text{Εμβαδό } \Lambda. O}{\text{Συνολικό εμβαδό}} \right) \times 100$$

2.4. ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Η μείωση των αποθεμάτων πετρελαίου, καθώς και οι περιβαλλοντολογικές ανησυχίες σχετικά με την χρήση αυτού, οδήγησαν στο αυξανόμενο ενδιαφέρον για εναλλακτικά καύσιμα, όπως το βιοντήζελ. Αυτό το βιοκαύσιμο, όπως έχει αναφερθεί, μπορεί να παραχθεί από φυτικά έλαια εδώδιμων φυτών, γεγονός που έχει σαν συνέπεια την αύξηση της τιμής αυτών των ελαίων με την αυξανόμενη παγκόσμια παραγωγή βιοντήζελ. Αντίθετα, ανανεώσιμες πρώτες ύλες, όπως η κυτταρίνη και η ημικυτταρίνη καθώς και τα περιεχόμενα σάκχαρα τους γλυκόζη και ξυλόζη, αποτελούν υποσχόμενες πρώτες ύλες για την παραγωγή υγρών καυσίμων λόγω της αφθονίας τους και του χαμηλού τους κόστους. Τα μικροβιακά λιπίδια έχουν λάβει μεγάλη προσοχή ως πιθανές εναλλακτικές πηγές για παραγωγή βιοντήζελ, ειδικότερα τα λιπίδια που παράγονται από ελαιογόνους ζύμες.

Στην παρούσα ερευνητική εργασία μελετήθηκε η επίδραση του λιγνοσουλφονικού νατρίου, το οποίο ανήκει στο ρεύμα αποβλήτων της βιομηχανίας χάρτου, στην φυσιολογική και κινητική συμπεριφορά στελεχών της ζύμης *R.toruloides* (μικροβιακή ανάπτυξη, παραγωγή λιπιδίων, σύσταση λιπιδίων και παραγωγή ενδοπολυσακχαριτών). Δεδομένου ότι τα λιγνοσουλφονικά άλατα είναι χαμηλού κόστους, ανανεώσιμα και άμεσα διαθέσιμα, η αξιοποίησή τους μπορεί να είναι επωφελής όχι μόνο σε ένα βιοδιωληστήριο, αλλά και στην βιομηχανία χάρτου. Σκοπός της παρούσας ερευνητικής εργασίας είναι να μελετηθεί το ενδεχόμενο η προσθήκη λιγνοσουλφονικού νατρίου στην καλλιέργεια της ελαιογόνου ζύμης *R.toruloides*, με πηγή άνθρακα την ξυλόζη να οδηγεί σε αύξηση της μικροβιακής παραγωγής λιπιδίων.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Σε αυτή την ενότητα παρατίθενται όλα τα πειραματικά αποτελέσματα, τα οποία συλλέχθηκαν από την μελέτη της κινητικής όλων των ζυμώσεων, καθώς και τα πειραματικά αποτελέσματα από τις διάφορες αναλύσεις που πραγματοποιήθηκαν.

Πιο συγκεκριμένα, από καθεμία ζύμωση και για κάθε στέλεχος μετρήθηκαν τα εξής δεδομένα: παραγωγή βιομάζας, παραγωγή ενδοπολυσακχαριτών, καταναλωθείσα ξυλόζη και παραγωγή μικροβιακού λίπους. Τα δεδομένα αυτά χρησιμοποιήθηκαν για τον υπολογισμό των παρακάτω παραμέτρων της μικροβιακής ανάπτυξης :

1. Συντελεστής απόδοσης του παραγόμενου λίπους ($Y_{L/x}$) ως προς την παραχθείσα βιομάζα (g/g).
2. Συντελεστής απόδοσης βιομάζας ($Y_{X/s}$) ως προς το καταναλωθέν υπόστρωμα (g/g).
3. Οι παραγόμενοι ενδοπολυσακχαρίτες ($Y_{IPS/x}$) ως προς την παραχθείσα βιομάζα (g/g).

Αρχικά πραγματοποιήθηκαν δύο ζυμώσεις, μία για το κάθε στέλεχος, χωρίς την προσθήκη SL, οι οποίες αποτέλεσαν τις ζυμώσεις αναφοράς για τις επόμενες ζυμώσεις. Στη συνέχεια, ακολούθησαν ζυμώσεις και για τα δύο στελέχη, όπου επικράτησαν οι ίδιες συνθήκες ζύμωσης με τη μόνη διαφορά ότι προστέθηκαν 10 g/L, 20 g/L και 40g/L λιγνοσουλφονικού νατρίου αντίστοιχα, με σκοπό να μελετηθεί η επίδραση της συγκέντρωσης του στην συμπεριφορά των στελεχών. Η αρχική συγκέντρωση της ξυλόζης ήταν 50 g/L.

Τέλος, πραγματοποιήθηκε ποιοτικός προσδιορισμός των λιπαρών οξέων του παραγόμενου λίπους με την βοήθεια της αέριας χρωματογραφίας, καθώς και υπολογισμός του ποσοστού τους.

Πίνακας 3.1: Κινητικά δεδομένα από τις ζυμώσεις βυθού του στελέχους DSM 4444 σε ξυλόζη αρχικής συγκέντρωσης 50 g/L , για διαφορετικές συγκεντρώσεις λιγνοσουλφονικού νατρίου.

SL(g/L)		T(h)	X(g/L)	Xylcons (g/L)	L (g/L)	Y _{X/S} (g/g)	Y _{L/X} (g/g)	Y _{IPS/X} (g/g)
0	β	68	1,9	4,0	1,46	0,48	0,76	0,24
	γ	140	7,8	22,8	1,80	0,34	0,23	0,31
	α, δ	288	11,6	43,1	2,66	0,27	0,23	0,20
10	β	72	5,7	12,0	2,19	0,47	0,39	0,16
	γ	96	8,2	16,4	2,82	0,50	0,34	0,19
	δ	216	11,2	41,5	4,13	0,27	0,37	0,10
	α	288	12,3	46,9	3,02	0,26	0,25	0,09
20	γ	72	6,9	9,0	2,56	0,77	0,37	0,15
	β, δ	168	12,6	35,6	4,77	0,36	0,38	0,07
	α	192	14,0	40,9	4,35	0,34	0,31	0,08
40	γ	72	7,8	10,0	1,02	0,78	0,13	0,10
	β	144	11,8	28,7	2,32	0,41	0,20	0,07
	δ	216	14,7	40,7	2,40	0,36	0,16	0,06
	α	240	18,6	43,3	2,36	0,43	0,13	0,05

Συνθήκες καλλιέργειας: Ασυνεχής ζύμωση σε ανακινούμενες κωνικές φιάλες (180±5 rpm), T=28±1 °C , αρχική συγκέντρωση ξυλόζης S_{0xyi}=50 g/L, pH=6,0±0,2 υπό αερόβιες και περιοριστικές σε άζωτο συνθήκες.

SL(g/L): λιγνοσουλφονικό νάτριο.

T(h): χρόνος ζύμωσης.

X (g/L): βιομάζα.

Xylcons (g/L): καταναλωθέν υπόστρωμα.

L (g/L): ενδοκυτταρικό λίπος,

Y_{X/S} (g/g) :συντελεστής απόδοσης βιομάζας ως προς το καταναλωθέν υπόστρωμα.

Y_{L/X} (g/g): συντελεστής απόδοσης του παραγόμενου λίπους ως προς την παραχθείσα βιομάζα.

Y_{IPS/X} (g/g): οι παραγόμενοι ενδοπολυσακχαρίτες ως προς την παραχθείσα βιομάζα.

α=Το σημείο με την μέγιστη παραγωγή βιομάζας (g/L).

β=Το σημείο με το μέγιστο ποσοστό λίπους επί ξηρής βιομάζας (g/g).

γ= Το σημείο με το μέγιστο ποσοστό ενδοπολυσακχαριτών επί ξηράς ουσίας (g/g).

δ= Το σημείο με την μέγιστη παραγωγή λίπους (g/L).

Από τον παραπάνω Πίνακα 3.1 προκύπτουν τα εξής συμπεράσματα:

- Η μεγαλύτερη παραγωγή λίπους για το DSM 4444 παρατηρήθηκε στη ζύμωση με την προσθήκη 20 g/L SL, η οποία έφθασε τα 4,77 g/L.
- Η μέγιστη τιμή βιομάζας παρατηρήθηκε στη ζύμωση με την προσθήκη 40 g/L SL, η οποία έφθασε τα 18,6 g/L.
- Το μέγιστο ποσοστό ενδοπολυσακχαριτών επί ξηράς ουσίας παρατηρήθηκε στη ζύμωση, στην οποία δεν υπήρξε προσθήκη SL και είχε τιμή 0,31 g/g.

Ο Πίνακας 3.2 απεικονίζει τα πειραματικά αποτελέσματα των ζυμώσεων βυθού του στελέχους NRRL Y-27012.

Πίνακας 3.2: Κινητικά δεδομένα από τις ζυμώσεις βυθού του στελέχους NRRL Y-27012 σε ξυλόζη αρχικής συγκέντρωσης 50 g/L, για διαφορετικές συγκεντρώσεις λιγνοσουλφονικού νατρίου.

SL(g/L)		T(h)	X (g/L)	Xylcons(g/L)	L(g/L)	Y _{X/S} (g/g)	Y _{L/X} (g/g)	Y _{IPS/X} (g/g)
0	β	68	4,0	13,6	0,98	0,29	0,25	0,25
	γ	140	8,4	28,3	1,75	0,30	0,21	0,30
	α, δ	288	11,4	43,4	2,21	0,26	0,19	0,19
10	γ	96	7,3	16,5	2,95	0,44	0,41	0,14
	β, δ	120	9,1	18,7	5,30	0,49	0,58	0,11
	α	288	12,6	46,9	3,22	0,31	0,26	0,09
20	γ	72	7,1	9,2	1,53	0,77	0,22	0,14
	β	144	11,6	32,8	4,69	0,35	0,41	0,07
	δ	192	13,4	41,7	4,98	0,32	0,37	0,08
	α	312	13,6	45,7	3,57	0,30	0,26	0,11
40	γ	72	8,1	10,5	1,50	0,78	0,18	0,11
	β	144	11,8	32,4	2,49	0,36	0,21	0,05
	δ	216	14,6	40,7	2,69	0,36	0,18	0,05
	α	264	15,2	44,0	2,32	0,35	0,15	0,03

Συνθήκες καλλιέργειας: Ασυνεχής ζύμωση σε ανακινούμενες κωνικές φιάλες (180±5 rpm), T=28±1 °C, αρχική συγκέντρωση ξυλόζης S_{0Xyl}=50 g/L, pH=6,0±0,2 υπό αερόβιες και περιοριστικές σε άζωτο συνθήκες.

SL(g/L): λιγνοσουλφονικό νάτριο.

T(h): χρόνος ζύμωσης.

X (g/L): βιομάζα.

Xylcons (g/L): καταναλωθέν υπόστρωμα.

L (g/L): ενδοκυτταρικό λίπος,

Y_{X/S} (g/g) : συντελεστής απόδοσης βιομάζας ως προς το καταναλωθέν υπόστρωμα.

Y_{L/X} (g/g): συντελεστής απόδοσης του παραγόμενου λίπους ως προς την παραχθείσα βιομάζα.

Y_{IPS/X} (g/g): οι παραγόμενοι ενδοπολυσακχαρίτες ως προς την παραχθείσα βιομάζα.

α=Το σημείο με την μέγιστη παραγωγή βιομάζας (g/L).

β=Το σημείο με το μέγιστο ποσοστό λίπους επί ξηράς βιομάζας (g/g).

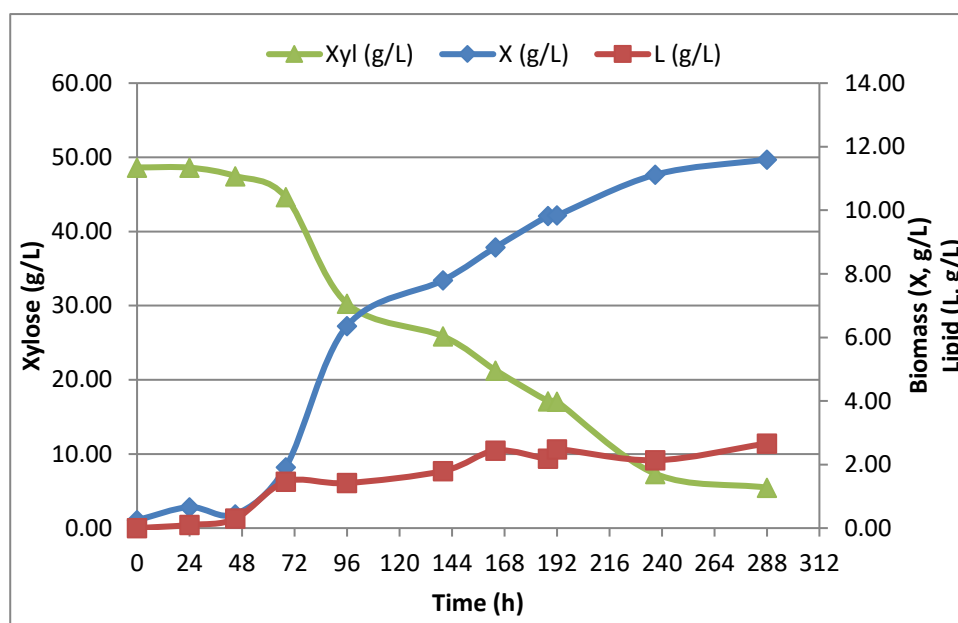
γ= Το σημείο με το μέγιστο ποσοστό ενδοπολυσακχαριτών επί ξηράς ουσίας (g/g).

δ= Το σημείο με την μέγιστη παραγωγή λίπους (g/L).

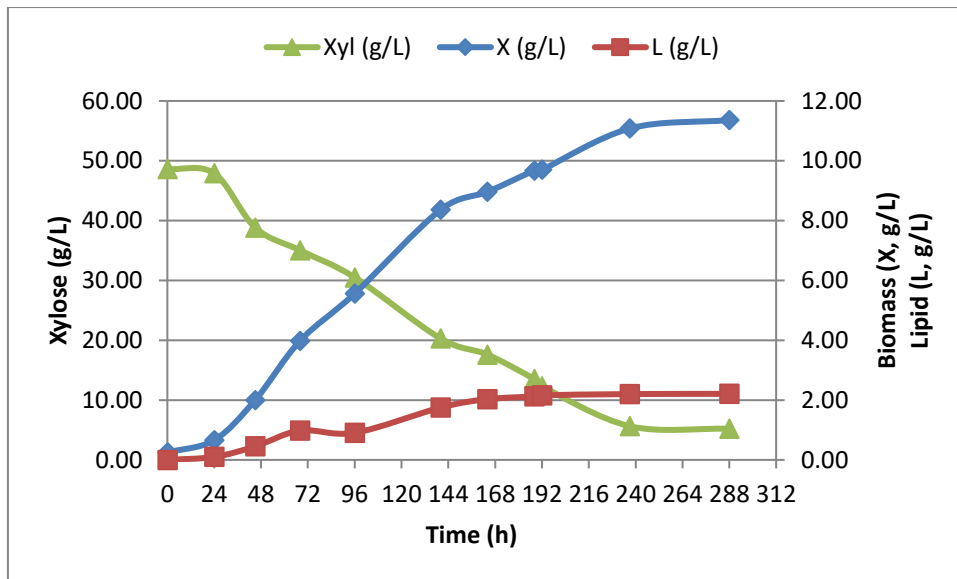
Από τον Πίνακα 3.2 προκύπτουν τα εξής συμπεράσματα:

- Η μεγαλύτερη παραγωγή λίπους για το NRRL Y-27012 παρατηρήθηκε στη ζύμωση με την προσθήκη 10 g/L SL, η οποία έφθασε τα 5,30 g/L.
- Η μέγιστη τιμή βιομάζας παρατηρήθηκε στη ζύμωση με την προσθήκη 40 g/L SL, η οποία έφθασε τα 15,2 g/L.
- Το μέγιστο ποσοστό ενδοπολυσακχαριτών επί ξηράς ουσίας παρατηρήθηκε στη ζύμωση, στην οποία δεν υπήρξε προσθήκη SL και είχε τιμή 0,30 g/g.

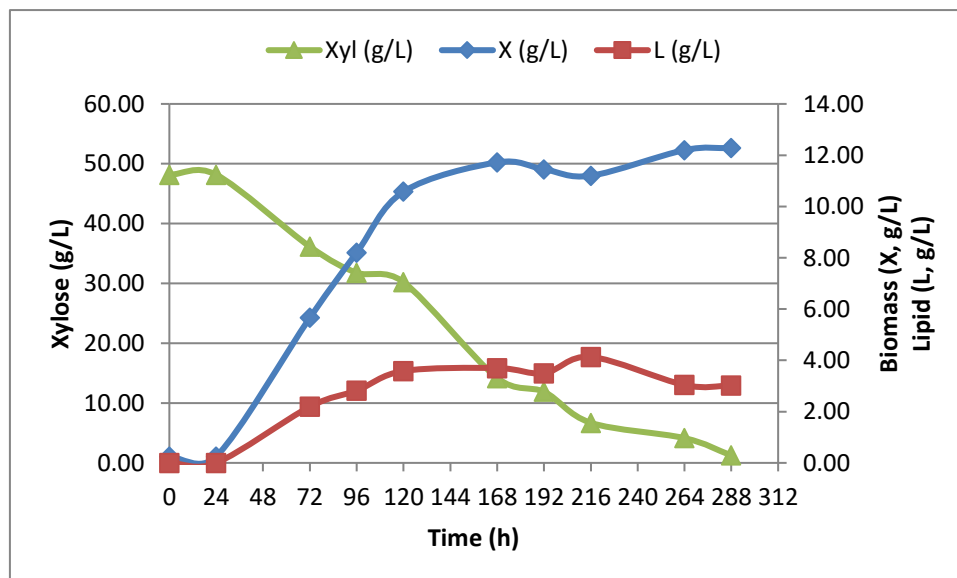
Ακολουθούν τα διαγράμματα της μεταβολής της βιομάζας, του αρχικού υποστρώματος και της μεταβολής του μικροβιακού λίπους σε συνάρτηση με τον χρόνο για τις ζυμώσεις βυθού, που πραγματοποιήθηκαν.



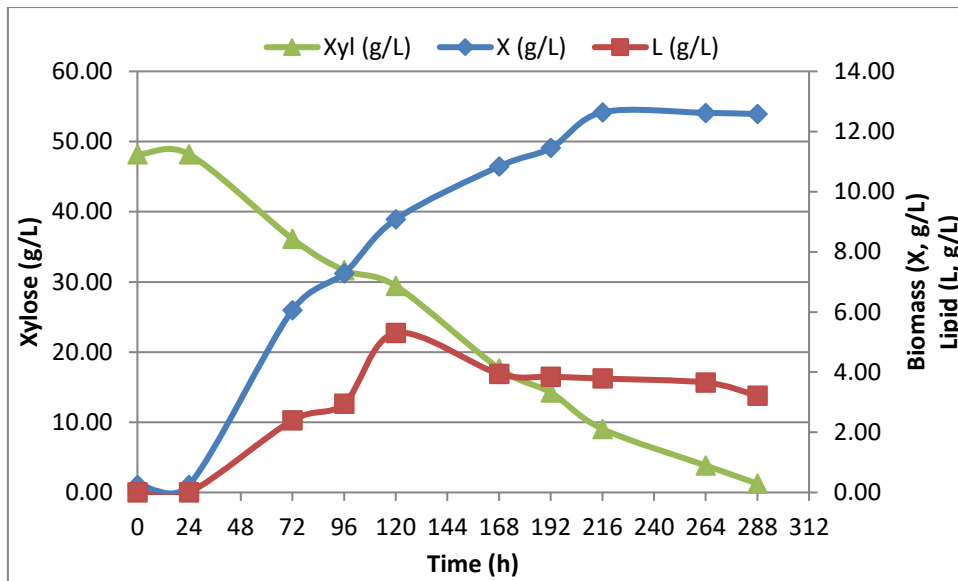
Γράφημα 3.1: Κινητικά δεδομένα για την μεταβολή της βιομάζας, του αρχικού υποστρώματος και την παραγωγή του λίπους του DSM 4444 ως προς τον χρόνο (ζύμωση αναφοράς).



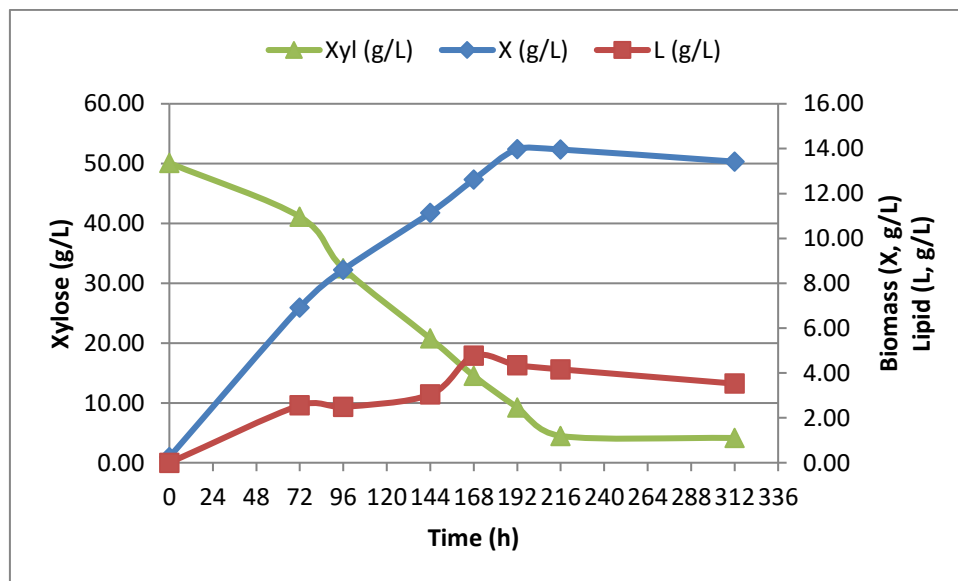
Γράφημα 3.2: Κινητικά δεδομένα για την μεταβολή της βιομάζας, του αρχικού υποστρώματος και την παραγωγή του λίπους του NRRL Y-27012 ως προς τον χρόνο (ζύμωση αναφοράς).



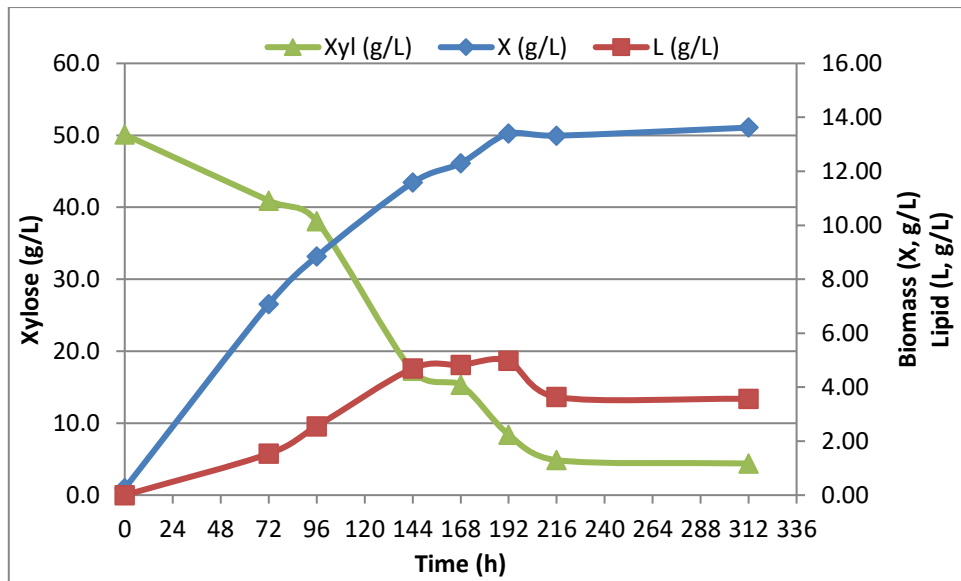
Γράφημα 3.3: Κινητικά δεδομένα για την μεταβολή της βιομάζας, του αρχικού υποστρώματος και της παραγωγής λίπους του DSM 4444 ως προς τον χρόνο - SL 10 g/L.



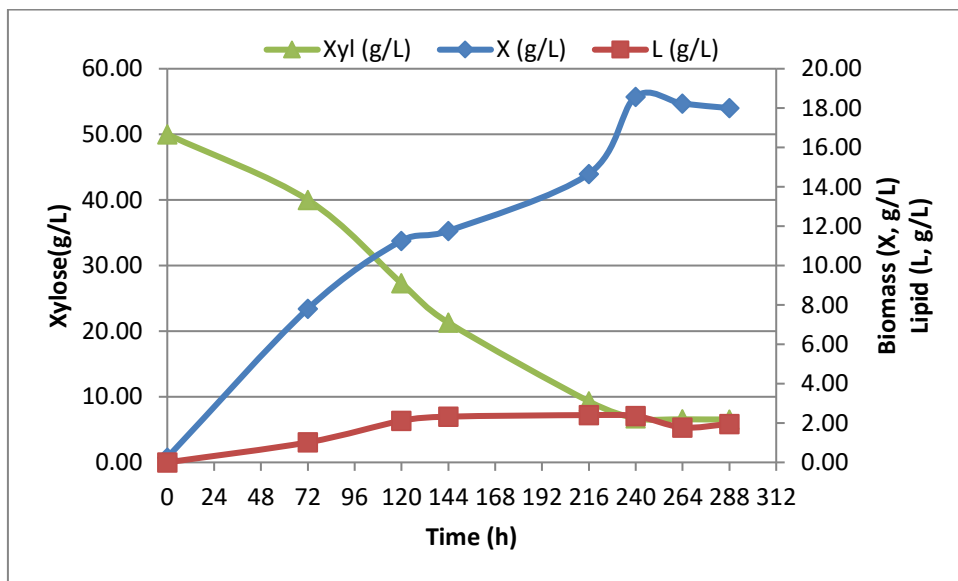
Γράφημα 3.4: Κινητικά δεδομένα για την μεταβολή της βιομάζας, του αρχικού υποστρώματος και της παραγωγής λίπους του NRRL Y-27012 ως προς τον χρόνο - SL 10 g/L.



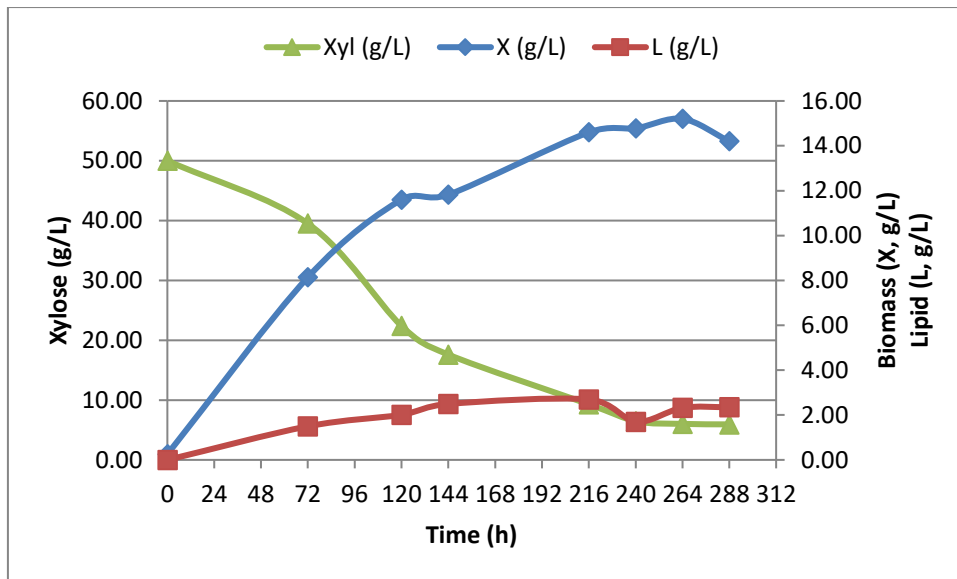
Γράφημα 3.5: Κινητικά δεδομένα για την μεταβολή βιομάζας, του αρχικού υποστρώματος και της παραγωγής λίπους του DSM 4444 ως προς τον χρόνο - SL 20 g/L.



Γράφημα 3.6: Κινητικά δεδομένα για την μεταβολή βιομάζας, του αρχικού υποστρώματος και της παραγωγής λίπους του NRRL Y-27012 ως προς τον χρόνο - SL 20 g/L.



Γράφημα 3.7: Κινητικά δεδομένα για την μεταβολή βιομάζας, του αρχικού υποστρώματος και της παραγωγής λίπους του DSM 4444 ως προς τον χρόνο - SL 40 g/L.



Γράφημα 3.8: Κινητικά δεδομένα για την μεταβολή βιομάζας, του αρχικού υποστρώματος και της παραγωγής λίπους του NRRL Y-27012 ως προς τον χρόνο – SL 40 g/L.

Στη συνέχεια παρουσιάζονται τα πειραματικά αποτελέσματα από την fed-batch ζύμωση, που πραγματοποιήθηκε σε βιοαντιδραστήρα. Για την συγκεκριμένη ζύμωση επιλέχθηκε να καλλιεργηθεί το στέλεχος NRRL Y-27012 και να γίνει προσθήκη 10 g/L SL. Στις 158 h της ζύμωσης προστέθηκε ασηπτικά ποσότητα ξυλόζης και αυτό είχε ως αποτέλεσμα η συγκέντρωση της στο υγρό ζύμωσης να φτάσει τα 58 g/L εκείνη την χρονική στιγμή. Επιλέχθηκε να καλλιεργηθεί το στέλεχος NRRL Y-27012 γιατί συγκριτικά με το στέλεχος DSM 4444 παρήγαγε περισσότερο λίπος. Πραγματοποιήθηκε προσθήκη 10 g/L SL αφού σε αυτή την συγκέντρωση SL το στέλεχος NNRL Y-27012 παρήγαγε την μεγαλύτερη συγκέντρωση λίπους.

Πίνακας 3.3: Κινητικά δεδομένα από την fed-batch ζύμωση του στελεχούς NRRL Y-27012 σε ξυλόζη αρχικής συγκέντρωσης 41,7 g/L, και προσθήκη 10 g/L SL.

T(h)	X(g/L)	Y _{IPS/X} (g/g)	Xyl(g/L)	Xylcons(g/L)	L (g/L)	Y _{L/X} (g/g)	Y _{X/S} (g/g)
0	0,3	0,00	41,7	0,0	0,00	0,00	0,00
41	3,1	0,19	34,5	7,2	2,40	0,79	0,42
66	5,7	0,15	28,4	13,3	2,53	0,44	0,43
89	8,9	0,14	24,5	17,2	2,64	0,30	0,52
115	14,4	0,12	18,2	23,5	2,64	0,18	0,61
134	14,8	0,10	11,9	29,8	3,85	0,26	0,50
157	15,6	0,10	4,6	37,1	4,36	0,28	0,42
158	15,6	0,10	58,0	37,1	4,36	0,28	0,42
184	16,4	0,09	50,6	44,5	4,58	0,28	0,37
208	19,0	0,08	47,4	47,7	9,12	0,48	0,40
231	20,9	0,07	39,6	55,5	11,50	0,55	0,38
256	23,4	0,07	27,8	67,3	13,14	0,56	0,35
279	24,3	0,04	12,8	82,3	14,77	0,61	0,29
303	28,0	0,02	8,4	86,7	15,84	0,57	0,32
312	29,7	0,02	4,2	90,9	17,00	0,57	0,33

Συνθήκες καλλιέργειας: Ημισυνεχής ζύμωση σε βιοαντιδραστήρα (300 rpm) , T=28±1 °C , αρχική συγκέντρωση ξυλόζης S_{0,xyl}=41,7g/L, pH=6,0±0,2 υπό αερόβιες και περιοριστικές σε άζωτο συνθήκες. Η παροχή αέρα στο βιοαντιδραστήρα ήταν σταθερή (1,5 vvm).

T (h): χρόνος ζύμωσης.

X (g/L): βιομάζα.

Y_{IPS/X} (g/g): οι παραγόμενοι ενδοπολυσακχαρίτες ως προς την παραχθείσα βιομάζα.

Xyl (g/L): συγκέντρωση ξυλόζης.

Xyl_{cons} (g/L): καταναλωθέν υπόστρωμα.

L (g/L): ενδοκυτταρικό λίπος.

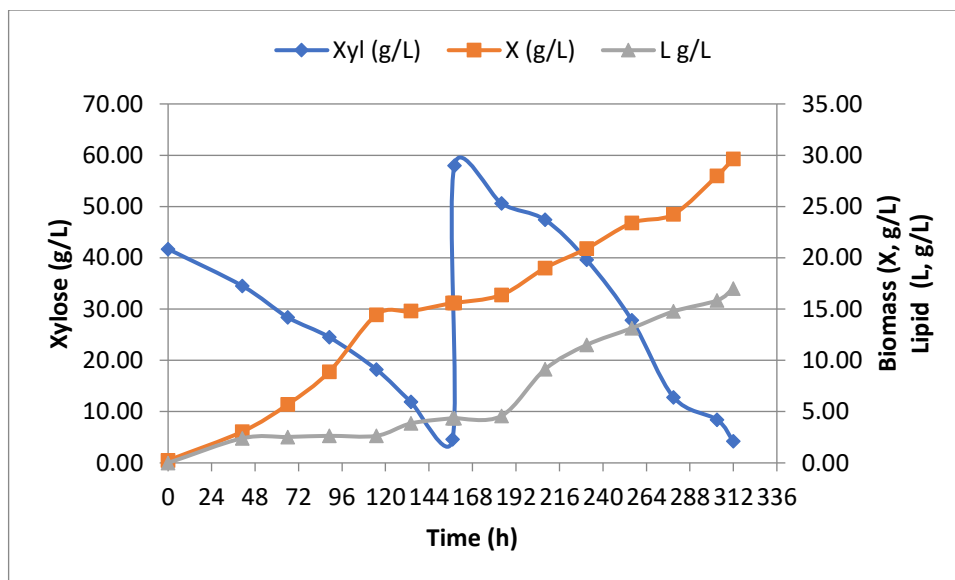
Y_{X/S} (g/g) : συντελεστής απόδοσης βιομάζας ως προς το καταναλωθέν υπόστρωμα.

Y_{L/X} (g/g): συντελεστής απόδοσης του παραγόμενου λίπους ως προς την παραχθείσα βιομάζα.

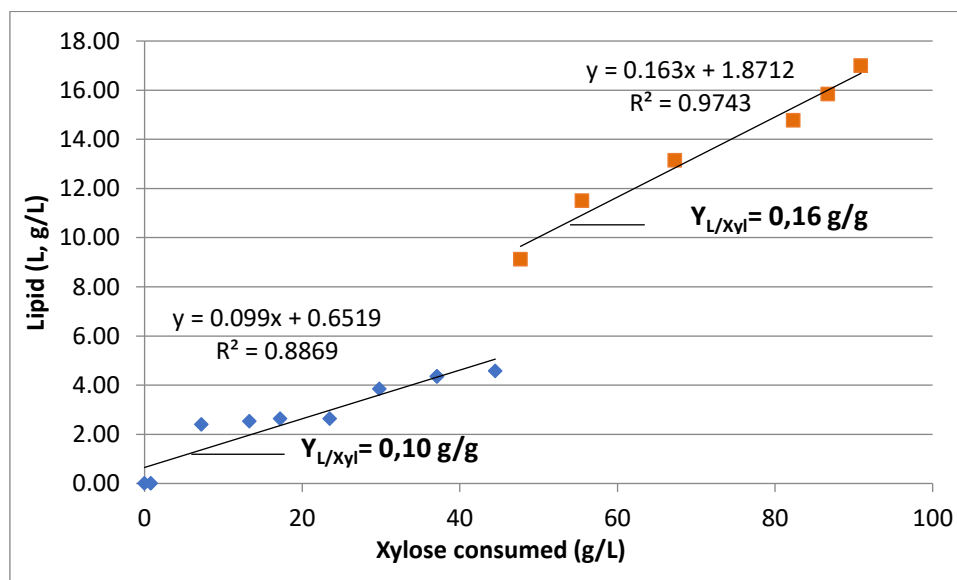
Από τον Πίνακα 3.3 προκύπτουν τα εξής συμπεράσματα:

- Το λίπος έφτασε τα 17,00 g/L στις 312 ώρες της ζύμωσης.
- Η βιομάζα έφτασε τα 29,7 g/L στις 312 ώρες της ζύμωσης.
- Η μέγιστη τιμή των ενδοπολυσακχαριτών επί την ξηρά ουσία ήταν 0,19 g/g.

Ακολουθούν διαγράμματα που απεικονίζουν την μεταβολή της βιομάζας, του υποστρώματος και του παραγόμενου λίπους κατά την διάρκεια της ημισυνεχούς ζύμωσης.



Γράφημα 3.9: Κινητικά δεδομένα για την μεταβολή βιομάζας, του αρχικού υποστρώματος και της παραγωγής λίπους του NRRL Y-27012 ως προς τον χρόνο (fed-batch) - SL 10 g/L.



Γράφημα 3.10: Παραγωγή λίπους του NRRL Y-27012 ως προς το καταναλωθέν υπόστρωμα (fed-batch) - SL 10 g/L.

Με την βοήθεια της αέριας χρωματογραφίας βρέθηκε ότι το μικροβιακό λίπος, που παράχθηκε και από τα δύο στελέχη DSM 4444 και NRRL Y-27012, αποτελείται από τα ακόλουθα λιπαρά οξέα : παλμιτικό οξύ (C16:0), στεατικό οξύ (C18:0), ελαϊκό οξύ (Δ^9 C18:1) , λινελαϊκό οξύ ($\Delta^{9,12}$ C18:2) και α-λινολενικό οξύ ($\Delta^{9,12,15}$ C18:3). Ακολουθούν πίνακες με τα αποτελέσματα που προέκυψαν με την βοήθεια της αέριας χρωματογραφίας.

Πίνακας 3.4: Σύσταση των λιπιδίων σε λιπαρά οξέα του DSM 4444 σε ξυλόζη αρχικής συγκέντρωσης 50 g/L, για διαφορετικές συγκεντρώσεις λιγνοσουλφονικού νατρίου.

		Λιπαρά Οξέα %				
SL (g/L)	T (h)	C 16:0	C 18:0	Δ^9 C 18:1	$\Delta^{9,12}$ C 18:2	$\Delta^{9,12,15}$ C 18:3 (n-3)
0	45	25,9	9,2	57,4	6,4	1,1
	164	25,5	8,8	56,4	7,8	1,5
	237	24,9	9,6	57,4	7,3	0,8
10	72	26,4	5,6	58,2	8,5	1,3
	120	27,3	7,7	57,3	6,8	0,9
	192	28,1	7,1	55,2	8,2	1,3
	288	26,8	6,5	55,7	9,5	1,5
20	72	33,0	6,9	50,3	8,5	1,3
	144	26,1	11,7	52,5	8,6	1,2
	216	28,3	7,1	56,4	7,3	1,0
	312	27,1	6,7	56,2	8,8	1,3
40	72	31,0	5,2	56,2	6,9	0,7
	144	31,0	6,9	53,8	7,2	1,1
	216	29,9	6,4	55,0	7,6	1,1
	288	29,5	5,9	55,3	8,1	1,2

Συνθήκες καλλιέργειας: Ασυνεχής ζύμωση σε ανακινούμενες κωνικές φιάλες (180±5 g/L), T=28±1 °C, αρχική συγκέντρωση ξυλόζης S_{oxy}=50 g/L, pH=6,0±0,2 υπό αερόβιες και περιοριστικές σε άζωτο συνθήκες.

SL(g/L): λιγνοσουλφονικό νάτριο.

T(h): χρόνος ζύμωσης.

C 16:0: Παλμιτικό οξύ

C 18:0: Στεατικό οξύ

Δ^9 C 18:1: Ελαϊκό οξύ

$\Delta^{9,12}$ C 18:2: Λινελαϊκό οξύ

$\Delta^{9,12,15}$ C 18:3 (n-3): α -λινολενικό οξύ

Από τον Πίνακα 3.4 προκύπτουν τα εξής συμπεράσματα:

- Κυρίαρχο λιπαρό οξύ σε όλες τις ζυμώσεις είναι το ελαϊκό οξύ (Δ^9 C18:1) σε ποσοστό που κυμαίνεται από 50,3-58,2 %.
- Ακολουθούν το παλμιτικό οξύ (C16:0) σε ποσοστό 24,9-33,0 %, στεατικό οξύ (C18:0) σε ποσοστό 5,2-11,7%, , λινελαϊκό οξύ ($\Delta^{9,12}$ C18:2) σε ποσοστό 6,4-9.5% και τέλος το α-λινολενικό οξύ ($\Delta^{9,12,15}$ C18:3) σε ποσοστό 0,7-1,5%.
- Δεν μεταβάλλεται ιδιαίτερα η ποσοστιαία κατανομή των λιπαρών οξέων κατά την διάρκεια των ζυμώσεων.
- Δεν μεταβάλλεται ιδιαίτερα η ποσοστιαία κατανομή των λιπαρών οξέων κατά την προσθήκη λιγνοσουλφονικού νατρίου.
- Λίπος με περιεκτικότητα σε ελαϊκό οξύ μεγαλύτερη του 50% είναι κατάλληλο για παραγωγή βιοντήζελ.

Πίνακας 3.5: Σύσταση των λιπιδίων σε λιπαρά οξέα του NRRL Y-27012 σε ξυλόζη αρχικής συγκέντρωσης 50 g/L, για διαφορετικές συγκεντρώσεις λιγνοσουλφονικού νατρίου.

		Λιπαρά Οξέα %				
SL (g/L)	T (h)	C 16:0	C 18:0	Δ^9 C 18:1	$\Delta^{9,12}$ C 18:2	$\Delta^{9,12,15}$ C 18:3 (n-3)
0	45	27,8	9,5	50,3	10,6	1,8
	164	29,1	8,3	51,6	9,4	1,7
	237	30,2	7,4	50,6	10,2	1,6
10	72	26,0	6,0	58,0	8,5	1,5
	120	27,7	7,4	57,0	6,8	1,1
	192	26,8	7,7	55,6	8,8	1,2
	288	25,7	7,1	57,3	8,6	1,3
20	72	26,0	11,7	52,5	8,6	1,2
	144	25,9	8,0	58,1	7,0	1,1
	216	26,9	6,8	57,1	8,1	1,1
	312	25,2	7,8	57,6	8,2	1,2
40	72	28,1	5,5	57,7	7,7	1,0
	144	27,7	7,2	56,5	7,6	1,0
	216	27,7	6,2	57,5	7,6	1,0
	288	26,8	6,0	57,8	8,3	1,2

Συνθήκες καλλιέργειας: Ασυνεχής ζύμωση σε ανακινούμενες κωνικές φιάλες (180±5 g/L), T=28±1 °C, αρχική συγκέντρωση ξυλόζης $S_{0,xy}$ =50 g/L, pH=6,0±0,2 υπό αερόβιες και περιοριστικές σε άζωτο συνθήκες.

SL(g/L): λιγνοσουλφονικό νάτριο.

T (h): χρόνος ζύμωσης.

C 16:0: Παλμιτικό οξύ

C 18:0: Στεατικό οξύ

Δ^9 C 18:1: Ελαϊκό οξύ

$\Delta^{9,12}$ C 18:2: Λινελαϊκό οξύ

$\Delta^{9,12,15}$ C 18:3 (n-3): α-λινολενικό οξύ

Από τον Πίνακα 3.5 προκύπτουν τα εξής συμπεράσματα:

- Κυρίαρχο λιπαρό οξύ σε όλες τις ζυμώσεις είναι το ελαϊκό οξύ (Δ^9 C18:1) σε ποσοστό που κυμαίνεται από 50,3-58,1%.
- Ακολουθούν το παλμιτικό οξύ (C16:0) σε ποσοστό 25,2-30,2 %, στεατικό οξύ (C18:0) σε ποσοστό 5,5-11,7%, λινελαϊκό οξύ ($\Delta^{9,12}$ C18:2) σε ποσοστό 6,8-10,6% και τέλος το α-λινολενικό οξύ ($\Delta^{9,12,15}$ C18:3) σε ποσοστό 1,0-1,8%.
- Δεν μεταβάλλεται ιδιαίτερα η ποσοστιαία κατανομή των λιπαρών οξέων κατά την διάρκεια των ζυμώσεων.
- Δεν μεταβάλλεται ιδιαίτερα η ποσοστιαία κατανομή των λιπαρών οξέων κατά την προσθήκη λιγνοσουλφονικού νατρίου.
- Λίπος με περιεκτικότητα σε ελαϊκό οξύ μεγαλύτερη του 50% είναι κατάλληλο για παραγωγή βιοντήζελ.

Πίνακας 3.6: Σύσταση των λιπιδίων σε λιπαρά οξέα του NRRL Y-27012 σε ξυλόζη αρχικής συγκέντρωσης ξυλόζη αρχικής συγκέντρωσης 41,7 g/L, και προσθήκη 10 g/L SL.

T (h)	Λιπαρά Οξέα %				
	C 16:0	C 18:0	Δ^9 C 18:1	$\Delta^{9,12}$ C 18:2	$\Delta^{9,12,15}$ C 18:3 (n-3)
66	23,9	4,7	60,4	11,0	-
134	28,9	4,9	60,8	5,4	-
157	24,5	5,1	63,4	7,0	-
184	27,4	4,5	61,6	6,5	-
256	26,7	6,7	59,2	7,3	-
312	26,9	4,5	62,5	6,1	-

Συνθήκες καλλιέργειας: Ημισυνεχής ζύμωση σε βιοαντιδραστήρα (300 gpm), T=28±1 °C, αρχική συγκέντρωση ξυλόζης S_{oxy1} = 41,7g/L, pH=6,0±0,2 υπό αερόβιες και περιοριστικές σε άζωτο συνθήκες. Η παροχή αέρα στο βιοαντιδραστήρα ήταν σταθερή (1,5 vvm).

T (h): χρόνος ζύμωσης.

C 16:0: Παλμιτικό οξύ

C 18:0: Στεατικό οξύ

Δ^9 C 18:1: Ελαϊκό οξύ

$\Delta^{9,12}$ C 18:2: Λινελαϊκό οξύ

$\Delta^{9,12,15}$ C 18:3 (n-3): α-λινολενικό οξύ

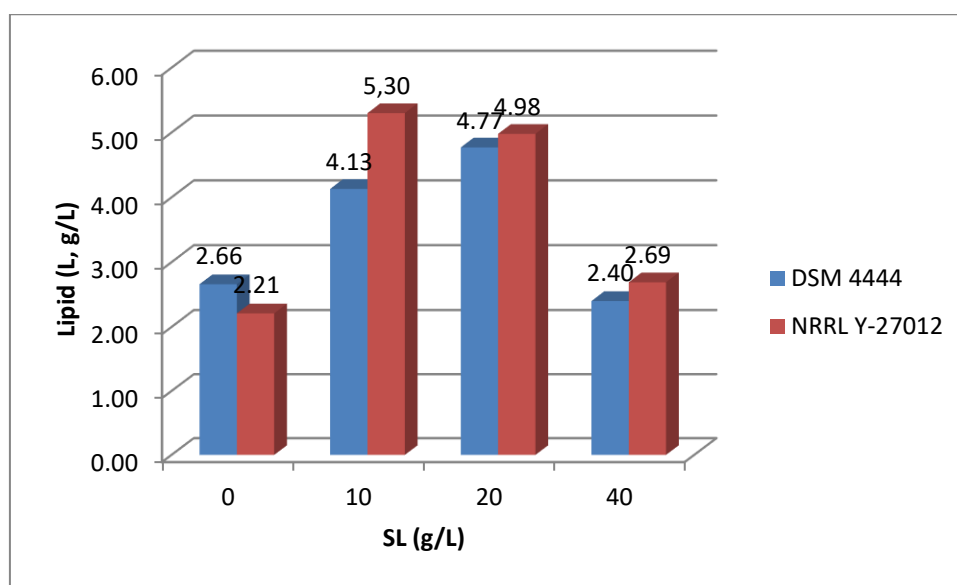
Από τον Πίνακα 3.6 προκύπτουν τα εξής συμπεράσματα:

- Όπως και στις προηγούμενες ζυμώσεις έτσι και σε αυτήν που πραγματοποιήθηκε στο βιοαντιδραστήρα κυρίαρχο λιπαρό οξύ είναι το ελαϊκό οξύ (Δ^9 C18:1) σε ποσοστό που κυμαίνεται από 59,2-63,4%.
- Ακολουθούν το παλμιτικό οξύ (C16:0) σε ποσοστό 23,9-28,9 %, λινελαϊκό οξύ ($\Delta^{9,12}$ C18:2) σε ποσοστό 6,1-11,0% και στεατικό οξύ (C18:0) σε ποσοστό 4,5-6,7%.
- Δεν παρατηρήθηκε παραγωγή α-λινολενικού οξέος ($\Delta^{9,12,15}$ C18:3).
- Δεν μεταβάλλεται ιδιαίτερα η ποσοστιαία κατανομή των λιπαρών οξέων κατά την διάρκεια της ζύμωσης.
- Λίπος με περιεκτικότητα σε ελαϊκό οξύ μεγαλύτερη του 50% είναι κατάλληλο για παραγωγή βιοντήζελ.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Σκοπός της παρούσας ερευνητικής εργασίας, όπως έχει προαναφερθεί, είναι να μελετηθεί η επίδραση του λιγνοσουλφονικού νατρίου στην κυτταρική ανάπτυξη και στην παραγωγή μικροβιακού λίπους και ενδοπολυσακχαριτών των στελεχών DSM 4444 και NRRL Y-27012 της ελαιογόνου ζύμης *R.toruloides*, σε υπόστρωμα με μοναδική πηγή άνθρακα ξυλόζη και περιοριστικές σε άζωτο συνθήκες.

Στις ασυνεχείς ζυμώσεις βυθού του στελέχους DSM 4444 που πραγματοποιήθηκαν, παρατηρήθηκε ότι με την προσθήκη 10g/L SL στο θρεπτικό μέσο αυξήθηκε η παραγωγή λίπους σε σχέση με την ζύμωση αναφοράς, στην οποία δεν είχε προστεθεί SL. Η προσθήκη 20 g/L SL οδήγησε σε ακόμη μεγαλύτερη παραγωγή λίπους. Όμως, στη ζύμωση στην οποία έγινε προσθήκη 40g/L SL, το SL δεν επέφερε την ίδια θετική επίδραση και η παραγωγή λίπους βρέθηκε να είναι λίγο μικρότερη σε σχέση με την ζύμωση αναφοράς. Στο διάγραμμα 4.1 φαίνονται οι μέγιστες συγκεντρώσεις, που έφθασε το λίπος (g/L) στις ζυμώσεις του DSM 4444 και του NRRL Y-27012 σε σχέση με τις διαφορετικές συγκεντρώσεις του λιγνοσουλφονικού νατρίου.



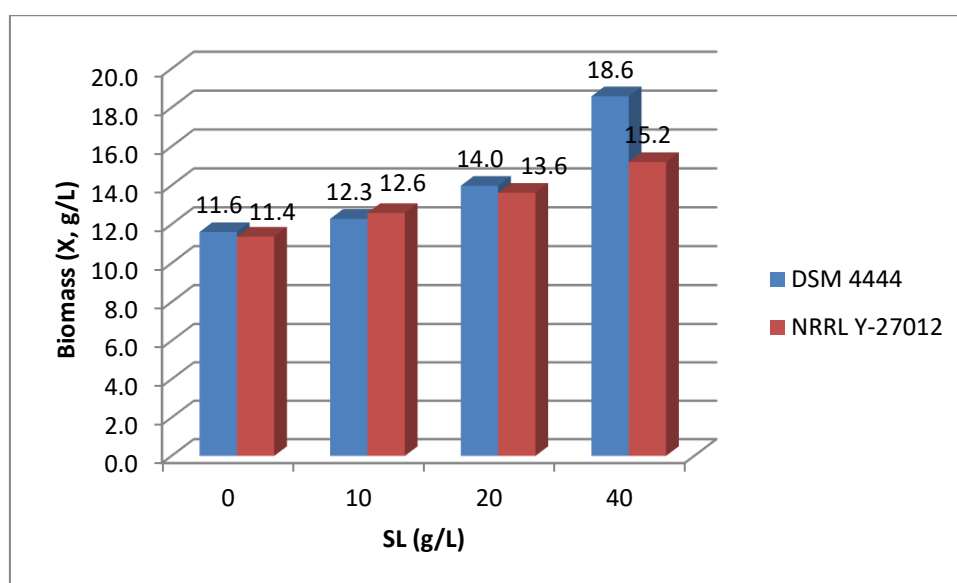
Γράφημα 4.1: Μέγιστη συγκέντρωση μικροβιακού λίπους κατά την αύξηση του στελέχους DSM 4444 και του NRRL Y-27012 σε υπόστρωμα ξυλόζης για τις διάφορες συγκεντρώσεις SL.

Η συγκέντρωση του λίπους που παράχθηκε από το στέλεχος NNRL Y-27012 αυξήθηκε με την προσθήκη 10 g/L και 20 g/L SL σε σχέση με την ζύμωση αναφοράς. Η μεγαλύτερη αύξηση της συγκέντρωσης αυτού προέκυψε με την προσθήκη 10 g/L SL. Με την προσθήκη 40 g/L SL, η συγκέντρωση του λίπους κυμάνθηκε σε επίπεδα ίδια με αυτά της ζύμωσης αναφοράς. Η θετική επίδραση που φαίνεται να έχει το λιγνοσουλφονικό νάτριο στην παραγωγή του μικροβιακού λίπους

συμπίπτει με την βιβλιογραφία. (Xu et al., 2015). Στη συγκέντρωση των 40 g/L SL, δεν παρατηρήθηκε αξιολογή διαφορά στην παραγωγή μικροβιακού λίπους. Παρατηρώντας το Γράφημα 4.1, συμπεραίνεται ότι σε όλες τις επόμενες ζυμώσεις που ακολούθησαν, με εξαίρεση την ζύμωση αναφοράς, το στέλεχος NRRL Y-27012 παρήγαγε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις λίπους σε σχέση με το στέλεχος DSM 4444.

Συγκρίνοντας την ημισυνεχή ζύμωση του NRRL Y-27012, που πραγματοποιήθηκε στο βιοαντιδραστήρα και την ζύμωση βυθού, στις οποίες έγινε προσθήκη 10 g SL, παρατηρήθηκε ότι η ξυλόζη καταναλώθηκε πολύ γρήγορα στη ζύμωση του βιοαντιδραστήρα σε σχέση με την ζύμωση βυθού. Φαίνεται πως η ζύμωση στο βιοαντιδραστήρα εξελίσσεται με ταχύτερο ρυθμό. Η συγκέντρωση του λίπους έφτασε τα 17,00 g/L ($Y_{L/X}= 0,57$ g/g) στις 312 ώρες της ζύμωσης, ενώ στη ζύμωση βυθού έφτασε τα 5,30 g/L ($Y_{L/X}= 0,55$ g/g) στις 120 ώρες ζύμωσης. Αυτό το συμπέρασμα είναι λογικό, καθώς στο βιοαντιδραστήρα επικρατούν καλύτερες συνθήκες ανάδευσης και αερισμού.

Αξιολογή ήταν και η παραγωγή βιομάζας για όλες τις ζυμώσεις. Αναλυτικότερα, τα πειράματα έδειξαν πως η προσθήκη όλο και μεγαλύτερης συγκέντρωσης SL οδηγούσε σε ολοένα και μεγαλύτερη παραγωγή βιομάζας, όπως μπορεί κανείς να συμπεράνει από το Γράφημα 4.2. Αυτό το συμπέρασμα αφορά και τα δύο στελέχη. Στην ημισυνεχή ζύμωση, που έλαβε χώρα στο βιοαντιδραστήρα, η παραγωγή της βιομάζας έφτασε τα 29,7 g/L στις 312 ώρες της ζύμωσης, σαφώς μεγαλύτερη συγκριτικά με την μέγιστη βιομάζα, που παράχθηκε στη ζύμωση του στελέχους NRRL Y-27012 με την προσθήκη 10 g/L SL, της οποίας η τιμή ήταν 12,6 g/L.



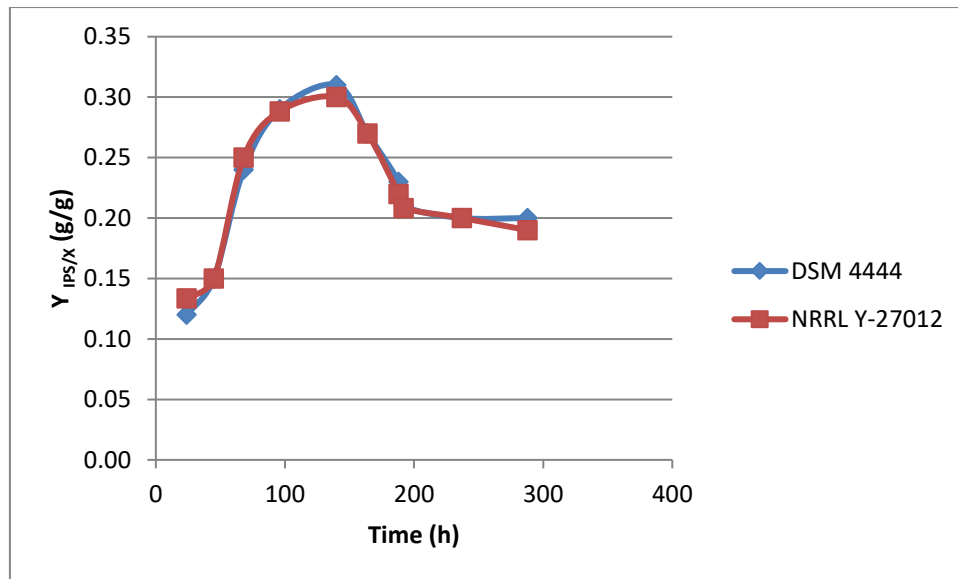
Γράφημα 4.2: Μέγιστη συγκέντρωση βιομάζας κατά την αύξηση του στελέχους DSM 4444 και του NRRL Y-27012 σε υπόστρωμα ξυλόζης για τις διάφορες συγκεντρώσεις SL.

Στον πίνακα 4.1 γίνεται σύγκριση των αποτελεσμάτων (παραγωγή βιομάζας και μικροβιακού λίπους) από την ζύμη *R.toruloides* της παρούσας μελέτης με δημοσιευμένα αποτελέσματα άλλων μελετών.

Πίνακας 4.1: Σύγκριση αποτελεσμάτων με άλλες μελέτες.

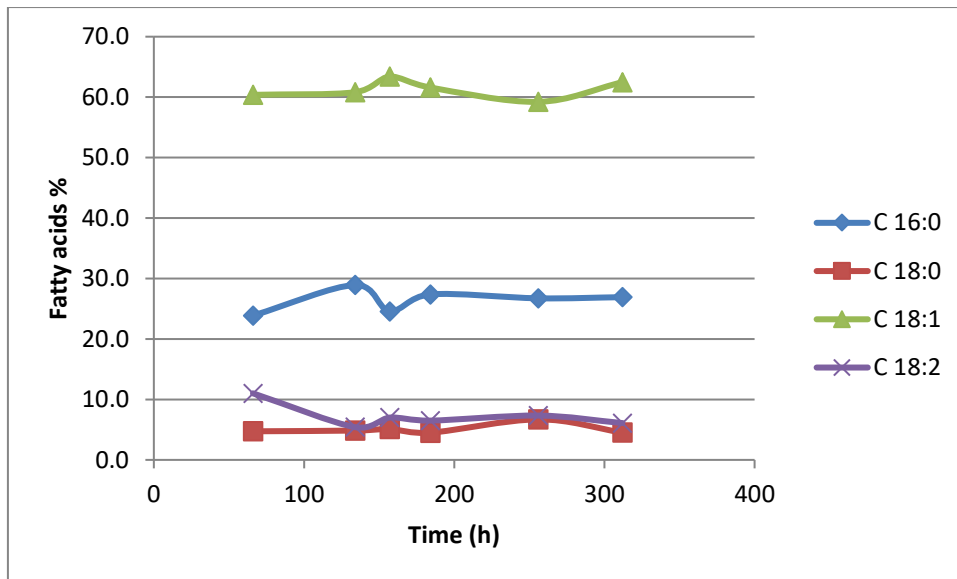
Στέλεχος	Υπόστρωμα	Τύπος ζύμωσης	X (g/L)	Y_{LX} (% w/w)	Αναφορές
<i>R.toruloides</i> AS2.1389	Glycerol	Shake flasks	19,2	47,7	Xu et al., 2012
<i>R.toruloides</i> AS2.1389	Glycerol	Batch bioreactor	26,7	69,5	Xu et al., 2012
<i>R.toruloides</i> AS2.1389	Glucose	Shake flasks	18,3	76,0	Li et al., 2007
<i>R.toruloides</i> DSM 4444	Glycerol/sunflower meal hydrolysate blend	Shake flasks	27,9	29,0	Leiva-Candia et al., 2015
<i>R.toruloides</i> DSM 4444	Glycerol/sunflower meal hydrolysate blend	Fed-batch bioreactor	37,4	51,3	Leiva-Candia et al., 2015
<i>R.toruloides</i> NRRL Y-27012	Biodiesel-derived glycerol	Shake flasks	30,1	40,0	Tchakouteu et al., 2015
<i>R.toruloides</i> Y4	Glucose	Fed-batch bioreactor	106,5	67,5	Li et al., 2007
<i>R.toruloides</i> Y4	Glucose (phosphate-limited trial)	Shake flasks	19,4	62,4	Wu et al., 2011
<i>R.toruloides</i> Y4	Glucose (sulphate-limited trial)	Shake flasks	23,0	20,8	Wu et al., 2011
<i>R.toruloides</i> CBS14	Glucose	Batch bioreactor	12,5	42,9	Moreton, 1988
<i>R.toruloides</i> CBS14	Fructose	Batch bioreactor	8,7	39,8	Moreton, 1988
<i>R.toruloides</i> CBS14	Xylose	Batch bioreactor	8,3	42,2	Moreton, 1988
<i>R.toruloides</i> CBS14	Glucose	Fed-batch bioreactor	35,0	71,4	Wiebe et al., 2012
<i>R.toruloides</i> CBS14	Glucose/xylose/arabinose blend	Fed-batch bioreactor	27,0	55,5	Wiebe et al., 2012
<i>R.toruloides</i> DSM 4444	Glucose	Batch bioreactor	~22	~40	Bommareddy et al., 2015
<i>R.toruloides</i> DSM 4444	Glycerol	Batch bioreactor	~15	~57	Bommareddy et al., 2015
<i>R.toruloides</i> DSM 4444	Xylose	Shake flasks	11,6	23,0	Παρούσα μελέτη
<i>R.toruloides</i> NRRL Y-27012	Xylose	Shake flasks	11,4	19,0	Παρούσα μελέτη
<i>R.toruloides</i> NRRL Y-27012	Xylose (SL-enriched culture)	Fed-batch bioreactor	29,7	57,0	Παρούσα μελέτη

Επίσης μετρήθηκαν για όλες τις ζυμώσεις οι παραγόμενοι ενδοπολυσακχαρίτες. Ο συντελεστής των παραγόμενων ενδοπολυσακχαριτών προς την παραχθείσα βιομάζα ($Y_{IPS/X}$) έφτασε περίπου τα 0,30 g/g και για τα δύο στελέχη στις ζυμώσεις αναφοράς, στις 140 ώρες της ζύμωσης. Σύμφωνα με την βιβλιογραφία (Ratledge, 1988; Papanikolaou and Aggelis, 2011a; 2011b), η βιοσύνθεση των ενδοπολυσακχαριτών πραγματοποιείται κατά την στάσιμη φάση ανάπτυξης. Θεωρητικά ενεργοποιείται μόλις ελαττωθεί το άζωτο από το μέσο καλλιέργειας, το οποίο οδηγεί σε μείωση της συγκέντρωσης του ενδοκυτταρικού AMP. Η ελάττωση της συγκέντρωσης του AMP οδηγεί στην αναστολή της δράσης της 6 PFK (Galiotou-Panayotou et al., 1998; Ratledge and Wynn, 2002; Papanikolaou and Aggelis, 2011a). Η προαναφερθείσα κατάσταση μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα την συσσώρευση των ενδοπολυσακχαριτών. Στη συνέχεια η τιμή του $Y_{IPS/X}$ μειώνεται μέχρι περίπου τα 0,20 g/g, όπου και διατηρείται σταθερή μέχρι το τέλος της ζύμωσης. Αυτή η μείωση μπορεί να υποδηλώνει ότι οι ενδοπολυσακχαρίτες χρησιμοποιούνται από την ζύμη για να καλύψουν διάφορες ενεργειακές ανάγκες. Επίσης, η ζύμη μπορεί να χρησιμοποιήσει τους ενδοπολυσακχαρίτες ως ενδοκυτταρικό υπόστρωμα προκειμένου να βιοσυντεθούν διάφορες ουσίες. Στο Γράφημα 4.3 φαίνεται πώς μεταβάλλεται ο συντελεστής $Y_{IPS/X}$ σε συνάρτηση με τον χρόνο για τα δύο στελέχη στη ζύμωση αναφοράς. Παρατηρείται και για τα δύο στελέχη πως όσο μεγαλώνει η συγκέντρωση λιγνοσουλφονικού νατρίου, που προστίθεται στο μέσο καλλιέργειας, τόσο μειώνεται ο συντελεστής $Y_{IPS/X}$. Για το στέλεχος DSM 4444, στη ζύμωση με την προσθήκη 10 g/L SL ο συντελεστής $Y_{IPS/X}$ έφτασε τα 0,19 g/g στις 96 ώρες της ζύμωσης, με την προσθήκη 20 g/L SL έφτασε τα 0,15 g/g στις 72 ώρες της ζύμωσης και, τέλος, στη ζύμωση με την προσθήκη 40 g/L SL, ο συντελεστής $Y_{IPS/X}$ έφτασε τα 0,10 g/g στις 72 ώρες της ζύμωσης. Για το στέλεχος NRRL Y-27012, η τιμή του συντελεστή $Y_{IPS/X}$ έφτασε τα 0,14 g/g για τις ζυμώσεις των 10 g/L και 20g/L SL, ενώ στη ζύμωση με την προσθήκη 40 g/L SL έφτασε τα 0,11 g/g στις 72 ώρες της ζύμωσης. Τέλος, στη ζύμωση που πραγματοποιήθηκε στο βιοαντιδραστήρα, ο συντελεστής των παραγόμενων ενδοπολυσακχαριτών προς την παραχθείσα βιομάζα έφτασε τα 0,19 g/g στις 41 ώρες της ζύμωσης.



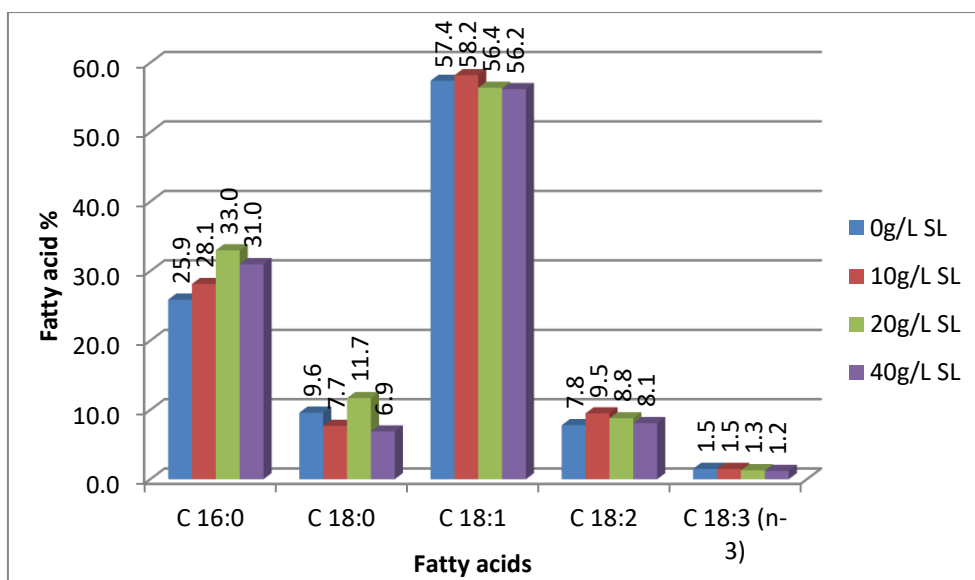
Γράφημα 4.3: Καμπύλη του συντελεστή των παραγόμενων ενδοπολυσακχαριτών ως προς την παραχθείσα βιομάζα σε συνάρτηση με τον χρόνο, για το στέλεχος DSM 4444 και το NRRL Y-27012 στη ζύμωση αναφοράς.

Με την βοήθεια της αέριας χρωματογραφίας βρέθηκε ότι το μικροβιακό λίπος, που παράχθηκε και από τα δύο στελέχη DSM 4444 και NRRL Y-27012, αποτελείται από τα ακόλουθα λιπαρά οξέα : παλμιτικό οξύ (C16:0), στεατικό οξύ (C18:0), ελαϊκό οξύ (Δ^9 C18:1) , λινελαϊκό οξύ ($\Delta^{9,12}$ C18:2) και α -λινολενικό οξύ ($\Delta^{9,12,15}$ C18:3). Επιπλέον, βρέθηκε ότι σε όλες τις ζυμώσεις, κυρίαρχα λιπαρά οξέα είναι το ελαϊκό οξύ (Δ^9 C18:1) και το παλμιτικό οξύ (C16:0). Στις ζυμώσεις βυθού βρέθηκε σε πολύ μικρά ποσοστά α -λινολενικό οξύ ($\Delta^{9,12,15}$ C18:3), ενώ στη ζύμωση του βιοαντιδραστήρα δεν ανιχνεύθηκε. Το προφίλ των λιπαρών οξέων δεν μεταβλήθηκε στις ζυμώσεις βυθού κατά την προσθήκη λιγνοσουλφονικού νατρίου, συμπέρασμα που επιβεβαιώνεται από την βιβλιογραφία. Επιπρόσθετα, παρατηρήθηκε πως δεν μεταβάλλεται σημαντικά η ποσοστιαία κατανομή των λιπαρών οξέων κατά την διάρκεια της ζύμωσης, όπως φαίνεται ενδεικτικά στο Γράφημα 4.4 για την ημισυνεχή ζύμωση του NRRL Y-27012. Αυτό το συμπέρασμα αφορά όλες τις ζυμώσεις και των δύο στελεχών που πραγματοποιήθηκαν.



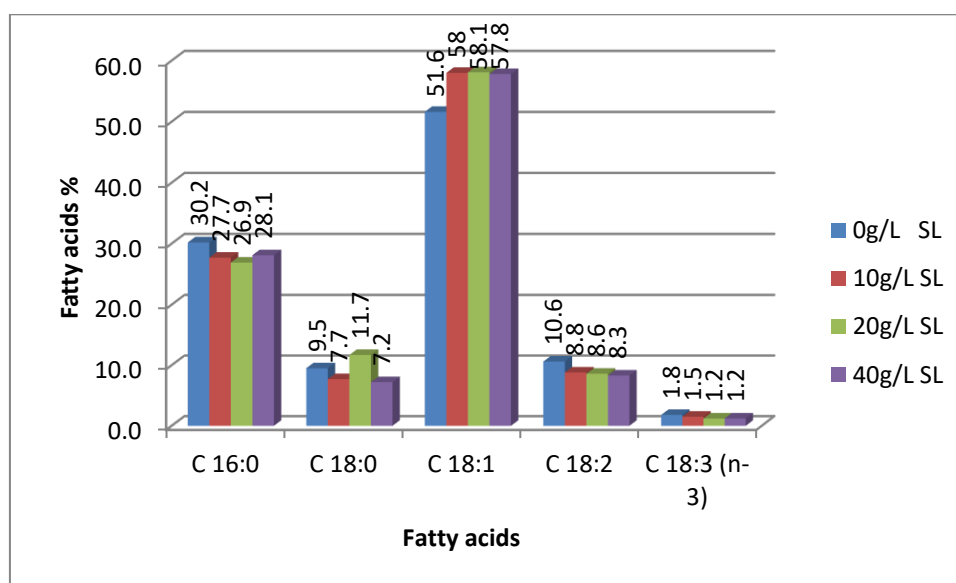
Γράφημα 4.4: Σύνθεση των λιπαρών οξέων του στελέχους NRRL Y-27012 κατά την ημισυνεχή ζύμωση (fed-batch) - SL 10 g/L.

Κατά την προσθήκη λιγνοσουλφονικού νατρίου δεν παρατηρήθηκε σημαντική μεταβολή στην ποσοστιαία κατανομή των λιπαρών οξέων. Στο Γράφημα 4.5 φαίνεται πώς μεταβλήθηκε η ποσοστιαία κατανομή του εκάστοτε λιπαρού οξέος, στις διάφορες ζυμώσεις βυθού για το στέλεχος DSM 4444.



Γράφημα 4.5: Ποσοστιαία κατανομή των λιπαρών οξέων κατά την αύξηση του στελέχους DSM 4444 σε υπόστρωμα ξυλόζης για τις διάφορες συγκεντρώσεις SL.

Όσον αφορά το παλμιτικό οξύ (C16:0), μπορεί κανείς να διαπιστώσει πως το ποσοστό του στη ζύμωση αναφοράς έφτασε το 25,9% και στη ζύμωση με την προσθήκη 10 g/L SL αυξήθηκε φθάνοντας έφθασε το 28,1%. Περαιτέρω αύξηση παρατηρήθηκε στη ζύμωση με την προσθήκη 20 g/L SL φθάνοντας το 33%, ενώ στη ζύμωση με την προσθήκη των 40 g/L SL μειώθηκε φθάνοντας το 31%. Για το στεατικό οξύ (C18:0), το μέγιστο ποσοστό του παρατηρήθηκε κατά την ζύμωση με την προσθήκη 20 g/L SL παίρνοντας τιμή 11,7% και το μικρότερο ποσοστό, της τάξεως του 6,9%, στη ζύμωση των 40 g/L. Το κυρίαρχο λιπαρό οξύ ήταν το ελαϊκό οξύ (Δ^9 C18:1), του οποίου η ποσοστιαία κατανομή κυμάνθηκε στα ίδια επίπεδα για όλες της ζυμώσεις σε ποσοστά από 56,2 % έως 58,2%. Σε πολύ μικρότερα ποσοστά ανιχνεύθηκε το λινελαϊκό οξύ ($\Delta^{9,12}$ C18:2) και το α-λινολενικό οξύ ($\Delta^{9,12,15}$ C18:3). Τα ποσοστά και των δύο αυτών λιπαρών οξέων δεν μεταβλήθηκαν σημαντικά στις επιμέρους ζυμώσεις. Για το λινελαϊκό οξύ ($\Delta^{9,12}$ C18:2), βρέθηκε πως υπάρχει σε μεγαλύτερο ποσοστό στη ζύμωση των 10 g/L SL, με τιμή 9.5%. Τέλος, η ποσοστιαία κατανομή του α-λινολενικού οξέος ($\Delta^{9,12,15}$ C18:3) παρουσίασε εύρος της τάξεως 1,2% έως 1,5%.



Γράφημα 4.6: Ποσοστιαία κατανομή των λιπαρών οξέων κατά την αύξηση του στελέχους NRRL Y-27012 σε υπόστρωμα ξυλόζης για τις διάφορες συγκεντρώσεις SL.

Όπως και στις ζυμώσεις του στελέχους DSM 4444, έτσι και εδώ δεν υπάρχει κάποιος γενικός κανόνας για το πώς επιδρά η συγκέντρωση του λιγνοσουλφονικού νατρίου στην ποσοστιαία κατανομή των λιπαρών οξέων. Το μεγαλύτερο ποσοστό του στεατικού οξέος (C18:0) παρατηρήθηκε στη ζύμωση αναφοράς και έφτασε το 30,2%. Το στεατικό οξύ (C18:0) έφτασε το 11,7% στη ζύμωση των 20 g/L SL. Το ελαϊκό οξύ (Δ^9 C18:1), στη ζύμωση αναφοράς, έφτασε το ποσοστό 51,6%. Προσθήκη λιγνοσουλφονικού άλατος οδήγησε σε αύξηση του ποσοστού αυτού, με το μεγαλύτερο

ποσοστό να επιτυγχάνεται στη ζύμωση με την προσθήκη 20 g/L SL, με τιμή 58,1%. Η προσθήκη λιγνοσουλφονικού νατρίου και για τις τρεις συγκεντρώσεις των 10, 20 και 40 g/L, αντίστοιχα, φάνηκε να επιφέρει μικρή μείωση της ποσοστιαίας κατανομής του λινελαϊκού οξέος ($\Delta^{9,12}$ C18:2) και του α -λινολενικού οξέος ($\Delta^{9,12,15}$ C18:3), αφού τα μεγαλύτερα ποσοστά τους βρέθηκαν στις ζυμώσεις αναφοράς, 10,6% για το λινελαϊκό οξύ ($\Delta^{9,12}$ C18:2) και 1,8% για το α -λινολενικό οξύ ($\Delta^{9,12,15}$ C18:3). Συγκρίνοντας την ζύμωση που πραγματοποιήθηκε στο βιοαντιδραστήρα με την ζύμωση βυθού, στην οποία έγινε προσθήκη 10 g/L SL για το στέλεχος NRRL Y-27012, βγαίνουν τα ακόλουθα συμπεράσματα: τα ποσοστά του παλμιτικού οξέος (C16:0) κυμάνθηκαν στα ίδια επίπεδα και στα δύο είδη ζύμωσης, ενώ το ποσοστό του στεατικού οξέος (C18:0) ήταν μεγαλύτερο στη ζύμωση βυθού (7,7%). Το ελαϊκό οξύ (Δ^9 C18:1), στη ζύμωση του βιοαντιδραστήρα, έφτασε τα 63,4%, ενώ στη ζύμωση βυθού το ποσοστό ήταν αρκετά μικρότερο (58%). Η ποσοστιαία κατανομή του λινελαϊκού οξέος ($\Delta^{9,12}$ C18:2) ήταν μεγαλύτερη στη ζύμωση του βιοαντιδραστήρα (11%). Τέλος, το α -λινολενικό οξύ ($\Delta^{9,12,15}$ C18:3) βρέθηκε σε πολύ μικρά ποσοστά στη ζύμωση βυθού, ενώ στην ημισυνεχή ζύμωση που πραγματοποιήθηκε σε βιοαντιδραστήρα δεν ανιχνεύθηκε.

Συνοψίζοντας προκύπτουν τα ακόλουθα συμπεράσματα:

- Η ζύμωση που πραγματοποιήθηκε στο βιοαντιδραστήρα οδήγησε σε αξιοσημείωτη παραγωγή βιομάζας και ενδοκυτταρικού λίπους. Η βιομάζα έφθασε τα 29,7 g/L και το λίπος τα 17,00 g/L ($Y_{L/X} = 0,57$ g/g).
- Η προσθήκη λιγνοσουλφονικού νατρίου σε συγκέντρωση 10 g/L και 20 g/L στο θρεπτικό μέσο της καλλιέργειας προκάλεσε αύξηση της παραγωγής του μικροβιακού λίπους και για τα δύο στελέχη της ζύμης *R.toruloides*.
- Προσθήκη 40 g/L λιγνοσουλφονικού νατρίου δεν προκάλεσε κάποια επίδραση όσον αφορά την παραγωγή του λίπους σε σχέση με τη ζύμωση αναφοράς. Το συμπέρασμα αυτό ισχύει και για τα δύο στελέχη.
- Προσθήκη λιγνοσουλφονικού νατρίου σε συγκεντρώσεις 10 g/L 20 g/L και 40 g/L, αντίστοιχα, ενίσχυσε την παραγωγή βιομάζας των δύο στελεχών. Παρατηρήθηκε πως όσο μεγάλωνε η συγκέντρωση του SL που προστίθετο, τόσο αυξανόταν η συγκέντρωση της βιομάζας.
- Παρατηρήθηκε και για τα δύο στελέχη, πως όσο μεγάλωνε η συγκέντρωση λιγνοσουλφονικού νατρίου, που προστίθετο στο μέσο καλλιέργειας, τόσο μειωνόταν ο συντελεστής $Y_{IPS/X}$.
- Η προσθήκη λιγνοσουλφονικού νατρίου σε όλες τις συγκεντρώσεις δεν προκάλεσε κάποια σημαντική μεταβολή στη σύνθεση των λιπαρών οξέων και για τα δύο στελέχη.

Τα συμπεράσματα της παρούσας ερευνητικής μελέτης, που παρατίθενται και αναλύονται παραπάνω, αποδεικνύουν ότι η προσθήκη λιγνοσουλφονικού νατρίου στο θρεπτικό υπόστρωμα της καλλιέργειας της ζύμης *R.toruloides* ασκεί θετική επίδραση στην κυτταρική ανάπτυξη και στην παραγωγή μικροβιακού λίπους. Τα εν λόγω συμπεράσματα ενισχύουν το ενδιαφέρον γύρω από τα μικροβιακά λιπίδια ως ερευνητικό πεδίο. Επιπλέον, δικαιολογούν την ολοένα και μεγαλύτερη προσοχή που λαμβάνουν τα μικροβιακά λιπίδια από την επιστημονική κοινότητα, ως εναλλακτική πρώτη ύλη (μη-τροφική), για την παραγωγή 2^{ης} γενιάς βιοντήζελ. Είναι, λοιπόν, πολύ σημαντικό να συνεχίζονται οι έρευνες για το πώς μπορεί να ενισχυθεί η παραγωγή μικροβιακού λίπους από ελαιογόνες ζύμες.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Abomohra, A.E-F., Jin, W., Tu, R., Han, S-F., Eid, M., Eladel, H., (2016). Microalgal biomass production as a sustainable feedstock for biodiesel: Current status and perspectives. *Renew. Sust. Energ. Rev.* 64, 596-606.
- AFNOR. (1984): Recueil des normes françaises des corps gras, grains oléagineux et produits dérivés. 3rd éd. Paris: Association Française pour normalisation, 95.
- Ageitos J.M., Vallejo J.A., Veiga Crespo P. and Villa T.G. (2011). Oily yeasts as oleaginous cell factories, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 90, 1219-12227.
- Akada R., Minomi K., Kai J., Yamashita I., Miyakawa T. and Fukui S. (1989). Multiple Genes Coding for Precursors of Rhodotorucine A, a Farnesyl Peptide Mating Pheromone of Basidiomycetous Yeast *Rhodosporidium toruloides*, *Mol. Cell Bio.* Vol 9 N. 8, 3491-3498.
- Alexandri M., Papapostolou H., Komaitis M., Stragier L., Verstraete W., Danezis G., Georgiou C., Ppanikolaou S., Koutinas A. (2016). Evaluation of an integrated biorefinery based on fractionation of spent sulphite liquor for the production of an antioxidant-rich extract, lignosulphonates and succinic acid. *Bioresource Technology* 214, 504–513.
- Bommareddy R.R., Sabra W., Maheshwari G., Zeng A.P. (2015). Metabolic network analysis and experimental study of lipid production in *Rhodosporidium toruloides* grown on single and mixed substrates. *Microb. Cell Fact.* 14, 36.
- Chakrabarty K., Krishna K.V., Saha P. and Ghoshal A.K., Membrane J. (2009). Extraction and recovery of lignosulfonate from its aqueous solution using bulk liquid membrane. *J. Membr. Sci.*, 330, 135-144.
- Chatzifragkou A., Papanikolaou S. (2012). Effect of impurities in biodiesel-derived waste glycerol on the performance and feasibility of biotechnological processes. *Appl Microbiol Biotechnol* 95, 13-27
- Clements A., Tull D., Jenney A., Farn J., Kim S., Bishop R., et al. (2007). Secondary acylation of *Klebsiella pneumonia* lipopolysaccharide contributes to sensitivity to antibacterial peptides. *J Biol Chem* 282, 15569-77.
- Da Silva T.L., Feijao D., Roseiro J.C., Reis A. (2011). Monitoring *Rhodotorula glutinis* CCM1 145 physiological response and oil production growing on xylose and glucose using multi-parameter flow cytometry, *Bioresour. Technol.* 102, 2998–3006.
- Diamantopoulou P., Papanikolaou S., Kapoti M., Komaitis M., Aggelis G., Philippoussis A. (2012a). Mushroom polysaccharides and lipids synthesized in liquid agitated and static cultures. Part I: Screening various mushroom species. *Appl Biochem Biotechnol* 167, 536-551.
- Diamantopoulou P., Papanikolaou S., Katsarou E., Komaitis M., Aggelis G., Philippoussis A. (2012b). Mushroom polysaccharides and lipids synthesized in liquid agitated and static cultures. Part II: Study of *Volvariella volvacea*. *Appl Biochem Biotechnol* 167, 1890-1906.
- Doherty W.O.S., Mousavioun P., Fellows C.M. (2011). Value-adding to cellulosic ethanol: Lignin polymers. *Ind.Crop. Prod.*, 33, 259-276.

- Fei Q., Chang H., Shang L., Choi J. (2011). Exploring low-cost carbon sources for microbial lipids production by fed-batch cultivation of *Cryptococcus albidus*. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 16, 482–487.
- Feria M.J., Garcia J.C., Zamudio M.A.M., Gomide J.L., Colodette J.L., López F. (2013). Kraft pulping and bleaching of paulownia wood. *Cellulose Chem. Technol.*, 47, 595-601.
- Fišerová M., Opálená E. and Maholányiová M. (2013). *Cellulose Chem. Technol.*, 47, 583.
- Folch J., Lees M., Sloane –Stanley G. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry* 199, 833-841.
- Galabova D., Tuleva B., Spasova D. (1996). Permeabilization of *Yarrowia lipolytica* cells by Triton X-100. *Enzyme Microb Technol* 18:18–22.
- Galiotou-Panayotou M., Kalatzi O., Aggelis G. (1998). Modeling of simultaneous production of polygalacturonase and exopolysaccharide by *Aureobasidium pullulans* ATHUM 2915. *Antonie Van Leeuwenhoek* 73, 155-162.
- Gong Z., Wang Q., Shen H., Hu C., Jin G., Zhao Z.K. (2012). Co-fermentation of cellobiose and xylose by *Lipomyces starkeyi* for lipid production, *Bioresour. Technol.* 17, 20–24.
- Koutinas A., Chatzifragkou A., Kopsahelis N., Papanikolaou S., Kookos I. (2014). Design and techno-economic evaluation of microbial oil production as a renewable resource for biodiesel and oleochemical production. *Fuel* 116, 566-577.
- Leiva-Candia D. E., Tsakona S., Kopsahelis N., Garcia I.L. et al., (2015). Biorefining of by-product streams from sunflower-based biodiesel production plants for integrated synthesis of microbial oil and value added co-products. *Bioresour. Technol.* 190, 57-65.
- Li Y., Zhao Z.K. and Bai F. (2007). High-density cultivation of oleaginous yeast *Rhodosporidium toruloides* Y4 in fed-batch culture, *Enzyme Microb. Technol.* 41, 312–317.
- Li Y., Liu B., Zhao Z.B. and Bai F.W. (2006). Optimization of Culture Conditions for lipid production by *Rhodosporidium toruloides*, *Chin. J. Biotechnol.* 22, 650-656.
- Lin J.P., Cen P.L., Guan Y.X. (2005). *Bioreaction engineering*. Beijing Higher Education Press.
- Los D.A., Mironov K.S., Allakhverdiev S.I. (2013). Regulatory role of membrane fluidity in gene expression and physiological functions. *Photosynth Res* 116, 489–509.
- Miller G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* 31 (3), 426-428.
- Moreton R.S. (1988). Physiology of lipid accumulating yeasts, in: Moreton R.S. (Ed.), *Single Cell Oil*, Longman Scientific & Technical Harlow, UK 1-31.
- Papanikolaou S., Aggelis G. (2011a). Lipids of oleaginous yeasts. Part I: Biochemistry of single cell oil production, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 113(8), 1031-1051.
- Papanikolaou S., Aggelis G. (2011b). Lipids of oleaginous yeasts. Part II: Technology and potential applications, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 113, 1052–1073.

- Qiu X., Kong Q., Zhou M., Yang D. (2010). Aggregation behavior of sodium lignosulfonate in water solution. *J Phys Chem B* 114, 15857–61.
- Rana D., Neale G.H., Hornof V. (2002). Surface tension of mixed surfactant systems: lignosulfonate and sodium dodecyl sulfate. *Colloid Polym Sci* 280, 775–8.
- Ratledge C., Wynn J. (2002). The biochemistry and molecular biology of lipid accumulation in oleaginous microorganisms. *Adv Appl Microbiol.* 51, 1-51.
- Ratledge C., Wynn J.P. (2006). Microbial production of oils and fats. In: *Food Biotechnology, Second Edition*. Taylor & Fancis, 460-481.
- Riemersma J.C. (1966). The effect of pH and temperature on the lysis of yeast cells by cationic dyes and surfactants. *J Pharm Pharmacol* 18, 602–10.
- Rodriguez-Vargas S., Sanchez-Garcia A., Martinez-Rivas J.M., Prieto J.A., Randez-Gil F. (2007). Fluidization of membrane lipids enhances the tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* to freezing and salt stress. *Appl Environ. Microb.* 73, 110–6.
- Sitepu I.R., Garay L.A., Sestric R., Levin D., Block D.E., German J.B., Boundy-Mills K.L. (2014a). Oleaginous yeasts for biodiesel: current and future trends in biology and production. *Biotechnol. Adv.* 32(7), 1336-1360.
- Soccol C., Dalmas N., Soccol T., Bittencourt S, Ferreira S., Pedroni B., Souza L. (2016). Pilot scale biodiesel production from *Rhodospiridium toruloides* DEBB 5533 microbial oil using sugarcane juice: Performance in diesel engine and preliminary economic study. *Bioresour Technol.* S0960-8524 31461-4.
- Tanimura A., Takashima M., Sugita T., Endoh R., Kikukawa M., Yamaguchi S., Sakuradan E., Ogawa J., Shima J. (2014). Selection of oleaginous yeasts with high lipid productivity for practical biodiesel production, *Bioresour. Technol.* 153, 230–235.
- Tchakouteu S.S., Kalantzi O., Gardeli C., Koutinas A., et al. (2015). Lipid production by yeasts growing on biodiesel-derived crude glycerol: Strain selection and impact of substrate concentration on the fermentation efficiency. *J. Appl. Microbiol.* 118, 911-927
- Tchakouteu S.S., Kopsahelis N., Chatzifragkou A., Kalantzi O., Stoforos N., Koutinas 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
- Wei G.Y., Li Y., Du G.C., Chen J. (2003). Effect of surfactants on extracellular accumulation of glutathione by *Saccharomyces cerevisiae*. *Process Biochem* 38, 1133–8.
- Wiebe M.G., Koivuranta K., Penttilä M., Ruohonen L. (2012). Lipid production in batch and fed-batch cultures of *Rhodospiridium toruloides* from 5 and 6 carbon carbohydrates, *BMC Biotechnology* 12, 26.
- Wu M., Yang T., Miao M., Ni J. (2009). Improvement of cell permeability on bioproduction of 1,3-propanediol. *Acta Chim Sin* 67, 2133-8.
- Wu S., Hu C., Jin G., Zhao X. and Zha Z.K. (2010). Phosphat-limitation mediated lipid production by *Rhodospiridium toruloides*, *Biores. Technol.* 101, 6124–612.

- Wu S., Zhao X., Shen H., Wang Q. and Zhao K.Z. (2011). Microbial lipid production by *Rhodospiridium toruloides* under sulfate-limited conditions, *Biores. Technol.* 102, pp. 1803-1807.
- Xiang Y., Xu W., Xia X., Xiong Y., Chen L. (2010). Lately progress of lignosulfonate research and main application. *Polym Bull* 99–104.
- Xu J., Zhao X., Wang W., Du W., Liu D. (2012). Microbial conversion of biodiesel byproduct glycerol to triacylglycerols by oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides* and the individual effect of some impurities on lipid production. *Biochem. Eng. J.* 65, 30-36
- Xu J., Du W., Zhao X., Liu D. (2015). Exploration of sodium lignosulfonate's effects on lipid production by *Rhodospiridium toruloides*, *Process Biochemistry* 50, 424–43.
- Yen H.W., Zhang Z.Y. (2011). Effects of dissolved oxygen level on cell growth and total lipid accumulation in the cultivation of *Rhodotorula glutinis*. *J Biosci Bioeng* 112, 71-4.
- Zhao X., Peng F., Du W., Liu C., Liu D. (2012). Effects of some inhibitors on the growth and lipid accumulation of oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides* and preparation of biodiesel by enzymatic transesterification of the lipid, *Bioprocess Biosyst. Eng.* 35, 993–1004.
- Zhu Z., Zhang S., Liu H., Shen H., Lin X., Yang F., Zhou Y.J., Jin G., Ye M., Zou H., Zhao Z.Z. (2012). A multi-omic map of the lipid-producing yeast *Rhodospiridium toruloides*, *Nat. Commun.* 3:1112 doi: 10.1038/ncomms 2112.