

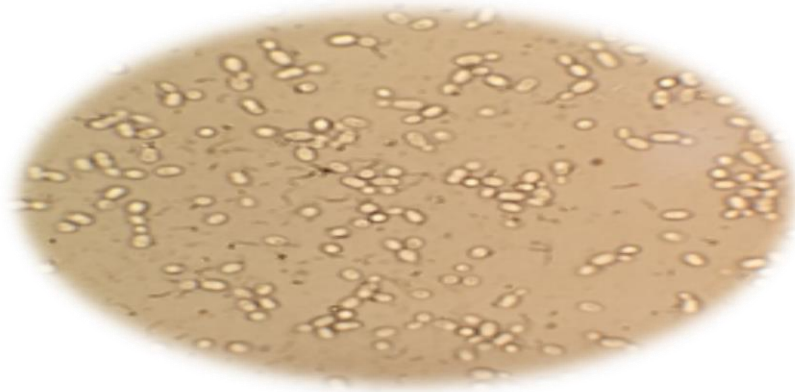


ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ: ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ &
ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ
ΠΜΣ: ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ & ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ &
ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ
ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ: ΒΙΟΔΙΕΡΓΑΣΙΩΝ ΤΡΟΦΙΜΩΝ &
ΒΙΟΔΙΥΛΙΣΤΗΡΙΩΝ**

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

ΘΕΜΑ: «Επίδραση διαφόρων πηγών άνθρακα στην σύσταση λιπιδίων και δευτερογενών μεταβολικών προϊόντων της ζύμης *Rhodosporidium toruloides*»



Έλλη-Άννα Γ. Σινάπη
Επιβλέπων: Παπανικολάου Σεραφείμ

Αθήνα, 2019

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

ΘΕΜΑ: «Επίδραση διαφόρων πηγών άνθρακα στην σύσταση λιπιδίων και δευτερογενών μεταβολικών προϊόντων της ζύμης *Rhodosporidium toruloides*»

«Effect of various carbon sources on the composition of lipid and secondary metabolic products of the yeast *Rhodosporidium toruloides*»

Έλλη-Άννα Γ. Σινάπη

Εξεταστική επιτροπή:

Επιβλέπων: Παπανικολάου Σεραφείμ, Αναπληρωτής Καθηγητής

A' Μέλος: Κουτίνας Απόστολος, Αναπληρωτής Καθηγητής

B' Μέλος: Διαμαντοπούλου Παναγιώτα, Αναπληρώτρια Ερευνήτρια

ΕΛΓΟ-ΔΗΜΗΤΡΑ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να εκφράσω τις ειλικρινείς μου ευχαριστίες σε όλους όσους συνέβαλαν στο να φέρω εις πέρας την παρούσα Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία. Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Επιβλέπων της εργασίας αυτής, κ. Σεραφείμ Παπανικολάου για την πολύτιμη βοήθειά του και τη διαρκή υποστήριξή του, τόσο κατά τη διεξαγωγή των πειραματικών διαδικασιών, όσο και κατά τη συγγραφή της παρούσας εργασίας, καθώς και τα άλλα δύο μέλη της εξεταστικής επιτροπής τον κ. Απόστολο Κουτίνα και την κ. Παναγιώτα Διαμαντοπούλου για τις χρήσιμες συμβουλές τους και την καθοδήγησή τους καθ' όλα τα στάδια διεκπεραίωσης της εργασίας.

Ξεχωριστά θέλω να ευχαριστήσω την υποψήφια διδάκτορα Ροζανίνα Φιλιπούση για την αποτελεσματική συνεργασία και καθοδήγηση της, καθώς χωρίς την πολύτιμη βοήθεια της η εκπόνηση της παρούσας μελέτης δε θα μπορούσε να είχε ολοκληρωθεί.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους: κ. Ουρανία Καλατζή, Έρη Τσούκο, Σαββούλα Μίχου, Ελένη Βασταρούχα και Ελίνα Κόπανου για τη σημαντική βοήθεια τις πολύτιμες συμβουλές και υποδείξεις τους καθ' όλη τη διάρκεια της διεξαγωγής των πειραμάτων.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου για την αμέριστη συμπαράσταση, βοήθεια και προ πάντων κατανόηση και ανοχή καθ' όλο το χρονικό διάστημα των σπουδών μου.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	8
1.1 Βιοντίζελ	9
1.2 Ελαιογόνοι μικροοργανισμοί	14
1.3 Η ζύμη <i>Rhodosporidium toruloides</i>	16
1.4 Οι πηγές άνθρακα στη βιοτεχνολογική παραγωγή μικροβιακού λίπους.....	17
1.4.1 Γλυκόζη.....	17
1.4.2 Γλυκερόλη.....	18
1.4.3 Ξυλόζη.....	21
1.4.4 Μαννόζη.....	23
1.4.5 Αραβινόζη	23
1.4.5 Γαλακτόζη.....	25
1.5 Βιοσυσσώρευση λίπους	25
1.6 Κλάσματα λιπιδίων.....	28
1.7 Σκοπός της ερευνητικής μελέτης.....	29
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	30
2.1 Βιολογικό υλικό.....	31
2.2 Θρεπτικά υποστρώματα.....	31
2.2.1 Παρασκευή προκαλλιέργειας	31
2.2.2 Παρασκευή κυρίως καλλιέργειας	32
2.3. Αναλύσεις.....	33
2.3.1 Προσδιορισμός βιομάζας	33
2.3.2 Προσδιορισμός ενδοπολυσακχαριτών (IPS)	34
2.3.3 Ποσοτικός προσδιορισμός ενδοκυτταρικού λίπους.....	34
2.3.4 Μεθυλεστεροποίηση	35

2.3.5 Ανάλυση στον αέριο χρωματογράφο (GC).....	36
2.3.6 Προσδιορισμός Σακχάρων	36
2.3.7 Κλασμάτωση λιπιδίων	37
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	39
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	65

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η διερεύνηση της ικανότητας της ελαιογόνου ζύμης *Rhodosporidium toruloides* να μεταβολίζει διαφορετικές πηγές άνθρακα προς παραγωγή βιομάζας, ενδοπολυσακχαριτών και λιπιδίων, καθώς και η επίδραση της εκάστοτε πηγής άνθρακα στη σύσταση των λιπαρών οξέων τα οποία αποτελούν το πρόδρομο στάδιο για την παραγωγή 2^{ns} γενιάς βιοντίζελ.

Στα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος *Rhodosporidium toruloides* NRRL Y-27012. Οι πηγές άνθρακα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν η γλυκόζη, η γλυκερόλη, η μαννόζη, η ξυλόζη, η αραβινόζη και η γαλακτόζη. Όλες οι ζυμώσεις έλαβαν χώρα σε περιοριστικές σε άζωτο συνθήκες. Αρχικά πραγματοποιήθηκαν καλλιέργειες βυθού σε κωνικές φιάλες Erlenmeyer των 250 mL, χρησιμοποιώντας κάθε φορά μία από τις πηγές άνθρακα που προαναφέρθηκαν με αρχική συγκέντρωση 60 g L⁻¹. Οι συνθήκες όλων των ζυμώσεων ήταν pH= 5.5±0.2, σε σταθερές συνθήκες ανάδευσης 180±5 rpm και θερμοκρασίας στους 28±1 °C. Ως πηγές αζώτου χρησιμοποιήθηκαν πεπτόνη 1 g L⁻¹ και yeast extract σε συγκέντρωση 2 g L⁻¹.

Σε όλες τις παραπάνω ζυμώσεις πραγματοποιήθηκε ο ποσοτικός προσδιορισμός της ξηρής βιομάζας, των ενδοπολυσακχαριτών, καθώς και του παραγόμενου μικροβιακού λίπους. Το παραγόμενο λίπος ύστερα από μεθυλεστεροποίηση που πραγματοποιήθηκε οδηγήθηκε για ανάλυση στον αέριο χρωματογράφο. Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε διαχωρισμός των λιπιδίων στα κλάσματα τους (ουδέτερα, σφιγγο-γλυκολιπίδια, φωσφολιπίδια) και στη συνέχεια έλαβε χώρα ο ποσοτικός και ποιοτικός προσδιορισμός των λιπαρών οξέων τους.

Συνοψίζοντας, η ζύμωση που πραγματοποιήθηκε με υπόστρωμα τη γλυκερόλη οδήγησε σε αξιοσημείωτη παραγωγή βιομάζας και ενδοκυτταρικού λίπους. Η βιομάζα έφθασε τα 21.0 g L⁻¹ και το λίπος τα 8.57 g L⁻¹. Σε όλες τις ζυμώσεις τα ποσοστά των παραγόμενων ενδοπολυσακχαριτών μειώνονταν κατά τη διάρκεια της ζύμωσης, ενώ το μέγιστο ποσοστό παρατηρήθηκε στη ζύμωση με υπόστρωμα τη γλυκόζη με 26.0%. Με τη βοήθεια της αέριας χρωματογραφίας βρέθηκε ότι το μικροβιακό λίπος που παράχθηκε αποτελούνταν από τα ακόλουθα λιπαρά οξέα: Μυριστικό οξύ (C14:0), Παλμιτικό οξύ (C16:0), Παλμιτελαϊκό οξύ (^{Δ9}C16:1),

Στεατικό οξύ (C18:0), Ελαϊκό οξύ (Δ^9 C18:1) και το Λινελαϊκό οξύ ($\Delta^9, 12$ C18:2). Κυρίαρχο λιπαρό οξύ σε όλες τις ζυμώσεις αποτέλεσε το Ελαϊκό οξύ (Δ^9 C18:1). Για όλες τις ζυμώσεις τα κλάσματα των λιπιδίων είχαν την εξής κατανομή: ουδέτερα λίπη σε ποσοστό 80%, σφιγγο-γλυκολιπίδια σε ποσοστό 15% και φωσφολιπίδια σε ποσοστό μόλις 5%.

Λέξεις κλειδιά: *Rhodosporidium toruloides*, διαφορετικές πηγές άνθρακα, μικροβιακό λίπος, ελαιογόνος ζύμη.

ABSTRACT

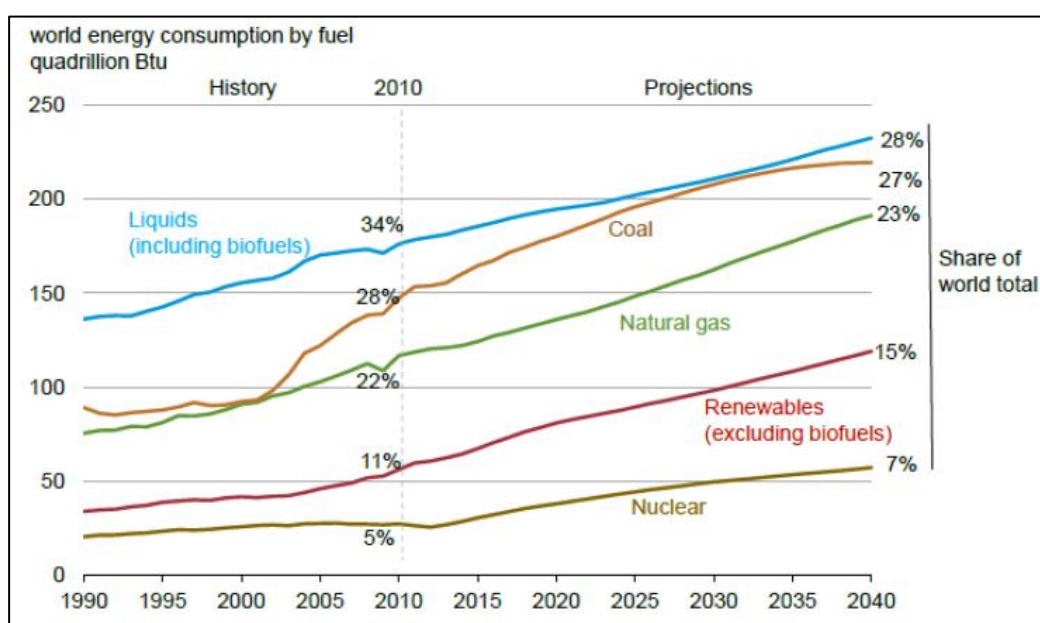
The aim of the present study is to investigate the ability of *Rhodospiridium toruloides* to metabolize different carbon sources in order to produce biomass, intracellular polysaccharide and lipids, as well as the effect of each carbon source on the composition of fatty acids, which are precursors substances for the production of 2nd generation biodiesel. The strain *Rhodospiridium toruloides* NRRL Y-27012 was used in the experiments. The carbon sources used were glucose, glycerol, mannose, xylose, arabinose and lactose. All fermentations conducted in nitrogen-limiting conditions, in submerged cultures were carried out in 250 mL Erlenmeyer flasks, using each of the above mentioned carbon sources at an initial concentration of 60 g L⁻¹. All fermentations were carried out in the same conditions (pH= 5.5±0.2, 180±5 rpm, 28±1 °C). As carbon sources used peptone 1 g L⁻¹ and yeast extract 2 g L⁻¹. Dry cell weight, the intracellular polysaccharides and produced microbial oil were quantified. The produced oil was analyzed by using gas chromatography. In addition, lipids were separated into their fractions (neutral lipids, shingolipids-glycolipids, phospholipids) and then quantitative and qualitative determination of their fatty acids took place. To conclude, the fermentation performed with glycerol resulted in remarkable biomass and intracellular lipid production. Biomass reached 21.0 g L⁻¹ and fat 8.57 g L⁻¹. In all fermentations, intracellular polysaccharides in dry cell weight decreased during fermentation, with the highest percentage observed in the fermentation with glucose substrate by 26.0%. Gas chromatography revealed that the microbial fat produced consisted of the following fatty acids: Myristic acid (C14:0), Palmitic acid (C16:0), Palmitoleic acid (^Δ9C16:1), Stearic acid (C18:0), Oleic acid (^Δ9C18:1) and Linoleic acid (^Δ9, 12C18:2). Oleic acid was the dominant fatty acid in all fermentations (^Δ9C18:1). In all fermentations the lipid fractions had the following distribution: neutral lipids at 80%, shingolipids-glycolipids at 15% and phospholipids at only 5%.

Keywords: *Rhodospiridium toruloides*, different sources of carbon, microbial fat, oleaginous yeast.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Βιοντίζελ

Το **βιοντίζελ** (FAME: fatty acid methyl ester) παράγεται από φυτικά έλαια, ζωικά λίπη, διάφορες ενεργειακές καλλιέργειες, φύκη, αλλά και ποικίλα ανακυκλωμένα λάδια. Το βιοντίζελ ανήκει στη μεγάλη οικογένεια των ανανεώσιμων καυσίμων και είναι το πλέον γνωστό και διαδεδομένο από τα βιοκαύσιμα. Η συνήθης χρήση του είναι ως καύσιμο σε ντιζελοκινητήρες και τούτο διότι η χημική του σύσταση είναι παραπλήσια με αυτή του ορυκτού ντίζελ, δηλαδή του πετρελαίου κίνησης που προέρχεται από την δύλιση του αργού πετρελαίου.



Διάγραμμα 1. Το ποσοστό συνεισφοράς των διάφορων μορφών ενέργειας στη παγκόσμια ενεργειακή κατανάλωση (EIA, International Energy Outlook 2013)

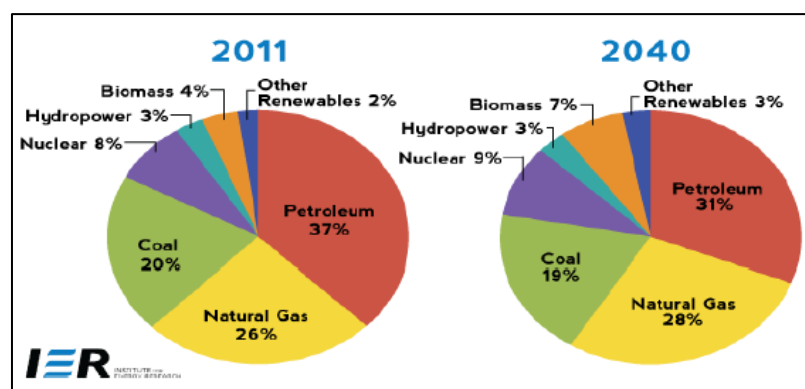
Η καύση του σε κινητήρες οχημάτων υποκαθιστά το πετρέλαιο κίνησης στις μεταφορές, με ευεργετικές για τους κινητήρες, την ατμόσφαιρα και το περιβάλλον επιδράσεις. Θεωρείται το καθαρότερο καύσιμο μετά το αέριο, λόγω των μειωμένων ρύπων που εκλύονται με την καύση του. Η αυξημένη διαλυτική του ιδιότητα έχει σαν αποτέλεσμα τη μείωση των κατάλοιπων καύσης και των επικαθίσεων στον κινητήρα. Εν γένει δρα ως βελτιωτικό καύσης.

Οι νεώτερης τεχνολογίας ντιζελοκινητήρες, ανάλογα με τις προδιαγραφές της χώρας, μπορεί να είναι σχεδιασμένοι και για καύση αυτούσιου βιοντίζελ, αλλά καλό

είναι αυτό να επιβεβαιώνεται από τον κατασκευαστή. Υπάρχουν χώρες στις οποίες διατίθεται αυτούσιο βιοντίζελ, κανονικά, ως προϊόν, σε πρατήρια υγρών καυσίμων.

Οφέλη της χρήσης βιοκαυσίμων στον τομέα των μεταφορών:

- ❖ Βελτιωμένη ποιότητα του αέρα στις αστικές περιοχές, μείωση του CO₂ αλλά και γενικότερη μείωση των εκπομπών αερίων του θερμοκηπίου.
- ❖ Μείωση της εξάρτησης από το πετρέλαιο.
- ❖ Δημιουργία νέων ευκαιριών για βιώσιμη αγροτική ανάπτυξη και συνεπώς αναθέρμανση της αγροτικής οικονομίας.
- ❖ Δημιουργία νέων βιομηχανικών μονάδων στο τομέα παραγωγής βιοκαυσίμων, επομένως νέες θέσεις εργασίας αλλά και επενδυτικών ευκαιριών.
- ❖ Συμβολή στην επίτευξη των στόχων για εξοικονόμηση ενέργειας, διαφοροποίηση ενεργειακών πόρων και ασφάλειας εφοδιασμού καυσίμων.(www.ypeka.gr).

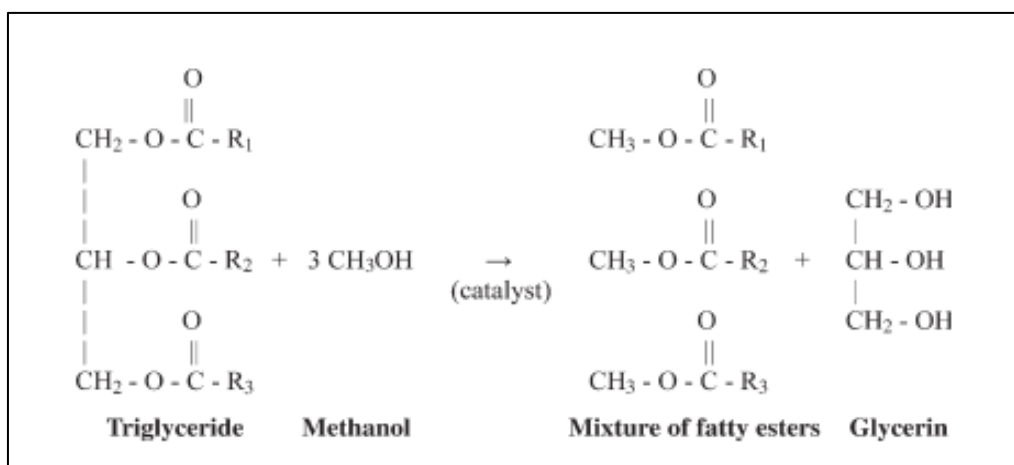


Διάγραμμα 2. Το ποσοστό των ανανεώσιμων πηγών ενέργειας στη παγκόσμια κατανομή και η αναμενόμενη πορεία

Παρόλα τα οφέλη η διείσδυση των βιοκαυσίμων στην ελληνική αγορά παραμένει σε χαμηλότερα επίπεδα σε σχέση με άλλες ευρωπαϊκές χώρες αν και οι εγχώριες εταιρίες παραγωγής βιοντίζελ διαθέτουν υψηλό παραγωγικό δυναμικό, το οποίο όμως αξιοποιείται σε περιορισμένο βαθμό.

Το βιοντίζελ είναι ένα εναλλακτικό καύσιμο ντίζελ το οποίο όπως προαναφέρθηκε παράγεται από φυτικά έλαια και ζωικά λίπη. Αποτελείται από τους μονοαλκυλ-εστέρες που σχηματίζονται από την καταλυόμενη αντίδραση των

τριγλυκεριδίων στο έλαιο ή το λίπος με μια απλή μονοϋδρική αλκοόλη. (Jon VanGerpen, 2005). Το βιοντίζελ δεδομένου ότι προέρχεται από φυτικές πηγές και όχι από το πετρέλαιο είναι βιοδιασπώμενο και λιγότερο τοξικό. Επιπλέον, σε σχέση με το συμβατικό ντιζελ, τα προϊόντα καύσης του έχουν μειωμένα επίπεδα σωματιδίων, οξειδίων του άνθρακα, οξειδίων του θείου και υπό ορισμένες συνθήκες, οξειδίων του αζώτου. Έτσι θεωρείται μια από τις πιο σημαντικές ανανεώσιμες πηγές ενέργειας (Papanikolaou & Aggelis, 2009; Wen *et al.*, 2009a).



Εικόνα 1. Αντίδραση μετεστεροποίησης τριγλυκεριδίου

Οι διαφορές στο προφίλ των λιπαρών οξέων που υπάρχουν από τις διαφορετικές πηγές μπορούν να επηρεάσουν τις ιδιότητες του βιοντίζελ. Τα δομικά χαρακτηριστικά που επηρεάζουν τις φυσικές ιδιότητες του καυσίμου ενός λιπαρού εστέρα είναι το μήκος της αλυσίδας, ο βαθμός ακορεστότητας και η διακλάδωση της αλυσίδας (Knothe, 2005). Τα έλαια με υψηλά μονοακόρεστα λιπαρά οξέα ευνοούν την υψηλότερη απόδοση του βιοντίζελ. Ομοίως, η υψηλότερη περιεκτικότητα σε ελεύθερα λιπαρά οξέα (FFA) οδηγεί σε υψηλότερο κόστος παραγωγής και λιγότερη απόδοση βιοντίζελ (Aransiola *et al.*, 2019).

Ωστόσο υπάρχουν και δυσκολίες για την παραγωγή του βιοντίζελ. Για αυτό το λόγο έχει προταθεί η ενζυματική παραγωγή βιοντίζελ για να ξεπεραστούν τα μειονεκτήματα των συμβατικών χημικά καταλυόμενων διεργασιών. Το κύριο εμπόδιο για την ενζυματική παραγωγή είναι το κόστος της (Al-Zuhair, 2007).

Το υψηλό κόστος των πρώτων υλών για τη παραγωγή του βιοντίζελ αποτελεί το κύριο εμπόδιο για την εμπορευματοποίηση του προϊόντος (Leiva – Candia *et al.*, 2014). Επιπλέον, εάν οι πρώτες ύλες προέρχονται από γεωργικές καλλιέργειες, θεωρείται ότι αυτού του είδους το βιοντίζελ συμβάλει στη αύξηση των τιμών των τροφίμων. Αυτά τα εμπόδια έστρεψαν τους επιστήμονες στην εύρεση νέων πρώτων υλών οι οποίες δεν θα ανταγωνίζονται την αλυσίδα εφοδιασμού τροφίμων ενώ και σε συνδυασμό με τη περιβαλλοντική κρίση που αντιμετωπίζει ο πλανήτης δημιουργήθηκε η ανάγκη για αξιοποίηση κάποιων από τα παραγόμενα απόβλητα.

Οι Zhang *et al.*, έδειξαν ότι με τη χρήση αποβλήτου μαγειρεμένου ελαίου για τη παραγωγή βιοντίζελ μειώθηκε το κόστος της πρώτης ύλης. Η καταλυόμενη με οξύ διαδικασία με το χρήση αυτού του αποβλήτου αποδείχθηκε τεχνικά εφικτή και ευκολότερη από την κατάλυση με αλκάλια, καθιστώντας έτσι ανταγωνιστική εναλλακτική λύση στην εμπορική παραγωγή βιοντίζελ.

Ένα ακόμη ενδιαφέρον παράδειγμα είναι η χρήση αποβλήτων ιχθύων που απορρίπτονται κατά την επεξεργασία τους από τη βιομηχανία. Οι Kara *et al.*, (2017) παρήγαγαν βιοντίζελ χρησιμοποιώντας το έλαιο από απορριπτόμενα μέρη των ιχθύων. Τα αποτελέσματα έδειξαν ικανοποιητικές ποσότητες παλμιτικού οξέος, ελαϊκού και λινολενικού οξέος τα οποία είναι απαραίτητα συστατικά για τη παραγωγή βιοντίζελ. Ενώ το τελικό προϊόν δεν περιείχε καθόλου ίχνη γλυκερόλης κάτι που ικανοποιεί τα απαιτούμενα διεθνή πρότυπα.

Ελαιογόνοι μικροοργανισμοί είναι διαθέσιμοι για την υποκατάσταση του συμβατικού ελαίου. Οι περισσότεροι από του ελαιογόνους μικροοργανισμούς όπως είναι: μικροάλγη, βακτήρια, μύκητες και ζύμες είναι διαθέσιμοι για την παραγωγή βιοντίζελ (Meng *et al.*, 2009).

Πίνακας 1. Λιπαρά οξέα που μπορούν να αξιοποιηθούν ως πρώτες ύλες για το βιοντίζελ (Tyson, 2001)

Fatty Acid Name	No of Carbons	Chemical Structure
Caprylic	C8	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_6\text{COOH}$
Capric	C10	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_8\text{COOH}$
Lauric	C12	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{COOH}$
Myristic	C14	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}\text{COOH}$
Palmitic	C16:0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COOH}$
Palmitoleic	C16:1	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_5\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$
Stearic	C18:0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{COOH}$
Oleic	C18:1	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$
Linoleic	C18:2	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$
Linolenic	C18:3	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$
Arachidic	C20:0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{18}\text{COOH}$
Eicosenoic	C20:1	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_9\text{COOH}$
Behenic	C22:0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{20}\text{COOH}$
Eureic	C22:1	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_{11}\text{COOH}$

1.2 Ελαιογόνοι μικροοργανισμοί

Ως ελαιογόνοι μικροοργανισμοί ορίζονται εκείνοι που δύναται να συσσωρεύουν ενδοκυτταρικό λίπος, σε ποσοστό μεγαλύτερο από 20% (w/w) επί της ξηράς ουσίας (Ageitos *et al.*, 2011; Papanikolaou & Aggelis, 2019). Ελαιογόνοι μικροοργανισμοί όπως προαναφέρθηκε μπορεί να είναι ζύμες, μύκητες, βακτήρια ή μικροφύκη. Ορισμένες ζύμες έχουν τη δυνατότητα να συνθέσουν TAGs, με παρόμοια σύνθεση με των φυτικών ελαίων, ενώ τα προκαρυωτικά βακτήρια μπορούν να συνθέσουν συγκεκριμένα λιπίδια. Πολλοί ελαιογόνοι μικροοργανισμοί μπορούν να συσσωρεύουν λιπίδια, έτσι μπορούν να θεωρηθούν ως πρόδρομοι παραγωγή βιοκαυσίμων (Liang & Jiang, 2013).

Το μικροβιακό λίπος που παράγουν ονομάζεται μονοκυτταρικό και μπορεί να χρησιμοποιηθεί είτε ως πρόσθετο σε τρόφιμα είτε για τη παραγωγή βιοντίζελ (Tsouko *et al.*, 2016). Οι πρώτες προσπάθειες να χρησιμοποιηθούν τα SCO (single cell oils) σε βιομηχανική κλίμακα αναφέρθηκαν στη χρήση τους ως υποκατάστατα σπάνιων και εξωτικών λιπιδίων όπως είναι το βούτυρο του κακάο (Bellou *et al.*, 2012; Papanikolaou & Aggelis, 2010).

Οι ελαιογόνες ζύμες παρουσιάζουν αρκετά πλεονεκτήματα για τη παραγωγή λιπιδίων σε σύγκριση με άλλες πηγές. Αρχικά, ο χρόνος διπλασιασμού τους είναι πολύ μικρός, επηρεάζονται λιγότερο σε σχέση με τα φυτά όσο αφορά τις κλιματικές συνθήκες, ενώ η εφαρμογή τους σε βιομηχανική κλίμακα είναι ευκολότερη συγκριτικά με τα μικροφύκη (Li *et al.*, 2008).

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, οι ζύμες μπορούν κατά κανόνα να παράγουν σε αξιοσημείωτες συγκεντρώσεις τα παρακάτω λιπαρά οξέα: μυριστικό οξύ (C14:0), παλμιτικό οξύ (C16:0), παλμιτολεϊκό οξύ (C16:1), στεαρικό οξύ (C18:0), ελαϊκό οξύ (C18:1), λινολενικό οξύ (C18:2) και α-λινολενικό οξύ (C18:3) (Gen *et al.*, 2014; Papanikolaou & Aggelis, 2011; Zhao *et al.*, 2011).

Πίνακας 2. Περιεκτικότητα λίπους σε ορισμένους μικροοργανισμούς (Meng *et al.*, 2009)

Microorganisms	Oil content (% dry wt)	Microorganisms	Oil content (% dry wt)
Microalgae		Yeast	
<i>Botryococcus braunii</i>	25-75	<i>Candida curvata</i>	58
<i>Cylindrotheca sp.</i>	16-37	<i>Cryptococcus albidus</i>	65
<i>Nitzschia sp.</i>	45-47	<i>Lipomyces starkeyi</i>	64
<i>Schizochytrium sp.</i>	50-77	<i>Rhodotorula glutinis</i>	72
Bacterium		Fungi	
<i>Arthrobacter sp.</i>	>40	<i>Aspergillus oryzae</i>	57
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	27-38	<i>Mortierella isabellina</i>	86
<i>Rhodococcus opacus</i>	24-25	<i>Humicola lanuginose</i>	75
<i>Bacillus alcalophilus</i>	18-24	<i>Mortierella vinacea</i>	66

Πίνακας 3. Σύσταση λιπιδίων σε ορισμένους μικροοργανισμούς (Meng *et al.*, 2009)

Microorganisms	Lipid composition (w/total lipid)					
	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3
Microalgae	12-21	55-57	1-2	58-60	4-20	14-30
Yeast	11-37	1-6	1-10	28-66	3-24	1-3
Fungi	7-23	1-6	2-6	19-81	8-40	4-42
Bacterium	8-10	10-11	11-12	25-28	14-17	-

1.3 Η ζύμη *Rhodosporidium toruloides*

Τα μικροβιακά λιπίδια αποτελούν μια πιθανή πηγή για τη παραγωγή βιοντίζελ και η κόκκινη ζύμη *Rhodosporidium toruloides* είναι ενδιαφέρουσα όχι μόνο επειδή μπορεί να συσσωρεύσει πάνω από το 50% της ξηρής βιομάζας της σε λίπος, αλλά και γιατί μπορεί να χρησιμοποιεί υδατάνθρακες όχι μόνο με έξι αλλά και με πέντε άτομα άνθρακα (Wiebe *et al.*, 2012). Αποτελεί μια υποσχόμενη βιομηχανική ελαιογόνο ζύμη, ικανή να μετατρέπει αποτελεσματικά τη γλυκόζη σε μικροβιακό λίπος (Fei *et al.*, 2016; Tchakouteu *et al.*, 2015).

Σε συγκεκριμένες συνθήκες το είδος *Rhodosporidium toruloides* έχει την ικανότητα να συσσωρεύει ποσοστό λίπους μεγαλύτερο από 70% της κυτταρικής τους μάζας (Li *et al.*, 2007).

Η κόκκινη αυτή ζύμη έχει υψηλή ικανότητα ανάπτυξης και σύνθεσης λιπιδίων σε μια σειρά από πηγές άνθρακα από γλυκόζη, φρουκτόζη και ξυλόζη μέχρι και γλυκερόλη (Bommareddy *et al.*, 2015; Tchakouteu *et al.*, 2015).

Εκτός από την ικανότητα παραγωγής λιπιδίων η ζύμη *Rhodosporidium toruloides* παράγει καροτενοειδή εμπορικού ενδιαφέροντος για τη βιομηχανία τροφίμων. Είναι γνωστό ότι η μικροβιακή σύνθεση των λιπιδίων και των καροτενοειδών εξαρτώνται έντονα από τις συνθήκες ανάπτυξης, ιδιαίτερα το μέσο pH (Dias *et al.*, 2016).

Πίνακας 4. Ανάπτυξη του *Rhodosporidium toruloides* σε διαφορετικά υποστρώματα (Bommareddy *et al.*, 2015)

Carbon source	Maximum yield of TAG [g·g⁻¹ substrate]	Maximum yield of TAG [g·g⁻¹ substrate]	Maximum cell mass yield [g·g⁻¹ substrate]
Glucose	0.30	0.58	0.67
Glycerol	0.32	0.63	0.73
Xylose	0.29	0.55	0.66
Arabinose	0.27	0.53	0.63

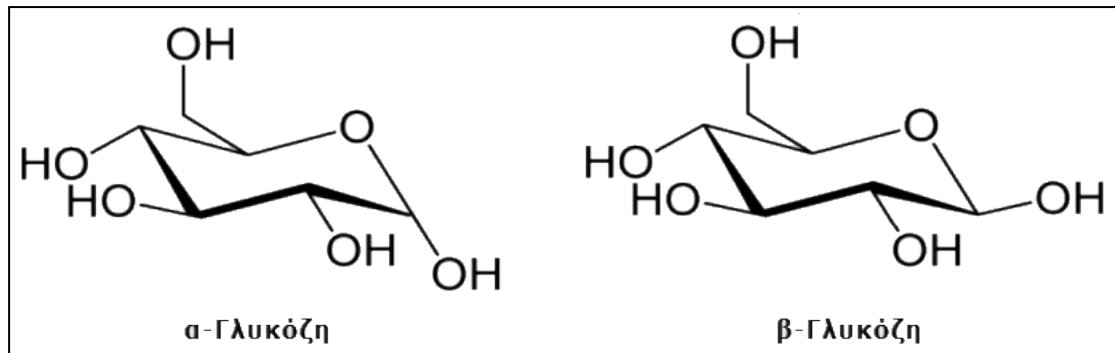


Εικόνα 2. Ελαιιογόνος ζύμη του γένους *Rhodosporidium* (www.jew.riken.jp).

1.4 Οι πηγές άνθρακα στη βιοτεχνολογική παραγωγή μικροβιακού λίπους

1.4.1 Γλυκόζη

Η γλυκόζη είναι το πιο απλό είδος υδατάνθρακα, ή αλλιώς ένας μονοσακχαρίτης με μοριακό τύπο: $C_6H_{12}O_6$ που βρίσκεται στα φυτά. Μαζί με τη φρουκτόζη και τη γαλακτόζη απορροφώνται άμεσα στη κυκλοφορία του αίματος κατά τη διάρκεια της πέψης. Αποτελεί τον σημαντικότερο υδατάνθρακα, αφού τα κύτταρα την χρησιμοποιούν ως την πρωταρχική πηγή ενέργειας και ως μέσο μεταβολισμού. Στα τρόφιμα βρίσκεται είτε αυτούσια είτε προκύπτει ως προϊόν καταβολισμού, κατά τη διάρκεια της πέψης, των δισακχαριτών και πολυσακχαριτών που περιέχονται σε αμυλούχα τρόφιμα. Η γλυκόζη είναι ένα από τα κύρια προϊόντα της φωτοσύνθεσης και χρησιμοποιείται ως καύσιμο για την κυτταρική αναπνοή. Η D-γλυκόζη είναι αλδόζη με έξι άτομα άνθρακα και βρίσκεται άφθονη στη φύση (Berg *et al.*, 2013).



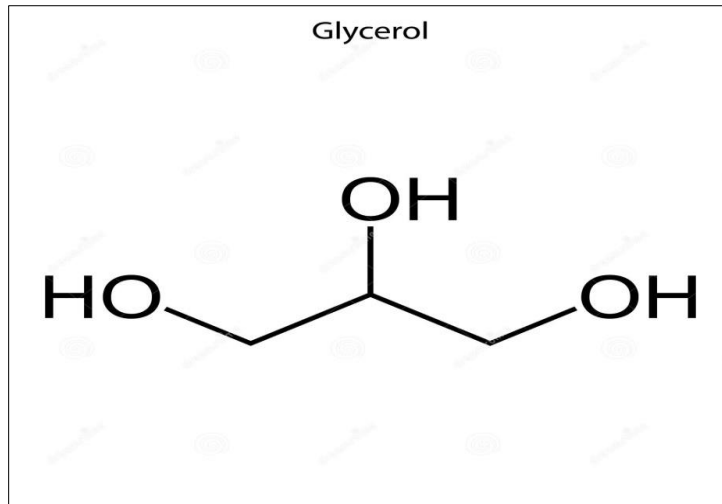
Εικόνα 3. Δομή μορίου γλυκόζης (Βαλαβανίδης, Ευσταθίου., 2012)

Η παραγωγή λιπιδίων από ελαιογόνες ζύμες, οι οποίες χρησιμοποιούν τη γλυκόζη ως πηγή άνθρακα, έχει μελετηθεί ευρέως (Papanikolaou *et al.*, 2011; Tanimura *et al.*, 2014).

Οι Qi *et al.*, 2016 δοκίμασαν τέσσερις διαφορετικές πηγές αζώτου και διαφορετικούς λόγους C/N για να διαπιστώσουν τις επιπτώσεις που θα είχαν στη βιομάζα, στη παραγωγή λιπιδίων από τη ζύμη *R. toruloides*, χρησιμοποιώντας τη γλυκόζη ως πηγή άνθρακα. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το στέλεχος που χρησιμοποιήθηκε μπορεί να έχει εμπορική εφαρμογή για τη μικροβιακή παραγωγή των PUFAs.

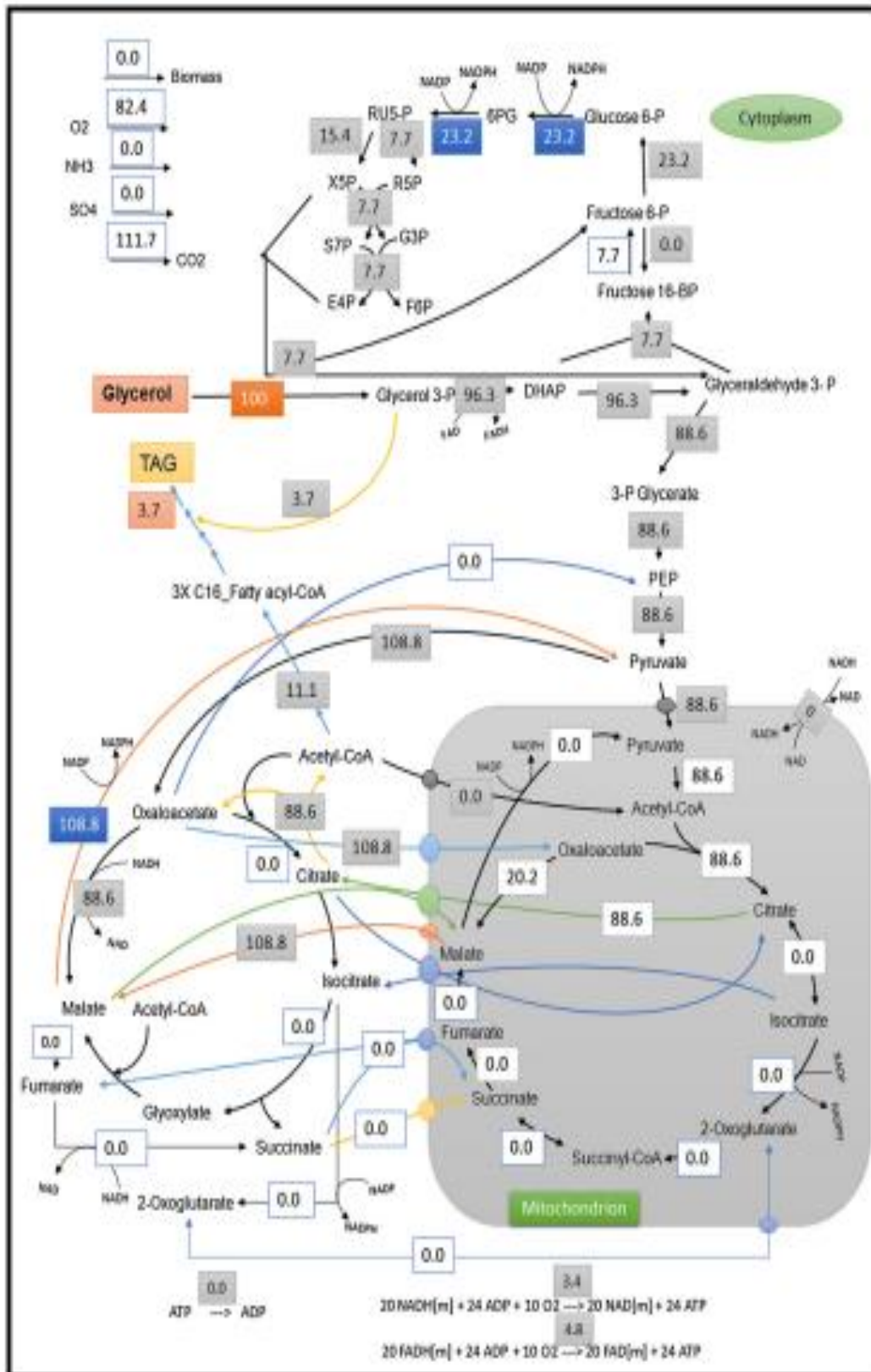
1.4.2 Γλυκερόλη

Η γλυκερόλη ή 1,2,3 προπανοτριόλη έχει εμπορική ονομασία γλυκερίνη, είναι μια χημική οργανική ένωση με μοριακό τύπο $C_3H_8O_3$ της οικογένειας των αλκοολών η οποία υπάρχει σε όλα τα φυσικά λιπίδια ζωικής ή φυτικής προέλευσης. Παράγεται από φυσικές πηγές, μέσω της υδρόλυσης των λιπών της ζύμωσης των σακχάρων ή παρασκευάζεται συνθετικά. Η γλυκερόλη αποτελεί το κύριο υποπροϊόν κατά τη διεργασία παραγωγής βιοντίζελ (Papanikolaou *et al.*, 2002; 2008; Tchakouteu *et al.*, 2015; Bommarreddy *et al.*, 2016).



Εικόνα 4. Το μόριο της γλυκερόλης (Βαλαβανίδης, Ευσταθίου, 2012)

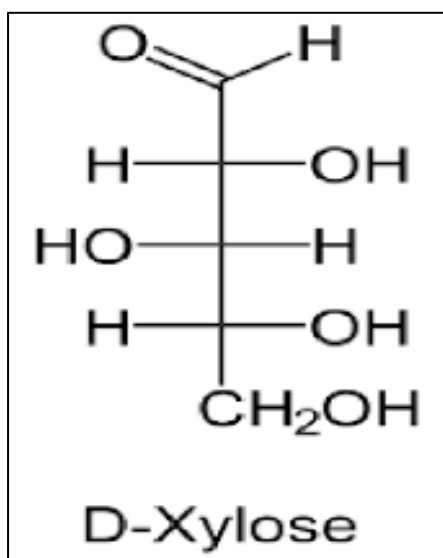
Οι Bommareddy *et al.*, αναφέρουν στη μελέτη τους ότι προηγούμενες μελέτες είχαν δείξει ότι η παραγωγή λιπιδίων από τη ζύμη *R. toruloides* σε πηγή άνθρακα γλυκόζη ήταν χαμηλότερη σε σύγκριση με την ανάπτυξη του μικροοργανισμού σε υπόστρωμα γλυκερόλης. Ενώ το αντίθετο συνέβη για τη παραγωγή βιομάζας.



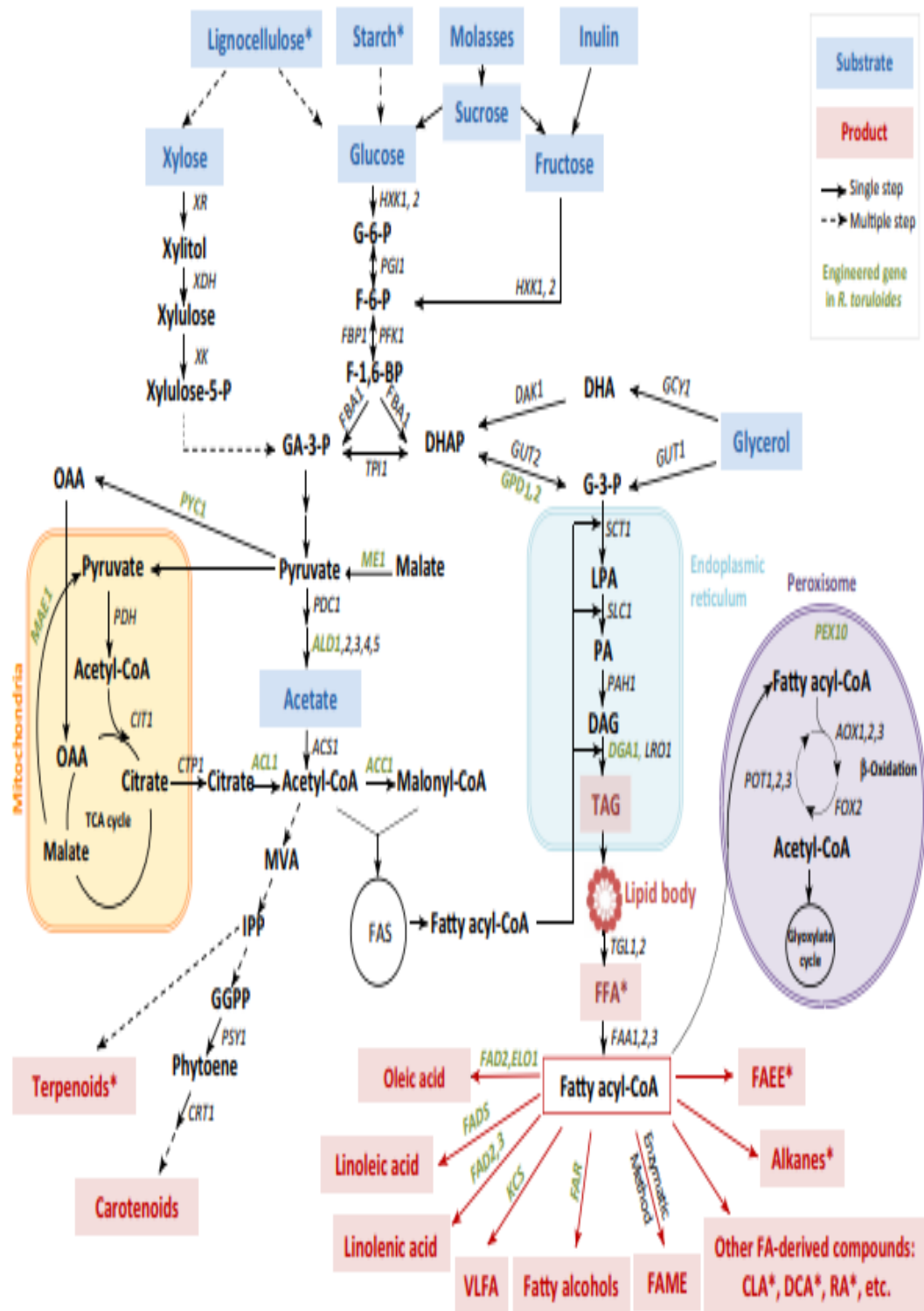
Εικόνα 5. Βέλτιστη κατανομή της ροής στη γλυκερόλη (Bommareddy *et al.*, 2015)

1.4.3 Ξυλόζη

Η ξυλόζη είναι ένα σάκχαρο το οποίο πρώτα απομονώθηκε από ξύλο και σε αυτό οφείλει και την ονομασία του. Η ξυλόζη είναι μονοσακχαρίτης με μοριακό τύπο $C_5H_{10}O_5$, είναι επίσης μια αλδοπεντόζη το οποίο σημαίνει ότι αποτελείται από πέντε άτομα άνθρακα ενώ περιλαμβάνει και μια λειτουργική ομάδα αλδεϋδης. Λόγω της ελεύθερης αλδεϋδης κατατάσσεται στα αναγωγικά σάκχαρα. Η D-Xylose είναι ένα από τα πιο άφθονα σάκχαρα πεντόζης που βρέθηκαν στη φύση. Η αφθονία και η ευκολία απομόνωσης της D-ξυλόζης την κάνουν να αποτελεί πιθανή πρώτη ύλη για την παραγωγή άλλων χρήσιμων χημικών ουσιών (Freer *et al.*, 1997).



Εικόνα 6. Το μόριο της ξυλόζης (Βαλαβανίδης, Ευσταθίου, 2012)

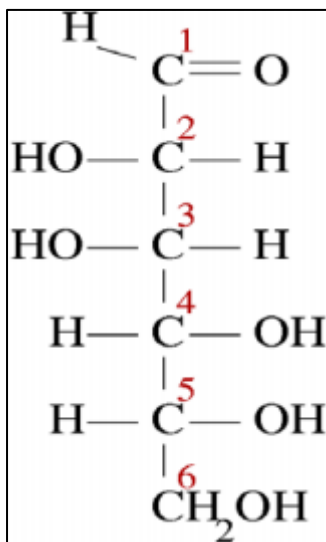


Εικόνα 7. Μεταβολική οδός της ζύμης *R. toruloides* (Park et al., 2017)

1.4.4 Μαννόζη

Η μαννόζη είναι απλό σάκχαρο με μοριακό τύπο $C_6H_{12}O_6$. Αποτελεί μια από τις σπουδαιότερες αλδοεξόζες. Η D-μαννόζη βρίσκεται σπάνια σε ελεύθερη κατάσταση, περισσότερο βρίσκεται ενωμένη σε γλυκοζίτες ή σε πολυσακχαρίτες.

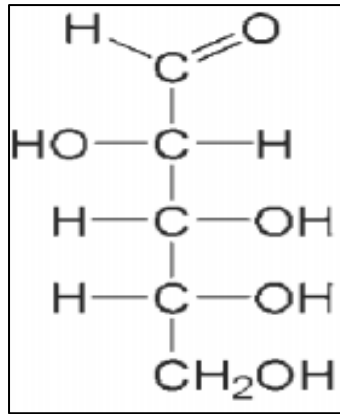
Λαμβάνεται με όξινη υδρόλυση των πολυσακχαριτών, γνωστών ως μαννάνες.



Εικόνα 8. Το μόριο της Μαννόζης (Βαλαβανίδης, Ευσταθίου, 2012)

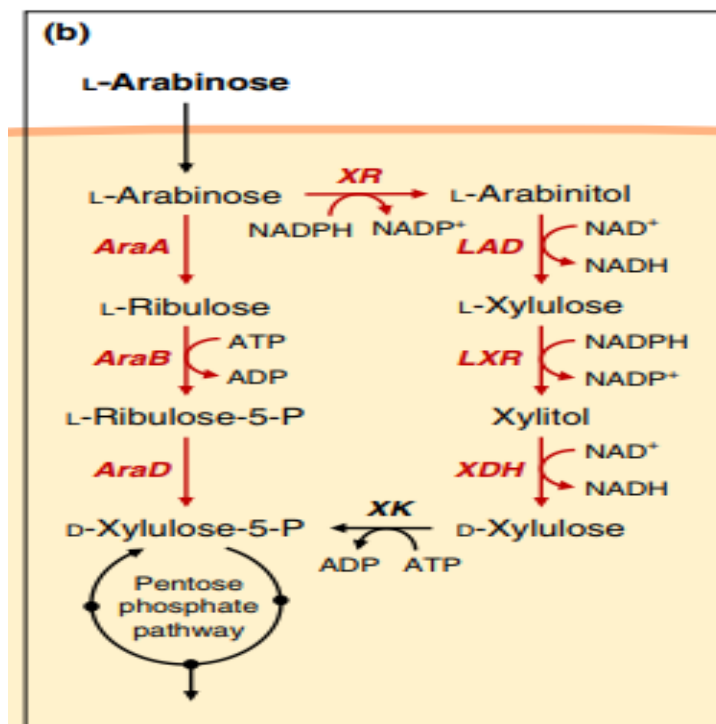
1.4.5 Αραβινόζη

Η αραβινόζη είναι μια σημαντική πεντόζη με μοριακό τύπο $C_5H_{10}O_5$, η L-αραβινόζη μπορεί να περιέχεται στις πηκτίνες ανάλογα με την προέλευση τους.



Εικόνα 9. Το μόριο της Αραβινόζης (Βαλαβανίδης, Ευσταθίου, 2012)

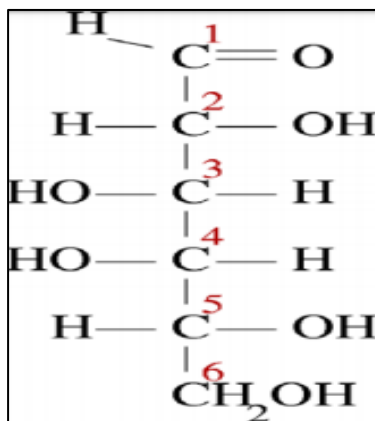
Οι Bommareddy *et al.*, μελέτησαν την ανάπτυξη του *R. toruloides* χρησιμοποιώντας διαφορετικές πηγές άνθρακα. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η ανάπτυξη σε αραβινόζη είχε τη χαμηλότερη απόδοση παραγωγής TAG με 0,27 g g⁻¹ υποστρώματος, αλλά και της βιομάζας με 0,63 g g⁻¹ υποστρώματος, συγκριτικά με τις άλλες πηγές άνθρακα που εξετάστηκαν (γλυκόζη, γλυκερόλη και ξυλόζη).



Εικόνα 10. Μεταβολική μηχανική για αποτελεσματική χρησιμότητα σακχάρων (Zhang *et al.*, 2015)

1.4.5 Γαλακτόζη

Η γαλακτόζη είναι μονοσακχαρίτης με μοριακό τύπο C₆H₁₂O₆. Η γαλακτόζη δεν απαντάται ελεύθερη στη φύση αλλά ενώνεται με τη γλυκόζη προκειμένου να σχηματιστεί η λακτόζη. Η γαλακτόζη βρίσκεται σε γαλακτομαννάνες, ημικυτταρίνες και πηκτίνες, γεγονός που τη καθιστά ενδιαφέρον υπόστρωμα για βιομετατροπές (Amaro & Nicaud, 2016).



Εικόνα 11. Το μόριο της γαλακτόζης (Βαλαβανίδης, Ευσταθίου, 2012)

Οι Fillet *et al.*, χρησιμοποίησαν τη ζύμη *R. toruloides* για τη παραγωγή λιπαρών αλκοολών. Επειδή ο μεταβολισμός της γαλακτόζης δεν ήταν αποτελεσματικός χρησιμοποίησαν ως πηγή άνθρακα γλυκόζη, φρουκτόζη και σουκρόζη.

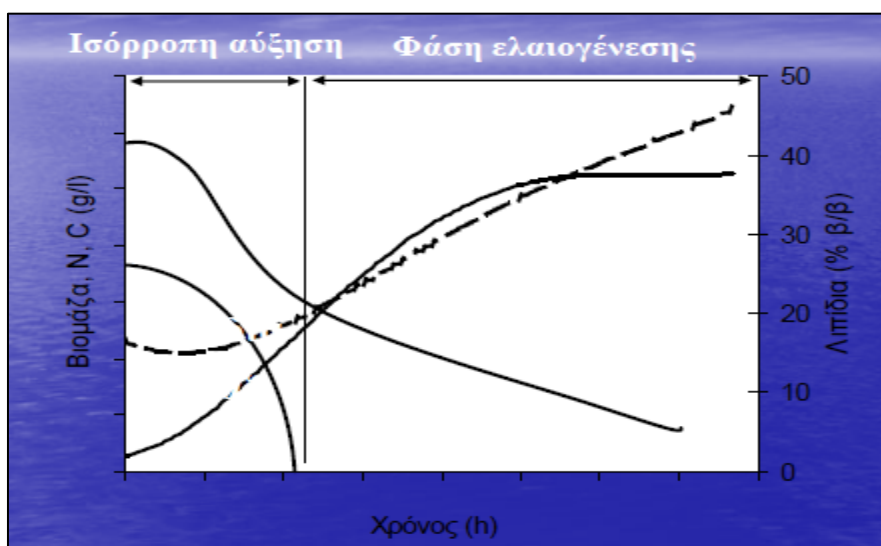
1.5 Βιοσυσσώρευση λίπους

Η βιοσύνθεση λιπιδίων στους ελαιογόνους και τους μη ελαιογόνους μικροοργανισμούς είναι παρόμοια. Η ικανότητα συσσώρευσης λιπιδίων σε υψηλές ποσότητες εξαρτάται κυρίως από τη ρύθμιση του βιοσυνθετικού μονοπατιού και την παροχή των πρόδρομων ουσιών και του συμπαραγόντα NADPH (Tamene & Dawit, 2014).

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία το βασικό στοιχείο για τη παραγωγή λιπιδίων είναι ο περιορισμός του αζώτου στο θρεπτικό μέσο της καλλιέργειας, δίδοντας αυξημένες

τιμές για τον λόγο Άνθρακα/Αζώτου (C/N) (Papanikolaou *et al.*, 2001; Papanikolaou & Aggelis, 2002; Ratledge, 2004; Athenaki *et al.*, 2017; Dourou *et al.*, 2018).

Η συσσώρευση των λιπιδίων από τους ελαιογόνους μικροοργανισμούς λαμβάνει χώρα όταν στη καλλιέργεια υπάρχει περίσσεια πηγής άνθρακα και ταυτόχρονα αρχίζει να εξαντλείται το άζωτο. Το άζωτο αποτελεί θεμέλιο λίθο για τη παραγωγή των πρωτεϊνών αλλά και των νουκλεϊκών οξέων. Έτσι η έλλειψη του αζώτου προκαλεί την παύση της κυτταρικής ανάπτυξης. Όμως, η κατανάλωση της παρέχουσας πηγής άνθρακα συνεχίζεται με αποτέλεσμα τη δημιουργία του ενδοκυτταρικού λίπους μέχρι το όριο του κάθε μικροοργανισμού (Ratledge & Wynn, 2006). Όταν πλέον εξαντληθεί και η πηγή άνθρακα οι ελαιογόνοι μικροοργανισμοί αρχίζουν να καταναλώνουν τα συσσωρευμένα λιπίδια (Papanikolaou & Aggelis, 2011).



Διάγραμμα 3. Τυπικό διάγραμμα συσσώρευσης λιπιδίων (σημειώσεις μαθήματος ενζυμικές και μικροβιακές διεργασίες Παπανικολάου)

Στη βιοσυνθετική οδό των λιπαρών οξέων χρησιμοποιείται ως πρόδρομο μόριο το ακετυλο-CoA, δότης του οποίου είναι το κιτρικό οξύ. Επομένως, ο συνεχής εφοδιασμός της διεργασίας με το ακετυλο-CoA είναι απαραίτητος καθώς και η επάρκεια του κυττάρου με το συνένζυμο NADPH. Μέσω της διάσπασης του κιτρικού οξέος σχηματίζεται το ακετυλο-CoA με τη συμβολή της ATP-κιτρικής λυάσης.



Η βιοσύνθεση των λιπαρών οξέων πραγματοποιείται στο κυτταρόπλασμα ενώ το κιτρικό οξύ σχηματίζεται μέσω του κύκλου των τρικαρβοξυλικών οξέων (TCA cycle) που λαμβάνει χώρα στο μιτοχόνδριο. Σε συνθήκες έλλειψης αζώτου οι μικροοργανισμοί αποδομούν το AMP προκειμένου να εξοικονομήσουν άζωτο, το οποίο είναι απαραίτητο για τη περαιτέρω αύξηση του.

$AMP \rightarrow \text{μονοφωσφορική αδενοσίνη} + NH_3$

Η μείωση της συγκέντρωσης της AMP έχει ως αποτέλεσμα την παρεμπόδιση του ενζύμου ισοκιτρική αφυδρογονάση (ICDH). Για αυτό το λόγο το κιτρικό οξύ δεν είναι δυνατόν να μεταβολιστεί και συσσωρεύεται στα μιτοχόνδρια. Στη συνέχεια, το κιτρικό οξύ εισέρχεται στο κυτταρόπλασμα και διασπάται από το ένζυμο ATP-κιτρική λυάση σε ακέτυλο-CoA και οξαλικό οξύ. Όπως, προαναφέρθηκε το ακέτυλο-CoA αποτελεί το πρόδρομο μόριο για τη βιοσύνθεση των λιπαρών οξέων, ενώ το οξαλικό οξύ μετατρέπεται σε μηλικό το οποίο τελικά χρησιμοποιείται στο κύκλο κιτρικού/μηλικού οξέος (Ratledge, 2002; 2004).

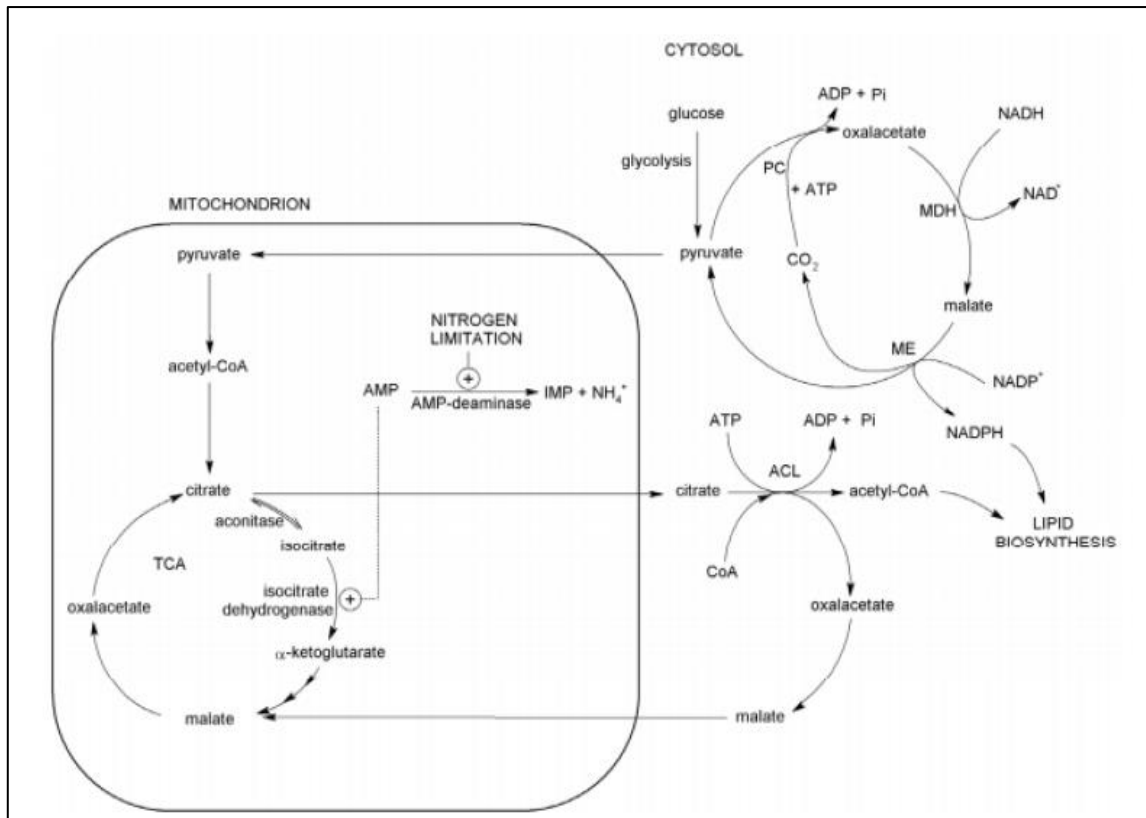
$\text{Κιτρικό οξύ} + \text{CoA} \rightarrow \text{CH}_3\text{COSCoA} + \text{Οξαλοξικό οξύ} + \text{ADP} + \text{P}_i$

Νωρίτερα έγινε αναφορά για τη σημαντικότητα της συνεχούς παροχής επαρκούς ποσότητας NADPH, ο προμηθευτής του είναι το μηλικό ένζυμο.

$\text{Μηλικό οξύ} + \text{NADP}^+ \rightarrow \text{Πυροσταφυλικό οξύ} + \text{CO}_2 + \text{NADPH}$

Τα παραγόμενα λιπαρά οξέα εστεροποιούνται με τη γλυκερόλη σε τριγλυκερίδια και ενσωματώνονται μέσω του ενδοπλασματικού δικτύου σε σταγονίδια λιπαρών οξέων.

Συνεπώς, η ATP-κιτρική λυάση και το μηλικό ένζυμο είναι τα δύο ένζυμα κλειδιά για τη βιοσύνθεση ενδοκυτταρικού λίπους (Ratledge & Wynn, 2002).



Διάγραμμα 4. Διάγραμμα βιοσυσσώρευσης λιπιδίων σε ελαιογόνους μικροοργανισμούς (Rossi *et al.*, 2011)

1.6 Κλάσματα λιπιδίων

Τα λιπίδια διακρίνονται από τρία κλάσματα: τα ουδέτερα λίπη, τα σφιγγογλυκολιπίδια και τα φωσφολιπίδια.

Τα ουδέτερα λίπη είναι μεγαλομοριακές ουσίες οι οποίες όμως δεν είναι πολυμερή. Κάθε ουδέτερο λιπίδιο αποτελείται από ένα μόριο γλυκερόλης και τρία μόρια λιπαρού οξέος συνδεδεμένα με εστερικούς δεσμούς. Τα τρία λιπαρά οξέα μπορεί να είναι τα ίδια ή να είναι δύο ή τριών ειδών. Επιπλέον τα ουδέτερα λιπίδια ορίζονται ως υδρόφοβα μόρια. Στους ζυμομύκητες οι τριαγλυκερόλες και οι στερυλ εστέρες αποτελούν το μεγαλύτερο μέρος των ουδέτερων λιπιδίων. Αυτά τα αποθηκευτικά λιπίδια συσσωρεύονται όταν παρέχεται στα κύτταρα περίσσεια θρεπτικών ουσιών (Athenstaedt, 2010; Papanikolaou & Aggelis, 2011; Athenaki *et al.*, 2018).

Τα φωσφολιπίδια αποτελούν συγγενικά είδη των ουδέτερων λιπών αλλά το καθένα διαθέτει μόνο δύο λιπαρά οξέα. Η τρίτη υδροξυλομάδα της γλυκερόλης ενώνεται με μια φωσφορική ομάδα. Η σύνθεση των φωσφολιπιδίων στους

ζυμομύκητες ρυθμίζεται από μια σειρά παραγόντων, κάποιιοι από αυτούς είναι το στάδιο ανάπτυξης και διάφοροι βιοχημικοί μηχανισμοί (Garman & Hal, 2011).

Τα γλυκολιπίδια και σφιγγολιπίδια βρίσκονται κατά κύριο λόγο στις κυτταρικές μεμβράνες. Ωστόσο, η ρύθμιση αυτού του σημαντικού βιοχημικού μονοπατιού δεν είναι ακόμα απόλυτα κατανοητή (Coward & Obeid, 2006).

1.7 Σκοπός της ερευνητικής μελέτης

Η μείωση των αποθεμάτων του αργού πετρελαίου, έχει οδηγήσει στην αύξηση της τιμής του καθώς και οι περιβαλλοντικές επιπτώσεις που προκύπτουν από τη χρήση του (φαινόμενο του θερμοκηπίου) είναι πλέον αδιαμφισβήτητα. Για αυτούς του λόγους δημιουργήθηκε η ανάγκη για εύρεση εναλλακτικών καυσίμων φιλικότερων προς το περιβάλλον. Τα τελευταία χρόνια η παραγωγή βιοντίζελ έχει αποκτήσει μεγάλο ενδιαφέρον καθώς αποτελεί ανανεώσιμο καύσιμο. Αυτό το βιοκαύσιμο παράγεται κυρίως από φυτικά έλαια αλλά και από ζωικά λίπη. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η χρήση μικροβιακών λιπιδίων των SCO (ελαίων μονοκύτταρων οργανισμών), ως πιθανές εναλλακτικές πρώτες ύλες για τη παραγωγή βιοντίζελ.

Ο σκοπός της μελέτης είναι η διερεύνηση της ικανότητας της ελαιογόνου ζύμης *Rhodospiridium toruloides* NRRL Y-27012 να μεταβολίζει διαφορετικές πηγές άνθρακα (γλυκόζη, γλυκερόλη, μαννόζη, αραβινόζη, γαλακτόζη, ξυλόζη) προς παραγωγή βιομάζας, ενδοπολυσακχαριτών και λιπιδίων, καθώς και η επίδραση των προαναφερθέντων πηγών στην σύσταση των λιπιδίων τα οποία αποτελούν το πρόδρομο στάδιο για την παραγωγή βιοντίζελ.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Βιολογικό υλικό

Στη παρούσα ερευνητική μελέτη χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος της ζύμης *Rhodosporidium toruloides* NRRL Y-27012, το οποίο ανήκει στην συλλογή NRRL (Peoria, USA).

Η διατήρηση του στελέχους γινόταν σε κεκλιμένους σωλήνες (slants) πληρωμένους με θρεπτικό μέσο YPDA (Yeast Peptone Dextrose Agar) στους 4°C. Η σύσταση του θρεπτικού υλικού ήταν η εξής: 10 g L⁻¹ γλυκόζη, 10 g L⁻¹ yeast extract, 10 g L⁻¹ πεπτόνη και 20 g L⁻¹ άγαρ. Για να διατηρηθεί η ζωτικότητα τους πραγματοποιούνταν ανανεώσεις σε τακτά χρονικά διαστήματα.



Εικόνα 12. Κεκλιμένοι σωλήνες (slants) πληρωμένοι με θρεπτικό μέσο YPDA

2.2 Θρεπτικά υποστρώματα

2.2.1 Παρασκευή προκαλλιέργειας

Πριν την έναρξη κάθε πειράματος, παρασκευαζόταν υγρή προκαλλιέργεια, ώστε ο μικροοργανισμός να βρίσκεται στην εκθετική φάση ανάπτυξης κατά τον εμβολιασμό της κυρίως καλλιέργειας. Η υγρή προκαλλιέργεια αποτελείται από υγρό θρεπτικό υπόστρωμα YPD (10 g L⁻¹ γλυκόζη, 10 g L⁻¹ yeast extract, 10 g L⁻¹ πεπτόνη), το οποίο προστίθεται σε κωνικές φιάλες των 250mL πληρωμένες κατά το 1/5 του όγκου τους (50±1 mL). Η κάθε φιάλη κλείνεται με υδρόφοβο βαμβάκι και οδηγείται προς αποστείρωση σε αυτόκλειστο σε θερμοκρασία 121°C για 20 λεπτά. Αφού οι κωνικές κρυώσουν ακολουθεί ο εμβολιασμός τους υπό ασηπτικές συνθήκες με τα κύτταρα της ζύμης, προερχόμενα από καλλιέργεια ηλικίας 3 ημερών. Τέλος, για την επώαση της προκαλλιέργειας οι φιάλες τοποθετούνται σε ανακινούμενο

επωαστικό θάλαμο με σταθερές συνθήκες ανάδευσης 180 ± 5 rpm και θερμοκρασίας στους 28 ± 1 °C.

2.2.2 Παρασκευή κυρίως καλλιέργειας

Πραγματοποιήθηκαν καλλιέργειες που περιήχαν 6 διαφορετικές πηγές άνθρακα (γλυκόζη, γλυκερόλη, μαννόζη, αραβινόζη, γαλακτόζη, ξυλόζη) σε αρχική συγκέντρωση 60 g L^{-1} . Όλες οι ζυμώσεις πραγματοποιήθηκαν υπό περιοριστικές σε άζωτο συνθήκες (Paranikolaou *et al.*, 2001). Ως πηγές αζώτου χρησιμοποιήθηκαν πεπτόνη 1 g L^{-1} και yeast extract σε συγκέντρωση 2 g L^{-1} . Τέλος, προστέθηκαν τα παρακάτω άλατα:

Πίνακας 5. Σύσταση μεταλλικών αλάτων (Paranikolaou *et al.*, 2001)

ΕΝΩΣΗ	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ (g L^{-1})
KH_2PO_4	7
Na_2HPO_4	2.5
$\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1.5
$\text{FeCl}_3\cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.15
$\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.15
$\text{ZnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.02
$\text{MnSO}_4\cdot \text{H}_2\text{O}$	0.06

Αφού προστέθηκαν όλα τα συστατικά και το απιονισμένο νερό μέχρι τον επιθυμητό τελικό όγκο, η καλλιέργεια μοιράστηκε σε κωνικές φιάλες των 250 mL πληρωμένες κατά το 1/5 του όγκου τους (50 ± 1 mL). Εν συνεχεία ακολούθησε αποστείρωση σε αυτόκλειστο. Τέλος οι κωνικές εμβολιάστηκαν με 1 mL εμβολίου από τη προκαλλιέργεια υπό ασηπτικές συνθήκες. Για την επώαση τοποθετήθηκαν σε ανακινούμενο επωαστικό θάλαμο, σε σταθερές συνθήκες ανάδευσης 180 ± 5 rpm και θερμοκρασίας στους 28 ± 1 °C.

Το pH κατά την διάρκεια των ζυμώσεων παρέμενε σταθερό και είχε τιμή 5.5 ± 0.2 .

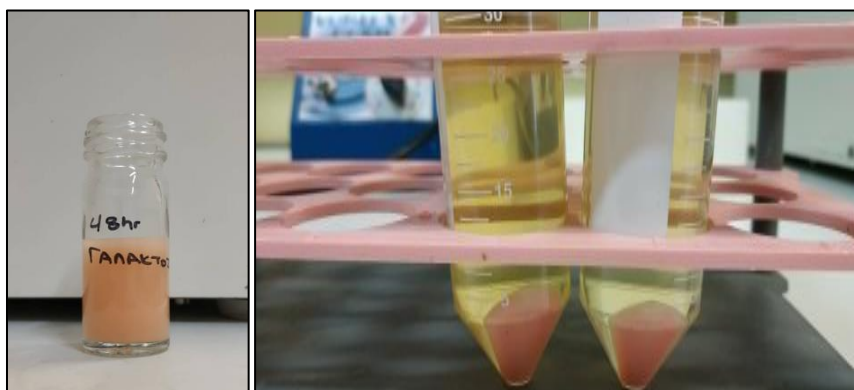


Εικόνα 13. Κωνικές φιάλες στον επωαστικό θάλαμο.

2.3. Αναλύσεις

2.3.1 Προσδιορισμός βιομάζας

Για το προσδιορισμό της βιομάζας λαμβάνονταν δείγματα από την καλλιέργεια και οδηγούνταν προς φυγοκέντρηση (9.000 rpm, 10 min, 4°C) σε φυγόκεντρο τύπου Hettich Universal 320 (Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Germany). Το υπερκείμενο απορρίπτονταν και ακολουθούσε δεύτερη φυγοκέντρηση με νερό για το ξέπλυμα των κυττάρων. Έπειτα, η βιομάζα τοποθετούνταν σε προζυγισμένα φιαλίδια και οδηγούνταν προς ξήρανση σε κλίβανο ($T=80\pm 5^{\circ}\text{C}$ / 48h) μέχρι ενδείξεως σταθερού βάρους του ξηρού υπολείμματος σε ζυγό ακριβείας τύπου Kern ABJ (Kern & Sohn GmbH, Balingen, Germany), εκφρασμένο σε g L^{-1} .



Εικόνα 14. Συλλογή νωπής βιομάζας σε φιάλη McCartney (αριστερά) & ίζημα βιομάζας (δεξιά)

2.3.2 Προσδιορισμός ενδοπολυσακχαριτών (IPS)

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό των παραγόμενων ενδοπολυσακχαριτών κάθε ζύμωσης, ακολουθήθηκε η διαδικασία ενός πρωτόκολλου, βασισμένο στους Liang *et al.*, 2009.

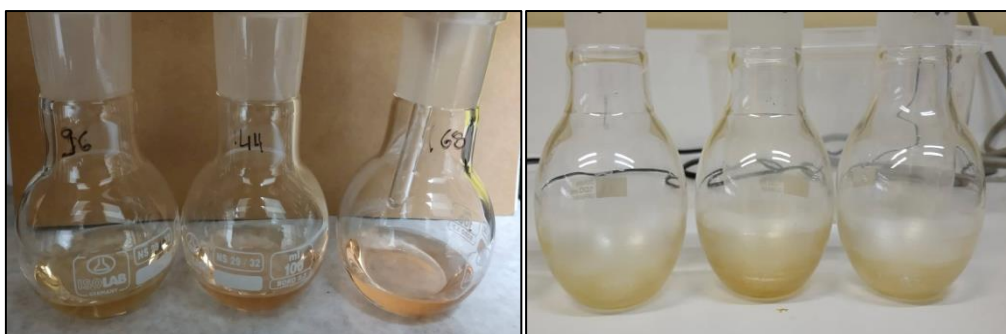
Αρχικά, έγινε παραλαβή 0.05 g ξηρής βιομάζας, τα οποία τοποθετήθηκαν σε δοκιμαστικό σωλήνα. Στη συνέχεια έγινε προσθήκη 10 mL υδροχλωρικού οξέος συγκέντρωσης (HCl, 2M) και ακολούθησε υδρόλυση του διαλύματος σε υδατόλουτρο στους 80°C για 30 λεπτά. Ακολούθως, προστέθηκαν 10 mL υδροξειδίου του νατρίου (NaOH 2M), προκειμένου να γίνει εξουδετέρωση. Ακολούθως γινόταν 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). Σε δοκιμαστικούς σωλήνες έγινε προσθήκη 0.5 mL αντιδραστηρίου DNS και 0.5 mL διηθημένου δείγματος, ακολούθησε ανάδευση του διαλύματος σε κυκλοαναμητήρα (vortex) και πραγματοποιήθηκε βρασμός στους 100°C για 5 λεπτά ακριβώς. Αφού έπεφτε η θερμοκρασία των δοκιμαστικών σωλήνων γινόταν προσθήκη 5 mL απιονισμένου νερού και μετά από ανάδευση του διαλύματος ακολούθησε μέτρηση της απορρόφησης στα 540 nm με την βοήθεια φασματοφωτόμετρου τύπου Hitachi U-2000 Spectrophotometer.

Για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης των αναγόντων σακχάρων (γλυκόζης) στα δείγματα χρησιμοποιήθηκαν πρότυπες καμπύλες αναφοράς και τα αποτελέσματα εκφράστηκαν σε ισοδύναμα γλυκόζης (g L^{-1}) για τους ενδοπολυσακχαρίτες.

2.3.3 Ποσοτικός προσδιορισμός ενδοκυτταρικού λίπους

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό του ενδοκυτταρικού λίπους ακολουθήθηκε η παρακάτω διαδικασία. Αρχικά στα φιαλίδια (McCartney) όπου βρίσκεται η ξηρή βιομάζα έγινε προσθήκη μίγματος διαλυτών χλωροφορμίου/μεθανόλης σε αναλογία $\text{CHCl}_3 / \text{CH}_3\text{OH}$ 2:1(v/v) με στόχο την εκχύλιση του λίπους (Folch *et al.*, 1957; Papanikolaou *et al.*, 2001). Το φιαλίδιο φυλάσσεται κλεισμένο αεροστεγώς στο

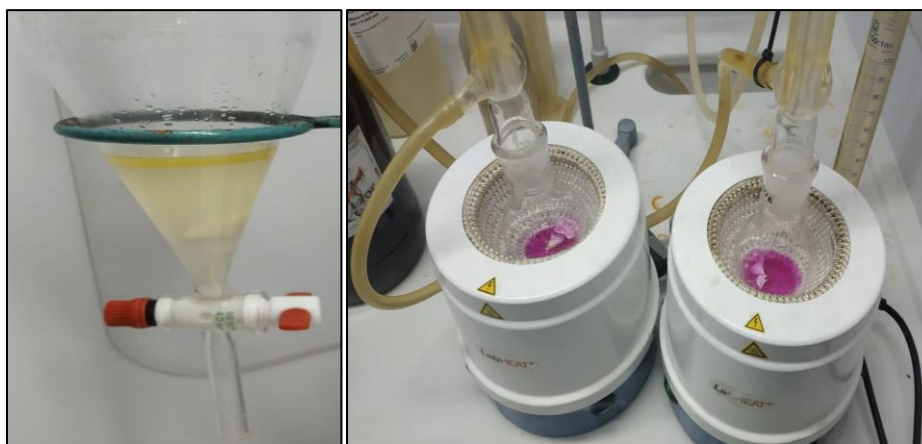
σκοτάδι, προκειμένου να αποφευχθεί η οξείδωση των λιπαρών οξέων για 72 ώρες. Μετά το πέρας των 72 ωρών πραγματοποιείται διήθηση του περιεχομένου του φιαλιδίου σε προζυγισμένη γυάλινη σφαιρική φιάλη ώστε να απομακρυνθεί η βιομάζα. Ακολουθεί εξάτμιση του διαλύτη (Folch) υπό κενό στους 40°C με την βοήθεια περιστροφικού εξάτμιστήρα τύπου Flash Evaporator - Rotavapor R -114, έτσι παραμένει στην σφαιρική φιάλη μόνο το μικροβιακό λίπος. Τέλος, η σφαιρική φιάλη ζυγίζεται με την βοήθεια ζυγού ακριβείας και από την διαφορά της μάζας υπολογίζεται το παραγόμενο ενδοκυτταρικό λίπος σε g L^{-1} .



Εικόνα 15. Λίπος διαλυμένο σε Folch (αριστερά) & λίπος μετά την εξάτμιση (δεξιά).

2.3.4 Μεθυλεστεροποίηση

Για να προσδιοριστεί η σύσταση των μικροβιακών λιπιδίων σε λιπαρά οξέα, απαιτείται η μετατροπή τους στους αντίστοιχους μεθυλεστέρες. Η αντίδραση της μεθυλεστεροποίησης πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο AFNOR (1954). Αναλυτικά, σε 100 mg ολικών λιπιδίων προστέθηκαν 10 mL μεθοξείδιο του νατρίου που περιείχε φαινολοφθαλεΐνη ως δείκτη pH και το μίγμα θερμάνθηκε μέχρι ήπιου βρασμού. Μετά το πέρας 20 min, προστέθηκε διάλυμα υδροχλωρικής μεθανόλης μέχρι το pH του μίγματος να γίνει όξινο (αλλαγή χρώματος του μίγματος από ερυθρό σε λευκό) και ο βρασμός συνεχίστηκε για άλλα 20 min. Η αντίδραση σταμάτησε με την προσθήκη νερού και οι μεθυλεστέρες των λιπαρών οξέων παρελήφθησαν με την προσθήκη 7 mL εξανίου.



Εικόνα 16. Διαχωρισμός φάσεων για τη συλλογή των μεθυλεστέρων (αριστερά) & μανδύες για το βρασμό (δεξιά).

2.3.5 Ανάλυση στον αέριο χρωματογράφο (GC)

Οι μεθυλεστέρες των λιπαρών οξέων αναλύθηκαν σε αέριο χρωματογράφο Fisons GC8000 εξοπλισμένο με τριχοειδή στήλη CPWAX 52 CB μήκους 30 m και με ανιχνευτή FID (Flame Ionization Detector). Ως φέρον αέριο χρησιμοποιήθηκε το He με ροή 2 mL/min (25°C). Η κάθε ανάλυση διήρκεσε 25 min. Η ταυτοποίηση των κορυφών των λιπαρών οξέων έγινε την βοήθεια πρότυπων μεθυλεστέρων των βασικότερων λιπαρών οξέων αντιστοιχίζοντας τους χρόνους κατακράτησης τους (tR). Το ποσοστό κάθε λιπαρού οξέος υπολογίστηκε με βάση το εμβαδό της κάθε κορυφής στα χρωματογραφήματα με την βοήθεια του τύπου:

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

2.3.6 Προσδιορισμός Σακχάρων

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης των σακχάρων καθ όλη τη διάρκεια των ζυμώσεων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση της Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography, HPLC).

Η στήλη που χρησιμοποιήθηκε διαθέτει δύο ανιχνευτές UV και RI. Για τη κινητή φάση χρησιμοποιήθηκε διάλυμα θεικού οξέος (H₂SO₄) με συγκέντρωση 5M, ροή 0.5 mL min⁻¹ και θερμοκρασία 65°C.

Η εύρεση των άγνωστων συγκεντρώσεων έγινε με τη χρήση πρότυπων καμπυλών αναφοράς των ζητούμενων ουσιών.

2.3.7 Κλασμάτωση λιπιδίων

Για τη κλασμάτωση λιπιδίων απαιτούνται περίπου 100 mg καθαρού μικροβιακού ελαίου το οποίο παραλαμβάνεται σε 1mL χλωροφορμίου και μεταφέρεται σε χρωματογραφική στήλη πυριτικού οξέος (silicic acid, Sigma). Το πυριτικό οξύ έχει ενεργοποιηθεί προηγουμένως, μετά από παραμονή για 1h σε θερμοκρασία 120⁰C.

- Για την έκπλυση του λίπους ακολουθήθηκε η παρακάτω διαδικασία: αρχικά ζυγίστηκε η ποσότητα του λίπους και στη συνέχεια προστέθηκε 25% KCl(0.88% w/w) και 75% Folch. Ανακινήθηκε καλά ώστε να διαλυθεί όλη η ποσότητα του λίπους και στη συνέχεια το φυγοκεντρήθηκε. Τέλος, το διάλυμα μεταφέρθηκε σε διαχωριστική χοάνη και συλλέχθηκε η κάτω φάση (καθαρό λίπος) σε προζυγισμένη σφαιρική φιάλη και εξατμίστηκαν οι διαλύτες.
- Για τη προετοιμασία τη στήλης: περίπου 1.3g silicic acid ενυδατώθηκαν με προσθήκη 5mL χλωροφορμίου σε ποτήρι ζέσεως. Το εναιώρημα προστέθηκε ανακινούμενο στο κέντρο της στήλης, έτσι ώστε να πέσει όσο λιγότερο γίνεται στα τοιχώματα της στήλης. Στη συνέχεια προστέθηκε στο ποτήρι χλωροφόρμιο και η διαδικασία επαναλήφθηκε μέχρι να παραληφθεί το σύνολο σχεδόν του silicic acid.
- Για το πακετάρισμα της στήλης: με πιπέτα προστέθηκε ποσότητα χλωροφορμίου στα τοιχώματα της στήλης ώστε να απομακρυνθεί το silicic acid που είχε επικαθίσει στο εσωτερικό της στήλης. Στη συνέχεια ανοίχθηκε η στρόφιγγα ώστε να περάσει με πίεση ο διαλύτης απ' το silicic acid. Προσέχουμε να μην αναταράξουμε την επιφάνεια του silicic acid και να είναι όσο το δυνατόν επίπεδη.
- Κλασμάτωση: αφού ολοκληρώθηκε το πακετάρισμα αδειάζουμε τη στήλη από το διαλύτη και αφήνουμε τόσο ώστε η στάθμη του να είναι λίγο πάνω από την επιφάνεια του silicic acid. Εν συνεχεία, στο καθαρό λίπος προσθέτουμε μικρή ποσότητα χλωροφορμίου ώστε να διαλυθεί. Με μια γυάλινη πιπέτα προσθέτουμε τα λιπίδια στα τοιχώματα της στήλης ώστε να μη διαταράξουμε

την επιφάνεια. Ανοίγουμε λίγο τη στρόφιγγα μέχρι να δούμε τα λιπίδια να εισέρχονται στο silicic acid και κλείνουμε τη στρόφιγγα. Ακολουθεί η έκλουση των λιπιδίων η οποία πραγματοποιείται με διαδοχική προσθήκη 40 mL χλωροφορμίου, ακετόνης και μεθανόλης, ενώ τα κλάσματα συλλέγονται σε προζυγισμένες γυάλινες φιάλες. Το κλάσμα του χλωροφορμίου περιέχει τα ουδέτερα λιπίδια (NL), το κλάσμα της ακετόνης τα γλυκολιπίδια και τα σφιγγολιπίδια (G+S) και το κλάσμα της μεθανόλης τα φωσφολιπίδια (PL).



Εικόνα 17. Διαχωρισμός για τη παραλαβή του καθαρού λίπους (αριστερά) & στήλη κλασμάτωσης (δεξιά)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Στη παρούσα ενότητα παρατίθενται όλα τα πειραματικά αποτελέσματα που προέκυψαν από τις αναλύσεις, καθώς και οι κινητικές όλων των ζυμώσεων που πραγματοποιήθηκαν.

Πιο συγκεκριμένα, τα δεδομένα που μελετήθηκαν από κάθε ζύμωση είναι τα παρακάτω: παραγωγή βιομάζας, παραγωγή ενδοπολυσακχαριτών, κατανάλωση υποστρώματος, παραγωγή μικροβιακού λίπους, ποσοτικός και ποιοτικός προσδιορισμός λιπαρών οξέων και τέλος διαχωρισμός των κλασμάτων των λιπαρών οξέων. Οι παράμετροι που υπολογίστηκαν σχετικά με την μικροβιακή ανάπτυξη ήταν:

- ❖ Συντελεστής απόδοσης του παραγόμενου λίπους ως προς τη παραχθείσα βιομάζα ($Y_{L/X}$, %).
- ❖ Συντελεστής απόδοσης βιομάζας ως προς το καταναλωθέν υπόστρωμα ($Y_{X/S}$, %).
- ❖ Ποσοστό παραγόμενων ενδοπολυσακχαριτών (IPS, %).

Αρχικά πραγματοποιήθηκαν έξι ζυμώσεις με αρχική συγκέντρωση υποστρώματος 60 g L^{-1} με το στέλεχος *R. toruloides* NRRL Y 27012 χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα διαφορετική πηγή άνθρακα κάθε φορά (γλυκόζη, γλυκερόλη, ξυλόζη, μαννόζη, αραβινόζη, γαλακτόζη), με σκοπό να μελετηθεί η επίδραση του εκάστοτε υποστρώματος τόσο στην ανάπτυξη όσο και στη παραγωγή των προϊόντων της συγκεκριμένης ζύμης.

Πίνακας 6. Κινητικά δεδομένα από τη ζύμωση του στελέχους NNRL 27012 σε υπόστρωμα γλυκόζης με αρχική συγκέντρωση $S_0=68.63, \text{ g L}^{-1}$.

Time (h)	Scons (g L^{-1})	Lipids (g L^{-1})	X (g L^{-1})	Y _{X/S} (%)	Y _{L/X} (%)	IPS (%)
0	0.0	0.00	0.0	-	-	-
24	16.9	0.07	2.8	16	2	13.5
48	36.2	0.70	9.0	25	8	26.0^d
56	40.6	0.85	10.3	25	8	22.6
72	49.3	1.96	12.3	25	16	19.0
80	52.5	3.11	13.5	26	23	18.0
96	57.6	4.09	15.1	26	27	17.2
120	68.6	4.83^a	17.2	25	28^c	16.2
168	68.6	3.69	17.8^b	26	21	9.7

Συνθήκες καλλιέργειας: Ασυνεχής ζύμωση σε ανακινούμενες κωνικές φιάλες ($180 \pm 5 \text{ rpm}$), $T=28 \pm 1^\circ\text{C}$, $\text{pH}=5.5 \pm 0.2$, υπό αερόβιες συνθήκες και περιοριστικές σε άζωτο.

Σημ: a= Το σημείο με την μέγιστη παραγωγή λίπους, g L^{-1}

b= Το σημείο με την μέγιστη παραγωγή βιομάζας, g L^{-1}

c= Το σημείο με την μέγιστη $Y_{L/X}$, %

d= Το σημείο με το μέγιστο IPS, %

Από τον πίνακα 6 προκύπτουν τα εξής συμπεράσματα:

- Η μεγαλύτερη παραγωγή λίπους παρατηρήθηκε στις 120 ώρες της ζύμωσης και έφθασε 4.83 g L^{-1} .
- Η μέγιστη τιμή βιομάζας παρουσιάστηκε στις 168 ώρες της ζύμωσης και έφθασε τα 17.8 g L^{-1} .

- Το μέγιστο ποσοστό ενδοπολυσακχαριτών παρατηρήθηκε στις 48 ώρες της ζύμωσης με τιμή 26.0%.

Πίνακας 7. Κινητικά δεδομένα από τη ζύμωση του στελέχους NNRL 27012 σε υπόστρωμα γλυκερόλης με αρχική συγκέντρωση $S_0=58.01, \text{ g L}^{-1}$.

Time (h)	Scons (g L^{-1})	Lipids (g L^{-1})	X (g L^{-1})	$Y_{X/S}$ (%)	$Y_{L/X}$ (%)	IPS (%)
0	0.0	0.00	0.0	-	-	-
24	1.4	0.08	3.0	70	3	11.5
48	9.4	1.37	6.1	65	22	15.3
120	27.8	5.35	13.0	47	41	17.2^d
168	37.7	6.90	16.6	44	42^c	13.3
192	40.5	6.91	17.2	42	40	7.9
240	52.5	8.57^a	20.5	39	42^c	4.5
264	56.3	5.35	21.0^b	37	26	2.0

Συνθήκες καλλιέργειας: Ασυνεχής ζύμωση σε ανακινούμενες κωνικές φιάλες ($180 \pm 5 \text{ rpm}$), $T=28 \pm 1^\circ\text{C}$, $\text{pH}=5.5 \pm 0.2$, υπό αερόβιες συνθήκες και περιοριστικές σε άζωτο.

Σημ: a= Το σημείο με την μέγιστη παραγωγή λίπους, g L^{-1}

b= Το σημείο με την μέγιστη παραγωγή βιομάζας, g L^{-1}

c= Το σημείο με την μέγιστη $Y_{L/X}$, %

d= Το σημείο με το μέγιστο IPS, %

Από τον πίνακα 7 προκύπτουν τα εξής συμπεράσματα:

- Η μεγαλύτερη παραγωγή λίπους παρατηρήθηκε στις 240 ώρες της ζύμωσης και έφθασε 8.57 g L^{-1} .

- Η μέγιστη τιμή βιομάζας παρουσιάστηκε στις 264 ώρες της ζύμωσης και έφθασε τα 21.0g L⁻¹.
- Το μέγιστο ποσοστό ενδοπολυσακχαριτών παρατηρήθηκε στις 120 ώρες της ζύμωσης με τιμή 17.2%.

Πίνακας 8. Κινητικά δεδομένα από τη ζύμωση του στελέχους NNRL 27012 σε υπόστρωμα μαννόζης με αρχική συγκέντρωση S₀=50.01, g L⁻¹.

Time (h)	Scons (g L ⁻¹)	Lipids (g L ⁻¹)	X (g L ⁻¹)	Y _{x/s} (%)	Y _{L/X} (%)	IPS (%)
0	0.0	0.00	0.0	-	-	-
24	14.0	0.37	4.1	29	9	13.2
48	22.6	1.68	8.3	37	20	13.9^d
72	31.3	2.79	10.5	34	27	9.2
120	39.4	4.26	12.7	32	33	8.0
144	46.3	3.32	13.7	30	24	5.8
168	46.8	4.96^a	14.4	31	34^c	3.7
173	46.9	4.71	14.9	31	32	2.8
192	47.0	3.76	17.5^b	37	21	2.6
216	48.32	2.86	17.1	35	17	2.2

Συνθήκες καλλιέργειας: Ασυνεχής ζύμωση σε ανακινούμενες κωνικές φιάλες (180±5 rpm), T=28±1⁰C, pH=5.5±0.2, υπό αερόβιες συνθήκες και περιοριστικές σε άζωτο.

Σημ: a= Το σημείο με την μέγιστη παραγωγή λίπους g L⁻¹

b= Το σημείο με την μέγιστη παραγωγή βιομάζας g L⁻¹

c= Το σημείο με την μέγιστη Y_{L/X} %

d= Το σημείο με το μέγιστο IPS %

Από τον πίνακα 8 προκύπτουν τα εξής συμπεράσματα:

- Η μεγαλύτερη παραγωγή λίπους παρατηρήθηκε στις 168 ώρες της ζύμωσης και έφθασε 4.96 g L^{-1} .
- Η μέγιστη τιμή βιομάζας παρουσιάστηκε στις 192 ώρες της ζύμωσης και έφθασε τα 17.5 g L^{-1} .
- Το μέγιστο ποσοστό ενδοπολυσακχαριτών παρατηρήθηκε στις 48 ώρες της ζύμωσης με τιμή 13.9%.

Πίνακας 9. Κινητικά δεδομένα από τη ζύμωση του στελέχους NNRL 27012 σε υπόστρωμα ξυλόζης με αρχική συγκέντρωση $S_0=60.87, \text{ g L}^{-1}$.

Time (h)	Scons (g L^{-1})	Lipids (g L^{-1})	X (g L^{-1})	$Y_{X/S}$ (%)	$Y_{L/X}$ (%)	IPS (%)
0	0.0	0.00	0.0	-	-	-
24	8.4	0.00	1.0	12	0	-
48	22.6	0.92	3.6	16	25	14.8
72	32.3	1.08	5.7	19	19	21.9^d
80	33.9	1.95	6.1	23	32	21.2
96	37.8	2.87	7.7	25	37	15.5
120	42.1	4.26^a	9.3	24	46^c	15.5
130	44.8	3.78	9.9	22	38	14.2
144	47.6	1.04	10.2	21	10	13.9
168	50.9	1.08	10.7^b	21	10	11.5

Συνθήκες καλλιέργειας: Ασυνεχής ζύμωση σε ανακινούμενες κωνικές φιάλες ($180 \pm 5 \text{ rpm}$), $T=28 \pm 1^\circ\text{C}$, $\text{pH}=5.5 \pm 0.2$, υπό αερόβιες συνθήκες και περιοριστικές σε άζωτο.

Σημ: a= Το σημείο με την μέγιστη παραγωγή λίπους, g L^{-1}

b= Το σημείο με την μέγιστη παραγωγή βιομάζας, g L^{-1}

c= Το σημείο με την μέγιστη $Y_{L/X}$, %

d= Το σημείο με το μέγιστο IPS, %

Από τον πίνακα 9 προκύπτουν τα εξής συμπεράσματα:

- Η μεγαλύτερη παραγωγή λίπους παρατηρήθηκε στις 120 ώρες της ζύμωσης και έφθασε 4.26 g L^{-1} .
- Η μέγιστη τιμή βιομάζας παρουσιάστηκε στις 168 ώρες της ζύμωσης και έφθασε τα 10.7 g L^{-1} .
- Το μέγιστο ποσοστό ενδοπολυσακχαριτών παρατηρήθηκε στις 72 ώρες της ζύμωσης με τιμή 21.9%.

Πίνακας 10. Κινητικά δεδομένα από τη ζύμωση του στελέχους NNRL 27012 σε υπόστρωμα αραβινόζης με αρχική συγκέντρωση $S_0=61.45, \text{ g L}^{-1}$.

Time (h)	Scons (g L^{-1})	Lipids (g L^{-1})	X (g L^{-1})	Y _{x/s} (%)	Y _{L/x} (%)	IPS (%)
0	0.0	0.00	0.0	-	-	-
24	7.2	0.37	1.9	27	19	0.9
48	14.3	1.41	5.2	37	27	1.3
72	15.3	1.74	6.7	44	26	1.9
120	17.5	1.60	7.8	44	21	2.3^d
144	24.1	2.22	8.7	36	26	2.1
168	43.8	2.40	8.9	20	27	1.8
192	51.1	2.80	9.4	18	30	1.1
200	57.7	4.46^a	10.0^b	17	44^c	0.9
240	61.3	1.50	9.7	16	15	0.7

Συνθήκες καλλιέργειας: Ασυνεχής ζύμωση σε ανακινούμενες κωνικές φιάλες (180 ± 5 rpm), $T=28 \pm 1^\circ\text{C}$, $\text{pH}=5.5 \pm 0.2$, υπό αερόβιες συνθήκες και περιοριστικές σε άζωτο.

Σημ: a= Το σημείο με την μέγιστη παραγωγή λίπους, g L^{-1}

b= Το σημείο με την μέγιστη παραγωγή βιομάζας, g L^{-1}

c= Το σημείο με την μέγιστη $Y_{L/x}$, %

d= Το σημείο με το μέγιστο IPS, %

Από τον πίνακα 10 προκύπτουν τα εξής συμπεράσματα:

- Η μεγαλύτερη παραγωγή λίπους παρατηρήθηκε στις 200 ώρες της ζύμωσης και έφθασε 4.46 g L^{-1} .
- Η μέγιστη τιμή βιομάζας παρουσιάστηκε στις 200 ώρες της ζύμωσης και έφθασε τα 10.0 g L^{-1} .
- Το μέγιστο ποσοστό ενδοπολυσακχαριτών παρατηρήθηκε στις 120 ώρες της ζύμωσης με τιμή 2.3%.

Πίνακας 11. Κινητικά δεδομένα από τη ζύμωση του στελέχους NNRL 27012 σε υπόστρωμα γαλακτόζης με αρχική συγκέντρωση $S_0=61, \text{ g L}^{-1}$.

Time (h)	Scons (g L^{-1})	Lipids (g L^{-1})	X (g L^{-1})	Y _{X/S} (%)	Y _{L/X} (%)	IPS (%)
0	0.0	0.00	0.0	-	-	-
24	5.8	0.00	4.4	77	0	2.1
48	22.3	0.15	8.8	40	2	5.4
72	30.2	0.61	11.2	37	5	8.3^d
96	37.5	0.46	13.0	35	4	8.1
120	47.1	1.44^a	14.4	31	10^c	5.7
144	58.4	1.02	15.0	26	7	5.0
152	60.4	0.9	14.7	24	6	4.8
168	61.0	0.84	16.2^b	27	5	1.2

Συνθήκες καλλιέργειας: Ασυνεχής ζύμωση σε ανακινούμενες κωνικές φιάλες ($180 \pm 5 \text{ rpm}$), $T=28 \pm 1^\circ\text{C}$, $\text{pH}=5.5 \pm 0.2$, υπό αερόβιες συνθήκες και περιοριστικές σε άζωτο.

Σημ: a= Το σημείο με την μέγιστη παραγωγή λίπους, g L^{-1}

b= Το σημείο με την μέγιστη παραγωγή βιομάζας, g L^{-1}

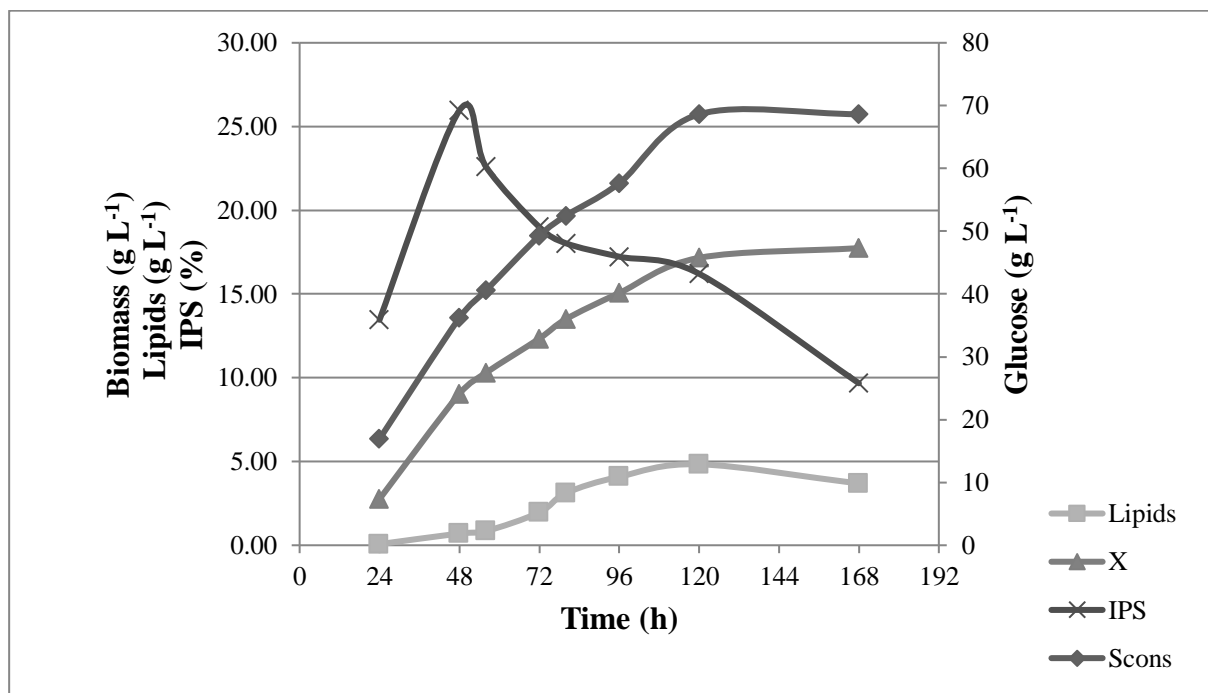
c= Το σημείο με την μέγιστη $Y_{L/X}$, %

d= Το σημείο με το μέγιστο IPS, %

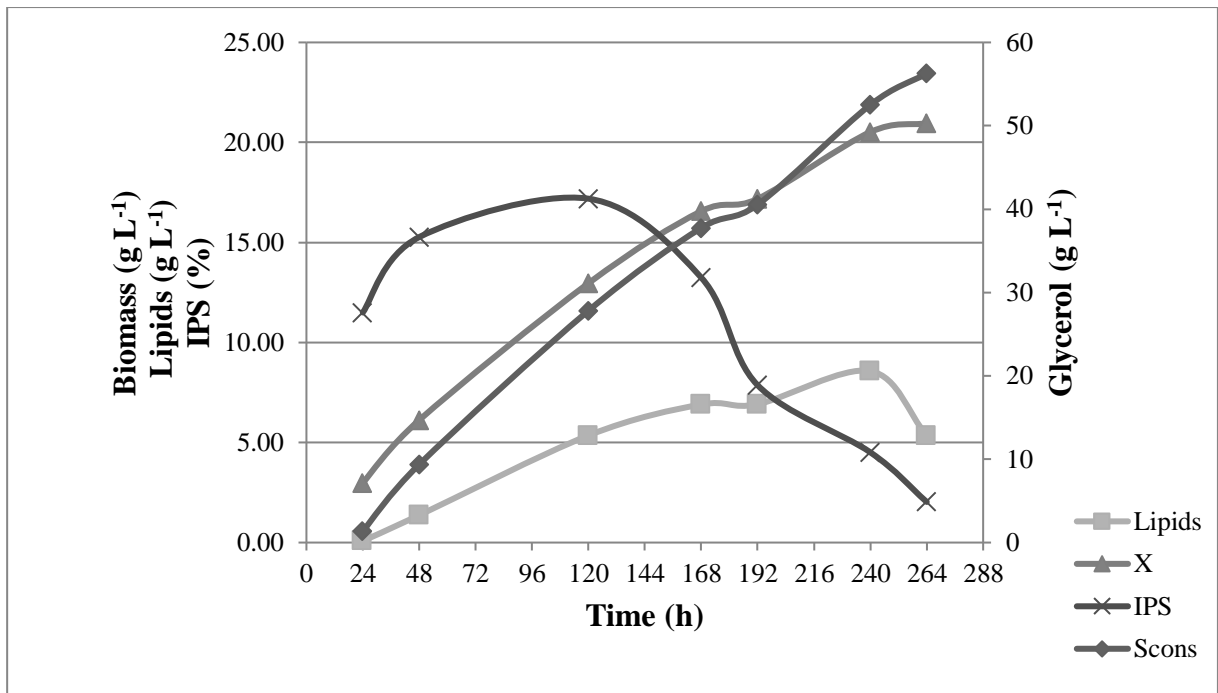
Από τον πίνακα 11 προκύπτουν τα εξής συμπεράσματα:

- Η μεγαλύτερη παραγωγή λίπους παρατηρήθηκε στις 120 ώρες της ζύμωσης και έφθασε 1.44g L^{-1} .
- Η μέγιστη τιμή βιομάζας παρουσιάστηκε στις 168 ώρες της ζύμωσης και έφθασε τα 16.2g L^{-1} .
- Το μέγιστο ποσοστό ενδοπολυσακχαριτών παρατηρήθηκε στις 72 ώρες της ζύμωσης με τιμή 8.3%

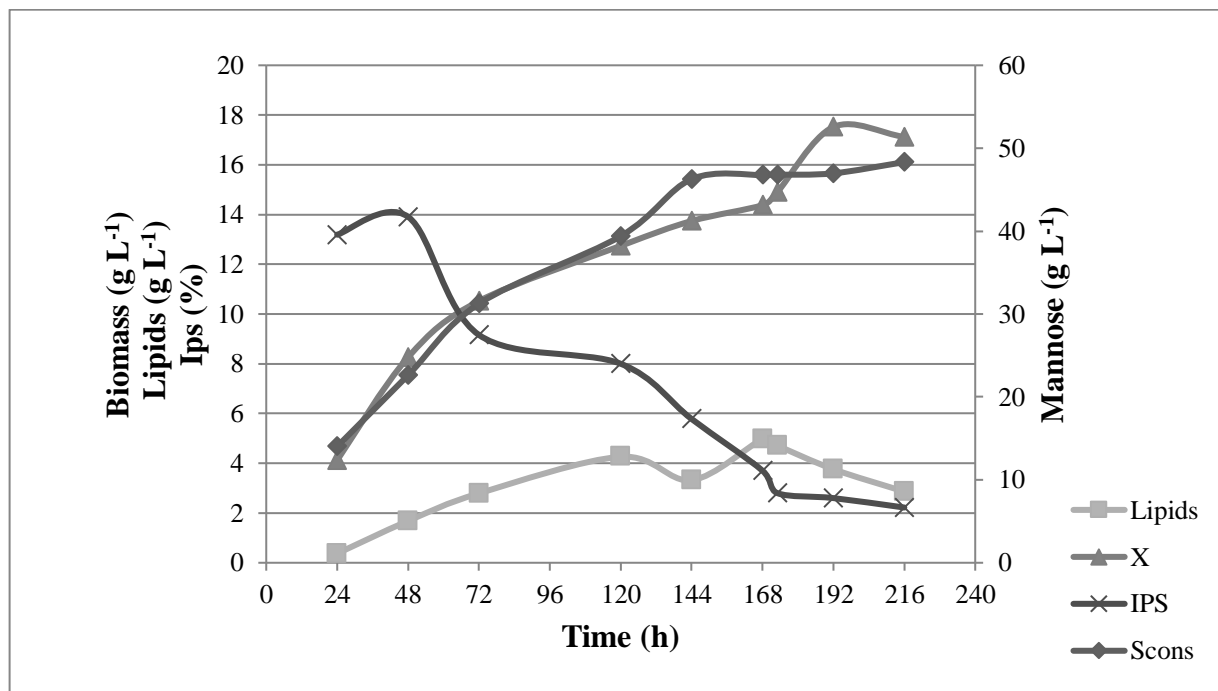
Ακολουθούν τα παρακάτω γραφήματα: της μεταβολής της βιομάζας, τη κατανάλωση του υποστρώματος, η παραγωγή μικροβιακού λίπους και το παραγόμενο ποσοστό των ενδοπολυσακχαριτών (IPS) σε συνάρτηση με το χρόνο της εκάστοτε ζύμωσης.



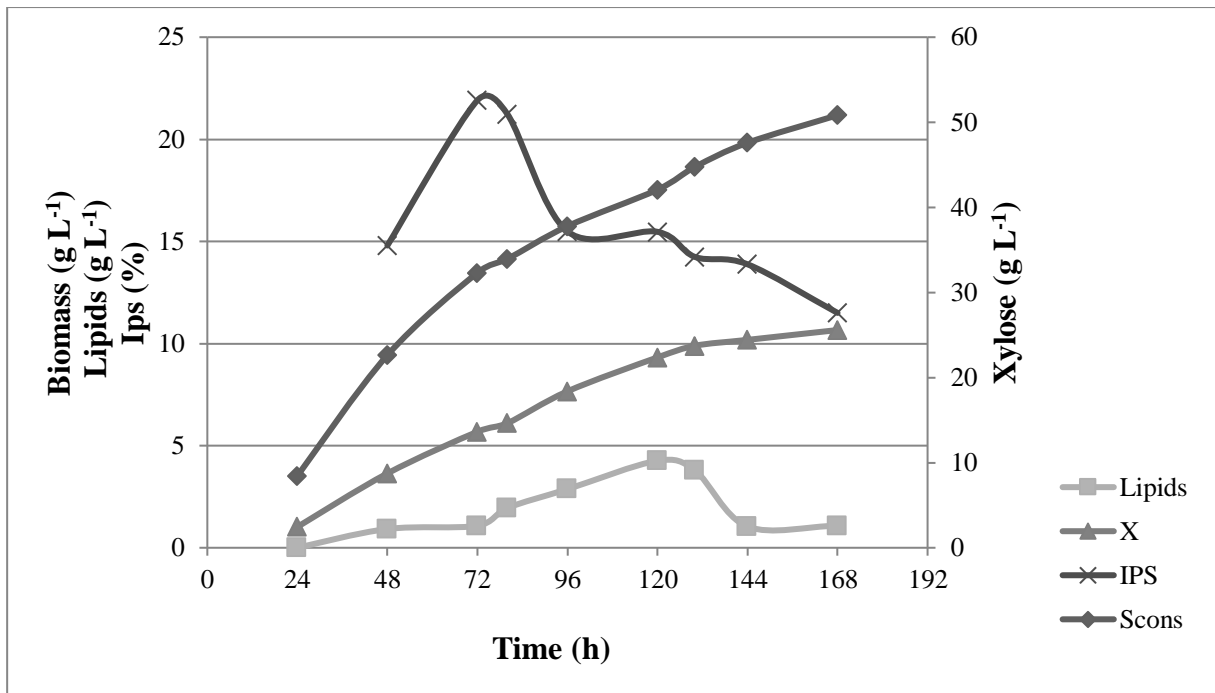
Γράφημα 1 Κινητικά δεδομένα σε υπόστρωμα γλυκόζης.



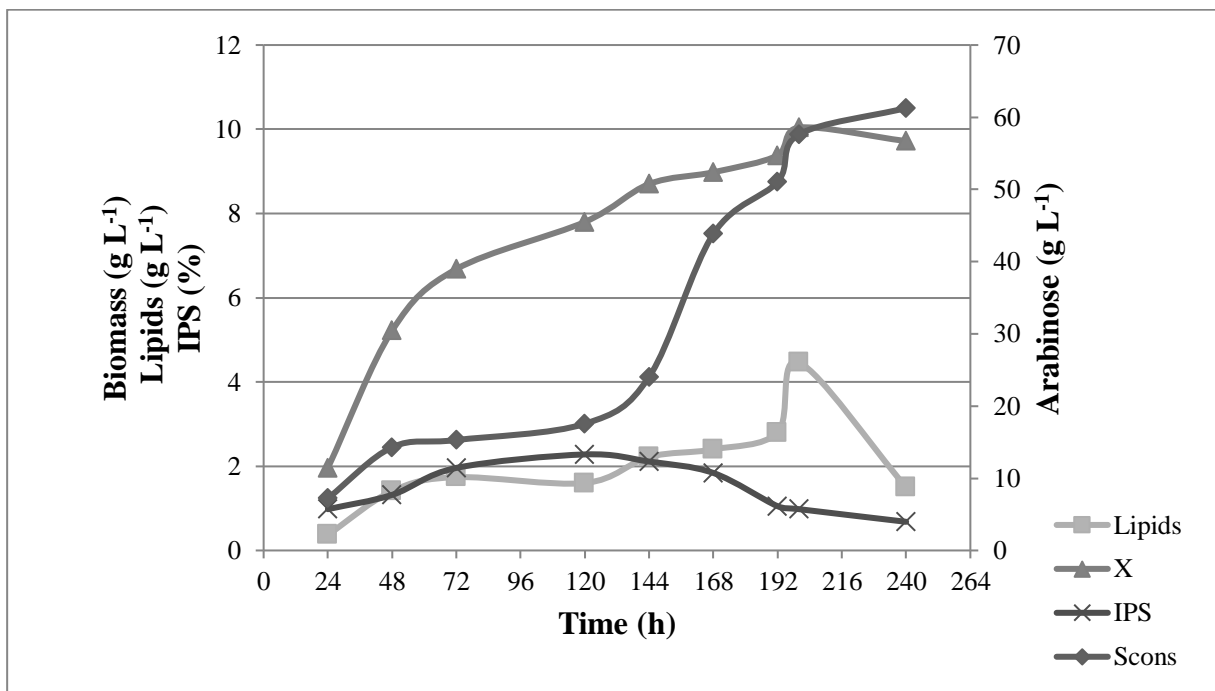
Γράφημα 2 Κινητικά δεδομένα σε υπόστρωμα γλυκερόλης.



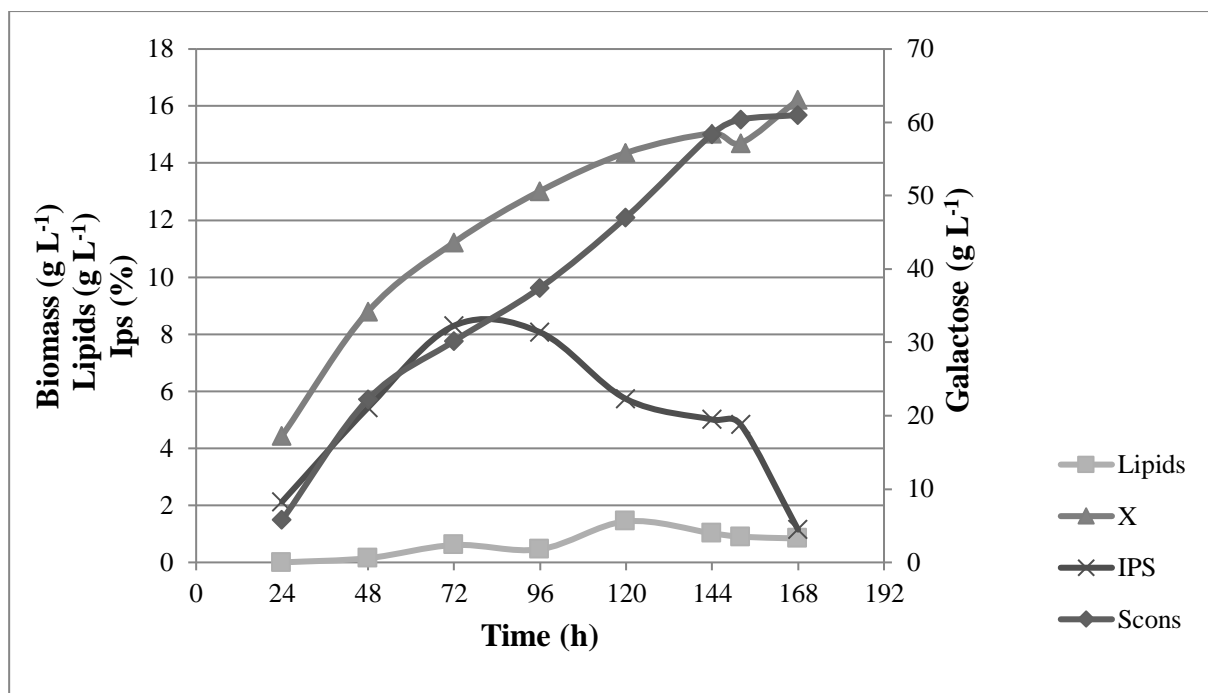
Γράφημα 3 Κινητικά δεδομένα σε υπόστρωμα μαννόζης.



Γράφημα 4 Κινητικά δεδομένα σε υπόστρωμα ξυλόζης.



Γράφημα 5 Κινητικά δεδομένα σε υπόστρωμα αραβινόζης.



Γράφημα 6 Κινητικά δεδομένα σε υπόστρωμα γαλακτόζης.

Με τη βοήθεια της αέριας χρωματογραφίας προσδιορίστηκε η σύσταση των παραγόμενων λιπαρών οξέων. Για κάθε ζύμωση μελετήθηκαν σε τρεις φάσεις: στα μέσα της εκθετικής (ΜΕΦ), τέλος της εκθετικής (ΤΕΦ) και στη στάσιμη φάση (ΣΦ) ώστε να διαπιστωθούν οι διακυμάνσεις κατά τη διάρκεια των ζυμώσεων.

Τα λιπαρά οξέα που παρατηρήθηκαν είναι τα εξής:

- Μυριστικό οξύ (C14:0)
- Παλμιτικό οξύ (C16:0)
- Παλμιτελαϊκό οξύ (^{Δ9}C16:1)
- Στεατικό οξύ (C18:0)
- Ελαϊκό οξύ (^{Δ9}C18:1)
- Λινελαϊκό οξύ (^{Δ9, 12}C18:2)

Παρακάτω παρουσιάζονται τα αποτελέσματα σε μορφή ποσοστού % που προέκυψαν από την ανάλυση.

Πίνακας 12. Σύσταση των λιπιδίων σε λιπαρά οξέα σε υπόστρωμα γλυκόζης.

Λιπαρά Οξέα (%)	ΜΕΦ	ΤΕΦ	ΣΦ
C14:0	1.57	2.19	2.01
C16:0	35.20	35.00	35.75
Δ^9C16:1	0.75	0.07	0.64
C18:0	3.45	4.60	4.52
Δ^9C18:1	53.89	52.29	51.38
Δ^9, Δ^{12}C18:2	5.11	5.84	5.65

Από τον πίνακα 12 προκύπτουν τα εξής συμπεράσματα:

- Κυρίαρχο λιπαρό οξύ στη ζύμωση με πηγή άνθρακα τη γλυκόζη είναι το ελαϊκό οξύ σε ποσοστό από 53.89 – 51.38%. επομένως είναι κατάλληλο για παραγωγή βιοντίζελ
- Ακολουθούν το παλμιτικό οξύ με ποσοστό 35.20 – 35.75% και το λινελαϊκό οξύ με 5.12 -5.68%
- Η ποσοστιαία κατανομή των λιπαρών οξέων δεν μεταβάλλεται ιδιαίτερα κατά τη διάρκεια της ζύμωσης

Πίνακας 13. Σύσταση των λιπιδίων σε λιπαρά οξέα σε υπόστρωμα γλυκερόλης.

Λιπαρά Οξέα (%)	ΜΕΦ	ΤΕΦ	ΣΦ
C14:0	-	-	-
C16:0	28.66	32.53	32.07
Δ^9C16:1	0.51	0.42	0.35
C18:0	9.17	8.63	9.59
Δ^9C18:1	51.24	49.68	48.96
Δ^9, Δ^{12}C18:2	10.40	8.73	9.01

Από τον πίνακα 13 προκύπτουν τα εξής συμπεράσματα:

- Κυρίαρχο λιπαρό οξύ στη ζύμωση με πηγή άνθρακα τη γλυκερόλη είναι το ελαϊκό οξύ σε ποσοστό από 51.24 – 48.96%. επομένως είναι οριακά κατάλληλο για παραγωγή βιοντίζελ
- Ακολουθούν το παλμιτικό οξύ με ποσοστό 28.66 – 32.07% και το λινελαϊκό οξύ με 10.40 -9.01%
- Η ποσοστιαία κατανομή των λιπαρών οξέων δεν μεταβάλλεται ιδιαίτερα κατά τη διάρκεια της ζύμωσης

Πίνακας 14. Σύσταση των λιπιδίων σε λιπαρά οξέα σε υπόστρωμα μαννόζης.

Λιπαρά Οξέα (%)	ΜΕΦ	ΤΕΦ	ΣΦ
C14:0	0.02	-	0.10
C16:0	29.72	28.57	28.35
Δ^9C16:1	0.29	0.42	0.37
C18:0	6.84	8.58	8.18
Δ^9C18:1	56.82	53.19	52.85
Δ^9, Δ^{12}C18:2	6.27	9.21	10.12

Από τον πίνακα 14 προκύπτουν τα εξής συμπεράσματα:

- Κυρίαρχο λιπαρό οξύ στη ζύμωση με πηγή άνθρακα τη μαννόζη είναι το ελαϊκό οξύ σε ποσοστό από 56.82 – 52.85%. επομένως είναι κατάλληλο για παραγωγή βιοντίζελ
- Ακολουθούν το παλμιτικό οξύ με ποσοστό 29.72 – 28.35% και το λινελαϊκό οξύ με 6.30 -10.13%
- Η ποσοστιαία κατανομή των λιπαρών οξέων δεν μεταβάλλεται ιδιαίτερα κατά τη διάρκεια της ζύμωσης

Πίνακας 15. Σύσταση των λιπιδίων σε λιπαρά οξέα σε υπόστρωμα ξυλόζης.

Λιπαρά Οξέα (%)	ΜΕΦ	ΤΕΦ	ΣΦ
C14:0	0.15	1.80	1.13
C16:0	48.18	30.53	26.49
Δ^9C16:1	0.28	0.60	0.33
C18:0	15.38	6.64	7.29
Δ^9C18:1	35.67	51.55	54.51
Δ^9, Δ^{12}C18:2	0.31	8.85	10.22

Από τον πίνακα 15 προκύπτουν τα εξής συμπεράσματα:

- Κυρίαρχο λιπαρό οξύ στη ζύμωση με πηγή άνθρακα τη ξυλόζη είναι το ελαϊκό οξύ σε ποσοστό από 35.67 – 54.51%. επομένως είναι κατάλληλο για παραγωγή βιοντίζελ
- Ακολουθούν το παλμιτικό οξύ με ποσοστό 48.18 – 26.49% και το στεατικό οξύ με 15.38 – 7.29%
- Η ποσοστιαία κατανομή των λιπαρών οξέων παρουσιάζει μεταβολή κατά τη διάρκεια της ζύμωσης

Πίνακας 16. Σύσταση των λιπιδίων σε λιπαρά οξέα σε υπόστρωμα αραβινόζης.

Λιπαρά Οξέα (%)	ΜΕΦ	ΤΕΦ	ΣΦ
C14:0	3.44	4.36	4.03
C16:0	37.02	37.0	41.03
Δ^9C16:1	0.6	1.3	1.8
C18:0	9.37	10.2	9.85
Δ^9C18:1	49.27	45.89	43.11
Δ^9, Δ^{12}C18:2	-	-	-

Από τον πίνακα 16 προκύπτουν τα εξής συμπεράσματα:

- Κυρίαρχο λιπαρό οξύ στη ζύμωση με πηγή άνθρακα τη αραβινόζη είναι το ελαϊκό οξύ σε ποσοστό από 49.27 – 43.11%. επομένως είναι κατάλληλο για παραγωγή βιοντίζελ
- Ακολουθούν το παλμιτικό οξύ με ποσοστό 41.03 – 37.02% και το στεατικό οξύ με 10.2 – 9.37%
- Η ποσοστιαία κατανομή των λιπαρών οξέων δεν παρουσιάζει ιδιαίτερη μεταβολή κατά τη διάρκεια της ζύμωσης

Πίνακας 17. Σύσταση των λιπιδίων σε λιπαρά οξέα σε υπόστρωμα γαλακτόζης.

Λιπαρά Οξέα (%)	ΜΕΦ	ΤΕΦ	ΣΦ
C14:0	2.58	2.14	2.43
C16:0	33.03	35.56	36.48
Δ^9C16:1	0.82	2.17	0.79
C18:0	6.7	5.00	5.65
Δ^9C18:1	49.8	48.39	46.93
Δ^9, Δ^{12}C18:2	7.04	6.7	7.01

Από τον πίνακα 17 προκύπτουν τα εξής συμπεράσματα:

- Κυρίαρχο λιπαρό οξύ στη ζύμωση με πηγή άνθρακα τη γαλακτόζη είναι το ελαϊκό οξύ σε ποσοστό από 46.93 – 49.8%. επομένως είναι κατάλληλο για παραγωγή βιοντίζελ
- Ακολουθούν το παλμιτικό οξύ με ποσοστό 33.03 – 36.48% και το οξύ με λινελαϊκό 7.04 – 6.7%
- Η ποσοστιαία κατανομή των λιπαρών οξέων δεν παρουσιάζει ιδιαίτερη μεταβολή κατά τη διάρκεια της ζύμωσης

Στη συνέχεια παρουσιάζονται τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την κλασμάτωση των λιπιδίων. Για τη συγκεκριμένη ανάλυση εξετάστηκαν δύο δείγματα για κάθε ζύμωση ένα από τη μέση και ένα προς το τέλος της κάθε ζύμωσης ώστε να υπάρχει ικανοποιητική ποσότητα λίπους για τη διεξαγωγή της ανάλυσης. Σημαντικό είναι να αναφερθεί ότι στη ζύμωση με τη χρήση υποστρώματος γαλακτόζης δεν πραγματοποιήθηκε κλασμάτωση λόγω ανεπαρκούς ποσότητας λίπους.

Πίνακας 18. Συγκεντρωτικός πίνακας ποσοστών κλασμάτων για όλες τις ζυμώσεις.

Υπόστρωμα:	Γλυκόζη		Γλυκερόλη		Μαννόζη		Ξυλόζη		Αραβινόζη
Χρόνος ζύμωσης (h):	56	96	120	240	72	120	96	120	120
ΚΛΑΣΜΑΤΑ (%)									
Ουδέτερα λίπη:	76.29	79.81	79.02	82.28	75.9	80.06	76.50	79.40	81.02
Σφιγγο-γλυκολιπίδια:	16.5	16.37	12.07	11.79	16.98	16.13	16.96	16.32	15.96
Φωσφολιπίδια:	7.21	3.82	8.91	5.93	7.12	3.81	6.54	4.28	3.02

Από τον πίνακα 18 προκύπτουν τα παρακάτω συμπεράσματα:

- Σε όλες τις ζυμώσεις τα ουδέτερα λίπη κατέλαβαν το υψηλότερο ποσοστό από 76-81%
- Ακολουθούν τα σφιγγο-γλυκολιπίδια με ποσοστό 11.79-16.98% ενώ τα φωσφολιπίδια παρουσίασαν τα χαμηλότερα ποσοστά από 3.02-8.91%

Στους πίνακες που ακολουθούν παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από την ανάλυση της αέριας χρωματογραφίας για τη σύσταση των κλασμάτων που αναφέρθηκαν παραπάνω για κάθε ζύμωση.

Πίνακας 19. Σύσταση λιπαρών οξέων των κλασμάτων σε υπόστρωμα γλυκόζης.

Κλάσματα λιπιδίων	Χρόνος ζύμωσης (h)	Λιπαρά Οξέα (%)			
		C16:0	C18:0	^{Δ9} C18:1	^{Δ9, 12} C18:2
Ουδέτερα λίπη	56	34.56	3.97	51.36	5.11
	96	39.02	4.50	59.3	2.18
Σφιγγο- γλυκολιπίδια	56	35.25	3.12	52.68	5.56
	96	40.73	3.78	48.02	2.47
Φωσφολιπίδια	56	34.43	3.95	50.86	5.76
	96	35.09	1.38	55.86	2.67

Από τον πίνακα 19 προκύπτουν τα εξής:

- Και τα τρία κλάσμα ήταν ακόρεστα σε όλη τη διάρκεια της ζύμωσης με το ελαϊκό οξύ να παίρνει τιμές από 48.02% - 59.3%. ενώ το παλμιτικό οξύ κυμάνθηκε μεταξύ 34.43% -40.73%.

Πίνακας 20. Σύσταση λιπαρών οξέων των κλασμάτων σε υπόστρωμα γλυκερόλης.

Κλάσματα λιπιδίων	Χρόνος ζύμωσης (h)	Λιπαρά Οξέα (%)			
		C16:0	C18:0	^{Δ9} C18:1	^{Δ9, 12} C18:2
Ουδέτερα λίπη	120	32.85	9.85	44.78	7.52
	240	31.56	10.04	44.29	9.11
Σφιγγο- γλυκολιπίδια	120	31.9	8.04	42.7	12.36
	240	35.6	11.23	38.92	9.25
Φωσφολιπίδια	120	35.9	11.60	39.85	7.66
	240	34.30	11.65	42.63	6.32

Από τον πίνακα 20 προκύπτουν τα εξής:

- Και τα τρία κλάσμα ήταν ακόρεστα σε όλη τη διάρκεια της ζύμωσης με το ελαϊκό οξύ να παίρνει τιμές από 38.92% - 44.78%. ενώ το παλμιτικό οξύ κυμάνθηκε μεταξύ 31.56% -35.9%.

Πίνακας 21. Σύσταση λιπαρών οξέων των κλασμάτων σε υπόστρωμα μαννόζης.

Κλάσματα λιπιδίων	Χρόνος ζύμωσης (h)	Λιπαρά Οξέα (%)			
		C16:0	C18:0	^{Δ9} C18:1	^{Δ9, 12} C18:2
Ουδέτερα λίπη	72	29.40	6.84	50.15	8.61
	144	29.57	4.71	51.58	9.14
Σφιγγο- γλυκολιπίδια	72	27.93.	4.3	53.75	9.02
	144	28.62	3.57	45.18	12.99
Φωσφολιπίδια	72	33.17	5.17	50.34	6.32
	144	31.71	6.14	49.77	7.38

Από τον πίνακα 21 προκύπτουν τα εξής:

- Και τα τρία κλάσματα, των ουδέτερων λιπιδίων, των Σφιγγο-γλυκολιπιδίων καθώς και των φωσφολιπιδίων αρχικά ήταν ακόρεστα σε όλη τη διάρκεια της ζύμωσης με το ελαϊκό οξύ να κυμαίνεται από 45.18% -53.75%.

Πίνακας 22. Σύσταση λιπαρών οξέων των κλασμάτων σε υπόστρωμα ξυλόζης.

Κλάσματα λιπιδίων	Χρόνος ζύμωσης (h)	Λιπαρά Οξέα (%)			
		C16:0	C18:0	Δ^9 C18:1	$\Delta^9, 12$ C18:2
Ουδέτερα λίπη	96	31.96	4.89	51.22	6.93
	120	30.05	5.93	51.96	7.06
Σφιγγο- γλυκολιπίδια	96	28.09	6.96	47.69	12.26
	120	25.07	7.52	50.01	12.4
Φωσφολιπίδια	96	27.54	5.96	48.52	12.98
	120	25.02	6.97	49.69	13.32

Από τον πίνακα 22 προκύπτουν τα εξής:

- Και τα τρία κλάσματα των λιπιδίων παρέμειναν σταθερά ακόρεστα, σε όλη τη διάρκεια της ζύμωσης, με το ελαϊκό οξύ να κυμαίνεται από 48.52% -51.96%, ενώ το παλμιτικό οξύ από 25.02%- 31-96%.

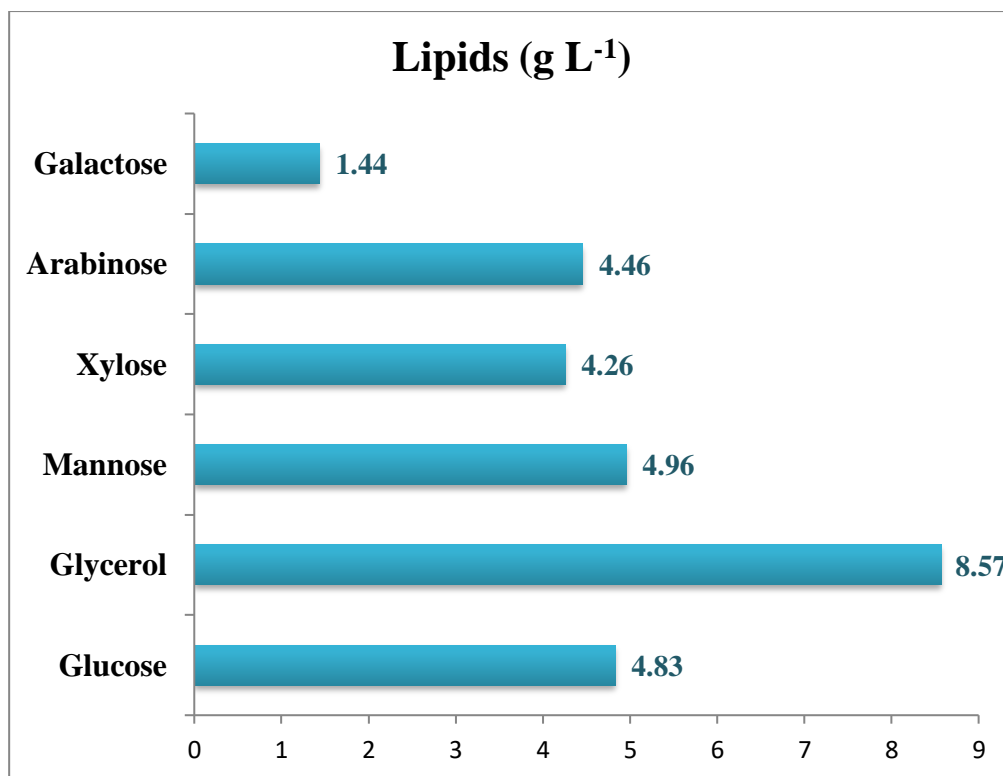
Πίνακας 23. Σύσταση λιπαρών οξέων των κλάσμάτων σε υπόστρωμα αραβινόζης.

Κλάσματα λιπιδίων	Χρόνος ζύμωσης (h)	Λιπαρά Οξέα (%)			
		C16:0	C18:0	^{Δ9} C18:1	^{Δ9, 12} C18:2
Ουδέτερα λίπη	192	38.30	10.01	44.51	-
Σφιγγο- γλυκολιπίδια	192	31.92	9.84	43.42	-

Από τον πίνακα 23 προκύπτουν τα εξής:

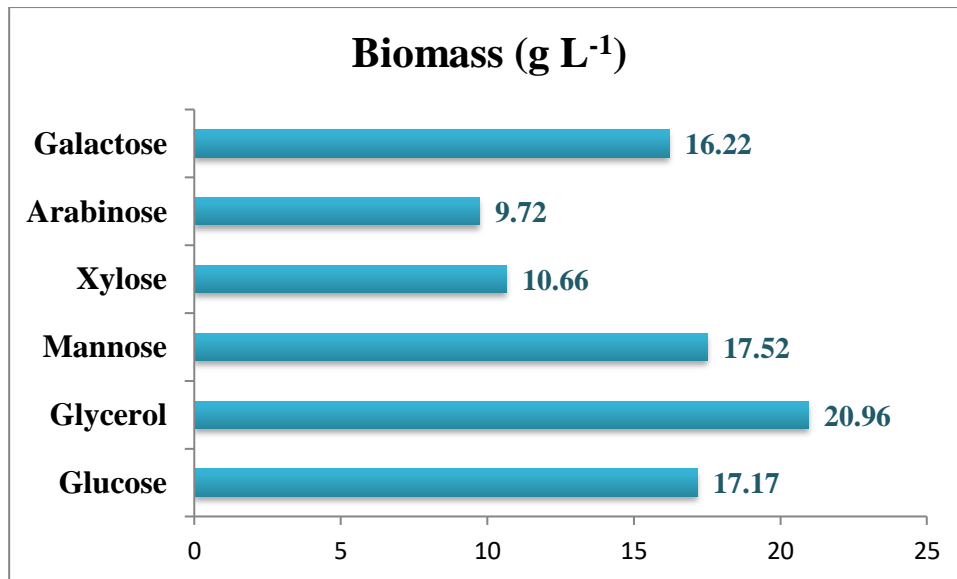
- Τόσο στο κλάσμα των ουδέτερων λιπιδίων όσο και σε αυτό των Σφιγγο-γλυκολιπιδίων κυρίαρχα λιπαρά οξέα ήταν το παλμιτικό και το ελαϊκό οξύ, με τα ουδέτερα λιπίδια να παρουσιάζουν υψηλότερο ποσοστό παλμιτικό 38.30% συγκριτικά με τα Σφιγγο-γλυκολιπίδια με 31.92%.
- Απουσία Λινελαϊκού οξέος και στα δύο κλάσματα.

Στις ασυνεχείς ζυμώσεις βυθού του στελέχους NRRL Y-27012 που πραγματοποιήθηκαν παρατηρήθηκε ότι η μέγιστη παραγωγή λίπους επιτεύχθηκε με τη χρήση της γλυκερόλης ως πηγή άνθρακα. Ακολούθησε η ζύμωση σε υπόστρωμα γλυκόζης σχεδόν με τη μισή παραγόμενη ποσότητα λίπους συγκριτικά με τη γλυκερόλη ενώ παρουσίασε κοντινές τιμές με τα υποστρώματα μαννόζης, αραβινόζης και ξυλόζης. Αντίθετα το μικροβιακό λίπος σε υπόστρωμα γαλακτόζης είχε τη χαμηλότερη τιμή η οποία μόλις που έφτασε το 1.5 g L^{-1} . Επομένως, η γαλακτόζη δεν είναι ιδιαίτερα αποτελεσματική για τη παραγωγή λιπιδίων τουλάχιστον από το συγκεκριμένο στέλεχος κάτι το οποίο επαληθεύεται και από τους Fillet *et al.*, 2015. Ενώ η γλυκερόλη φαίνεται ως η πιο αποδοτική πηγή άνθρακα το οποίο συμπίπτει με τη βιβλιογραφία (Bommareddy *et al.*, 2015). Στο γράφημα 7 παρουσιάζονται οι μέγιστες τιμές παραγωγής μικροβιακού λίπους σε g L^{-1} ανά ζύμωση.



Γράφημα 7. Μέγιστη συγκέντρωση μικροβιακού λίπους κατά την αύξηση του στελέχους NRRL Y-27012 σε διάφορα υποστρώματα.

Αξιόλογη ήταν και η κυτταρική ανάπτυξη σχεδόν σε όλες τις ζυμώσεις. Αναλυτικότερα, όπως μπορεί να κανείς να συμπεράνει από το γράφημα 8 η ζύμωση σε υπόστρωμα γλυκερόλης είναι και πάλι αυτή με την υψηλότερη τιμή και ακολουθούν η μαννόζη η γλυκόζη και η γαλακτόζη. Σε αντίθεση με τη παραγωγή λιπιδίων οι ζυμώσεις με τις χαμηλότερες τιμές για τη παραγόμενη βιομάζα είναι η αραβινόζη και η ξυλόζη με σχεδόν τη μισή ποσότητα από αυτή της γλυκερόλης.



Γράφημα 8. Μέγιστη συγκέντρωση βιομάζας κατά την αύξηση του στελέχους NRRL Y-27012 σε διάφορα υποστρώματα.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Σκοπός της παρούσας ερευνητικής μελέτης, όπως έχει προαναφερθεί, είναι η διερεύνηση για την επίδραση των διαφορετικών πηγών άνθρακα (γλυκόζη, γλυκερόλη, μαννόζη, αραβινόζη, γαλακτόζη, ξυλόζη) στο μεταβολισμό της ελαιογόνου ζύμης *Rhodospiridium toruloides* NRRL Y-27012 ως προς τη κυτταρική ανάπτυξη τη παραγωγή μικροβιακού λίπους και ενδοπολυσακχαριτών καθώς επίσης και η επίδραση των προαναφερθέντων πηγών στην σύσταση των λιπιδίων.

Στον πίνακα 24 γίνεται σύγκριση των αποτελεσμάτων για τη παραγόμενη κυτταρική βιομάζα, το μικροβιακό λίπος καθώς και ο συντελεστής απόδοσης του λίπους ως προς τη βιομάζα για τη ζύμη *R.toruloides* της παρούσας μελέτης με δημοσιευμένα αποτελέσματα άλλων ερευνών.

Πίνακας 24. Συγκριτικά αποτελέσματα ερευνών.

Strain	Culture mode	Substrate	X (g L⁻¹)	L (g L⁻¹)	Y_{L/x} (%)	Reference
ACCC 20341	Fed-batch bioreactor	Glucose	27.4	11.0	40.0	Qi <i>et al.</i> , 2016
Mutant M18	Fed-batch bioreactor	Glucose	31.0	12.2	39.0	Qi <i>et al.</i> , 2016
DSMZ 4444	Shake flasks	Glycerol/ sunflower meal hydrolysate blend	27.9	-	29.0	Leiva-Candia <i>et al.</i> , 2015
DSMZ 4444	Fed-batch bioreactor	Glycerol/ sunflower meal hydrolysate blend	37.4	-	51.3	Leiva-Candia <i>et al.</i> , 2015
DSMZ 4444	Online sugar control Fed-batch bioreactor	lignocellulosic hydrolysate	54.0	32.0	-	Qiang <i>et al.</i> , 2016
DSMZ 4444	Batch bioreactor	Glycerol	11.2	< 5	-	Bommareddy <i>et al.</i> , 2015

DSM 4444	Batch bioreactor	Glycerol	15	-	57	Bommareddy <i>et al.</i> , 2015
DSM 4444	Batch bioreactor	Glucose	22	-	40	Bommareddy <i>et al.</i> , 2015
NCYC 921	Batch shake flasks	Glucose	5.9	1.24	-	Dias <i>et al.</i> , 2016
AS 2. 1389	Shake flasks	Glucose	18.3	-	76.0	Li <i>et al.</i> , 2007
AS 2. 1389	Batch bioreactor	Glycerol	26.7	-	69.5	Xu <i>et al.</i> , 2012
AS 2. 1389	Shake flasks	Glycerol	19.2	-	47.7	Xu <i>et al.</i> , 2012
AS 2. 1389	Batch shake flasks	Glycerol	26.5	10.0	-	Jingyang <i>et al.</i> , 2016
CBS14	Batch bioreactor	Glucose	12.5	-	20.8	Moreton, 1988
CBS14	Batch bioreactor	Xylose	8.3	-	42.2	Moreton, 1988
CBS14	Batch bioreactor	Fructose	8.7	-	39.8	Moreton, 1988
CBS14	Batch bioreactor	Xylose	11.0	3.0	-	Wiebe <i>et al.</i> , 2012
CBS14	Fed-batch bioreactor	Glucose	35.0	-	71.4	Wiebe <i>et al.</i> , 2012
CBS14	Batch bioreactor	Arabinose	18.0	2.6	-	Wiebe <i>et al.</i> , 2012
IFO0880	Batch shake flasks	Xylose	23.0	4.4	-	Jagtap & Rao, 2017
CBS14	Fed-batch bioreactor	Blend: Glucose. Xylose. Arabinose	27.0	-	55.5	Wiebe <i>et al.</i> , 2012
Y4	Fed-batch	Glucose	106.5	-	67.5	Li <i>et al.</i> , 2007

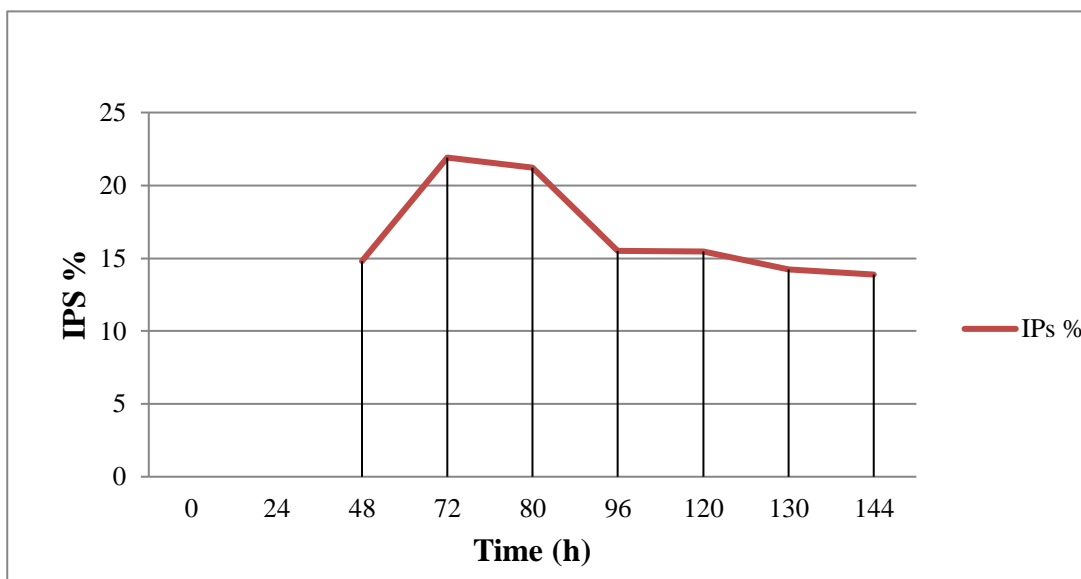
bioreactor						
Y4	Shake flasks	Glucose (phosphate-limited trial)	19.4	-	62.4	Wu <i>et al.</i> , 2011
Y4	Shake flasks	Glucose (sulphate-limited trial)	23.0	-	20.8	Wu <i>et al.</i> , 2011
Y-27012	Shake flasks	Biodiesel-derived glucerosol	30.0	-	40.0	Tchakouteu <i>et al.</i> , 2015
Y-27012	Shake flasks	Glucose	17.74	4.83	28.0	Παρούσα μελέτη
Y-27012	Shake flasks	Glycerol	20.96	8.57	42.0	Παρούσα μελέτη
Y-27012	Shake flasks	Xylose	10.66	4.26	46.0	Παρούσα μελέτη
Y-27012	Shake flasks	Mannose	17.52	4.96	34.0	Παρούσα μελέτη
Y-27012	Shake flasks	Arabinose	9.72	4.46	47.0	Παρούσα μελέτη
Y-27012	Shake flasks	Galactose	16.22	1.44	10.0	Παρούσα μελέτη

Τα αποτελέσματα των Zhang *et al.* έδειξαν ότι η ζύμη *R. toruloides* ήταν ικανή να παράγει $16.4 \pm 1.1 \text{ g L}^{-1}$ λίπος με μόνη πηγή άνθρακα τη γλυκόζη. Ενώ με την ίδια αρχική συγκέντρωση υποστρώματος αλλά τη ξυλόζη ως πηγή άνθρακα παράχθηκε σχεδόν η μισή ποσότητα λιπιδίων $9.5 \pm 1.3 \text{ g L}^{-1}$.

Η παρουσία ξυλόζης στο μέσο προκάλεσε την αύξηση του παλμιτικού και του λινελαϊκού οξέος αντίθετα μειώθηκε το ποσοστό του ελαϊκού οξέος στα λιπαρά οξέα συγκριτικά με το μέσο που περιείχε γλυκόζη (Wiebe *et al.*, 2012).

Επίσης υπολογίστηκαν για όλες τις ζυμώσεις οι παραγόμενοι ενδοπολυσακχαρίτες. Το ποσοστό των παραγόμενων ενδοπολυσακχαριτών (IPS%) έφθασε περίπου τα 25.96% στις 48 ώρες τη ζύμωση με υπόστρωμα τη γλυκόζη και παρουσίασε και τους υψηλότερες τιμές

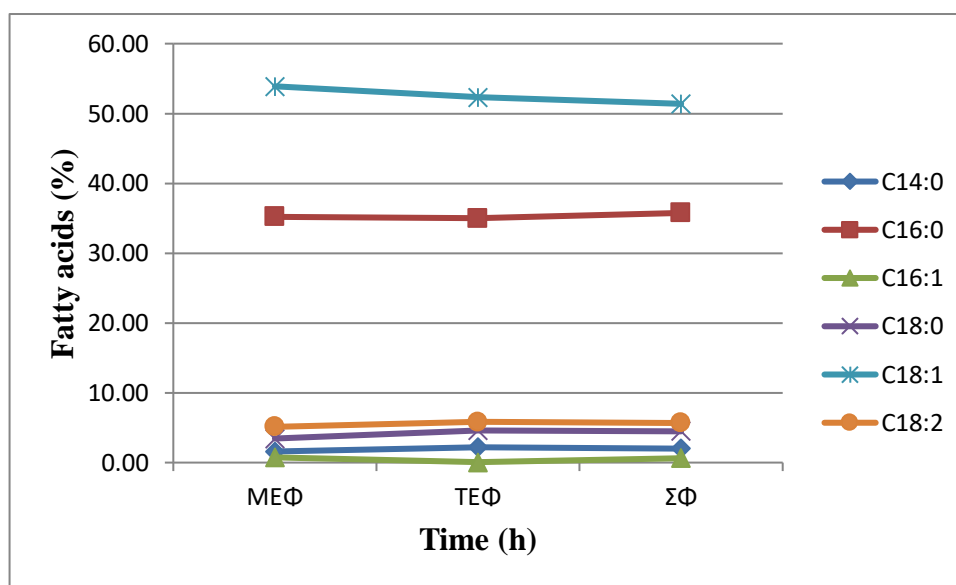
συγκριτικά με τις άλλες ζυμώσεις. Η ζύμωση με υπόστρωμα τη γλυκερόλη έφτασε το 17.19% στις 120 ώρες ενώ αυτή με τη γαλακτόζη το 8.3% στις 72 ώρες. Αντίστοιχα, για τη μαννόζη έφτασε το 13.91% στις 48 ώρες, για τη ξυλόζη το 21.91% στις 72 ώρες και για την αραβινόζη μόλις 2.28% στις 120 ώρες. Σε όλες τις ζυμώσεις όπως φαίνεται ενδεικτικά στο γράφημα 9 η τιμή του IPS μειώνεται κατά τη διάρκεια της ζύμωσης. Σύμφωνα με την βιβλιογραφία (Ratledge. 1988; Papanikolaou and Aggelis. 2011a; 2011b) η βιοσύνθεση των ενδοπολυσακχαριτών λαμβάνει χώρα κατά την στάσιμη φάση ανάπτυξης του μικροοργανισμού. Θεωρητικά ενεργοποιείται μόλις ελαττωθεί το άζωτο από το μέσο καλλιέργειας το οποίο στη συνέχεια οδηγεί σε μείωση της συγκέντρωσης του ενδοκυτταρικού AMP. Ακολούθως, αναστέλλεται η δράση της 6 PFK (Galiotou-Panayotou *et al.*, 1998; Papanikolaou and Aggelis. 2011a; Ratledge & Wynn. 2002). Επιπλέον, η μείωση της τιμής του IPs είναι πιθανό να υποδηλώνει τη χρήση των ενδοπολυσακχαριτών για τη κάλυψη ενεργειακών αναγκών καθώς επίσης και τη χρήση τους ως υπόστρωμα για τη βιοσύνθεση διαφόρων ουσιών. Υπάρχουν αναφορές ότι η βιοσύνθεση των πολυσακχαριτών ευνοείται από πηγές άνθρακα, όπως η γλυκόζη και από οργανικές πηγές αζώτου (πεπτόνη, yeast extract) (Gern *et al.*, 2008 ; Tang *et al.*, 2008). Επίσης, η τιμή του pH, η θερμοκρασία της ζύμωσης καθώς και ο αερισμός είναι παράγοντες που επηρεάζουν σημαντικά τη βιοσύνθεση των πολυσακχαριδίων. Ωστόσο, αρκετές φορές μπορεί οι συνθήκες καλλιέργειας να ευνοούν την παραγωγή βιομάζας αλλά όχι και τη συσσώρευση των πολυσακχαριτών (κυρίως των έξωπολυσακχαριτών) και αντιστρόφως (Diamantopoulou *et al.*, 2012a; 2012b).



Γράφημα 9 Καμπύλη του ποσοστού των παραγόμενων ενδοπολυσακχαριτών σε συνάρτηση με το χρόνο για τη ζύμωση με υπόστρωμα τη ξυλόζη.

Με τη χρήση της αέριας χρωματογραφίας προσδιορίστηκαν τα λιπαρά οξέα του παραγόμενου μικροβιακού λίπους από τη ζύμη *R.toruloides* σε όλες τις ζυμώσεις που πραγματοποιήθηκαν. Τα λιπαρά οξέα που προέκυψαν είναι τα εξής: Μυριστικό οξύ (C14:0) Παλμιτικό οξύ (C16:0) Παλμιτελαϊκό οξύ (Δ^9 C16:1)

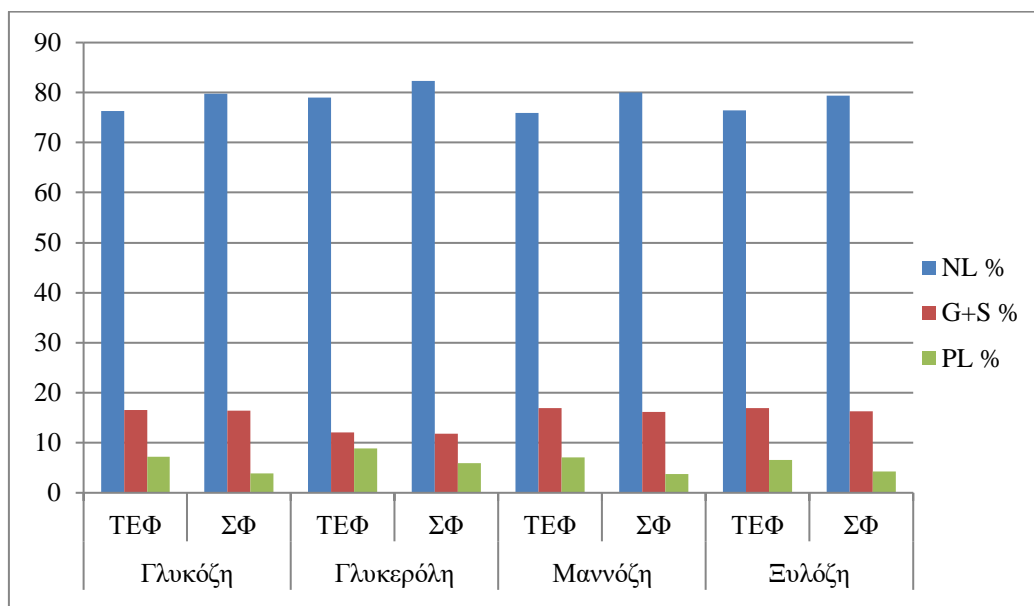
Στεατικό οξύ (C18:0) Ελαϊκό οξύ (Δ^9 C18:1) Λινελαϊκό οξύ ($\Delta^9, 12$ C18:2) Επιπλέον, βρέθηκε ότι σε όλες τις ζυμώσεις το Ελαϊκό και το Παλμιτικό οξύ παρουσίασαν τα υψηλότερα ποσοστά το οποίο επιβεβαιώνεται και από τη βιβλιογραφία (Li *et al.*, 2007), οι οποίοι υπολόγισαν το Ελαϊκό με ποσοστό 55.3% και το Παλμιτικό με 23.6%. Αντίθετα το Παλμιτελαϊκό οξύ ήταν αυτό με τα μικρότερα ποσοστά. Επιπρόσθετα, δε παρατηρήθηκε σημαντική μεταβολή στη ποσοστιαία κατανομή των λιπαρών οξέων κατά τη διάρκεια της κάθε ζύμωσης Ακολουθεί ενδεικτικό γράφημα από τη ζύμωση με υπόστρωμα τη γλυκόζη.



Γράφημα 10 Σύνθεση των λιπαρών οξέων κατά τη διάρκεια της ζύμωσης σε υπόστρωμα γλυκόζης.

Μια ακόμη ανάλυση που πραγματοποιήθηκε είναι η κλασμάτωση του παραγόμενου λίπους σε δυο σημεία για κάθε ζύμωση. Όπως έχει προαναφερθεί η συγκεκριμένη ανάλυση δεν πραγματοποιήθηκε στη ζύμωση με υπόστρωμα τη γαλακτόζη λόγω της μικρής ποσότητας λίπους και συνεπώς αδυναμίας να ολοκληρωθεί η ανάλυση. Τα αποτελέσματα αφορούν όλες τις ζυμώσεις όπου: τα ουδέτερα λίπη καταλαμβάνουν το μεγαλύτερο ποσοστό και κυμαίνονται μεταξύ 78.03-81.02 %. ακολουθούν τα σφιγγο-γλυκολιπίδια με ποσοστό 15.96-16.81% και τέλος τα φωσφολιπίδια με τα χαμηλότερα ποσοστά από 3.02-5.69%. Η κατανομή των

ποσοστών των κλασμάτων επιβεβαιώνεται και από τη βιβλιογραφία (Fakas *et al.* 2006), οι οποίοι υπολόγισαν το κλάσμα των ουδέτερων λιπιδίων στη στάσιμη φάση με ποσοστό 74%, τα σφιγγο-γλυκολιπίδια με 20% και τα φωσφολιπίδια με 6%. Επιπλέον, τα ουδέτερα λιπίδια είχαν την τάση να αυξάνονται κατά τη διάρκεια της ζύμωσης, αντίθετα τα ποσοστά των σφιγγο-γλυκολιπιδίων και φωσφολιπιδίων μειώνονταν με το πέρας της ζύμωσης.



Γράφημα 11. Ποσοστιαία κατανομή κλασμάτων κατά τη διάρκεια της ζύμωσης.

Συνοψίζοντας προκύπτουν τα παρακάτω συμπεράσματα:

- Η ζύμωση που πραγματοποιήθηκε με υπόστρωμα τη γλυκερόλη οδήγησε σε αξιοσημείωτη παραγωγή βιομάζας και ενδοκυτταρικού λίπους. Η βιομάζα έφθασε τα 20.96 g L^{-1} και το λίπος τα 8.57 g L^{-1} ($Y_{L/X}=0.42 \text{ g g}^{-1}$).
- Η ζύμωση που παρουσίασε την υψηλότερη τιμή απόδοσης του παραγόμενου λίπους ως προς τη βιομάζα είναι η αραβινόζη με τιμή 0.47 g g^{-1} .
- Η ζύμωση με υπόστρωμα τη γλυκόζη είχε τα υψηλότερα ποσοστά του παραγόμενων ενδοπολυσακχαριτών φτάνοντας τα 25.96%.
- Τα κυριότερα λιπαρά οξέα για όλες τις ζυμώσεις ήταν το ελαϊκό και το παλμιτικό. Το ελαϊκό οξύ έφτασε το 56.82% στη ζύμωση της μαννόζης ενώ το παλμιτικό το 48.18% στη ζύμωση της ξυλόζης.

- Για όλες τις ζυμώσεις τα κλάσματα των λιπιδίων είχαν την εξής κατανομή: ουδέτερα λίπη σε ποσοστό 80%. σφίγγο-γλυκολιπίδια σε ποσοστό 15% και φωσφολιπίδια σε ποσοστό μόλις 5%.
- Για όλες τις ζυμώσεις, τα κλάσματα καθ' όλη τη διάρκεια των ζυμώσεων παρέμενα ακόρεστα τα κυριότερα λιπαρά οξέα των κλασμάτων ήταν το ελαϊκό το παλμιτικό. Αξιοσημείωτο είναι ότι στη ζύμωση με υπόστρωμα την αραβινόζη δεν υπήρξε καθόλου Λινελαϊκό οξύ.
- Ωστόσο, φαίνεται ότι το υπόστρωμα επηρέασε τα ποσοστά ελαϊκού και του παλμιτικού οξέος. Η ζύμωση με υπόστρωμα τη γλυκόζη παρουσίασε τα υψηλότερα ποσοστά τόσο για το ελαϊκό όσο και για το παλμιτικό οξύ 36.51% και 53.01% αντίστοιχα. Στη ζύμωση με υπόστρωμα τη γλυκερόλη έφτασαν το 33.69% και 42.20%, με τη μαννόζη 30.49% και 50.13%, με τη ξυλόζη 27.96% και 49.85% ενώ με την αραβινόζη 35.1% και 44%.

Τα συμπεράσματα της παρούσας ερευνητικής μελέτης, που παρατίθενται και αναλύονται παραπάνω αποδεικνύουν ότι στις ίδιες συνθήκες η γλυκερόλη είναι το υπόστρωμα στο οποίο η ανάπτυξη του μικροοργανισμού *R.toruloides* Y-27012 αποδίδει τις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις λίπους αλλά και βιομάζας. Ωστόσο και άλλες πηγές άνθρακα όπως η αραβινόζη και η ξυλόζη εμφανίζουν υψηλούς συντελεστές ($Y_{L/X}=0.47 \text{ g g}^{-1}$, 0.46 g g^{-1}) αντίστοιχα. Τα εν λόγω αποτελέσματα ενισχύουν το βιομηχανικό ενδιαφέρον γύρω από το μικροβιακό λίπος λόγω των ιδιαίτερων χαρακτηριστικών του. Διάφορες ανανεώσιμες πρώτες ύλες μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως πηγή άνθρακα για τη παραγωγή μικροβιακού λίπους, το οποίο έχει την ίδια σύσταση λιπαρών οξέων με τα φυτικά έλαια. Το μικροβιακό λίπος μπορεί να χρησιμοποιηθεί είτε για εφαρμογές υψηλής προστιθέμενης αξίας όπως είναι τα πρόσθετα σε τρόφιμα, είτε για την παραγωγή βιοντίζελ. Η βιομηχανική εφαρμογή του μικροβιακού λίπους για τη παραγωγή βιοντίζελ εξαρτάται από την εξέλιξη της μικροβιακής ζύμωσης, γ' αυτό είναι σημαντικό να γίνει η σωστή επιλογή μικροοργανισμού, υποστρώματος αλλά και συνθηκών. Επομένως, περαιτέρω έρευνες είναι σημαντικό να πραγματοποιηθούν ώστε να επιτευχθεί η μέγιστη δυνατή παραγωγή μικροβιακού λίπους από ελαιογόνες ζύμες.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Ageitos. J. M., Vallejo. J. A., Veiga-crespo. P., & Villa. T. G. (2011). Oily yeasts as oleaginous cell factories. 1219–1227.
- Athenaki. M., Gardeli. C., Diamantopoulou. P., Tchakouteu. S. S., Sarris. D., Philippoussis. A., Papanikolaou. S. (2017). Lipids from yeasts and fungi: physiology, production and analytical considerations.
- Athenstaedt. K. (2010). Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology. Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology.
- Bellou. S., Triantaphyllidou. I., Aggeli. D., Elazzazy. A. M., Baeshen. M. N., & Aggelis. G. (2016). ScienceDirect Microbial oils as food additives : recent approaches for improving microbial oil production and its polyunsaturated fatty acid content. Current Opinion in Biotechnology. 37. 24–35.
- Berg. J. M., Tymoczko. J. L., & Stryer. L. (2012). Biochemistry / Jeremy M. Berg. John L. Tymoczko. Lubert Stryer ; with Gregory J. Gatto. Jr.
- Bommareddy. R. R., Sabra. W., & Zeng. A. P. (2017). Glucose-mediated regulation of glycerol uptake in *Rhodospiridium toruloides*: Insights through transcriptomic analysis on dual substrate fermentation. Engineering in Life Sciences. 17(3). 282–291.
- Bommareddy. R. R., Sabra. W., Maheshwari. G., & Zeng. A. P. (2015). Metabolic network analysis and experimental study of lipid production in *Rhodospiridium toruloides* grown on single and mixed substrates. Microbial Cell Factories. 14(1).
- Cowart. L. A., & Obeid. L. M. (2007). Yeast sphingolipids: Recent developments in understanding biosynthesis. regulation. and function. Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids. 1771(3). 421–431.
- 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.
- Dias. C., Silva. C., Freitas. C., Reis. A., & da Silva. T. L. (2016). Effect of Medium pH on *Rhodospiridium toruloides* NCYC 921 Carotenoid and Lipid Production

Evaluated by Flow Cytometry. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 179(5). 776–787.

- Dourou, M., Aggeli, D., Papanikolaou, S., & Aggelis, G. (2018). Critical steps in carbon metabolism affecting lipid accumulation and their regulation in oleaginous microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(6), 2509–2523.
- Fakas, S., Papanikolaou, S., Galiotou-Panayotou, M., Komaitis, M., & Aggelis, G. (2006). Lipids of *Cunninghamella echinulata* with emphasis to γ -linolenic acid distribution among lipid classes. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 73(3). 676–683.
- Fei, Q., O'Brien, M., Nelson, R., Chen, X., Lowell, A., & Dowe, N. (2016). Enhanced lipid production by *Rhodospiridium toruloides* using different fed-batch feeding strategies with lignocellulosic hydrolysate as the sole carbon source. *Biotechnology for Biofuels*. 9(1).
- Fillet, S., Gibert, J., Suárez, B., Lara, A., Ronchel, C., & Adrio, J. L. (2015). Fatty alcohols production by oleaginous yeast. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 42(11). 1463–1472.
- Folch, J., Lees, M., & Sloane Stanley, G. . (1987). a Simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. 55(5). 999–1033.
- Freer, S. N., Skory, C. D., & Bothast R. J. (1997, November). D-Xylose metabolism in *Rhodospiridium toruloides*. *Biotechnology Letters*. Vol. 19. pp. 1119–1122.
- 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.
- Gen, Q., Wang, Q., & Chi, Z. M. (2014). Direct conversion of cassava starch into single cell oil by co-cultures of the oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides* and immobilized amylases-producing yeast *Saccharomycopsis fibuligera*. *Renewable Energy*. 62. 522–526.
- Jagtap, S. S., & Rao, C. V. (2018). Production of d-arabitol from d-xylose by the oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides* IFO0880. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 102(1). 143–151.
- Jiru, T. M., & Abate, D. (2014). Oleaginous microorganisms. diversity. lipid biosynthesis pathway and strain improvement. *WebPub Journal of Scientific Research*. 2(6). 55–65.

- Johnson. V. W., Singh. M., & Yadav. N. K. (n.d.). Influence of growth conditions on the accumulation of ergosterol by *Rhodotorula glutinis*. In *World Journal of Microbiology & Biotechnology* (Vol. 10).
- Kara. K., Ouanji. F., Lotfi. E. M., Mahi. M. El. Kacimi. M., & Ziyad. M. (2018). Biodiesel production from waste fish oil with high free fatty acid content from Moroccan fish-processing industries. *Egyptian Journal of Petroleum*. 27(2). 249–255.
- Knothe. G., Gerpen. J.V., Krahl. J. (2005). *The biodiesel handbook*. USA: AOCS press. 34-48.
- Ledesma-Amaro. R., & Nicaud. J. M. (2016. October 1). Metabolic Engineering for Expanding the Substrate Range of *Yarrowia lipolytica*. *Trends in Biotechnology*. Vol. 34. pp. 798–809.
- Leiva-Candia. D. E., Pinzi. S., Redel-Macías. M. D., Koutinas. A., Webb. C., & Dorado. M. P. (2014. May 1). The potential for agro-industrial waste utilization using oleaginous yeast for the production of biodiesel. *Fuel*. Vol. 123. pp. 33–42.
- Li. Y., Zhao. Z. (Kent). & Bai. F. (2007). High-density cultivation of oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides* Y4 in fed-batch culture. *Enzyme and Microbial Technology*. 41(3). 312–317.
- Liang. M. H., & Jiang. J. G. (2013). Advancing oleaginous microorganisms to produce lipid via metabolic engineering technology. *Progress in Lipid Research*. Vol. 52. pp. 395–408.
- Maria, R., Gern, M., Wisbeck, E., Rosa, J., Luiz, J., & Aparecida, S. (2008). Alternative medium for production of *Pleurotus ostreatus* biomass and potential antitumor polysaccharides. 99, 76–82.
- Meng. X., Yang. J., Xu. X., Zhang. L., Nie. Q., & Xian. M. (2009). Biodiesel production from oleaginous microorganisms. 34. 1–5.
- Metelitsa. A., Leahy. M.(2013), *International Energy outlook 2013*, (2).
- Papanikolaou S., Aggelis G. (2011b). Lipids of oleaginous yeasts. Part II: Technology and potential applications. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 113. 1052–1073.
- Papanikolaou S., Aggelis G. (2011α). 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. (2009). Biotechnological valorization of biodiesel derived glycerol waste through production of single cell oil and citric acid by *Yarrowia lipolytica*. *Lipid Technology*. 21(4). 83–87.

- Papanikolaou, S., & Aggelis, G. (2010). *Yarrowia lipolytica*: A model microorganism used for the production of tailor-made lipids. *European Journal of Lipid Science and Technology*. 112(6). 639–654.
- Papanikolaou, S., Chevalot, I., Komaitis, M., Aggelis, G., & Marc, I. (2001). Kinetic profile of the cellular lipid composition in an oleaginous *Yarrowia lipolytica* capable of producing a cocoa-butter substitute from industrial fats. *Antonie van Leeuwenhoek. International Journal of General and Molecular Microbiology*. 80(3–4). 215–224.
- Park, Y., Nicaud, J., & Ledesma-amaro, R. (2017). The Engineering Potential of *Rhodospiridium toruloides* as a Workhorse for Biotechnological Applications. *Trends in Biotechnology*.
- Qi, F., Sun, L., Zhang, M. L., Jiang, X. Z., Cao, X., & Huang, J. Z. (2016). Alpha-Linolenic Acid Production by the Mutant *Rhodospiridium toruloides*; ETP *International Journal of Food Engineering*.
- 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.
- Ratledge, C. (2002). Regulation of lipid accumulation in oleaginous micro-organisms. *Biochemical Society Transactions*. 30(6). 1047–1050.
- Ratledge, C. (2004). Fatty acid biosynthesis in microorganisms being used for Single Cell Oil production. *Biochimie*. 86(11). 807–815.
- Rossi, M., Amaretti, A., Raimondi, S., & Leonardi, A. (2010). 2011_ InTech-Getting_lipids_for_biodiesel_production_from_oleaginous_fungi.
- Signori, L., Ami, D., Posterl, R., Giuzzi, A., Mereghetti, P., Porro, D., & Branduardi, P. (2016). Assessing an effective feeding strategy to optimize crude glycerol utilization as sustainable carbon source for lipid accumulation in oleaginous yeasts. *Microbial Cell Factories*. 15(1).
- Tang, Y. J., Zhu, L. L., Liu, R. S., Li, H. M., Li, D. S., & Mi, Z. Y. (2008). Quantitative response of cell growth and Tuber polysaccharides biosynthesis by medicinal mushroom Chinese truffle *Tuber sinense* to metal ion in culture medium. *Bioresource Technology*, 99(16), 7606–7615.
- Tchakouteu, S. S., Kalantzi, O., Gardeli, C., Koutinas, A. A., Aggelis, G., & Papanikolaou, S. (2015). Lipid production by yeasts growing on biodiesel-derived crude glycerol: Strain selection and impact of substrate concentration on the fermentation efficiency. *Journal of Applied Microbiology*. 118(4). 911–927.

- Tsouko. E., Papanikolaou. S., & Koutinas. A. A. (2016). Production of fuels from microbial oil using oleaginous microorganisms. In Handbook of Biofuels Production: Processes and Technologies: Second Edition.
- Van Gerpen. J. (2005). Biodiesel processing and production. Fuel Processing Technology. 86(10). 1097–1107.
- 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.
- Xu. J., Du. W., Zhao. X., & Liu. D. (2016). Renewable microbial lipid production from Oleaginous Yeast: some surfactants greatly improved lipid production of *Rhodospiridium toruloides*. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 32(7).
- Zhang. S., Skerker. J. M., Rutter. C. D., Maurer. M. J., Arkin. A. P., & Rao. C. V. (2016). Engineering *Rhodospiridium toruloides* for increased lipid production. Biotechnology and Bioengineering. 113(5). 1056–1066.
- Zhao. X., Hu. C., Wu. S., Shen. H., & Zhao. Z. K. (2011). Lipid production by *Rhodospiridium toruloides* Y4 using different substrate feeding strategies. 627–632.