

Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής Του Ανθρώπου

Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων

ΠΜΣ Βιοδιεργασίες Τροφίμων και Βιοδιυλιστήρια



Μεταπτυχιακή Εργασία

«Παραγωγή μεταβολικών προϊόντων κατά την αύξηση στελεχών της ζύμης
Yarrowia lipolytica, σε υποστρώματα με βάση τη γλυκερόλη»

Αικατερίνη Κ. Σανδάλι

Επιβλέπων Καθηγητής:
Σεραφείμ Παπανικολάου

Αθήνα, 2020

Μεταπτυχιακή Εργασία

«Παραγωγή μεταβολικών προϊόντων κατά την αύξηση στελεχών της ζύμης *Yarrowia lipolytica*, σε υποστρώματα με βάση τη γλυκερόλη»

“Production of metabolic products during the growth of *Yarrowia lipolytica* yeast strains, on glycerol-based substrates”

Αικατερίνη Κ. Σανδάλη

Εξεταστική Επιτροπή:

Σεραφείμ Παπανικολάου, Καθηγητής Γ.Π.Α. (Επιβλέπων)

Απόστολος Κουτίνας, Αναπληρωτής Καθηγητής Γ.Π.Α.

Νικόλαος Στοφόρος, Καθηγητής Γ.Π.Α.

Αθήνα, 2020

Περίληψη

Ο σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η διερεύνηση της ικανότητας ανάπτυξης στελεχών της ζύμης *Yarrowia lipolytica* χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα ανανεώσιμες πρώτες ύλες. Πιο συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκε ακάθαρτη βιομηχανική γλυκερόλη, η οποία είναι παραπροϊόν της βιομηχανικής παραγωγής βιοκαυσίμου (biodiesel). Μελετήθηκε η ικανότητα των στελεχών να μεταβολίζουν την ακάθαρτη βιομηχανική γλυκερόλη προς παραγωγή βιομάζας, δευτερογενών ενδοκυτταρικών μεταβολιτών (μικροβιακού λίπους και ενδοπολυσακχαριτών) καθώς και εξωκυτταρικών μεταβολικών προϊόντων (π.χ. ερυθριτόλη, μαννιτόλη, αραβιτόλη). Οι καλλιέργειες διενεργήθηκαν σε διαφορετικές συγκεντρώσεις υποστρώματος και χλωριούχου νατρίου σε σταθερές συνθήκες ανάδευσης, θερμοκρασίας και τιμής pH. Η γλυκερόλη που χρησιμοποιήθηκε ήταν διαχωρισμένη και καθαρότητας 88% κατά βάρος.

Χρησιμοποιήθηκαν στελέχη ζυμών του γένους *Yarrowia lipolytica* FMCC Y74 και FMCC Y75.

Στην πειραματική διαδικασία πραγματοποιήθηκαν υγρές καλλιέργειες, ασυνεχούς και fed-batch τύπου, σε αναδευόμενες φιάλες Erlenmeyer των 250 mL, χρησιμοποιώντας ως πηγή άνθρακα γλυκερόλη, σε διαφορετικές συγκεντρώσεις, με ή χωρίς προσθήκη χλωριούχου νατρίου, με περιοριστικό παράγοντα αύξησης το άζωτο σε συνθήκες καλλιέργειας (29 °C, pH 6.0). Έγινε προσδιορισμός του ξηρού βάρους βιομάζας, πραγματοποιήθηκε μέτρηση της βιομάζας με ξήρανση και στη συνέχεια εκχύλιση των λιπιδίων για τον ποσοτικό προσδιορισμό τους. Επίσης, η παραγωγή ενδοπολυσακχαριτών προσδιορίστηκε με τη μέθοδο DNS. Η παραγωγή πολυολών και η κατανάλωση των σακχάρων προσδιορίστηκε μέσω υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC).

Η παρούσα μελέτη χωρίστηκε σε τρία πειραματικά στάδια.

Στο πρώτο στάδιο εξετάστηκαν τα δυο στελέχη σε υγρές καλλιέργειες ασυνεχούς τύπου με υπόστρωμα βιομηχανικής γλυκερόλης, συγκέντρωσης 40 g L⁻¹, 80 g L⁻¹, 130 g L⁻¹, 170 g L⁻¹ σε σταθερή θερμοκρασία 29 °C και τιμή pH 6.0. Αξιολογήθηκαν ως προς την ικανότητα τους να καταναλώνουν την γλυκερόλη και να την μετατρέπουν σε βιομάζα, ενδοπολυσακχαρίτες και δευτερογενείς μεταβολίτες. Διαπιστώθηκε από τις μετρήσεις ότι και τα δυο στελέχη προσαρμόστηκαν στο υπόστρωμα της γλυκερόλης, παράγοντας

ικανοποιητικές ποσότητες βιομάζας. Το στέλεχος FMCC Y74 παρατηρήθηκε ότι παρήγαγε μεγαλύτερες ποσότητες πολυολών. Ειδικότερα, σε συγκέντρωση 170 g L^{-1} , το σύνολο των πολυολών έφτασε τα $72,09 \text{ g L}^{-1}$, με παραγωγή μαννιτόλης $39,2 \text{ g L}^{-1}$ στις 552 h.

Στο δεύτερο στάδιο πραγματοποιήθηκαν με τα ίδια στελέχη, υγρές ασυνεχούς τύπου ζυμώσεις, με σταθερή συγκέντρωση γλυκερόλης 40 g L^{-1} , στις ίδιες σταθερές τιμές pH και θερμοκρασίας όπως στο πρώτο στάδιο, αλλά με διαφορετικές συγκέντρωσεις προσθήκης χλωριούχου νατρίου 10 g L^{-1} , 30 g L^{-1} , 50 g L^{-1} , 80 g L^{-1} . Με την αύξηση της συγκέντρωσης προσθήκης NaCl παρατηρήθηκε μεγαλύτερη παραγωγή ερυθριτόλης από ότι μαννιτόλης.

Στο τρίτο στάδιο μελετήθηκαν τα στελέχη σε καλλιέργεια ημισυνεχούς τύπου με υπόστρωμα βιομηχανικής γλυκερόλης, συγκέντρωσης 50 g L^{-1} και παρατηρήθηκε ευνοϊκή επίδραση του προστιθέμενου στείρου θρεπτικού υλικού στην παραγωγή των πολυολών, με την παραγωγή μαννιτόλης να υπερτερεί εκείνη της ερυθριτόλης.

Επιστημονική Περιοχή: Βιοτεχνολογία Τροφίμων

Λέξεις Κλειδιά: Ζύμες, βιομηχανική γλυκερόλη, μαννιτόλη, ερυθριτόλη, πολυόλες

Abstract

The purpose of this study was to investigate the ability of *Yarrowia lipolytica* yeast strains to grow on renewable raw materials. Specifically, crude-industrial glycerol, which is the main by-product of the industrial production of biodiesel, was used. In particular, the ability of yeast strains to metabolize industrial crude glycerol to produce biomass, secondary metabolites (single cell oil and intra-cellular polysaccharides) and various metabolic products (e.g., erythritol, mannitol, arabitol) was studied. Fermentations were performed at different substrate and sodium chloride concentrations at constant stirring, temperature and pH. The glycerol used was separated and 88% purity w/w.

In the experimental procedure, were used strains of the genus *Yarrowia lipolytica* FMCC Y74 and FMCC Y75.

In the experimental procedure, liquid cultures, discontinuous and fed-batch, were conducted in Erlenmeyer flasks 250 mL, using glycerol as the carbon source at different concentrations (40 g L⁻¹, 80 g L⁻¹, 120 g L⁻¹, 150 g L⁻¹), with or without addition of sodium chloride, with nitrogen limiting factor in crop conditions (29°C, pH 6.0). Dry biomass weight was determined, biomass was measured by drying and then extraction of the lipids for quantitative determination. The production of intra-cellular polysaccharides determined by the DNS method. The production of polyols and the consumption of sugars were determined by high performance liquid chromatography (HPLC).

This study was divided into three experimental stages.

At the first stage, the two strains were examined in liquid batch cultures with industrial glycerol substrate, at different concentrations 40 g L⁻¹, 80 g L⁻¹, 130 g L⁻¹, 170 g L⁻¹ at a constant temperature of 29 °C and pH 6.0. The strains were evaluated on their ability to consume glycerol and convert it into biomass, intra-cellular polysaccharides and secondary metabolites. From the results were found that both strains were adapted to the glycerol substrate producing sufficient quantities of biomass. FMCC Y74 strain was observed to produce larger amounts of polyols. In particular, at a substrate concentration

of 170 g L^{-1} , the total amount of polyols reached 72.09 g L^{-1} , and at 552 h mannitol production reached 39.2 g L^{-1} .

At the second stage, liquid batch fermentations were performed with the same yeast strains at constant substrate concentration 40 g L^{-1} , at the same constant pH and temperature values as in stage 1, with addition of sodium chloride at different concentrations 10 g L^{-1} , 30 g L^{-1} , 50 g L^{-1} , 80 g L^{-1} . As the concentration of added NaCl increased, higher production of erythritol than mannitol was observed.

At the third stage, yeast strains were studied in a fed-batch culture of 50 g L^{-1} at industrial glycerol substrate. A beneficial effect of the new added sterile nutritional material on the production of the polyols has been observed, with the production of mannitol exceeding that of erythritol.

Scientific Area: Food Biotechnology

Keywords: Yeasts, industrial glycerol, mannitol, erythritol, polyols

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα μεταπτυχιακή μελέτη εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων του τμήματος Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου, του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών υπό την επίβλεψη του Καθηγητή Σεραφείμ Παπανικολάου, τον οποίο θα ήθελα αρχικά να ευχαριστήσω για τις συμβουλές του, την στηριξή του καθώς και για την άριστη συνεργασία μας καθ' όλη την διάρκεια της μελέτης αυτής.

Ακόμη, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στον αξιότιμο Αναπληρωτή Καθηγητή Απόστολο Κουτίνα και τον αξιότιμο Καθηγητή Νικόλαο Στοφόρο, της εξεταστικής επιτροπής, για τον χρόνο που αφιέρωσαν στη διόρθωση και βαθμολόγηση της παρούσας μεταπτυχιακής μελέτης.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ακόμη όλο το ανθρώπινο δυναμικό του εργαστηρίου Μικροβιολογίας & Βιοτεχνολογίας Τροφίμων και ιδιαίτερα την υποψήφια διδάκτορα Ελένη Σταυρούλα Βασταρούχα για την πολύτιμη βοήθεια, στήριξη και καθοδήγηση της, καθώς επίσης την κα Ουρανία Καλαντζή (ΕΔΙΠ), τις υποψήφιες διδάκτορες Σέβη Μίχου και Ροζανίνα Φιλιπούση για την πολύτιμη και ανιδιοτελή βοήθεια τους, τον Γρηγόρη Χαλμούκο, την Μαρία Μπελιμπασάκη, τον Σπύρο Σταματιάδη, τον Γιάννη Κωστάκη και όλους τους συμφοιτητές μου για την άριστη συνεργασία μας και το ευχάριστο κλίμα που επικράτησε αυτά τα δύο χρόνια.

Τέλος, να ευχαριστήσω την οικογένεια μου που στέκεται στο πλευρό μου όλα αυτά τα χρόνια στηρίζοντας με στην πραγματοποίηση των στόχων μου.

Σας ευχαριστώ όλους θερμά!

I. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	9
1. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΣΥΝΘΕΣΗ.....	11
1.1 ΓΛΥΚΕΡΟΛΗ	12
1.2 ΒΙΟΝΤΙΖΕΛ	15
1.3 ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΗ ΓΛΥΚΕΡΟΛΗ.....	17
1.4 ΖΥΜΕΣ – Η ΖΥΜΗ <i>Yarrowia lipolytica</i>	19
1.4.1. ΖΥΜΕΣ.....	19
1.4.2. Η ΖΥΜΗ <i>Yarrowia lipolytica</i>	23
1.5 ΠΑΡΑΓΟΜΕΝΑ ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΑ ΠΡΟΪΟΝΤΑ ΑΠΟ ΤΗΝ ΖΥΜΗ <i>Yarrowia lipolytica</i>	25
1.5.1. ΠΟΛΥΟΛΕΣ	25
1.5.2. ΕΝΔΟΠΟΛΥΣΑΚΧΑΡΙΤΕΣ.....	29
1.5.3. ΛΙΠΙΔΙΑ	31
1.6 ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΗ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΠΟΛΥΟΛΩΝ, ΕΝΔΟΠΟΛΥΣΑΚΧΑΡΙΤΩΝ ΚΑΙ ΛΙΠΙΔΙΩΝ	33
1.6.1. ΒΙΟΣΥΝΘΕΣΗ ΠΟΛΥΟΛΩΝ	33
1.6.2. ΒΙΟΣΥΝΘΕΣΗ ΕΝΔΟΠΟΛΥΣΑΚΧΑΡΙΤΩΝ	34
1.6.2. ΒΙΟΣΥΝΘΕΣΗ ΛΙΠΙΔΙΩΝ	35
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	39
2.1 ΒΙΟΛΟΓΙΚΟ ΥΛΙΚΟ.....	40
2.2 ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ	41
2.2.1. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΠΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ.....	41
2.2.2. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΚΥΡΙΑΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ	42
2.2.3. ΑΝΑΛΥΣΗ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΩΝ ΣΤΑΔΙΩΝ	43
2.3 ΧΗΜΙΚΕΣ ΑΝΑΛΥΣΕΙΣ	45
2.3.1. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΡΗ.....	45
2.3.2. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΒΙΟΜΑΖΑΣ	46
2.3.3. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΝΔΟΠΟΛΥΣΑΚΧΑΡΙΤΩΝ (IPS).....	47
2.3.4. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΝΔΟΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΛΙΠΟΥΣ	47
2.3.5. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΠΟΛΥΟΛΩΝ ΚΑΙ ΓΛΥΚΕΡΟΛΗΣ	49
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	51
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	68
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	78

I. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τις τελευταίες δεκαετίες η ανθρωπότητα έρχεται αντιμέτωπη με το πρόβλημα της διαχείρισης των περιοριζόμενων πόρων και της αύξησης των αναγκών που φέρνει η αύξηση του πληθυσμού. Η αυξημένη ζήτηση του πετρελαίου και η σταδιακή μείωση των αποθεμάτων δημιούργησε την ανάγκη εξεύρεσης εναλλακτικών καυσίμων όπως το βιοντίζελ. Το βιοντίζελ θεωρείται ανανεώσιμη πηγή ενέργειας λόγω της ανανεώσιμης προέλευσης των πρώτων υλών που συμμετέχουν στην παραγωγή του και η χρήση του παρουσιάζει σημαντικά περιβαλλοντικά και ενεργειακά οφέλη. Κύριο παραπροϊόν της διεργασίας παραγωγής του είναι η γλυκερόλη. Ο όγκος της βιομηχανικής γλυκερόλης αυξάνεται καθώς αυξάνεται και η παραγωγή του βιολογικού πετρελαίου, μειώνοντας το κόστος της, μετατρέποντας την σε ένα υπόστρωμα χαμηλού κόστους. Η χρήση της ως υλικό εκκίνησης ζυμώσεων στη Βιομηχανική Βιοτεχνολογία οδηγεί στην παραγωγή μεταβολικών προϊόντων που μπορούν να αξιοποιηθούν με ποικίλους τρόπους σε φάρμακα, τρόφιμα κλπ. Η ζύμη *Yarrowia lipolytica* αξιοποιεί ένα ευρύτατο φάσμα πηγών άνθρακα, όπως η γλυκερόλη και δύναται να βιοσυνθέσει πολλούς μεταβολίτες όπως πολυόλες και ενδοπολυσακχαρίτες, καθώς και να συσσωρεύσει ποσότητες μικροβιακού λίπους. Στόχος την μελέτης αυτής, είναι η χρήση της γλυκερόλης ως υπόστρωμα για την παραγωγή μεταβολικών προϊόντων, μέσω αγρίων στελεχών, απομονωμένων από εδώδιμα προϊόντα ζωικής προέλευσης, της πολυμορφικής ζύμης *Yarrowia lipolytica* και τα στοιχεία που μπορεί να δώσει η περαιτέρω ανάλυση προς αξιοποίηση.

1. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΣΥΝΘΕΣΗ

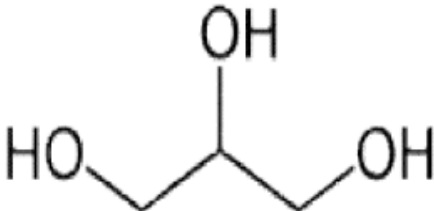
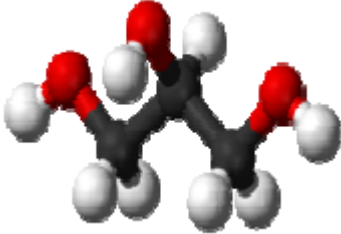
1.1 ΓΛΥΚΕΡΟΛΗ

Η γλυκερόλη ή αλλιώς 1,2,3- προπανοτριόλη αποτελείται από τρία άτομα άνθρακα όπου ο πρώτος και ο τελευταίος συνδέονται με 2 άτομα υδρογόνου και μια ρίζα υδροξυλίου, ενώ ο μεσαίος με ένα άτομο υδρογόνου και ένα υδροξύλιο, όπως περιγράφεται στο συντακτικό τύπο: **HOCH₂-CHOH-CH₂OH**. Η γλυκερόλη οφείλει την υδατοδιαλυτή της ικανότητα και την υδρόφιλη φύση της στις τρεις υδροξυλομάδες, που περιέχει στο μόριο της (Rahmat *et al.*, 2010).

Ειδικότερα στην αγγλική και γαλλική ορολογία ο όρος «γλυκερόλη» χαρακτηρίζει την καθαρή χημική ένωση, ενώ ο όρος «γλυκερίνη» αποδίδεται περισσότερο στα διάφορα εμπορικά παρασκευάσματα, όπου η περιεχόμενη καθαρή ουσία είναι περισσότερη του 95%.

Σε κανονικές συνθήκες είναι ημίρρευστη, διαυγής, άχρωμη, σχεδόν άοσμη, με γλυκιά γεύση από όπου και πήρε την ονομασία της, όταν ανακαλύφθηκε το 1779 από τον σουηδό χημικό Carl W. Scheele. Στην καθαρή άνυδρη κατάστασή της, η γλυκερόλη έχει πυκνότητα 1.261 g mL⁻¹. Το ειδικό της βάρος είναι περίπου 1.26 g mL⁻¹, το μοριακό της βάρος είναι 92.10 g mol⁻¹, έχει σημείο τήξης τους 17.8 °C και σημείο βρασμού τους 290 °C, ενώ σε θερμοκρασίες χαμηλότερες των 17 °C, βρίσκεται σε κατάσταση ιξώδους μορφής (πυκνόρρευστη) (CRC Handbook of Chemistry and Physics, 87th edn., Boca Raton (FL): 2006.). (Πίνακας 1.1.1.)

Πίνακας 1.1: Φυσικοχημικές ιδιότητες και δομή γλυκερόλης (Διαφάνειες Μαθήματος Βιομηχανικής Βιοτεχνολογίας, 2017, Παπανικολάου)

Γενικά χαρακτηριστικά	Συντακτικός τύπος
Χημική ονομασία: 1,2,3-προπανοτριόλη	
Μοριακός τύπος: C ₃ H ₈ O ₃	
Μοριακή μάζα: 92,10 g mol ⁻¹	
Χημικές ιδιότητες	Τρισδιάστατη απεικόνιση μορίου γλυκερόλης
Σημείο τήξης: 17,8 °C Σημείο βρασμού: 290 °C Σημείο ανάφλεξης: 177 °C	
Ειδικό βάρος: 1,26 (20 °C) Πυκνότητα 1,261 g mL ⁻¹	
Φυσικές ιδιότητες	
Άχρωμη	
Άοσμη (σχεδόν)	
Διαυγής	
Υγροσκοπική	
Ημίρρευστη	

Η τρισθενής αυτή αλκοόλη μπορεί να μετατραπεί σε γλυκερόζη υπό την επίδραση ήπιων οξειδωτικών μέσων ενώ υπό την επίδραση ισχυρών οξειδωτικών μέσων μετατρέπεται σε γλυκερινικό οξύ. Όταν θερμαίνεται παρουσία KHSO₄, σχηματίζει μία ακόρεστη αλδεύδη την ακρολεΐνη (Pagliaro *et al.*, 2008). Στο νερό και στις αλκοόλες είναι διαλυτή ενώ είναι ελαφρά διαλυτή στους περισσότερους κοινούς διαλύτες όπως στους αιθέρες και δεν διαλύεται στους υδρογονάνθρακες. Η γλυκερίνη παρέχει εστέρες, ή αλλιώς γλυκερίδια, από τα οποία σημαντικότερα είναι τα λιπίδια που σχηματίζονται με τα λιπαρά οξέα.

Η γλυκερίνη παρουσιάζει ένα ευρύ φάσμα χρήσεων, μεταξύ των οποίων ως διαλύτης, μέσο διαβροχής, πλαστικοποιητής, θρεπτικό συστατικό σε ζυμοτεχνικές βιομηχανίες καθώς και ως πρώτη ύλη στην παραγωγή φαρμάκων, καλλυντικών, βερνικιών, σαπώνων και εκρηκτικών υλών (νιτρογλυκερίνη), στο ηλεκτρονικό τσιγάρο ως υγρό - βάση αναπλήρωσης φίλτρων, εντός της οποίας προστίθενται αρώματα και νικοτίνη. Σημαντική, επίσης, χρήση της γίνεται και ως υποκατάστατο της ζάχαρης σε διαβητικούς, ενώ χρησιμοποιείται με τη μορφή υποθέτου σαν καθαρτικό. Τέλος,

χρησιμοποιείται ακόμη και στη θεατρική και κινηματογραφική σκηνοθεσία ως «τρικ» υποκαθιστώντας τα πραγματικά δάκρυα.

Συνολικά, διαθέτει ένα μοναδικό συνδυασμό φυσικών και χημικών ιδιοτήτων οι οποίες χρησιμοποιούνται σε χιλιάδες εμπορικά προϊόντα. Πάνω από 1500 γνωστές χρήσεις, συμπεριλαμβανομένων των εφαρμογών της ως συστατικό ή ενισχυτικό στον τομέα των καλλυντικών, σε είδη προσωπικής υγιεινής, σε προϊόντα προσωπικής φροντίδας σε φαρμακευτικά σκευάσματα και σε τρόφιμα. Ακόμα, είναι εξαιρετικά σταθερή υπό κανονικές συνθήκες αποθήκευσης, συμβατή με πολλές άλλες χημικές ουσίες και δεν έχει γνωστές αρνητικές περιβαλλοντικές επιπτώσεις (Pagliaro *et al.*, 2010).

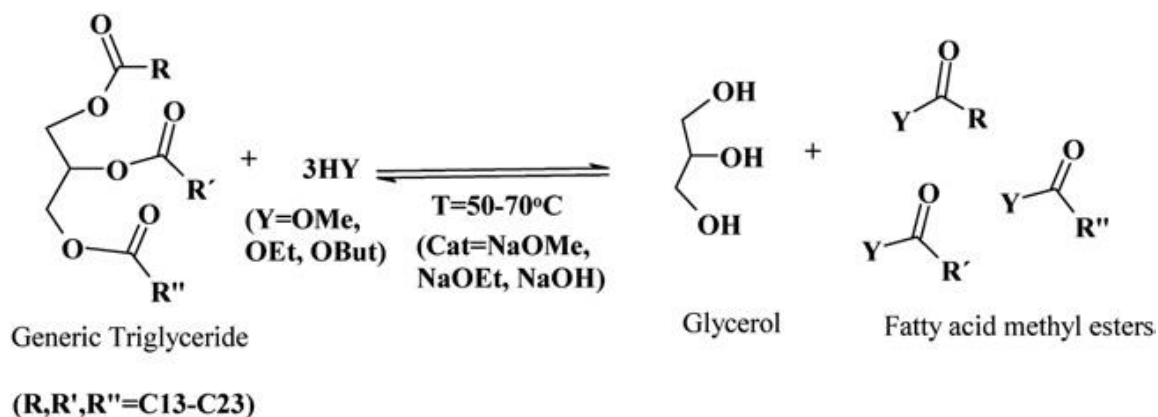
Η παραγωγή της γλυκερόλης επιτυγχάνεται είτε μέσω των μικροβιακών ζυμώσεων, με πιο γνωστή την περίπτωση της ζύμης *Saccharomyces cerevisiae* κατά την τέλεση της αλκοολικής ζύμωσης και συγκεκριμένα κατά τον σχηματισμό των δευτερογενών μεταβολικών προϊόντων της αλκοολικής ζύμωσης μέσω της γλυκεροπυροσταφυλικής ζύμωσης (Sarris and Papanikolaou, 2016). Παραδοσιακά, η γλυκερόλη παράγεται μέσω της υδρόλυσης των λιπών κατά την διαδικασία παρασκευής σαπώνων. Ωστόσο, η αντικατάσταση των σαπώνων με μη σαπωνοειδούς φύσεως απορρυπαντικά, έχει μειώσει σημαντικά την παραγωγή της γλυκερόλης από τη βιομηχανία σαπώνων σε παγκόσμιο επίπεδο. Γενικά, η γλυκερόλη αποτελεί υλικό εκκινήσεως για μια πληθώρα χημικών μετατροπών, μέσω δύο διακριτών οδών. Η πρώτη οδός περιλαμβάνει την οξείδωση ή την αναγωγή της γλυκερόλης σε προϊόντα με τρία άτομα άνθρακα, ενώ η δεύτερη οδός περιλαμβάνει την αντίδραση της γλυκερόλης με άλλα μόρια για τη δημιουργία νέων προϊόντων (Pagliaro *et al.*, 2007). Από την επιλεκτική οξείδωση ή αναγωγή της γλυκερόλης, δύνανται να παραληφθούν χαρακτηριστικά προϊόντα όπως η δι-υδροξυακετόνη, το γαλακτικό οξύ, το πυροσταφυλικό οξύ, η προπανόλη, η ισοπροπανόλη, η ακετόνη, η ακρολεΐνη, η προπιοναλδεΐδη, αλλά και το υδροξυπυροσταφυλικό οξύ (Claunde, 1999; da Silva *et al.*, 2009; Rahmat *et al.*, 2010). Ενδιαφέρον παρουσιάζει, εξάλλου, η παραγωγή της ανθρακικής γλυκερόλης (glycerol carbonate) η οποία επιτυγχάνεται μέσω της κατεργασίας της γλυκερόλης παρουσία διοξειδίου του άνθρακα (Pagliaro *et al.*, 2007; Rahmat *et al.*, 2010).

1.2 BIONTIZEΛ

Τα βιοκαύσιμα είναι ανανεώσιμες πηγές ενέργειας που προέρχονται από βιολογικές διεργασίες. Οι διεργασίες αυτές, ολοκληρώνονται σε σχετικά σύντομο χρονικό διάστημα συγκριτικά με τα πιο συμβατικά ορυκτά καύσιμα που χρησιμοποιούνται. Τα ορυκτά καύσιμα προέρχονται από γεωλογικές διεργασίες που έλαβαν χώρα σε προϊστορικούς χρόνους και γι' αυτό πρακτικά θεωρούνται μη ανανεώσιμες πηγές. Θεωρητικά, τα βιοκαύσιμα μπορούν να παραχθούν από οποιασδήποτε μορφής βιομάζα, αλλά κυρίως οι πρώτες ύλες που χρησιμοποιούνται είναι γεωργικά απόβλητα και διάφορες καλλιέργειες. Η παραγωγή τους επίσης μπορεί να γίνει με την χρήση βιομάζας μικροοργανισμών όπως μύκητες, ζύμες, βακτήρια και μικροφύκη (Zinoviev *et al.*, 2010). Με τον όρο “βιοκαύσιμα” αναφερόμαστε σε πολλές κατηγορίες καυσίμων. Τέτοια είναι το βιολογικό πετρέλαιο (Βιοντίζελ), η βιοαιθανόλη και το βιοαέριο. Η ευρεία χρήση τους έχει προκύψει από την ανάγκη να βρεθεί κάποιο καύσιμο με στόχο την αντικατάσταση των ορυκτών καυσίμων και τον επιβαρυντικό αντίκτυπο που έχουν στο περιβάλλον. Τα βιοκαύσιμα ταξινομούνται ανάλογα με την πηγή της πρώτης ύλης, τη χρησιμοποιούμενη τεχνολογία, τον μικροοργανισμό που συμμετέχει και διαχωρίζονται σε πρώτη, δεύτερη και τρίτη γενιά (Ago *et al.*, 2016).

Βιοντίζελ ονομάζεται κάθε φυσικής προέλευσης λίπος ή έλαιο ή χημικό παράγωγο του (π.χ. μεθυλεστέρες λιπαρών οξέων - FAMES) που έχει συγκρίσιμες ιδιότητες ως καύσιμο με το ντίζελ και για το λόγο αυτό μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως βιολογικής προέλευσης υποκατάστατο του τελευταίου. Χημικά αποτελείται από μακράς αλυσίδας καρβοξυλικούς αλκυλεστέρες (RCOOR), μεθυλεστέρες (RCOOCH₃), αιθυλεστέρες (RCOOCH₂CH₃) ή προπυλεστέρες (RCOOCH₂CH₂CH₃). Τυπικά, παράγεται μετά την χημική αντίδραση λιπιδίων με μια αλκοόλη. Η αντίδραση αυτή λέγεται εστεροποίηση και παράγονται αντίστοιχοι εστέρες των χρησιμοποιούμενων λιπαρών οξέων.

Η σύνθεση του βιοντίζελ εμφανίζεται στο κατωτέρω σχήμα (Chatzifragkou and Papanikolaou 2012).



Σχήμα 1.1: Τυπική αντίδραση μετεστεροποίησης και παραγωγή βιοντίζελ, με τη γλυκερόλη να συντίθεται ως το κύριο υποπροϊόν της διεργασίας (Chatzifragkou and Papanikolaou, 2012)

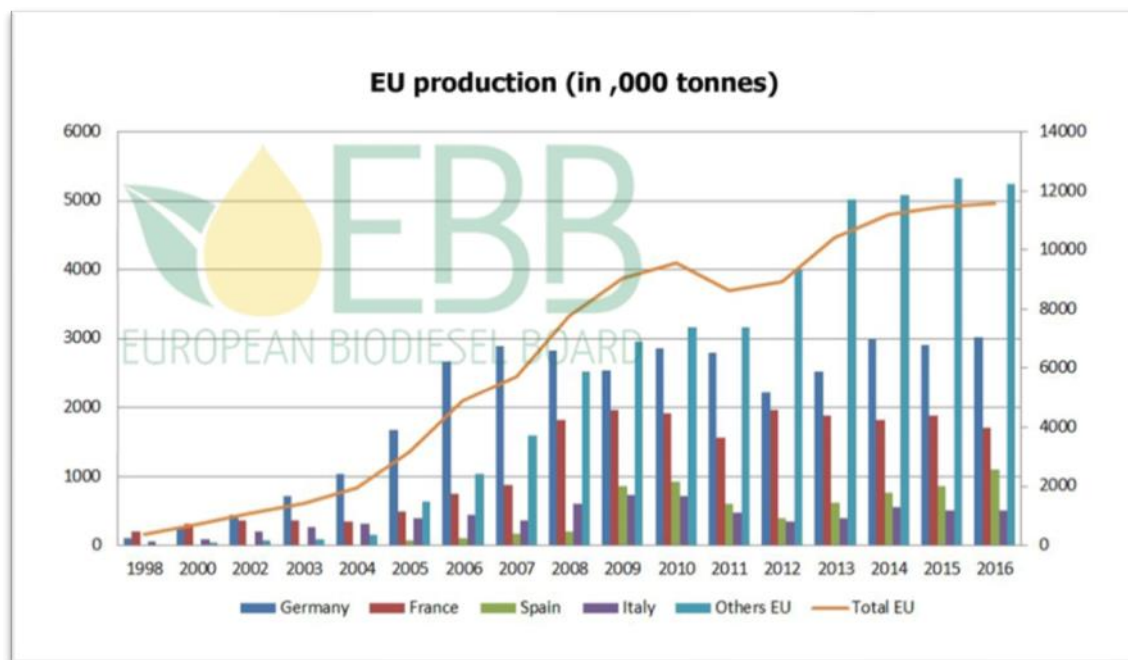
Έχει σκοπό να χρησιμοποιείται σε κανονικούς κινητήρες ντίζελ και γι' αυτό διακρίνεται από φυτικά και απόβλητα έλαια που χρησιμοποιούνται ως καύσιμα μόνο σε κινητήρες ντίζελ, οι οποίοι έχουν υποστεί κατάλληλη μετατροπή. Το βιοντίζελ μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως καύσιμο ντίζελ, τόσο μόνο του, όσο και σε μίγματα με το συμβατικό πετρέλαιο κίνησης σε οποιεσδήποτε αναλογίες, καθώς και να χρησιμοποιηθεί ως πετρέλαιο θέρμανσης (Van Gerpen *et al.*, 2004).

Ο όρος βιοντίζελ, αντίθετα με ότι έχει επικρατήσει στην καθημερινή γλώσσα, εκφράζει μια πολύ συγκεκριμένη ομάδα χημικών ενώσεων, τους μεθυλεστέρες των ανώτερων λιπαρών οξέων οι οποίοι προέρχονται από οργανικά έλαια και όχι οποιοδήποτε καύσιμο οργανικής προέλευσης, το οποίο μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε κινητήρες έναυσης με συμπίεση. Το γεγονός ότι οι μεθυλεστέρες προέρχονται από πρώτες ύλες οργανικής βάσης, οι οποίες είναι ανανεώσιμες, δικαιολογεί το χαρακτηρισμό τους ως βιοκαύσιμα (Van Gerpen *et al.*, 2004). Η δυνατότητα του βιοντίζελ να υποκαταστήσει το συμβατικό ντίζελ σε κινητήρες εσωτερικής καύσης είναι γνωστή εδώ και δύο δεκαετίες. Το βιοντίζελ προτάθηκε σαν εναλλακτική λύση ως προς τα σκέτα φυτικά έλαια τα οποία τις περισσότερες φορές παρουσιάζουν χαρακτηριστικά που τα καθιστούν ακατάλληλα για χρήση στους κινητήρες αυτούς. Τα τελευταία 10 χρόνια η παραγωγή βιοντίζελ έχει σημειώσει ιδιαίτερη ανάπτυξη στην Ευρωπαϊκή Ένωση, που είναι και ο μεγαλύτερος παραγωγός παγκοσμίως και ιδιαίτερα στην Γερμανία. Η αύξηση της παραγωγής ενισχύεται από την επιταγή της κοινοτικής οδηγίας 2003/30/EK η οποία προβλέπει την

εισαγωγή των βιοκαυσίμων στις αγορές των κρατών μελών. Οι ιδιότητες και τα χαρακτηριστικά του βιοντίζελ το οποίο διακρίνεται στην ευρωπαϊκή αγορά προδιαγράφονται από το ευρωπαϊκό πρότυπο EN14214.

1.3 ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΗ ΓΛΥΚΕΡΟΛΗ

Η γλυκερόλη μπορεί να αφομοιωθεί εύκολα από πολυάριθμους ευκαρυωτικούς και προκαρυωτικούς μικροοργανισμούς, ως πηγή άνθρακα,. Η ένωση αυτή είχε παραμεληθεί ως υπόστρωμα για μικροβιακές καλλιέργειες για πολλά χρόνια, κυρίως λόγω του υψηλού κόστους της. Η εξέλιξη της αγοράς καυσίμων οδήγησε στην παραγωγή του βιοντίζελ, όπου σε μεγάλη κλίμακα που προέρχεται από φυτικά έλαια, αντιστρέφοντας αυτήν την κατάσταση. Σήμερα, στις μονάδες παραγωγής βιοντίζελ η γλυκερόλη είναι διαθέσιμη σε μεγάλες ποσότητες. Αυτή η βιομηχανία παράγει τεράστιες ποσότητες γλυκερόλης ως υποπροϊόν κατά τη διάρκεια της διαδικασίας μετεστεροποίησης του ελαίου με μεθανόλη ή αιθανόλη. Συνεπώς, η γλυκερόλη μετατρέπεται σε μια ελκυστική πρώτη ύλη. Για κάθε 100 kg βιοντίζελ που παράγονται, εκτιμάται ότι δημιουργούνται περίπου 10 kg ακατέργαστης γλυκερόλης καθαρότητας περίπου 90% κ.β. (Paranikolaou and Aggelis 2009).



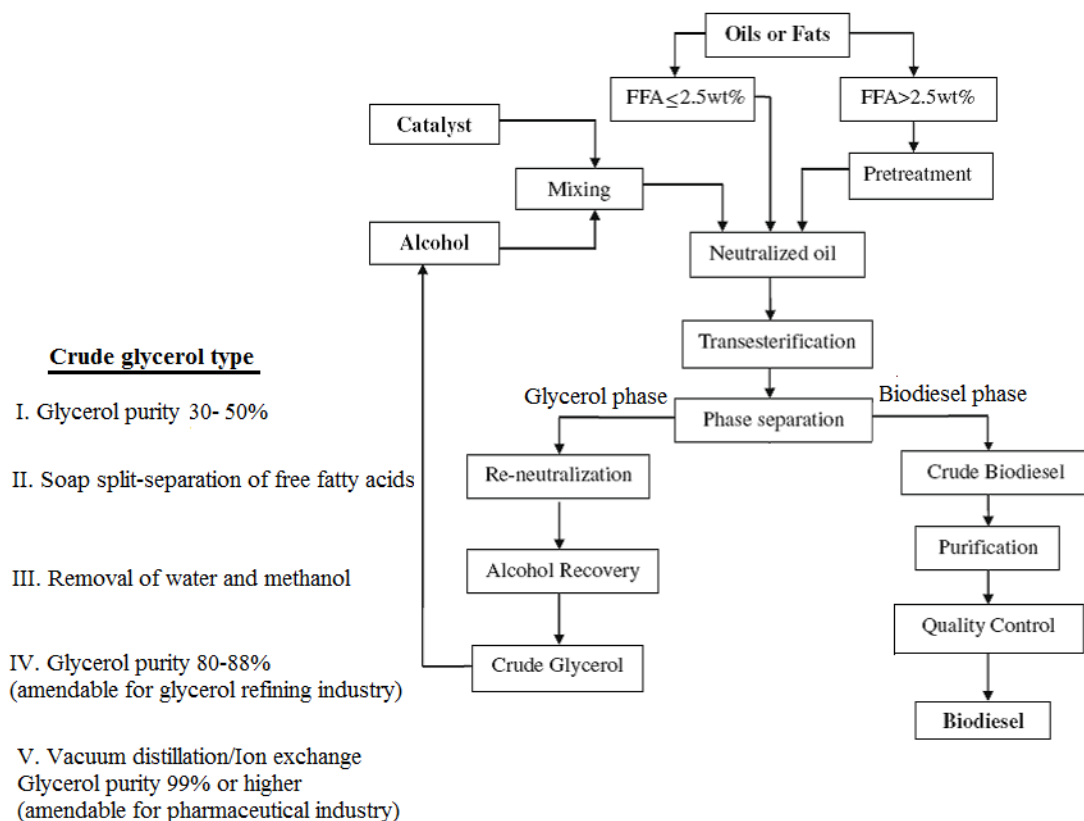
Σχήμα 1.2.: Η παραγωγή βιοντίζελ εντός της Ευρωπαϊκής Ένωσης από το 1998 έως το 2016 (Πηγή: European Biodiesel Board)

Η ακατέργαστη γλυκερόλη αντιπροσωπεύει το υποπροϊόν που παράγεται σε μεγαλύτερη ποσότητα από τη βιομηχανία βιοντίζελ. Όπως φαίνεται στο Σχήμα 1.2 η παραγωγή βιοντίζελ εντός της Ευρωπαϊκής Ένωσης τα τελευταία χρόνια γνωρίζει μια

ταχεία αύξηση, γεγονός που έχει ως απόρροια τον κατακλυσμό της αγοράς με πλεονάζουσα ποσότητα ακατέργαστης γλυκερόλης.

Βιομηχανικά, η γλυκερόλη παράγεται μέσω της διαδικασίας της σαπωνοποίησης δηλαδή την αντίδραση υδρόλυσης των λιπών και των ελαίων, κατά την οποία τα τριγλυκερίδια διασπώνται παρουσία αλκαλικών υλών στα συστατικά τους, τα λιπαρά οξέα και γλυκερόλη. Η προκύπτουσα ακατέργαστη γλυκερόλη υποβάλλεται σε καθαρισμό και στη συνέχεια σε απόσταξη, για να περιοριστεί η περιεκτικότητα σε νερό μέχρι ποσοστού 3%, προκειμένου να χρησιμοποιηθεί σε φαρμακευτικά ή βιομηχανικά προϊόντα (Chatzifragkou and Papanikolaou, 2012).

Τυπικό διάγραμμα ροής της σύνθεσης βιοντίζελ από εδώδιμα και μη εδώδιμα έλαια μέσω χημικής εστεροποίησης, και της αντίστοιχης παραγωγής γλυκερόλης φαίνεται κατωτέρω (Σχήμα 1.3) (Chatzifragkou and Papanikolaou 2012).



Σχήμα 1.3.: Διάγραμμα ροής μετεστεροποίησης λιπαρών υλών προς παραγωγή βιοντίζελ και παραγωγή γλυκερόλης ως υποπροϊόντος της διεργασίας. (Chatzifragkou and Papanikolaou, 2012)

1.4 ΖΥΜΕΣ – Η ΖΥΜΗ *Yarrowia lipolytica*

1.4.1. ΖΥΜΕΣ

Οι ζύμες είναι ευκαρυωτικοί μονοκύτταροι μικροοργανισμοί και ανήκουν στο βασίλειο των μυκήτων. Η λέξη ζύμη προέρχεται από ινδοευρωπαϊκή ρίζα και σημαίνει «αφρός» ή «φούσκα». Οι ζύμες βρίσκονται κατανεμημένες σε διάφορα φυσικά περιβάλλοντα, καθώς έχουν απομονωθεί από χερσαίο, υδάτινο και από ατμοσφαιρικό περιβάλλον. Επίσης, πολλά είδη ζυμών έχουν απομονωθεί από εξειδικευμένα ή ακραία περιβάλλοντα. Για παράδειγμα, περιβάλλοντα με συνθήκες χαμηλού υδατικού δυναμικού (δηλαδή με υψηλές συγκεντρώσεις άλατος ή σακχάρου), περιβάλλοντα με χαμηλή διαθεσιμότητα οξυγόνου (π.χ. στην εντερική οδό των ζώων) και περιβάλλοντα με χαμηλές θερμοκρασίες (ζύμες που απομονώθηκαν από την Ανταρκτική). Μέχρι σήμερα υπολογίζεται ότι έχουν αναγνωριστεί περίπου 1.500 είδη ζυμών, τα οποία ανήκουν σε περισσότερα από 100 γένη. Εκτιμάται ότι έχει περιγραφεί μόνο το 1% των ζυμών της γης (Shivaji *et al.*, 2009).

Επί του παρόντος, οι ζύμες χρησιμοποιούνται σε πολλές βιομηχανικές διεργασίες. Πιο συγκεκριμένα, στην παραγωγή αλκοολούχων ποτών, βιομάζας (μικροβιακής πρωτεΐνης που χρησιμοποιείται στην παραγωγική διεργασία αρτοσκευασμάτων και συναφών υλικών), τροφίμων, ζωοτροφών ενώ σε πολλές περιπτώσεις χρησιμοποιούνται ως «κυτταρικά εργοστάσια» σχετικά με την παραγωγή διαφόρων μεταβολικών προϊόντων. Στα μεταβολικά προϊόντα περιλαμβάνονται ένζυμα, βιταμίνες, πολυσακχαρίτες, καροτενοειδή, πολυόλες, λιπίδια, γλυκολιπίδια, κιτρικό οξύ, αιθανόλη, διοξείδιο του άνθρακα και ενώσεις που συντίθενται με την εισαγωγή του ανασυνδυασμένου DNA σε ζυμομύκητες. Κάποια από αυτά τα προϊόντα παράγονται εμπορικά ενώ άλλα είναι δυνητικά πολύτιμα στον τομέα της βιοτεχνολογίας. Ορισμένες από τις παρούσες και πιθανές χρήσεις των ζυμών στις βιομηχανίες τροφίμων, ποτών και άλλων βιομηχανιών ζύμωσης παρατίθενται στον πίνακα 1.3.1 (Demain *et al.*, 1998).

Πίνακας 1.2: Ορισμένες χρήσεις ζυμών στις βιομηχανίες τροφίμων, ποτών και ζύμωσης [πηγή: (Demain *et al.*, 1998)]

Εφαρμογή	Στέλεχος Ζύμης
Ζύμωση μύρας τύπου “ale”	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Διόγκωση ψωμιών και ζυμών (προζύμι)	<i>S. cerevisiae, Saccharomyces exiguus</i>
D – Αραβιτόλη (γλυκαντική ουσία)	<i>Candida diddensiae</i>
Γαλακτωματοποιητές	<i>Candida lipolytica</i>
Ζύμωση αιθανόλης	<i>S. cerevisiae</i>
Ιχθυοτροφές και πτηνοτροφές (ασταξανθίνη)	<i>Phaffia rhodozyma</i>
Ζωοτροφές και μονοκυτταρική πρωτεΐνη	<i>Candida utilis</i>
Ζύμωση λακτόζης και γάλακτος	<i>Candida pseudotropicalis, “Kluyveromyces fragilis”</i>
Ζύμωση μύρας τύπου “lager”	<i>“Saccharomyces carlsbergensis” (= S. pastorianus)</i>
Μαννιτόλη (ενυδατική ουσία)	<i>“Torulopsis mannifaciens”</i>
Σάλτσα και πάστα σόγιας	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>
Ζύμωση κρασιού	<i>S. cerevisiae</i>
Ξυλιτόλη (γλυκαντική ουσία)	<i>“Torulopsis candida”</i>
Ζύμωση D – Ξυλόζης	<i>Candida shehatae, Pichia stiritis, Pichia segobiensis</i>
Παρασκευή κεφίρ	<i>Saccharomyces kefir</i>
Λαχανικά	<i>Guehomyces</i>
Ωρίμανση ροκφόρ	<i>Penicillium roqueforti</i>

1.4.1.1. ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΖΥΜΩΣΕΩΝ

Οι πρώτες πρακτικές εφαρμογές ζυμώμενων προϊόντων αναφέρονται από παλαιωτάτων χρόνων και αποτελούν την αρχαιότερη εφαρμογή της βιοτεχνολογίας που αξιοποίησε ο άνθρωπος. Ευρήματα της χρήσης των ζυμώσεων χρονολογούνται από την εποχή των πρώτων ανθρώπινων πολιτισμών κατά τη διάρκεια της αγροτικής επανάστασης, όπου ο άνθρωπος άρχισε να δημιουργεί μόνιμους οικισμούς. Από την εποχή που ο άνθρωπος ξεκίνησε να καλλιεργεί τη γη και να εξημερώνει τα πρώτα ζώα, η διατροφή του βασίστηκε στις καλλιέργειες και τα κοπάδια του και όχι στο κυνήγι και την τροφосυλλογή (Chambers and Pretorius, 2010; Studies and Joshi, 2014).

Μια σύντομη αλλά κατατοπιστική αναφορά:

- Το 7.000 π. Χ. αναφέρεται παραγωγή πρωτόλειου τύπου άρτου στις περιοχές της Μεσοποταμίας.
- Οι Σουμέριοι και οι Βαβυλώνιοι παρασκεύαζαν μπύρα σε οικιακή και οικοτεχνική κλίμακα από το 6000 π. Χ.
- Οι Ασσύριοι παρασκεύαζαν κρασί από το 3500 π. Χ.
- Στην Αρχαία Ελλάδα ο Διόνυσος ήταν ο προστάτης και θεός του Οίνου και η Ελληνική μυθολογία θεωρεί ότι αυτός εγκατέλειψε τους λαούς της Μεσοποταμίας και εγκαταστάθηκε στην Ελλάδα λόγω της ροπής που έδειχναν οι πρώτοι στη μέθη.
- Το πρώτο «ζυμωμένο» ψωμί θεωρείται ότι καταναλώθηκε στην Αρχαία Αίγυπτο, όπου υπήρχε τεράστια αφθονία στα άλευρα.
- Ήδη από το 4000 π. Χ. αναφέρεται στην Αίγυπτο η χρήση προζυμιού προερχομένου από την προηγούμενη αρτοποιήση για το φούσκωμα του ψωμιού.
- Η αρτοποιήση και η οινοποίηση θεωρείται ότι συν-περπάτησαν ήδη από το 7000 π. Χ., ενώ η αρτοποιήση θεωρήθηκε ένα από τα λαμπρότερα επιτεύγματα του πρωτογόνου ανθρώπου.
- Κατανάλωση «άζυμου» άρτου αναφέρεται στην Αγία Γραφή, όπου γίνεται αναφορά στην κραυγαλέα υστέρηση σε οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του άρτου αυτού σε σχέση με τον «ζυμωμένο» άρτο.
- Ο αρτοποιός ήταν το πρώτο επίσημα αναγνωρισμένο επάγγελμα στους Ρωμαϊκούς χρόνους.
- Το 100 π. Χ. υπήρχαν στη Ρώμη ήδη 100 αρτοποιεία.
- Ο αυτοκράτορας Τραϊανός είχε ιδρύσει σχολή αρτοποιιών.
- Το 14 μ. Χ. ιδρύθηκε το σωματείο αρτοποιών, το πρώτο γνωστό επαγγελματικό σωματείο στην Ιστορία.
- Κατά τον ίδιο τρόπο η ζύμωση και η οξίνιση του γάλακτος χάνεται στα βάθη της (Προ)-Ιστορίας.
- Από το 7000 π. Χ. αναφέρεται η χρήση εκχυλίσματος οπού συκιάς για πήξιμο του γάλακτος προς παραγωγή τυριών.
- Ο Όμηρος στα έπη του αναφέρει την παρασκευή μαλακών τυριών κατά αντίστοιχο τρόπο με τα σημερινά.
- Η ζύμωση ελιών, τουρσιών, ψαριών, κλπ αναφέρεται σε μεταγενέστερες εποχές
- Η κατανάλωση του ζυμωμένου άρτου και του οίνου χάνονται στην προϊστορία

- Στην Αρχαία Ελλάδα αρχικώς, αλλά και στη Ρώμη αργότερα υπήρχε πληθώρα αναφορών για παρασκευή οίνων σε οικιακή και οικοτεχνική κλίμακα.
- Στην Αρχαία Ελλάδα δεν είναι ξεκάθαρο ποια ήταν η περιοχή από την οποία προέρχονταν αρχικώς οι οίνοι. Άλλοι θεωρούν αρχική περιοχή εκκίνησης την Κρήτη, από όπου διαδόθηκε στη Νάξο και κατόπιν σε όλη την Ελλάδα. Άλλοι θεωρούν ότι ο οίνος ξεκίνησε να παράγεται από την Αιτωλία και κατόπιν διαδόθηκε στη λοιπή χώρα. Άλλοι τέλος θεωρούν ότι η Θράκη ήταν η περιοχή «γέννησης» του οίνου στην Ελλάδα.
- Από τη Θράκη θεωρείτο ότι οι Έλληνες προμηθεύονταν τον οίνο κατά την πολιορκία της Τροίας.
- Στη Θράκη παρασκευαζόταν ο διάσημος οίνος «Ισμαρος» με τον οποίο θεωρείται ότι ο Οδυσσέας μέθυσε το γίγαντα Πολύφημο, πριν τον τυφλώσει. (Ο Πολύφημος θεωρείτο ο πρώτος τυροκόμος της Ιστορίας).
(Διαφάνειες μαθήματος «Βιομηχανική Βιοτεχνολογία», 2017, Παπανικολάου).

Το γεγονός ότι οι ζυμώσεις είναι άρρηκτα συνδεδεμένες με την γεωργία και την κτηνοτροφία σχετίζεται με τα οφέλη που προκύπτουν από τα ζυμωμένα προϊόντα. Βασικό πλεονέκτημα είναι η μεγάλη περιεκτικότητα τους σε φυσικές συντηρητικές ενώσεις όπως οργανικά οξέα, καθώς και η μειωμένη περιεκτικότητα τους σε νερό. Σαν αποτέλεσμα, περιορίζεται η ανάπτυξη μικροοργανισμών και αυξάνεται ο χρόνος ζωής και η ασφάλεια των τροφίμων. Τέλος, με την ζύμωση, βελτιώνεται η διατροφική αξία και οι οργανοληπτικές ιδιότητες των τροφίμων. Παρόλο που οι ζυμώσεις και τα προϊόντα τους αποτελούσαν κομμάτι της καθημερινότητας για χιλιάδες χρόνια, η γνώση γύρω από τα αίτια που τις προκαλούν παρέμεναν για πολλά χρόνια σχετικά έως και εντελώς άγνωστα. Οι πρώτες ανακαλύψεις για την λειτουργία των ζυμώσεων χρονολογούνται από την εποχή της βιομηχανικής επανάστασης στην Ευρώπη. Ταυτόσημη με την βιομηχανική επανάσταση, είναι η μεγέθυνση της αστικοποίησης και η ανάγκη μαζικής παραγωγής τροφίμων (Chambers and Pretorius, 2010; Studies and Joshi, 2014).

1.4.2. Η ΖΥΜΗ *Yarrowia lipolytica*

Η ζύμη *Yarrowia lipolytica* φυλογενετικά έχει την ακόλουθη κατάταξη: Fungi, Ascomycota, Saccharomycetes, Saccharomycetales, Dipodascaceae, *Yarrowia*, *Yarrowia lipolytica* (Barth & Gaillardin, 1997).

Πίνακας 1.3: Ταξινόμηση της ζύμης *Yarrowia lipolytica*

Βασίλειο	Fungi
Φύλο	Ascomycota
Ομάδα	Saccharomycetes
Τάξη	Saccharomycetales
Οικογένεια	Dipodascaceae
Γένος	<i>Yarrowia</i>
Είδος	<i>Yarrowia lipolytica</i>

Στο φύλο Ascomycota είναι περιλαμβάνονται 18.000 σαπροφυτικά και παρασιτικά είδη και ένας εξίσου μεγάλος αριθμός (περίπου 14.000) ειδών που δημιουργούν λειχήνες.

Στην τάξη Saccharomycetales περιλαμβάνονται μικροοργανισμοί ιδιαίτερης σημασίας για τη βασική βιολογική έρευνα, τη βιομηχανία τροφίμων και ποτών, την ιατρική και τη βιοτεχνολογία.

Ο πολλαπλασιασμός στα στελέχη του γένους *Yarrowia* πραγματοποιείται αγενώς με εκβλάστηση ή διχοτόμηση των κυττάρων, ενώ εγγενώς πολλαπλασιάζονται με ασκοσπόρια, σπόρια χαρακτηριστικά του φύλου των Ascomycota, που παράγονται σε εξειδικευμένα κύτταρα, τους ασκούς.

Αρχικά, τα στελέχη του είδους *Y. lipolytica* είχαν τοποθετηθεί στο γένος *Candida*, αλλά όταν έγινε γνωστός ο εγγενής τρόπος αναπαραγωγής τους, μετονομάστηκαν σε *Endomycopsis lipolytica* (Wickerham *et al.*, 1970), κατόπιν σε *Saccharomycopsis lipolytica* και τελικά σε *Yarrowia lipolytica* (Yarrow, 1972). Όπως φαίνεται και από το όνομα “*lipolytica*”, τα στελέχη του είδους, έχουν τη δυνατότητα να υδρολύουν λιπαρές ύλες και να χρησιμοποιούν τα προϊόντα υδρόλυσης ως πηγή άνθρακα και ενέργειας λόγω των λιπασών που εκκρίνουν (Kamzolova *et al.*, 2005, 2007).

Η ζύμη *Yarrowia lipolytica* είναι μια πολυμορφική ζύμη που απαντάται με τη μορφή απλών κυττάρων, ψευδομυκηλίου ή αληθινού μυκηλίου (Van der Walt, 1980) και η μορφολογία της επηρεάζεται από το περιβάλλον της αύξησης και κυρίως από τον αερισμό (Bellou *et al.*, 2014).

Επίσης παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον για τη βασική βιολογική έρευνα και τη βιοτεχνολογία και είναι από τις περισσότερο μελετημένες μη-συμβατικές ζύμες. Είναι ο μοναδικός ετερότροφος ελαιογόνος μικροοργανισμός του οποίου το γονιδίωμα έχει ταυτοποιηθεί πλήρως και χρησιμοποιείται ως πρότυπο ελαιογόνου μικροοργανισμού για τη μελέτη των διεργασιών της συσσώρευσης και της αποδόμησης των ενδοκυτταρικών λιπιδίων.

Η ζύμη *Yarrowia lipolytica* έχει χρησιμοποιηθεί σε μια μεγάλη ποικιλία βιοτεχνολογικών εφαρμογών. Μελέτες αποτελεσματικότητας και ασφάλειας κατέδειξαν την ασφαλή χρήση των παραγόμενων προϊόντων από την ζύμη *Yarrowia lipolytica* που περιέχουν σημαντικές ποσότητες βιομάζας της ζύμης ή την ίδια τη ζύμη ως το τελικό προϊόν. Η φυσική εμφάνιση της ζύμης στα τρόφιμα, στα γαλακτοκομικά προϊόντα, ιδίως στο τυρί, και το κρέας, είναι ένα ακόμη επιχειρήμα που υποστηρίζει την ασφάλειά της. Τα στελέχη του γένους δεν θεωρούνται παθογόνα (Holzschu *et al.*, 1979) και έχει ταξινομηθεί ως ασφαλές από την Αμερικανική Παραγωγή Τροφίμων και Φαρμάκων (FDA) για την παραγωγή κιτρικού οξέος (Fickers *et al.*, 2005). Προκαλεί σπάνιες ευκαιριακές μολύνσεις σε σοβαρά ανοσοκατασταλαμένους ή άλλους σοβαρά ασθενείς με άλλες υποκείμενες ασθένειες ή καταστάσεις. Οι μολύνσεις μπορούν να αντιμετωπιστούν αποτελεσματικά με τη χρήση τακτικών αντιμυκητιακών φαρμάκων και σε μερικές περιπτώσεις εξαφανίστηκαν χωρίς φάρμακα. Καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για έναν «ασφαλή στη χρήση» μικροοργανισμό (Groenewald *et al.*, 2014).

Αρκετές πηγές άνθρακα και ενέργειας έχουν χρησιμοποιηθεί με επιτυχία για την καλλιέργεια της ζύμης *Yarrowia lipolytica* μεταξύ των οποίων η γλυκερόλη, η γλυκόζη, διάφορα σάκχαρα, ζωικά λίπη, φυτικά έλαια, ελαιοκράμβη και τα υγρά απόβλητα ελαιοτριβείου (Aggelis & Sourdis, 1997; André *et al.*, 2009, 2010; Beopoulos *et al.*, 2009; Chatzifragkou *et al.*, 2011; Förster *et al.*, 2007; Kamzolova *et al.*, 2013; Makri *et al.*, 2010; Papanikolaou & Aggelis, 2009; Papanikolaou *et al.*, 2002, 2009; Sarris *et al.*, 2011).

Επιπλέον, η ζύμη *Yarrowia lipolytica* είναι ικανή να παράγει προϊόντα υψηλής προστιθέμενης αξίας όπως για παράδειγμα λιπαρές ύλες ειδικής δομής και σύστασης και συγκεκριμένα υποκατάστατα του λίπους του κακάο (Papanikolaou *et al.*, 2001), αλλά και οργανικά οξέα όπως το κιτρικό και το α-κετογλουταρικό οξύ (Yin *et al.*, 2012), προϊόντα με ευρύτατη εφαρμογή στη βιομηχανία τροφίμων.

Χρησιμοποιείται, εξακολουθεί να αναπτύσσεται και θεωρείται κατάλληλη για πολλαπλές βιομηχανικές εφαρμογές όπως για παράδειγμα:

- (i) ως πηγή πρωτεΐνης υψηλής ποιότητας για ζωοτροφή
- (ii) ως βιοτεχνολογικός παραγωγός για πολλά οργανικά οξέα
(π.χ. κιτρικό οξύ, α-κετογλουταρικό οξύ, κλπ) ή υδρόφοβες ουσίες υψηλής αξίας όπως εξωτικά λιπίδια ή καροτενοειδή
- (iii) ως παραγωγός φαρμακευτικών προϊόντων και βιομηχανικών πρωτεϊνών και ενζύμων και
- (iv) για τη μαζική παραγωγή βιοκαυσίμων.

(Groenewald *et al.*, 2014).

1.5 ΠΑΡΑΓΟΜΕΝΑ ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΑ ΠΡΟΪΟΝΤΑ ΑΠΟ ΤΗΝ ΖΥΜΗ *Yarrowia lipolytica*

1.5.1. ΠΟΛΥΟΛΕΣ

Πολυόλες ή πολυαλκοόλες ονομάζονται οι αλκοόλες που περιέχουν πολλαπλές υδροξυλομάδες (-OH) , όπως για παράδειγμα η μαννιτόλη ($C_6H_{14}O_6$) , η ερυθριτόλη ($C_4H_{10}O_4$) και η αραβιτόλη ($C_5H_{12}O_5$). Ουσιαστικά είναι αλδόζες ή κετόζες, οι οποίες με αναγωγικά μέσα, ανάγονται στο σημείο της καρβονυλικής ομάδας πολυσθενείς αλκοόλες (ή πολυόλες ή πολυαλκοόλες), τις αλδιτόλες. Οι πολυόλες που παράγονται από την *Y. lipolytica* είναι η μαννιτόλη, η ερυθριτόλη και η αραβιτόλη (Belitz *et al.*, 2009; BeMiller *et al.*, 1996).

Οι πολυόλες ή αλκόολες σακχάρων είναι σημαντικά υποκατάστατα ζάχαρης. Υποκατάστατα ζάχαρης ονομάζονται οι ενώσεις που χρησιμοποιούνται σαν τα σάκχαρα, για γλύκανση, αλλά μεταβολίζονται χωρίς την επίδραση της ινσουλίνης (Belitz *et al.*, 2009).

Τον τελευταίο καιρό η ζήτηση για τα εναλλακτικά σάκχαρα έχει αυξηθεί λόγω των ωφέλιμων ιδιοτήτων τους.

Παρακάτω είναι οι ιδιότητες που τα εναλλακτικά σάκχαρα πρέπει να διαθέτουν:

- χαμηλή θερμιδική τιμή $\sim 0,2 \text{ kcal g}^{-1}$
- να μην προκαλούν τερηδόνα
- η γλυκύτητα τους να είναι παρόμοια της σακχαρόζης
- να είναι άχρωμα
- να είναι άοσμα και
- πρέπει να μεταβολίζονται κανονικά

(Himabindu *et al.*, 2014)

1.5.1.1. MANNITOLH

Η μαννιτόλη ($C_6H_{14}O_6$) είναι μια πολυσθενής αλκοόλη που αποτελείται από έξι άτομα άνθρακα και έχει πολλές εφαρμογές στις βιομηχανίες τροφίμων, φαρμάκων και στις ιατρικές επιστήμες. Είναι η πιο άφθονη πολυόλη στη φύση που εμφανίζεται σε ή παράγεται από βακτήρια, ζύμες, μύκητες, φύκη, λειχήνες και διάφορα φυτά όπως κολοκύθες, σέλινο, κρεμμύδια, χόρτα, ελιές και γκι, ενώ αποτελεί έναν από τους κύριους υδατάνθρακες των μανιταριών (Tomaszewska *et al.*, 2012; Wisselink, 2012).

Αναφέρεται ότι η χρήση μαννιτόλης επιφέρει διάφορα αποτελέσματα που προάγουν την υγεία, οπότε η προσθήκη μαννιτόλης στα τρόφιμα μπορεί να οδηγήσει σε προϊόντα με επιπλέον θρεπτική αξία. Η μαννιτόλη μπορεί είτε να προστεθεί απευθείας στα τρόφιμα είτε η χρήση βακτηρίων, ζυμών ή μυκήτων που παράγουν μαννιτόλη μπορεί να οδηγήσει κατευθείαν σε «φυσικά» τρόφιμα που περιέχουν μαννιτόλη. (Wisselink, 2012) Αυτή τη στιγμή παράγεται βιομηχανικώς με χημική σύνθεση χρησιμοποιώντας την τεχνική υδρογόνωσης της φρουκτόζης σε υψηλή θερμοκρασία και πίεση. Αυτή η διαδικασία δεν είναι πολύ αποτελεσματική και απαιτεί υψηλή καθαρότητα υποστρωμάτων. Ως εκ τούτου, η μικροβιολογική παραγωγή μαννιτόλης θα ήταν μια ενδιαφέρουσα εναλλακτική λύση (Tomaszewska *et al.*, 2012).

1.5.1.2. ΕΡΥΘΡΙΤΟΛΗ

Η ερυθριτόλη ($C_4H_{10}O_4$) είναι μια αλκοόλη που αποτελείται από τέσσερα άτομα άνθρακα και παράγεται με μικροβιολογικές μεθόδους. Έμφανίζεται φυσικά σε μερικά φρούτα και ζυμωμένα τρόφιμα και ανακαλύφθηκε από τον Σκωτσέζο χημικό John Stenhouse το 1848. Σε βιομηχανικό επίπεδο, παράγεται από γλυκόζη με ζύμωση με χρήση ζυμών ως «κυτταρικών εργαστασίων» της διεργασίας. Σε σύγκριση με άλλες πολυόλες που χρησιμοποιούνται σήμερα ως υποκατάστατα σακχαρόζης, η ερυθριτόλη έχει μια πολύ χαμηλότερη θερμιδική τιμή ($\sim 0,2 \text{ kcal g}^{-1}$) από τη σακχαρόζη ($\sim 4 \text{ kcal g}^{-1}$). Είναι τόσο γλυκιά (60-70%) όσο η σακχαρόζη, δεν επηρεάζει το σάκχαρο του αίματος και απορροφάται εν μέρει από το σώμα. Επιπλέον, αυτή η πολυόλη δεν προκαλεί τερηδόνα και με την τακτική χρήση της δεν προκαλεί γαστρικές παρενέργειες. Η χρήση της ως πρόσθετο τροφίμων έχει εγκριθεί σε παγκόσμιο επίπεδο (Tomaszewska *et al.*, 2012).

1.5.1.3. ΑΡΑΒΙΤΟΛΗ

Η αραβιτόλη ονομάζεται επίσης αραβινιτόλη ή λυξιτόλη ($C_5H_{12}O_5$) είναι μια είναι αλκοόλη που αποτελείται από πέντε άτομα άνθρακα και υπάρχει και στις δύο μορφές D και L, είναι γλυκιά, άχρωμη, κρυσταλλική, υδατοδιαλυτή, τήκεται στους $103\text{ }^\circ\text{C}$ (Himabindu *et al.*, 2014; Koganti 2012), με πιθανές εφαρμογές στη βιομηχανία τροφίμων και φαρμακευτικών προϊόντων. Η αραβιτόλη, στο φυσικό περιβάλλον, υπάρχει στα μανιτάρια και τις λειχήνες. (Himabindu *et al.*, 2014). Επί του παρόντος, η παραγωγή αραβιτόλης είναι με χημική αναγωγή λακτονών αραβινικών και λυξονικών οξέων. Αυτή η διαδικασία απαιτεί ακριβό καταλύτη και πολύ υψηλή θερμοκρασία $100\text{ }^\circ\text{C}$. Η D-αραβιτόλη χρησιμοποιείται για σύνθεση ενώσεων οι οποίες είναι εναντιομερές και έχουν ιατρικές ιδιότητες κατάλληλες να χρησιμοποιηθούν ως ανοσοκατασταλτικά γλυκολιπίδια και ζιζανιοκτόνα. Η αραβιτόλη διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ενεργειακά ελεγχόμενη διατροφή, καθώς απορροφάται αργά από το πεπτικό σύστημα. Αναφέρεται ότι δεν προκαλεί τερηδόνα, καθώς δεν μπορεί εύκολα να μεταβολιστεί από τη στοματική χλωρίδα. Ως εκ τούτου, παράλληλα με την ξυλιτόλη, η αραβιτόλη χρησιμοποιείται ευρέως ως φυσικό γλυκαντικό (Himabindu *et al.*, 2014) και κυρίως η ως συστατικό σε τσίχλες. Αυτή η πολυόλη μπορεί να παραχθεί από ζύμες με τη διαδικασία της βιομετατροπής ή με τη βιομετατροπή των αποβλήτων από τη γεωργία, τη δασοκομία και τη βιομηχανία βιοντίζελ (γλυκερόλη). Η αραβιτόλη συντίθεται μέσω της οδού των φωσφορικών πεντοζών. Παρ'όλο που οι αναφορές σχετικά με τη μικροβιακή παραγωγή αραβιτόλης είναι περιορισμένες, η έρευνα για το θέμα τα τελευταία χρόνια έχει αυξηθεί, με ερευνητές να αναζητούν νέους μικροοργανισμούς, υποστρώματα και τεχνολογίες (Koganti *et al.*, 2011).

1.5.2. ΕΝΔΟΠΟΛΥΣΑΚΧΑΡΙΤΕΣ

Οι ενδοπολυσακχαρίτες είναι πολυμερή αποτελούμενα από μονοσακχαρίτες και ο γενικός χημικός τους τύπος είναι $(C_6H_{10}O_5)_n$, συνήθως με $n > 100$. Αποτελούνται από μονάδες γλυκοζυλίου σε γραμμική ή διακλαδισμένη διάταξη. Οι μεγάλοι πολυμερείς ολιγοσακχαρίτες που σχηματίζονται από τη σύνδεση πολλαπλών μονοσακχαριτών ονομάζονται πολυσακχαρίτες. Οι περισσότεροι, αποτελούνται από πολλούς περισσότερους από 20 μονοσακχαρίτες, που είναι το όριο για τους ολιγοσακχαρίτες. Ο βαθμός πολυμερισμού (ΒΠ), που ονομάζεται ο αριθμός των μονάδων μονοσακχαριτών σε έναν πολυσακχαρίτη, ποικίλλει. Λίγοι πολυσακχαρίτες έχουν ένα ΒΠ μικρότερο από 100. Οι περισσότεροι έχουν ΒΠ μεταξύ του εύρους 200-3000. Οι μεγαλύτεροι από αυτούς, όπως η κυτταρίνη, έχουν ένα ΒΠ από 7000-15000.

Ακόμα, χρησιμεύουν ως αποταμιευτικές και δομικές ύλες σε ζωικούς και φυτικούς οργανισμούς. Περισσότερο από το 90% της σημαντικής μάζας υδατάνθρακα στη φύση εκτιμάται ότι είναι στη μορφή των πολυσακχαριτών.

Ο επιστημονικός όρος για τους πολυσακχαρίτες είναι ο όρος γλυκάνες (BeMiller *et al.*, 1996; Belitz *et al.*, 2009). Διακρίνονται σε διάφορες κατηγορίες ανάλογα με το είδος των μονοσακχαριτών από τους οποίους αποτελούνται. Οι πολυσακχαρίτες έχουν κατά κανόνα διαφορετικές φυσικοχημικές ιδιότητες από αυτές των μονοσακχαριτών από τους οποίους αποτελούνται. Εάν όλοι οι μονοσακχαρίτες είναι όμοιοι, αυτά τα πολυμερή ονομάζονται ομοπολυσακχαρίτες (όπως το άμυλο και η κυτταρίνη), ενώ εάν οι μονοσακχαρίτες είναι διαφορετικοί ονομάζονται ετεροπολυσακχαρίτες (όπως οι πηκτίνες). Στις φαρμακευτικές βιομηχανίες αλλά και στις βιομηχανίες τροφίμων, καθώς και σε διάφορες ιατρικές εφαρμογές χρησιμοποιούνται ευρέως πολλοί από τους προαναφερόμενους πολυσακχαρίτες (Stacey, 1967).

Οι μύκητες έχουν μελετηθεί για την παραγωγή έξω- και ένδο-πολυσακχαριτών και σε πολλές περιπτώσεις παρουσιάζουν φαρμακευτικές και θεραπευτικές δράσεις με αντικαρκινικές και ανοσολογικές ιδιότητες (ετερο-β-γλυκάνες) (Tang and Zhong, 2002). Οι β-γλυκάνες αποτελούνται από μόρια γλυκόζης ενωμένα με β-(1,3) γλυκοσιδικούς δεσμούς στα οποία συνδέονται με διακλαδώσεις μόρια γλυκόζης με γλυκοσιδικό δεσμό β-(1,6) (Seviour *et al.*, 1992; Fazenda *et al.*, 2008). Σε πολλά είδη μυκήτων η έκταση της διακλάδωσης διαφέρει παρ'όλα αυτά σε πολλά είδη μυκήτων (π.χ. *Botryosphaeria rhodina*, *Lentinula edodes*, *Pleurotus eryngii*, *Pleurotus ostreatoroseus*). Σε κάποια η συχνότητα διακλάδωσης εμφανίζεται κάθε τρία μόρια

γλυκόζης της βασικής αλυσίδας, ενώ σε άλλα, όπως το *Pestalotia* spp. εμφανίζεται μεγαλύτερη συχνότητα διακλαδώσεων με τρία μόρια γλυκόζης ενωμένα με β-(1,6) γλυκοσιδικό δεσμό κάθε πέντε μόρια γλυκόζης της βασικής αλυσίδας (Fazenda *et al.*, 2008).

Οι μύκητες παράγουν πολυσακχαρίτες είτε από υγρές καλλιέργειες βυθού είτε από ζυμώσεις στερεής κατάστασης. Η σύσταση των παραγόμενων πολυσακχαριτών επηρεάζεται σημαντικά από τους εξής παράγοντες:

- τις συνθήκες που τελείται η ζύμωση
- τη σύσταση του μέσου καλλιέργειας (επηρεάζει σε μεγαλύτερο βαθμό)

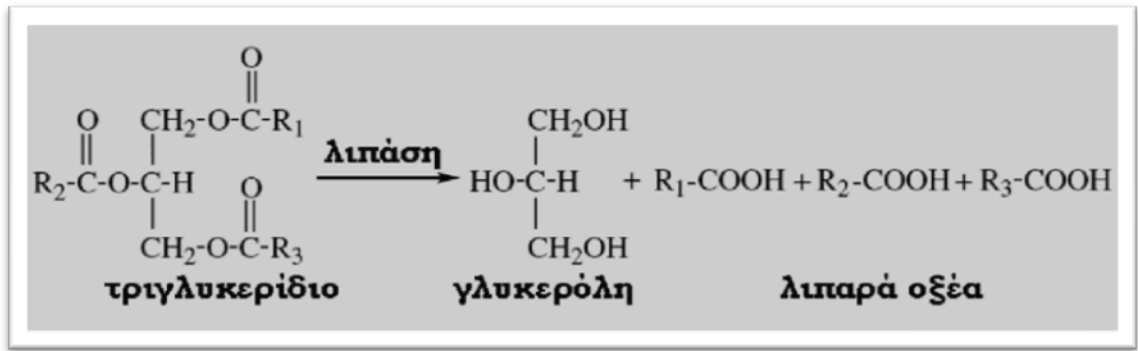
(Wu *et al.*, 2006).

Η γνώση των παραγόντων αυτών είναι απαραίτητη, έτσι ώστε να οδηγηθεί ο μεταβολισμός των μυκήτων προς την παραγωγή των επιθυμητών μεταβολιτών. Η παραγωγή των πολυσακχαριτών επηρεάζεται θετικά από πηγές άνθρακα όπως η γλυκόζη, αλλά και από διάφορες οργανικές πηγές αζώτου (π.χ. yeast extract, peptone, corn steep liquor) (Gern *et al.*, 2008; Tang and Zhong, 2002). Σημαντικό ρόλο παίζουν παράγοντες όπως η θερμοκρασία της ζύμωσης, το pH αλλά και ο αερισμός στη βιοσύνθεση των πολυσακχαριτών. Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι οι συνθήκες που ευνοούν την παραγωγή βιομάζας μπορεί να μην ευνοούν την συσσώρευση των πολυσακχαριτών (κυρίως των εξωπολυσακχαριτών) και αντιστρόφως (Diamantopoulou *et al.*, 2012a; 2012b; 2014; Tang and Zhong, 2002).

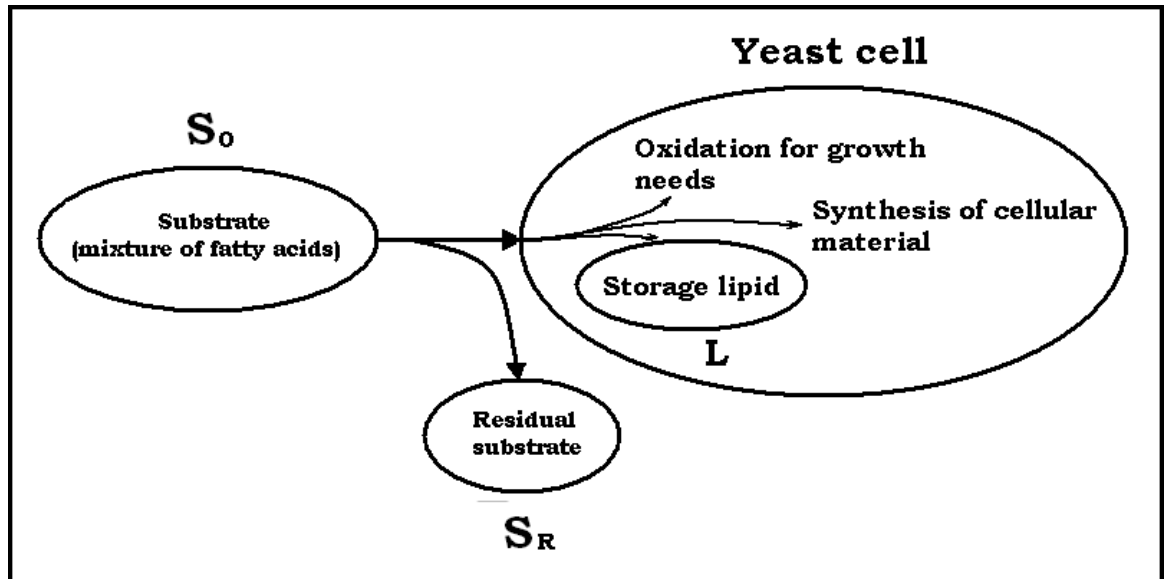
1.5.3. ΛΙΠΙΔΙΑ

Τα μικροβιακά λιπίδια (SCO “Single Cell Oils”) μπορούν να παραχθούν από ελαιογόνους μύκητες, ζύμες, βακτήρια και μικροφύκη (Liu *et al.*, 2013). Οι ελαιογόνοι μικροοργανισμοί έχουν την δυνατότητα να παράγουν SCOs πλούσια σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFAs-Polyunsaturated Fatty Acids) (Aggelis *et al.*, 1987; Ratledge, 1993, 2004; Leman, 1997; Athenaki *et al.* 2018; Papanikolaou and Aggelis 2019), ή τριγλυκερίδια (TAGs) σπάνιας δομής (Papanikolaou *et al.*, 2001). Οι ελαιογόνες ζύμες έχουν πολλά πλεονεκτήματα σε σχέση με άλλους μικροοργανισμούς, όσον αφορά την παραγωγή μικροβιακών λιπιδίων. Σε αντίθεση με τα μικροφύκη, η ζύμωση των ζυμών δεν επηρεάζεται σε από τις κλιματικές συνθήκες. Επίσης, οι ζύμες μπορούν να χρησιμοποιήσουν ως πηγή άνθρακα ποικίλα σάκχαρα από ότι τα ετερότροφα μικροφύκη. Σε σύγκριση με τους μύκητες, οι ζύμες εμφανίζουν μεγαλύτερη ανθεκτικότητα σε ιόντα μετάλλων αλλά και στην χαμηλή παροχή οξυγόνου. Τα κύτταρα των ζυμών μπορούν να συλλεχθούν λόγω του μεγάλου μεγέθους τους πιο εύκολα σε σχέση με τα κύτταρα των βακτηρίων (Santos and Reis, 2014; Shen *et al.*, 2013).

Πιο συγκεκριμένα, η *Yarrowia lipolytica* είναι μια ζύμη που αναπτύσσεται σε μια ποικιλία υδρόφοβων υποστρωμάτων και μπορεί να συσσωρεύσει λιπίδια ενδοκυτταρικά έως το 40% ή και περισσότερο (π.χ. 60% κ.β.) του ξηρού βάρους των κυττάρων της. (Papanikolaou *et al.*, 2007; Groenewald *et al.*, 2014). Μάλιστα, στελέχη της ανωτέρω ζύμης, δύνανται να τροποποιούν τη σύσταση της λιπαρής ύλης επί της οποίας αυξάνονται, ενώ και τα παραγόμενα ενδο-κυτταρικά λιπίδια (ο μηχανισμός παραγωγής τους είναι ο λεγόμενος *ex novo* μηχανισμός), δύναται να έχει ως απόρροια τα ενδο-κυτταρικά λιπίδια να έχουν αξιοσημείωτα διαφορετική σύσταση σε σχέση με το αρχικό λιπαρό υλικό. Οι διεργασίες οι οποίες χωρούν κατά την αύξηση στελεχών του είδους *Yarrowia lipolytica* σε λιπαρές πρώτες ύλες χρησιμοποιούμενες ως υλικά εκκίνησης έχουν ως εξής:



A) Υδρόλυση των λιπαρών υλών



B) Εκλεκτική αφομοίωση των παραγόμενων λιπαρών οξέων, ex novo σύνθεση λιπιδίων

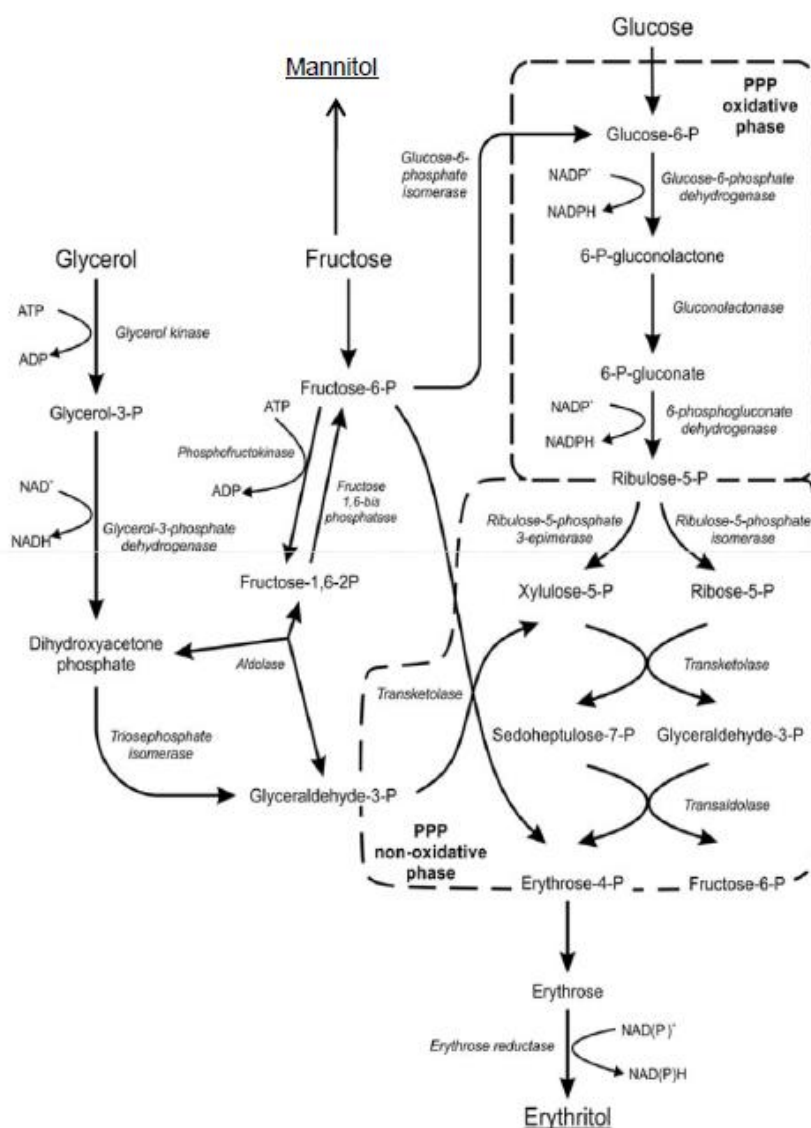
Σχήμα 1.4.: Η αποκοδόμηση λιπιδίων (Paranikolaou and Aggelis, 2010; 2011)

Οι κύριες βιολογικές λειτουργίες των λιπιδίων σχετίζονται με την αποθήκευση ενέργειας και τη λειτουργία ως δομικά συστατικά κυτταρικών μεμβρανών. Τα λιπίδια έχουν βιομηχανικές εφαρμογές στους τομείς των καλλυντικών, τροφίμων καθώς και στον τομέα της νανοτεχνολογίας (Maitland *et al.*, 1998)

1.6 ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΗ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΠΟΛΥΟΛΩΝ, ΕΝΔΟΠΟΛΥΣΑΚΧΑΡΙΤΩΝ ΚΑΙ ΛΙΠΙΔΙΩΝ

1.6.1. ΒΙΟΣΥΝΘΕΣΗ ΠΟΛΥΟΛΩΝ

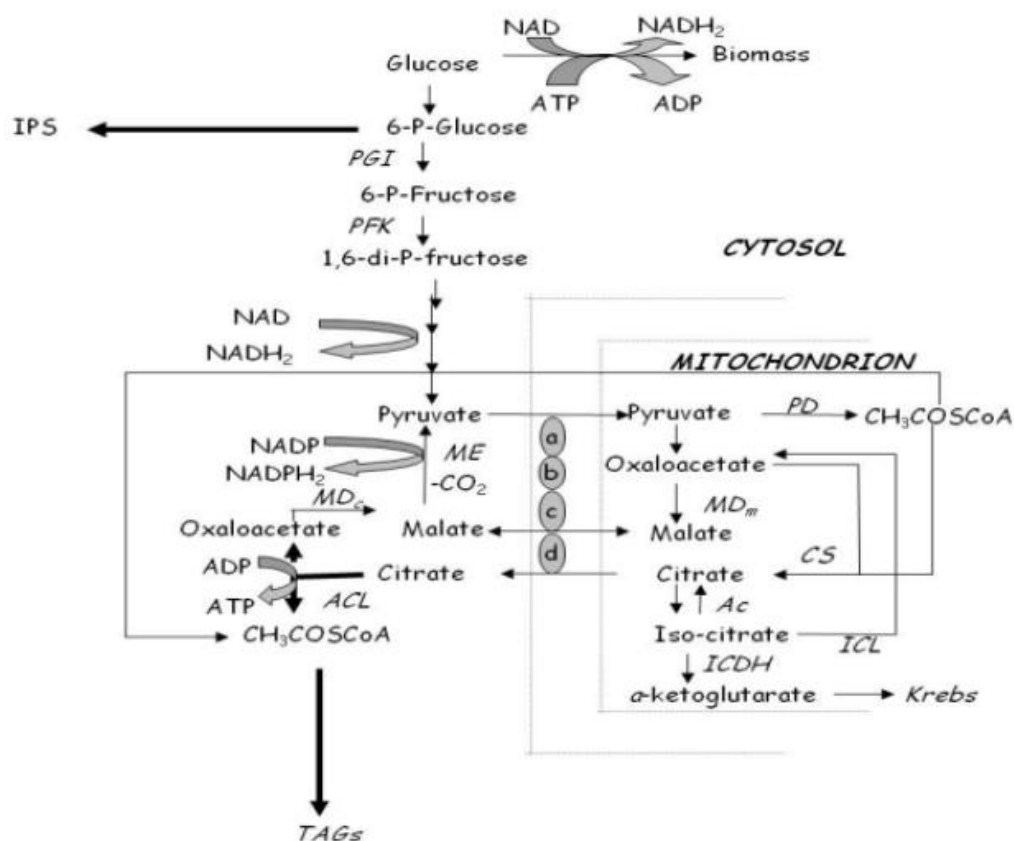
Τα τελευταία χρόνια η τεχνολογία μέγιστης αιχμής συνιστά την βιοτεχνολογική παραγωγή πολυολών δια της μικροβιακής οδού μέσω αξιοποίησης της γλυκερόλης. Παρ'όλα αυτά, η βιοχημική σύνθεση των οργανικών αυτών ουσιών δεν είναι απολύτως διευκρινισμένη. (Διαφάνειες μαθήματος «Αξιοποίηση ανανεώσιμων πρώτων υλών», 2017, Παπανικολάου). Υποθετικά σενάρια σύνθεσης των πολυολών στις ζύμες παρουσιάζονται στο παρακάτω σχήμα.



Σχήμα 1.5: Υποθετικά σενάρια σύνθεσης πολυολών στις ζύμες (Πηγή: Διαφάνειες μαθήματος «Αξιοποίηση ανανεώσιμων πρώτων υλών», 2017, Παπανικολάου)

1.6.2. ΒΙΟΣΥΝΘΕΣΗ ΕΝΔΟΠΟΛΥΣΑΧΚΑΡΙΤΩΝ

Βιβλιογραφικά αποδεικνύεται ότι η εξάντληση του αζώτου στο μέσο ευνοεί τη διαδικασία συσσώρευσης των ενδοπολυσακχαριτών. Να αναφερθεί ότι ο μηχανισμός είναι παρόμοιος με αυτόν της συσσώρευσης αποθήκευσης των λιπιδίων που θα αναλυθεί παρακάτω. Βιβλιογραφικά, υποστηρίζεται σε πολλές αναφορές πως η εξάντληση του αζώτου στο μέσο της καλλιέργειας, ευνοεί την βιοσυσσώρευση των ενδοπολυσακχαριτών λόγω της υποχρεωτικής διάσπασης του AMP, ώστε να εξασφαλιστούν από τα κύτταρα οι απαιτήσεις τους σε άζωτο. Το ένζυμο 6-φωσφοροφρουκτοκινάση (6 PFK) ενεργοποιείται αλλοστερικά από το κυτταρικό AMP και έτσι η ελάττωση της συγκέντρωσης του AMP αναστέλλει τη δράση της 6 PFK (Galiotou-Panayotou *et al.*, 1998; Ratledge and Wynn, 2002; Papanikolaou and Aggelis, 2011a). Η κατάσταση αυτή μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα την συσσώρευση των ενδοπολυσακχαριτών. Το υποθετικό σενάριο της βιοσυσσώρευσης των ενδοκυτταρικών πολυσακχαριτών και λιπιδίων απεικονίζεται στο Σχήμα 1.6.



Σχήμα 1.6: Βιοσυσσώρευση ενδοπολυσακχαριτών και λιπιδίων. (Πηγή: Papanikolaou and Aggelis, 2009)

1.6.2. ΒΙΟΣΥΝΘΕΣΗ ΛΙΠΙΔΙΩΝ

Οι ελαιογόνοι μικροοργανισμοί έχουν την ικανότητα να συσσωρεύουν λιπίδια σε περισσότερο από 20% β / β, στην ξηρή κυτταρική τους μάζα) ως πηγές ελαίων και λιπών (τα λεγόμενα single cell oils, SCOs), παρουσιάζουν μεγάλο βιομηχανικό ενδιαφέρον. Επομένως, η αναγνώριση μικροοργανισμών ικανών να παράγουν σε αυξημένες ποσότητες λιπίδια με δομή και σύνθεση παρόμοια με εκείνη των λιπών υψηλής αξίας και μετέπειτα μεγάλης κλίμακας παραγωγή μπορεί να παρουσιάσει ένα τεράστιο οικονομικό ενδιαφέρον. (Papanikolaou and Aggelis, 2011). Ορισμένα είδη ζυμών δεν είναι ικανά να συσσωρεύσουν περισσότερο από 10% κατά βάρος έλαιο στην κυτταρική τους μάζα, όπως συμβαίνει για παράδειγμα στους *Saccharomyces cerevisiae* και *Candida utilis* (Ratledge, 2004).

Όταν καλλιεργηθούν σε θρεπτικά μέσα στα οποία υπάρχει περίσσεια πηγή άνθρακα και περιοριστικές σε άζωτο συνθήκες, εξαντλούν πρώτα την πηγή αζώτου και στη συνέχεια αφομοιώνουν την πηγή άνθρακα. Όταν υπάρξει έλλειψη του αζώτου σταματά η κυτταρική αύξηση, καθώς αυτό είναι απαραίτητο για την παραγωγή πρωτεϊνών, που παίζουν σημαντικό ρόλο στην δημιουργία νέων κυττάρων. Έτσι η επιπλέον πηγή άνθρακα που καταναλώνει ο μικροοργανισμός πλέον δεν χρησιμοποιείται για την κυτταρική ανάπτυξη, αλλά διοχετεύεται προς την συσσώρευση λίπους μέσω της κυτταρικής αναπνοής. Η κυτταρική αναπνοή είναι μια διαδικασία μετατροπής της τροφής σε ενέργεια που συμβαίνει σε όλους τους ζωντανούς οργανισμούς. Η συσσώρευση του ενδοκυτταρικού λίπους συνεχίζεται μέχρι ενός γενετικά προκαθορισμένου ορίου για κάθε μικροοργανισμό (Ratledge and Wynn, 2006) και διαρκεί έως ότου εξαντληθεί η πηγή 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 μπορούν συσσωρεύουν λίπος σε ποσοστό πάνω από 10% β / β στην ξηρή κυτταρική τους μάζα. Σε αντίθεση με τους ελαιογόνους μικροοργανισμούς, οι μη ελαιογόνοι 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). Σε ορισμένα είδη ζυμών η συσσώρευση του ελαίου στη βιομάζα ξεπερνά το 70%, όπως για παράδειγμα στους μικροοργανισμούς *Rhodotorula* και *Lipomyces* (Ratledge, 2004).

Η βιοσύνθεση λιπιδίων στις ζύμες γίνεται με δύο τρόπους, ανάλογα με το υπόστρωμα: *de novo* και *ex novo*.

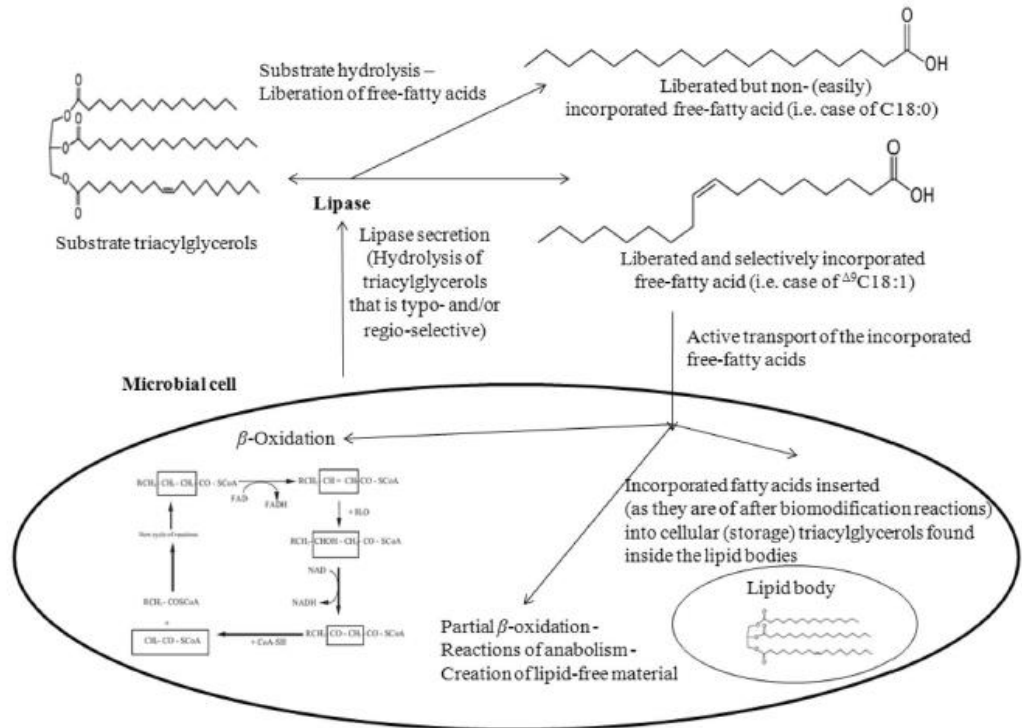
- Στη *de novo* βιοσύνθεση χρησιμοποιούνται ως υποστρώματα η γλυκόζη ή παρομοίως μεταβολιζόμενα υλικά ως πηγή άνθρακα.
- Στην *ex novo* βιοσύνθεση χρησιμοποιούνται υδροφοβικά υποστρώματα όπως τα φυτικά έλαια, τα βιομηχανικά λίπη, τα ελεύθερα λιπαρά οξέα, εστέρες των λιπαρών οξέων κ.α. ως μοναδική πηγή άνθρακα.
- Στην πρώτη περίπτωση, αν παράλληλα επικρατούν περιοριστικές συνθήκες αζώτου, μετά την εξάντληση του αζώτου, η αύξηση του μικροοργανισμού περιορίζεται, καθώς το άζωτο αποτελεί δομικό συστατικό των πρωτεϊνών και των νουκλετιδίων, ενώ η περίσσεια του άνθρακα συνεχίζει να αφομοιώνεται από τα κύτταρα του μικροοργανισμού και μετατρέπεται μέσα στην κυτταρική του μάζα σε τριγλυκερίδια.

Στην πρώτη περίπτωση, αν παράλληλα επικρατούν περιοριστικές συνθήκες αζώτου, μετά την εξάντληση του αζώτου, η αύξηση του μικροοργανισμού περιορίζεται, καθώς το άζωτο αποτελεί δομικό συστατικό των πρωτεϊνών και των νουκλετιδίων, ενώ η περίσσεια του άνθρακα συνεχίζει να αφομοιώνεται από τα κύτταρα του μικροοργανισμού και μετατρέπεται μέσα στην κυτταρική του μάζα σε τριγλυκερίδια.

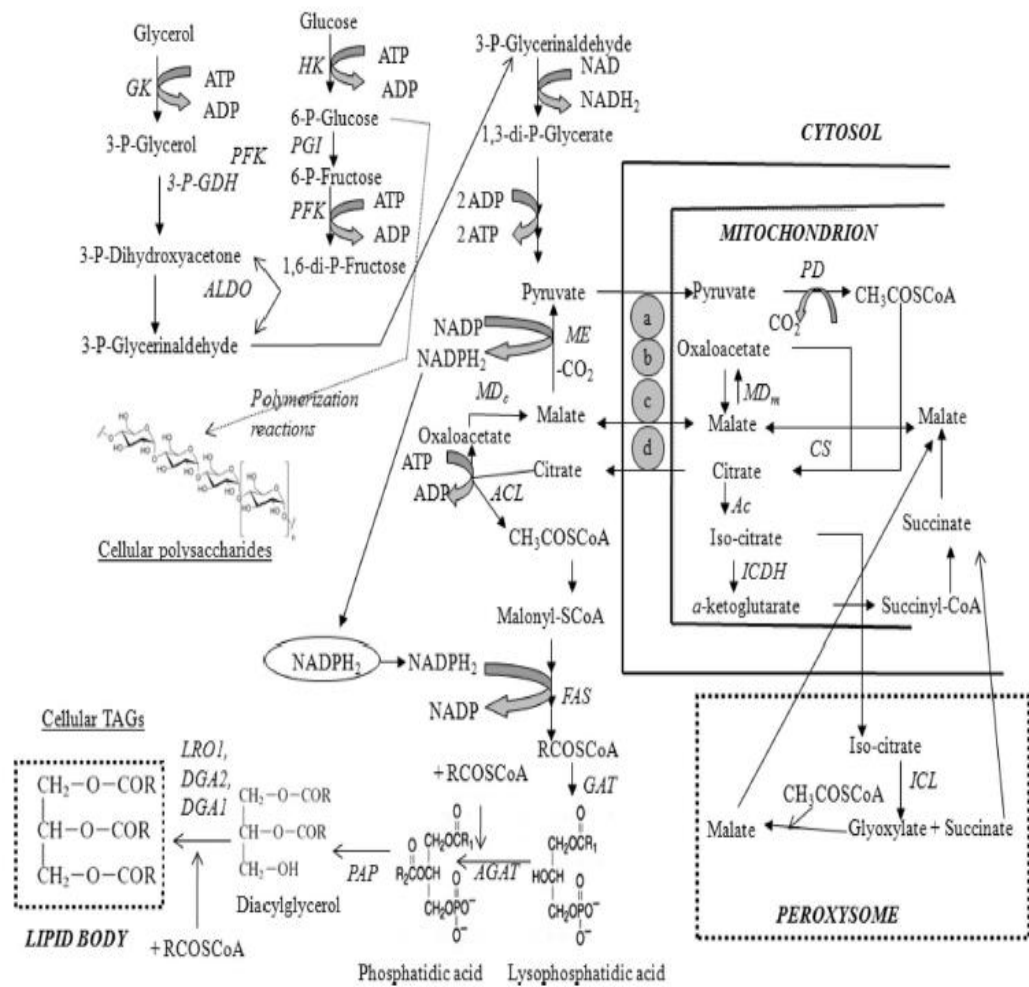
Στην δεύτερη περίπτωση, η συσσώρευση των λιπιδίων είναι ανεξάρτητη από την εξάντληση της πηγής αζώτου στο μέσο ανάπτυξης του μικροοργανισμού. Μάλιστα, η συσσώρευση των λιπιδίων πραγματοποιείται ταυτόχρονα με τη σύνθεση της βιομάζας του μικροοργανισμού ελεύθερης ελαίου. (Papanikolaou and Aggelis, 2011a; Ratledge, 2004). Είναι σημαντικό να σημειωθεί, ότι *de novo* βιοσύνθεση συσσώρευσης λιπιδίων δεν πραγματοποιείται στους μη ελαιογόνους μικροοργανισμούς. Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, όταν καλλιεργούνται οι τελευταίοι σε θρεπτικό υπόστρωμα με περιοριστικές συνθήκες αζώτου, τείνουν να περιορίζουν τον περαιτέρω κυτταρικό πολλαπλασιασμό ή αν συνεχίζουν, αφομοιώνουν την περίσσεια του άνθρακα κ τον μετατρέπουν μέσα στην κυτταρική

τους μάζα σε διάφορες μορφές πολυσακχαριτών. (Philippoussis and Diamantopoulou, 2012).

Συγκεκριαίωτικά, η *ex novo* και η *de novo* σύνθεση λιπιδίων παρουσιάζεται στο πιο κάτω σχήμα:



Σχήμα 1.7: Μηχανισμοί εμπλεκόμενοι στην αποικοδόμηση λιπιδίων και την *ex novo* συρρόρευση μικροβιακών ελαίων (Πηγή: Papanikolaou and Aggelis, 2019)



Σχήμα 1.8: Μηχανισμοί εμπλεκόμενοι στην αποικοδόμηση γλυκόζης/γλυκερόλης και τη *de novo* συρρώρευση μικροβιακών ελαίων (Πηγή: Papanikolaou and Aggelis, 2019).

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Κατά την έναρξη κάθε νέου πείραματος ακολουθούνται οι εξής διαδικασίες:

- Ανανέωση του μικροοργανισμού που πρόκειται να χρησιμοποιηθεί στο εκάστοτε πείραμα και διατήρησή του
- Παρασκευή προκαλλιέργειας και εμβολιασμός της
- Παρασκευή κύριας καλλιέργειας και εμβολιασμός της
- Χημικές Αναλύσεις

2.1 ΒΙΟΛΟΓΙΚΟ ΥΛΙΚΟ

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν στελέχη της ζύμης *Yarrowia lipolytica*, τα οποία απομονώθηκαν, αναγνωρίστηκαν και ταυτοποιήθηκαν στο Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών (Tryfinopoulou *et al.*, 2002; Filippoussi *et al.*, 2019). Τα δύο στελέχη που έλαβαν μέρος στα πειράματα ήταν το FMCC Y74 και το FMCC Y75.

Τα παραπάνω στελέχη ανανεώνονταν σε σωλήνες (slants) κεκλιμένα πεπληρωμένους με στερεό θρεπτικό μέσο που αποτελούταν από 10 g L⁻¹ glucose, 10 g L⁻¹ peptone, 10 g L⁻¹ yeast extract και 20 g L⁻¹ agar και η επώαση τους πραγματοποιούνταν σε θερμοκρασία 30 °C για 3ημέρες, σε επωαστή τύπου memmert. Ύστερα από την επώαση τους φυλάσσονταν και διατηρούνταν σε θερμοκρασία 4 °C.

Οι ανανεώσεις πραγματοποιούνταν σε τακτά χρονικά διαστήματα για τη διατήρηση της ζωτικότητάς των στελεχών. Πριν από κάθε εμβολιασμό του θρεπτικού μέσου κάθε προκαλλιέργειας τα στελέχη ανανεώνονταν, προκειμένου να βρίσκονται στην ίδια επιθυμητή φάση αύξησης, την εκθετική.



Εικόνα 2.1: Επωαστής τύπου Memmert

2.2 ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ

2.2.1. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΠΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ

Ύστερα από την ανανέωση και επώαση του μικροοργανισμού, παρασκευαζόταν υγρή προκαλλιέργεια. Η προκαλλιέργεια αποτελείτο από υγρό θρεπτικό υπόστρωμα αποτελούμενο από Yeast, πεπτόνη και γλυκόζη, σε κωνικές φιάλες Erlenmeyer χωρητικότητας 250 mL, πληρωμένες κατά το 1/5 του όγκου τους (50 ± 1 ml). Στα στόμια των κωνικών φιαλών τοποθετούνταν ανυδρόφιλο βαμβάκι και αλουμινόχαρτο, ώστε να μπορούν να αποστειρωθούν. Η αποστείρωση λάμβανε χώρα στους $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ για 20 min. Ακολουθούσε ο εμβολιασμός της προκαλλιέργειας υπό ασηπτικές συνθήκες, με κύτταρα ζυμών, τα οποία βρίσκονταν στην εκθετική φάση, από τα ανανεωμένα slants. Οι εμβολιασμένες φιάλες τοποθετήθηκαν σε ανακινούμενο επωαστικό θάλαμο (New BrunswickSc, USA), προς επώαση σε σταθερές συνθήκες ανάδευσης, στις 180 ± 5 rpm και θερμοκρασία στους $29\pm 1^{\circ}\text{C}$ για 24 ώρες. Μετά το πέρας 24 ωρών, 1 mL της εκθετικά ευρισκόμενης προκαλλιέργειας, η οποία αποτελεί το εμβόλιο της ζύμης χρησιμοποιείται για τον εμβολιασμό του θρεπτικού μέσου της κύριας καλλιέργειας.

2.2.2. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΚΥΡΙΑΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ

Όλες οι κυρίως καλλιέργειες που πραγματοποιήθηκαν ήταν σε ζυμώσεις εντός κωνικών φιαλών των 250 mL, πληρωμένες κατά το 1/5 τους ($50 \pm 1\text{mL}$) με θρεπτικό μέσο. Για τη διεξαγωγή των πειραμάτων, χρησιμοποιήθηκε στα θρεπτικά υποστρώματα γλυκερόλη καθαρότητας 88%, ως μοναδική πηγή άνθρακα.

Για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών, απαραίτητα στοιχεία αποτελούν ο άνθρακας, το άζωτο, το οξυγόνο και ένας σημαντικός αριθμός αλάτων.

- Πηγή άνθρακα αποτέλεσε η γλυκερόλη στις εξής συγκεντρώσεις:
 40 g L^{-1} , 80 g L^{-1} , 130 g L^{-1} , 170 g L^{-1}
- Πηγή αζώτου αποτέλεσαν:
η πεπτόνη (peptone) 2 g L^{-1} και
το εκχύλισμα ζύμης (yeast extract) 1 g L^{-1}
ώστε να δημιουργηθούν περιοριστικές σε άζωτο συνθήκες (nitrogen limited) οι οποίες επάγουν τη σύνθεση λιπιδίων και λοιπών δευτερογενών μεταβολιτών (π.χ. κιτρικό οξύ, πολυόλες, κοκ) κατά την αύξηση του μικροοργανισμού *Yarrowia lipolytica* σε υποστρώματα τύπου «γλυκερόλης» (Athenaki *et al.*, 2018; Papanikolaou and Aggelis 2019).
- Τα μεταλλικά άλατα που προστέθηκαν στο θρεπτικό μέσο της κύριας καλλιέργειας:

Πίνακας 2.2: Σύσταση μεταλλικών αλάτων (Papanikolaou *et al.*, 2001)

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

- Για να προκληθεί εξωτερική οσμωτική πίεση στα κύτταρα του μικροοργανισμού έγινε προσθήκη χλωριούχου νατρίου NaCl στις εξής συγκεντρώσεις:
10 g L⁻¹, 30 g L⁻¹, 50 g L⁻¹, 80 g L⁻¹

2.2.3. ΑΝΑΛΥΣΗ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΩΝ ΣΤΑΔΙΩΝ

Στόχος αυτής της μελέτης ήταν να εξεταστεί η ικανότητα ,των στελεχών της ζύμης *Yarrowia lipolytica*, να παράγουν πολυόλες (μαννιτόλη, ερυθριτόλη και αραβιτόλη), από ακάθαρτη γλυκερόλη, τόσο παρουσία όσο και απουσία χλωριούχου νατρίου.

Για την επίτευξη του στόχου η μελέτη χωρίστηκε σε τρία πειραματικά στάδια. Σε όλα τα στάδια χρησιμοποιήθηκε ως υπόστρωμα γλυκερόλη καθαρότητας 88% , σε σταθερές συνθήκες ανάδευσης (180±5 rpm), θερμοκρασίας (29±1°C) και τιμής pH (6.0). Επίσης, σε όλα τα πειράματα μελετήθηκαν συγκριτικά τα δύο στελέχη ζυμών του γένους *Yarrowia lipolytica* FMCC Y74 και FMCC Y75. Όλες οι υγρές καλλιέργειες πραγματοποιήθηκαν σε περιοριστικές σε άζωτο συνθήκες (nitrogen-limited), μέσα σε κωνικές φιάλες Erlenmeyer χωρητικότητας 250 mL. Η κάθε ζύμωση διήρκεσε διαφορετικές ώρες ανάλογα με τις εκάστοτε συνθήκες.

Να σημειωθεί ότι πριν από κάθε μέτρηση και κάθε εμβολιασμό προκαλλιέργειας ή κύριας καλλιέργειας, η καθαρότητα της εκάστοτε καλλιέργειας (ή slant) από μολύνσεις εξακριβώθηκε με παρατήρηση δείγματος στο μικροσκόπιο.

2.2.3.1. ΠΡΩΤΟ ΣΤΑΔΙΟ (ΑΠΟΥΣΙΑ NaCl)

Στο πρώτο πειραματικό στάδιο εξετάστηκαν οι μικροοργανισμοί σε υπόστρωμα βιομηχανικής γλυκερόλης, σε συγκεντρώσεις 40 g L⁻¹, 80 g L⁻¹, 130 g L⁻¹ και 170 g L⁻¹. Το pH ήταν σταθερό στο 6.0 και διορθωνόταν όταν ήταν αναγκαίο.

2.2.3.2. ΔΕΥΤΕΡΟ ΣΤΑΔΙΟ (ΠΑΡΟΥΣΙΑ NaCl)

Ομοίως, στο δεύτερο πειραματικό στάδιο εξετάστηκαν οι μικροοργανισμοί σε υπόστρωμα γλυκερόλης, αυτή τη φορά σε σταθερή συγκέντρωση 40 g L^{-1} , με τη διαφορά ότι σε κάθε ζύμωση άλλαζε η συγκέντρωση της προσθήκης του χλωριούχου νατρίου. Οι συγκεντρώσεις NaCl ήταν οι εξής: 10 g L^{-1} , 30 g L^{-1} , 50 g L^{-1} και 80 g L^{-1} . Το pH ήταν σταθερό στο 6.0 και διορθωνόταν όταν ήταν αναγκαίο.

2.2.3.3. ΤΡΙΤΟ ΣΤΑΔΙΟ (FED-BATCH)

Τέλος, στο τρίτο στάδιο των πειραμάτων, σε αντίθεση με τα δύο προηγούμενα στάδια, οι ζυμώσεις που πραγματοποιήθηκαν δεν ήταν κλειστού τύπου (batch), αλλά ημισυνεχούς τύπου (fed-batch). Τα πειράματα έγιναν απουσία χλωριούχου νατρίου σε αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης 50 g L^{-1} . Πρίν τη λήξη της ζύμωσης πραγματοποιήθηκε εξωτερική τροφοδοσία με αποστειρωμένο πυκνό διάλυμα γλυκερόλης. Μετά την τροφοδοσία, η συγκέντρωση γλυκερόλης βρέθηκε να είναι στα $51,5 \text{ g L}^{-1}$ για το στέλεχος FMCC Y74 και $48,5 \text{ g L}^{-1}$ για το στέλεχος FMCC Y75. Το pH ήταν σταθερό στο 6.0 και διορθωνόταν όταν ήταν αναγκαίο.



Εικόνα 2.2: Μικροσκόπιο τύπου Motic

2.3 ΧΗΜΙΚΕΣ ΑΝΑΛΥΣΕΙΣ

2.3.1. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΡΗ

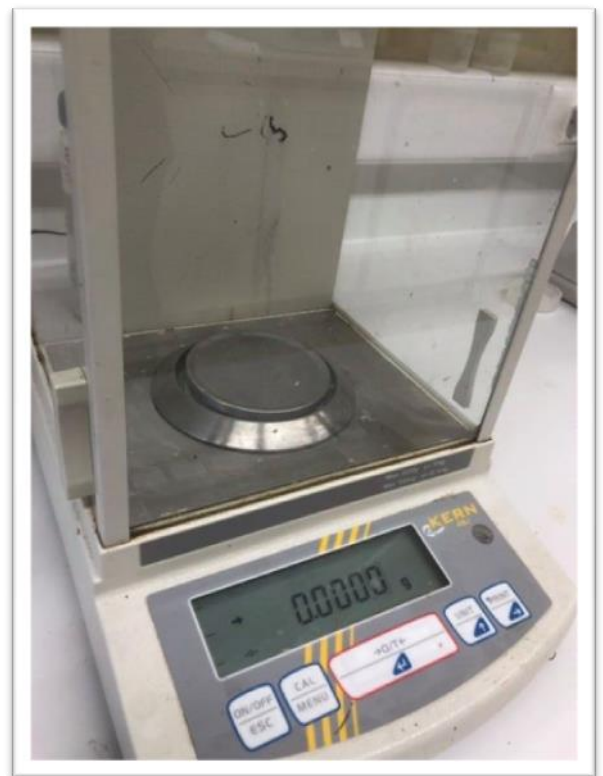
Το pH της καλλιέργειας μετρήθηκε με pH-μετρο τύπου Hanna Instruments HI 2211 pH/ORP Meter. Το pH ήταν επιθυμητό να κυμαίνεται σε εύρος τιμών 6.0 ± 0.3 . Μετά τη μέτρηση κάθε σημείου της κινητικής, πραγματοποιείτο διόρθωση του pH του θρεπτικού μέσου της καλλιέργειας στις υπόλοιπες φιάλες, όποτε κρινόταν απαραίτητο. Η διόρθωση του pH γίνονταν υπό ασηπτικές συνθήκες με διάλυμα καυστικού νατρίου (NaOH) 5M. (Sarris *et al.*, 2011).



Εικόνα 2.3: pH-μετρο τύπου Hanna instruments HI 2211 PH/ORP Meter

2.3.2. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΒΙΟΜΑΖΑΣ

Αρχικά, το δείγμα του σημείου της κινητικής τοποθετείται σε falcon tubes και φυγοκεντρείται σε φυγόκεντρο τύπου Heraeus Sepatech Suprafuge 320 στις 9000 rpm για 10 min στους 4°C. Το υπερκείμενο της πρώτης φυγοκέντρησης συλλέγεται σε Eppendorf, για αναλύσεις που θα αναφερθούν παρακάτω. Ύστερα από έκπλυση των κυττάρων με απιονισμένο νερό ακολουθούσε δεύτερη και τρίτη φυγοκέντρηση κάτω από τις ίδιες συνθήκες. Στη συνέχεια, η βιομάζα απαλλαγμένη από θρεπτικό μέσο μεταφέρονταν σε προζυγισμένα φιαλίδια McCartney και τοποθετούνταν στον φούρνο, τύπου Gallenkamp oven BS OV-160, προς ξήρανση. Τέλος, το ξηρό υπόλειμμα ζυγίστηκε σε ζυγό ακριβείας τύπου KERN EW 420-3NM, με ακρίβεια 4 δεκαδικών ψηφίων. Ο προσδιορισμός της παραγόμενης βιομάζας υπολογίστηκε από τη διαφορά βάρους και εκφράστηκε σε $g L^{-1}$.



Εικόνα 2.4: (Αριστερά) Φυγόκεντρος τύπου Heraeus Sepatech Suprafuge 320

Εικόνα 2.5: (Δεξιά) Ζυγός τύπου KERN EW 420-3NM

2.3.3. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΝΔΟΠΟΛΥΣΑΚΧΑΡΙΤΩΝ (IPS)

Στις καλλιέργειες των πειραμάτων που διενεργήθηκαν, έγινε ποσοτικός προσδιορισμός ενδοπολυσακχαριτών (IPS, Intracellular polysaccharides), με την φασματοφωτομετρική μέθοδο του 3,5-δινιτροσαλικυλικού οξέος (DNS) (Miller, 1959). Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης των ενδοπολυσακχαριτών (IPS) έγινε σύμφωνα με το πρωτόκολλο των Liang *et al* (2009).

Πιο συγκεκριμένα, ποσότητα ξηρής βιομάζας 0.05 g , η οποία ζυγίστηκε σε ζυγό ακριβείας, τοποθετήθηκε σε δοκιμαστικούς σωλήνες για κάθε σημείο της κινητικής. Σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα προστέθηκαν 10 mL υδροχλωρικού οξέος (HCl 2M) και ακολούθουσε υδρόλυση στους 80°C για 30 λεπτά. Στην συνέχεια, πραγματοποιείτο προσθήκη 10 mL καυστικού νατρίου (NaOH, 2M), και διήθηση με διπλό διηθητικό χαρτί, ώστε το διήθημα που προκύπτει να είναι διαυγές. Ακολουθούσε προσθήκη 0,5 ml διηθημένου δείγματος και 0,5 ml αντιδραστηρίου DNS σε δοκιμαστικούς σωλήνες και ανάδευση σε vortex. Ύστερα, τοποθετούνταν σε υδατόλουτρο στους 100 °C για 5 λεπτά ακριβώς. Έπειτα, οι δοκιμαστικοί σωλήνες αφήνονται να κρυώσουν. Γίνεται προσθήκη 5 ml απιονισμένου νερού και μετά από ανάδευση του διαλύματος ακολουθεί μέτρηση της απορρόφησης στα 540 nm σε φασματοφωτόμετρο τύπου Hitachi U-2000 Spectrophotometer. Η συγκέντρωση του κάθε δείγματος υπολογίστηκε από πρότυπη καμπύλη αναφοράς και εκφράστηκε σε ισοδύναμα γλυκόζης (g L^{-1}).

2.3.4. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΝΔΟΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΛΙΠΟΥΣ

Για την εκχύλιση και τον ποσοτικό προσδιορισμό της παραγωγής ενδοκυτταρικού λίπους από τη ζύμη, ακολουθήθηκαν τα εξής πειραματικά βήματα:

- Στο φιαλίδιο McCartney με τη ξηρή βιομάζα, προσθέτονταν μια ποσότητα από ένα μίγμα διαλυτών χλωροφορμίου/ μεθανόλης $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ σε αναλογία 2:1 (Folch *et al*, 1957; Papanikolaou *et al*, 2001). Ακολουθούσε παραμονή των γεμάτων φιαλιδίων στο σκοτάδι, για τουλάχιστον 72 ώρες ,αεροστεγώς κλεισμένων για την αποφυγή οξείδωσης των λιπαρών οξέων του λίπους με στόχο την εκχύλιση του μικροβιακού λίπους.

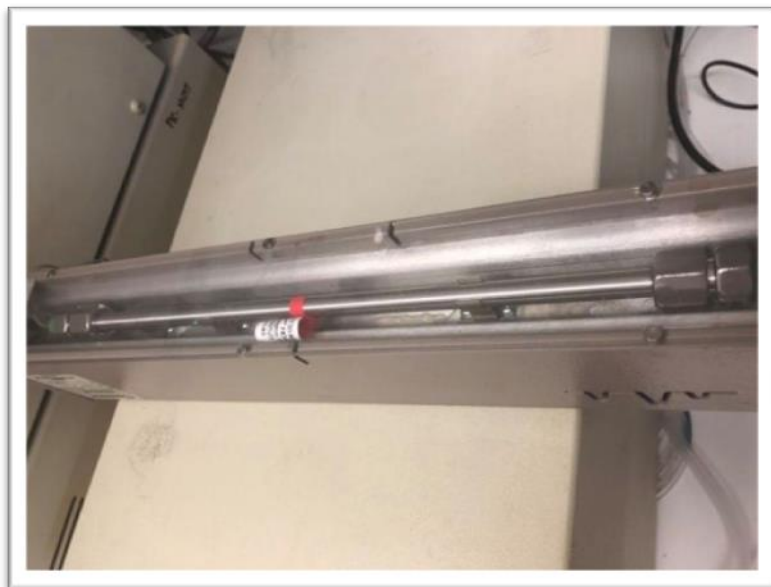
- Μετά το πέρας των 72 ωρών, ακολουθούσε διήθηση του περιεχόμενου του φιαλιδίου, με απλό διηθητικό χαρτί, σε προζυγισμένη σφαιρική φιάλη εξάτμισης.
- Με την βοήθεια περιστροφικού εξατμιστήρα τύπου Flash Evaporator-Rotavapor R-114, πραγματοποιείτο εξάτμιση υπό κενό του διηθήματος στους 50-55 °C, ώστε να παραμείνει στην σφαιρική φιάλη μόνο το μικροβιακό λίπος.
- Μετά την εξάτμιση ζυγίστηκαν οι φιάλες ,που περιείχαν αυτή τη φορά μόνο ενδοκυτταρικό λίπος, σε ζυγό ακριβείας Ο προσδιορισμός του παραγόμενου μικροβιακού λίπους υπολογίστηκε από τη διαφορά βάρους και εκφράστηκε σε $g L^{-1}$ ή σε $g g^{-1}$ ξηρής βιομάζας.



Εικόνα 2.6: Περιστροφικός εξατμιστήρας τύπου Flash Evaporator- Rotavapor R -114

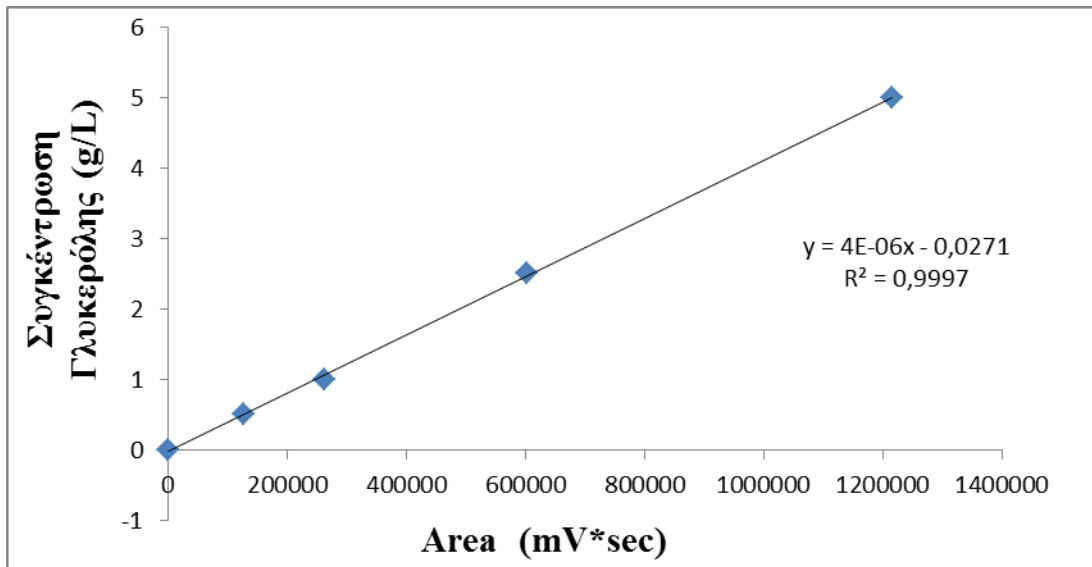
2.3.5. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΠΟΛΥΟΛΩΝ ΚΑΙ ΓΛΥΚΕΡΟΛΗΣ

Ο προσδιορισμός των συγκεντρώσεων των παραγόμενων πολυολών (μαννιτόλη, αραβιτόλη, ερυθριτόλη) και της καταναλωθείσας γλυκερόλης έγινε με την χρήση της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (H.P.L.C., High Pressure Liquid Chromatography). Μέσω ανιχνευτή διαφορικού διαθλασίμετρου (RI Waters 410) πραγματοποιήθηκε η ανίχνευση. Η ταυτοποίηση της κάθε ουσίας βασίστηκε στον χρόνο κατακράτησης, ο οποίος συγκρίθηκε με γνωστά δείγματα. Ως κινητή φάση χρησιμοποιήθηκε υδατικό διάλυμα H_2SO_4 (0.005 M) και η ροή της ρυθμίστηκε στα 0.5 mL min^{-1} . Η στήλη με την οποία έγινε ο διαχωρισμός του μίγματος ήταν τύπου phenomenex TS-130 και θερμοκρασίας 60°C . Από τη στήλη περνούσαν μL δείγματος και η διάρκεια της ανάλυσης ήταν 31 min.



Εικόνα 2.7: Στήλη τύπου phenomenex TS-130

Ενδεικτικά εμφανίζεται η γραμμή αναφοράς της γλυκερόλης (Γράφημα 2.1)



Γράφημα 2.1: Πρότυπη καμπύλη προσδιορισμού γλυκερόλης

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Το κόστος της πηγής άνθρακα που χρησιμοποιείται σε μικροβιακές καλλιέργειες επηρεάζει σημαντικά το κόστος και την απόδοση των παραγόμενων προϊόντων.

Η γλυκερόλη που προέρχεται ως παραπροϊόν παραγωγής βιοντίζελ, αποτελεί διαθέσιμη πηγή άνθρακα μηδενικής ή ελάχιστης αξίας. Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι η σύνθεση της γλυκερόλης μπορεί να διαφέρει αρκετά και να έχει θετικές είτε αρνητικές συνέπειες στην μικροβιακή αύξηση και στον σχηματισμό προϊόντων.

Σε αυτό το κεφάλαιο εξετάζονται οι παραγόμενες ποσότητες σε βιομάζα, μεταβολικά προϊόντα, ενδοπολυσακχαρίτες καθώς και οι αποδόσεις προς το καταναλωθέν υπόστρωμα.

Κατά τη διάρκεια της κινητικής των καλλιεργειών μελετήθηκαν τα δεδομένα της μικροβιακής αύξησης:

- Η παραγωγή βιομάζας.
- Η καταναλισκόμενη πηγή άνθρακα (γλυκερόλη).
- Η παραγωγή πολυολών (μαννιτόλη, ερυθριτόλη, αραβιτόλη).
- Η παραγωγή ενδοπολυσακχαριτών (IPS).
- Η παραγωγή μικροβιακού λίπους.

Τα δεδομένα που μετρήθηκαν, χρησιμοποιήθηκαν για τον υπολογισμό των εξής παραμέτρων της μικροβιακής αύξησης:

- Συντελεστής απόδοσης της παραχθείσας βιομάζας ($Y_{X/S}$) ως προς το καταναλωθέν υπόστρωμα.
- Συντελεστής απόδοσης της παραγόμενης μαννιτόλης ($Y_{M/S}$) ως προς το καταναλωθέν υπόστρωμα.
- Συντελεστής απόδοσης των συνολικών παραγόμενων πολυολών ($Y_{SP/S}$) ως προς το καταναλωθέν υπόστρωμα.
- Οι παραγόμενοι ενδοπολυσακχαρίτες ($Y_{IPS/X}$) ως προς την παραχθείσα βιομάζα.
- Το παραγόμενο μικροβιακό λίπος ($Y_{L/X}$) ως προς την παραχθείσα βιομάζα.

Όλα τα σημεία τα οποία θα παρουσιαστούν είναι αποτέλεσμα μέσου όρου δύο μετρήσεων.

Στο πρώτο στάδιο εξετάστηκαν τα δυο στελέχη σε υγρές καλλιέργειες ασυνεχούς τύπου με υπόστρωμα βιομηχανικής γλυκερόλης, απουσία NaCl. Πιο συγκεκριμένα οι συγκεντρώσεις για την πηγή άνθρακα που επιλέχθηκαν ήταν οι εξής:

- 1) 40 g L⁻¹ γλυκερόλης
- 2) 80 g L⁻¹ γλυκερόλης
- 3) 130 g L⁻¹ γλυκερόλης
- 4) 170 g L⁻¹ γλυκερόλης

σε σταθερή θερμοκρασία 29 °C και αρχική τιμή pH 6.0.

Αξιολογήθηκαν ως προς την ικανότητα τους να καταναλώνουν την γλυκερόλη και να την μετατρέπουν σε βιομάζα, ενδοπολυσακχαρίτες και δευτερογενείς μεταβολίτες.

Η μέγιστη συγκέντρωση της βιομάζας 18.93 g L⁻¹, παρατηρήθηκε στο στέλεχος *Yarrowia lipolytica* FMCC Y75 σε υγρές καλλιέργειες με αρχική συγκέντρωση βιομηχανικής γλυκερόλης 170 g L⁻¹ και σε pH 6.0 στις 480 ώρες καλλιέργειας.

Η μέγιστη συγκέντρωση ενδοπολυσακχαριτών 4.3 g L⁻¹, παρατηρήθηκε από το στέλεχος FMCC Y74 σε κλειστές καλλιέργειες αρχικής συγκέντρωσης υποστρώματος 40 g L⁻¹ και σε pH 6.0 στις 48 ώρες καλλιέργειας.

Επίσης, στην παραγωγή πολυολών παρατηρήθηκε μέγιστη παραγωγή σε κλειστές καλλιέργειες αρχικής συγκέντρωσης υποστρώματος 170 g L⁻¹ και συγκεκριμένα το στέλεχος *Yarrowia lipolytica* FMCC Y74 με σύνολο πολυολών 72.1 g L⁻¹ για pH 6.0 στις 552 ώρες καλλιέργειας. Στην προκειμένη περίπτωση παρατηρήθηκε η αξιοσημείωτη παραγωγή μαννιτόλης 39.2 g L⁻¹.

Παρατίθενται πίνακες με τις μέγιστες τιμές των στοιχείων των κινητικών που παρατηρήθηκαν και για τα δυο στελέχη.

Πίνακας 3.3.: Κινητικά δεδομένα του στελέχους FMCC Y74 στην ακάθαρτη γλυκερόλη αρχικών συγκεντρώσεων 40 g L^{-1} , 80 g L^{-1} , 130 g L^{-1} και 170 g L^{-1} , υπό περιοριστικές συνθήκες N, απουσία NaCl.

		T (h)	X (g L ⁻¹)	G _{l_{ol}} _{cons} (g L ⁻¹)	MI (g L ⁻¹)	Y _{X/S} (g g ⁻¹)	Y _{M/GLOL} (g g ⁻¹)	Y _{SP/GLOL} (g g ⁻¹)	Y _{LX} (g g ⁻¹)	Y _{IPS/X} (g g ⁻¹)
40 g L⁻¹	δ	48	7.21	22.94	11.93	0.31	0.52	0.66	0.05	0.60
	α,β,γ	120	11.89	38.99	17.94	0.31	0.46	0.59	0.07	0.43
80 g L⁻¹	δ	96	8.13	42.04	15.70	0.19	0.37	0.50	0.18	0.38
	α, β	268	12.31	79.95	25.17	0.15	0.31	0.47	0.07	0.35
130 g L⁻¹	α	312	14.71	46.49	20.33	0.32	0.44	0.89	0.16	0.43
	β	504	14.63	101.86	32.15	0.14	0.32	0.59	0.32	0.59
170 g L⁻¹	β	552	18.73	144.83	39.16	0.13	0.30	0.50	0.07	0.38

Όπου:

T(h): χρόνος ζύμωσης.

X (g L⁻¹): βιομάζα.

G_{l_{ol}}_{cons} (g L⁻¹): καταναλωθέν υπόστρωμα.

MI (g L⁻¹): παραγωγή μαννιτόλης

Y_{X/S} (g g⁻¹): συντελεστής απόδοσης της παραχθείσας βιομάζας ως προς το καταναλωθέν υπόστρωμα.

Y_{M/GLOL} (g g⁻¹): συντελεστής απόδοσης της παραγόμενης μαννιτόλης ως προς το καταναλωθέν υπόστρωμα.

Y_{SP/GLOL} (g g⁻¹): συντελεστής απόδοσης των συνολικών παραγόμενων πολυολών ως προς το καταναλωθέν υπόστρωμα.

Y_{LX} (g g⁻¹): συντελεστής απόδοσης του παραγόμενου λίπους ως προς την παραχθείσα βιομάζα.

Y_{IPS/X} (g g⁻¹): οι παραγόμενοι ενδοπολυσακχαρίτες ως προς την παραχθείσα βιομάζα.

α: σημείο με την μέγιστη παραγωγή βιομάζας

β: σημείο με την μέγιστη παραγωγή μαννιτόλης

γ: σημείο με τον μέγιστο ποσοστό λίπους επί ξηράς ουσίας (g g⁻¹)

δ: σημείο με τον μέγιστο ποσοστό ενδοπολυσακχαριτών επί ξηράς ουσίας (g g⁻¹)

Πίνακας 3.2.: Κινητικά δεδομένα του στελέχους FMCC Y75 στην ακάθαρτη γλυκερόλη αρχικών συγκεντρώσεων 40 g L⁻¹, 80 g L⁻¹, 130 g L⁻¹ και 170 g L⁻¹, υπό περιοριστικές συνθήκες N, απουσία NaCl.

		T (h)	X (g L ⁻¹)	GloI _{cons} (g L ⁻¹)	MI (g L ⁻¹)	Y _{x/s} (g g ⁻¹)	Y _{M/GLOL} (g g ⁻¹)	Y _{ΣP/GLOL} (g g ⁻¹)	Y _{LX} (g g ⁻¹)	Y _{IPS/X} (g g ⁻¹)
40 g L⁻¹	δ	72	10.47	36.75	11.95	0.28	0.33	0.43	0.04	0.57
	α,β,γ	144	11.99	39.69	12.78	0.30	0.32	0.44	0.15	0.39
80 g L⁻¹	δ	120	5.91	39.85	18.45	0.15	0.46	0.56	0.04	0.34
	α,β	220	12.14	70.04	26.79	0.17	0.38	0.51	0.09	0.35
130 g L⁻¹	α	360	17.81	55.84	20.58	0.32	0.37	0.70	0.15	0.25
	β	504	18,01	96.88	31.25	0,18	0.32	0.36	0.07	0.16
170 g L⁻¹	β	480	18,93	149.86	38.14	0,12	0.25	0.45	0.07	0.10

Όπου:

T(h): χρόνος ζύμωσης.

X (g L⁻¹): βιομάζα.

GloI_{cons} (g L⁻¹): καταναλωθέν υπόστρωμα.

MI (g L⁻¹): παραγωγή μαννιτόλης

Y_{x/s} (g g⁻¹): συντελεστής απόδοσης της παραχθείσας βιομάζας ως προς το καταναλωθέν υπόστρωμα.

Y_{M/GLOL} (g g⁻¹): συντελεστής απόδοσης της παραγόμενης μαννιτόλης ως προς το καταναλωθέν υπόστρωμα.

Y_{ΣP/GLOL} (g g⁻¹): συντελεστής απόδοσης των συνολικών παραγόμενων πολυολών ως προς το καταναλωθέν υπόστρωμα.

Y_{LX} (g g⁻¹): συντελεστής απόδοσης του παραγόμενου λίπους ως προς την παραχθείσα βιομάζα.

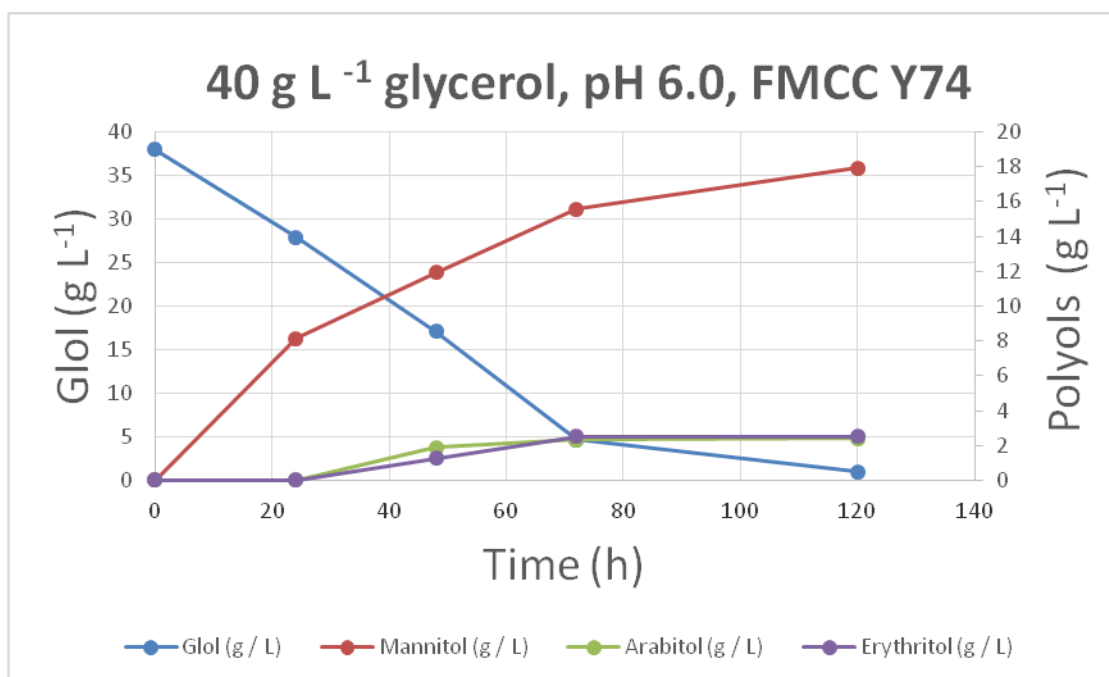
Y_{IPS/X} (g g⁻¹): οι παραγόμενοι ενδοπολυσακχαρίτες ως προς την παραχθείσα βιομάζα.

α: σημείο με την μέγιστη παραγωγή βιομάζας

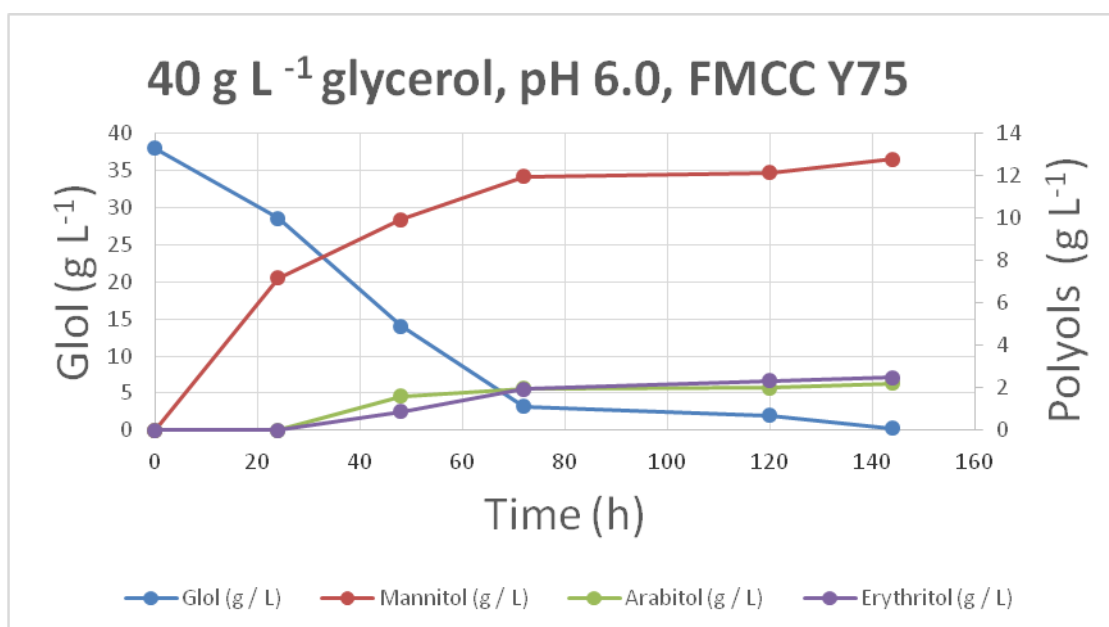
β: σημείο με την μέγιστη παραγωγή μαννιτόλης

γ: σημείο με τον μέγιστο ποσοστό λίπους επί ξηράς ουσίας (g g⁻¹)

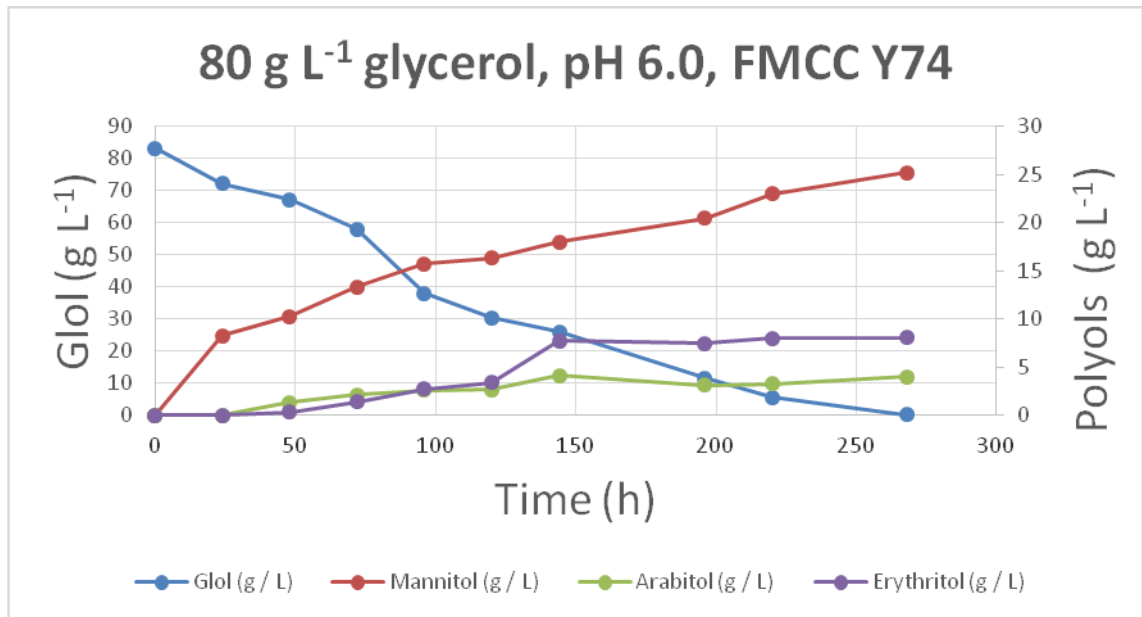
δ: σημείο με τον μέγιστο ποσοστό ενδοπολυσακχαριτών επί ξηράς ουσίας (g g⁻¹)



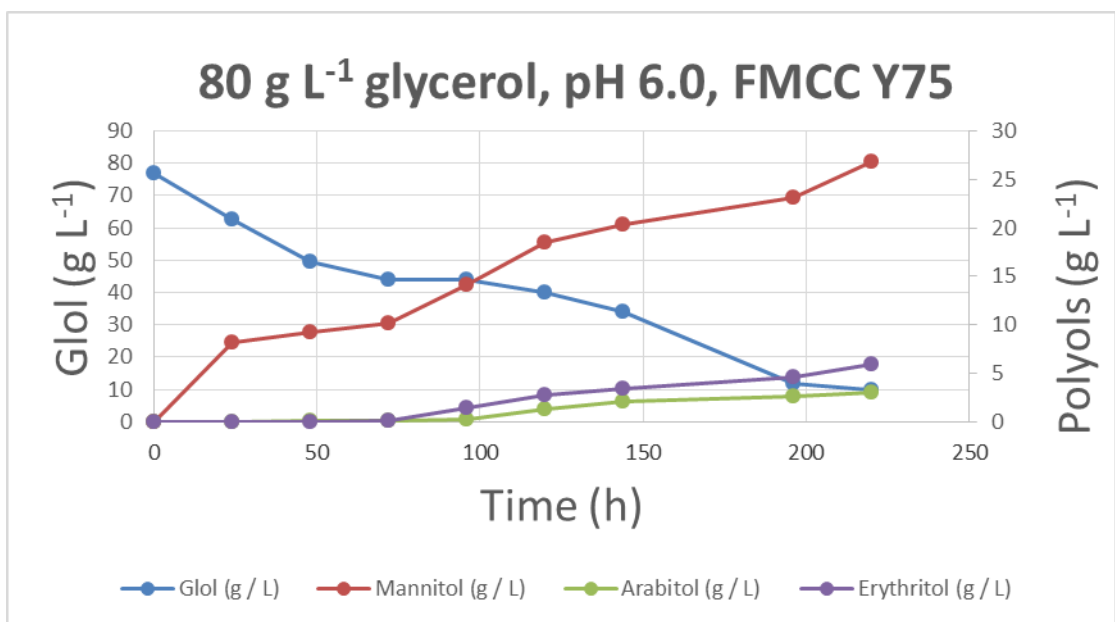
Διάγραμμα 3.1.: Κινητικά δεδομένα για την συμπεριφορά του στελέχους FMCC Y74 σε ασυνεχή καλλιέργεια αρχικής συγκέντρωσης 40 g L⁻¹ και pH 6.0.



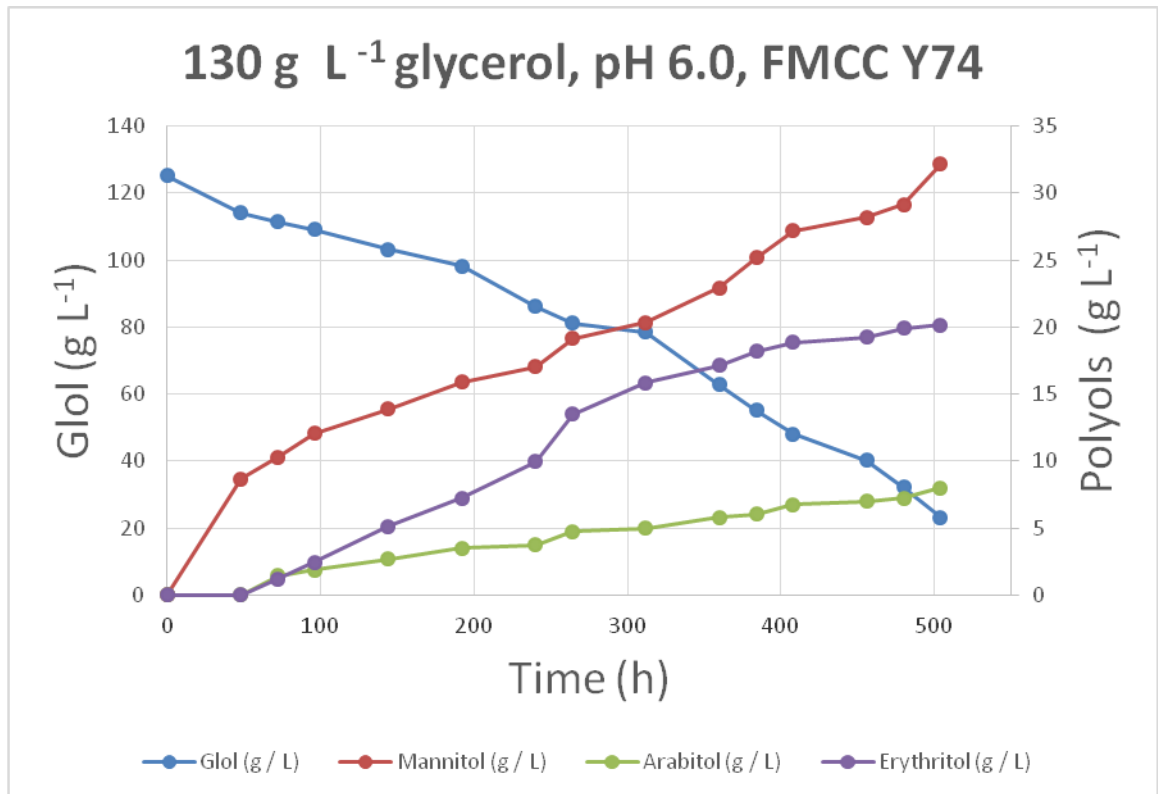
Διάγραμμα 3.2.: Κινητικά δεδομένα για την συμπεριφορά του στελέχους FMCC Y75 σε ασυνεχή καλλιέργεια αρχικής συγκέντρωσης 40 g L⁻¹ και pH 6.0.



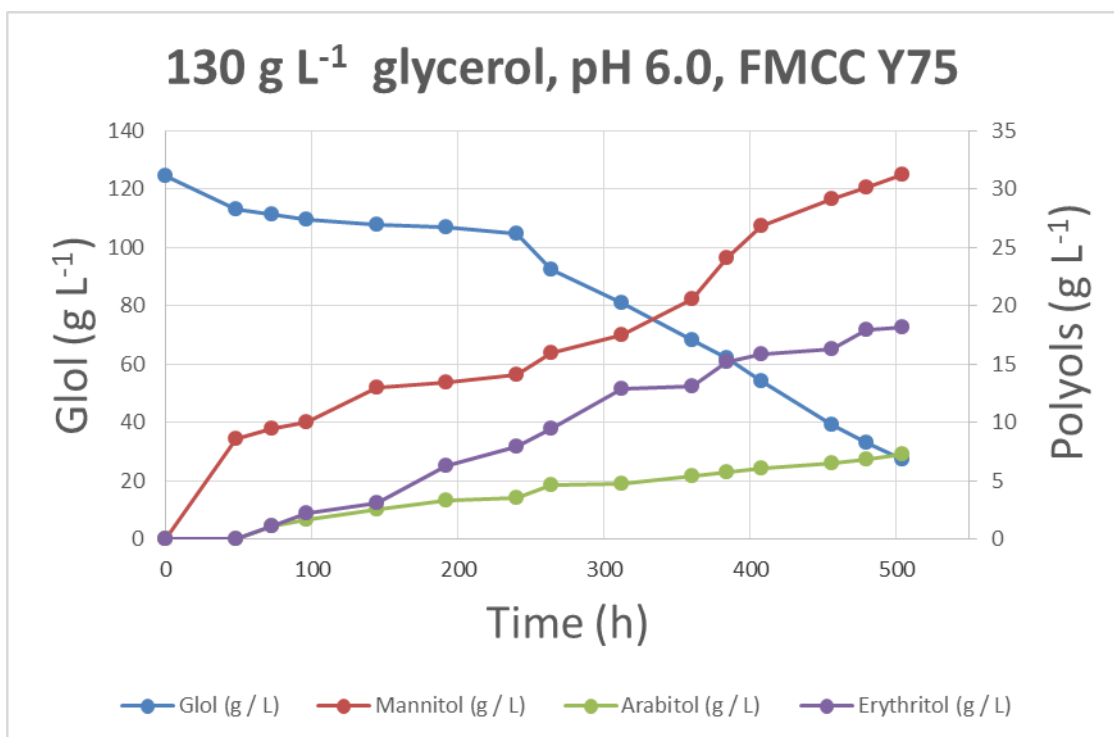
Διάγραμμα 3.3.: Κινητικά δεδομένα για την συμπεριφορά του στελέχους FMCC Y74 σε ασυνεχή καλλιέργεια αρχικής συγκέντρωσης 80 g L⁻¹ και pH 6.0.



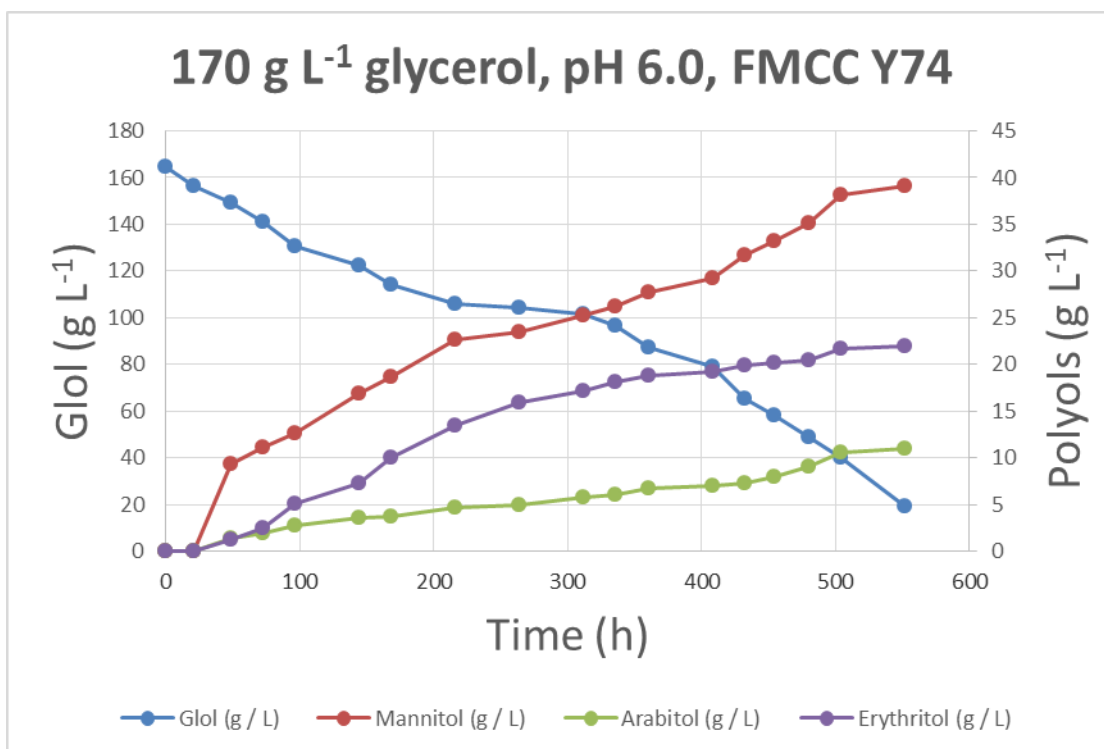
Διάγραμμα 3.4.: Κινητικά δεδομένα για την συμπεριφορά του στελέχους FMCC Y75 σε ασυνεχή καλλιέργεια αρχικής συγκέντρωσης 80 g L⁻¹ και pH 6.0.



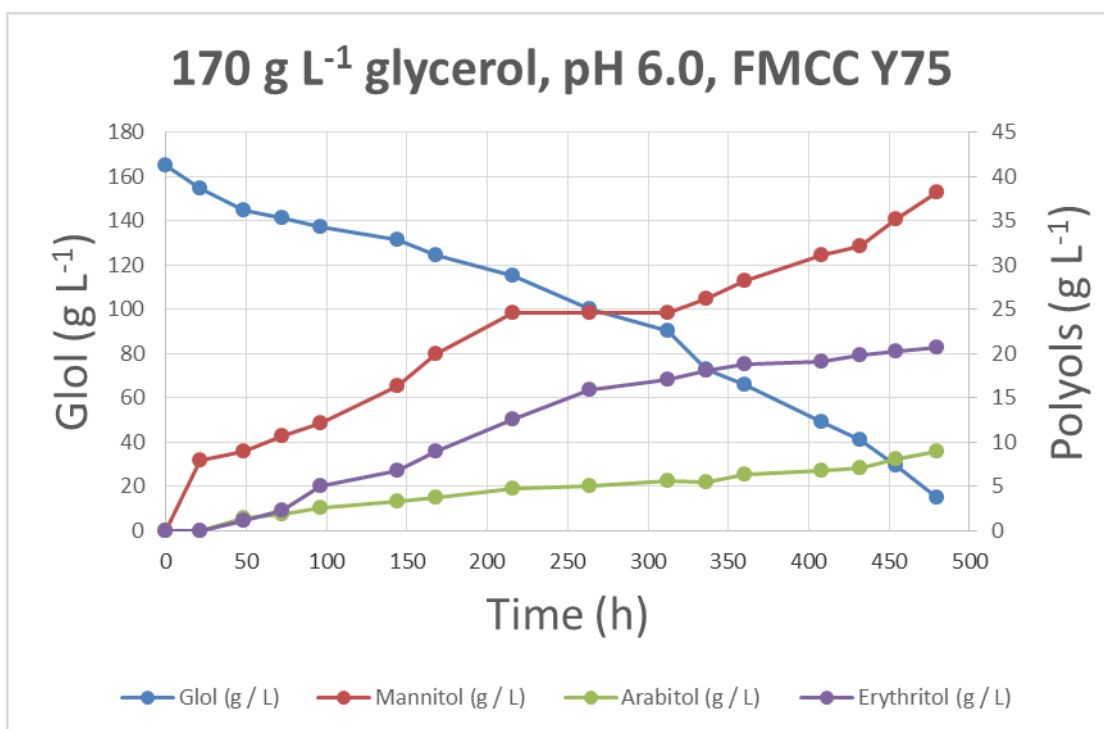
Διάγραμμα 3.5.: Κινητικά δεδομένα για την συμπεριφορά του στελέχους FMCC Y74 σε ασυνεχή καλλιέργεια αρχικής συγκέντρωσης 130 g L⁻¹ και pH 6.0.



Διάγραμμα 3.6.: Κινητικά δεδομένα για την συμπεριφορά του στελέχους FMCC Y75 σε ασυνεχή καλλιέργεια αρχικής συγκέντρωσης 130 g L⁻¹ και pH 6.0.



Διάγραμμα 3.7.: Κινητικά δεδομένα για την συμπεριφορά του στελέχους FMCC Y74 σε ασυνεχή καλλιέργεια αρχικής συγκέντρωσης 170 g L⁻¹ και pH 6.0.



Διάγραμμα 3.8.: Κινητικά δεδομένα για την συμπεριφορά του στελέχους FMCC Y75 σε ασυνεχή καλλιέργεια αρχικής συγκέντρωσης 170 g L⁻¹ και pH 6.0.

Στο δεύτερο στάδιο εξετάστηκαν τα δυο στελέχη σε υγρές καλλιέργειες ασυνεχούς τύπου με υπόστρωμα 40 g L^{-1} βιομηχανικής γλυκερόλης παρουσία NaCl. Πιο συγκεκριμένα οι συγκεντρώσεις χλωριούχου νατρίου που επιλέχθηκαν ήταν οι εξής:

- 1) 10 g L^{-1} NaCl
- 2) 30 g L^{-1} NaCl
- 3) 50 g L^{-1} NaCl
- 4) 80 g L^{-1} NaCl

σε σταθερή θερμοκρασία $29 \text{ }^{\circ}\text{C}$ και τιμή pH 6.0.

Αξιολογήθηκαν ως προς την ικανότητα τους να καταναλώνουν την γλυκερόλη με την παρουσία χλωριούχου νατρίου σε διαφορετικές συγκεντρώσεις και να την μετατρέπουν σε βιομάζα, ενδοπολυσακχαρίτες και δευτερογενείς μεταβολίτες.

Η μέγιστη συγκέντρωση της βιομάζας 14.23 g L^{-1} , παρατηρήθηκε στο στέλεχος *Yarrowia lipolytica* FMCC Y75 σε υγρές καλλιέργειες με αρχική συγκέντρωση βιομηχανικής γλυκερόλης 40 g L^{-1} , NaCl 10 g L^{-1} και σε pH 6.0 στις 144 ώρες καλλιέργειας.

Η μέγιστη συγκέντρωση ενδοπολυσακχαριτών 5.4 g L^{-1} , παρατηρήθηκε από το στέλεχος FMCC Y74 σε κλειστές καλλιέργειες αρχικής συγκέντρωσης υποστρώματος 40 g L^{-1} , NaCl 10 g L^{-1} και σε pH 6.0 στις 72 ώρες καλλιέργειας.

Επίσης, στην παραγωγή πολυολών παρατηρήθηκε μέγιστη παραγωγή σε κλειστές καλλιέργειες αρχικής συγκέντρωσης υποστρώματος 40 g L^{-1} , NaCl 10 g L^{-1} και συγκεκριμένα το στέλεχος *Yarrowia lipolytica* FMCC Y74 για pH 6.0 στις 144 ώρες καλλιέργειας παραγωγή μαννιτόλης 15.04 g L^{-1} .

Αξίζει να σημειωθεί η παρατήρηση της μέγιστης παραγωγής ερυθριτόλης στο στέλεχος *Yarrowia lipolytica* FMCC Y75 για pH 6.0 στις 216 ώρες καλλιέργειας, σε κλειστές καλλιέργειες με αρχική συγκέντρωση βιομηχανικής γλυκερόλης 40 g L^{-1} , NaCl 80 g L^{-1} η οποία έφτασε στα $11,79 \text{ g L}^{-1}$.

Παρατίθενται πίνακες με τις μέγιστες τιμές των στοιχείων των κινητικών που παρατηρήθηκαν και για τα δυο στελέχη.

Πίνακας 3.3.: Κινητικά δεδομένα του στελέχους FMCC Y74 στην ακάθαρτη γλυκερόλη αρχικής συγκεντρώσεως 40 g L^{-1} , υπό περιοριστικές συνθήκες N, παρουσία NaCl, συγκεντρώσεων 10 g L^{-1} , 30 g L^{-1} , 50 g L^{-1} και 80 g L^{-1} .

		T (h)	X (g L^{-1})	GloI_{cons} (g L^{-1})	MI (g L^{-1})	Y_{X/S} (g g^{-1})	Y_{M/GLOL} (g g^{-1})	Y_{ΣP/GLOL} (g g^{-1})	Y_{L/X} (g g^{-1})	Y_{IPS/X} (g g^{-1})
40 g L⁻¹glyc, 10 g L⁻¹NaCl	α,β	144	13.08	38.73	15.05	0.34	0.39	0.60	0.13	0.38
	γ	120	12.88	36.53	14.34	0.35	0.39	0.57	0.15	0.39
	δ	72	9.73	29.26	11.94	0.33	0.41	0.55	0.10	0.56
40 g L⁻¹glyc, 30 g L⁻¹NaCl	α,β	144	10.42	39.51	11.38	0.26	0.29	0.59	0.17	0.40
	γ,δ	120	9.50	32.26	10.68	0.29	0.33	0.66	0.24	0.49

Όπου:

T(h): χρόνος ζύμωσης.

X (g L^{-1}): βιομάζα.

GloI_{cons} (g L^{-1}): καταναλωθέν υπόστρωμα.

MI (g L^{-1}): παραγωγή μαννιτόλης

Y_{X/S} (g g^{-1}): συντελεστής απόδοσης της παραχθείσας βιομάζας ως προς το καταναλωθέν υπόστρωμα.

Y_{M/GLOL} (g g^{-1}): συντελεστής απόδοσης της παραγόμενης μαννιτόλης ως προς το καταναλωθέν υπόστρωμα.

Y_{ΣP/GLOL} (g g^{-1}): συντελεστής απόδοσης των συνολικών παραγόμενων πολυολών ως προς το καταναλωθέν υπόστρωμα.

Y_{L/X} (g g^{-1}): συντελεστής απόδοσης του παραγόμενου λίπους ως προς την παραχθείσα βιομάζα.

Y_{IPS/X} (g g^{-1}): οι παραγόμενοι ενδοπολυσακχαρίτες ως προς την παραχθείσα βιομάζα.

α: σημείο με την μέγιστη παραγωγή βιομάζας

β: σημείο με την μέγιστη παραγωγή μαννιτόλης

γ: σημείο με τον μέγιστο ποσοστό λίπους επί ξηράς ουσίας (g g^{-1})

δ: σημείο με τον μέγιστο ποσοστό ενδοπολυσακχαριτών επί ξηράς ουσίας (g g^{-1})

Πίνακας 3.4.: Κινητικά δεδομένα του στελέχους FMCC Y75 στην ακάθαρτη γλυκερόλη αρχικής συγκεντρώσεως 40 g L^{-1} , υπό περιοριστικές συνθήκες N, παρουσία NaCl, συγκεντρώσεων 10 g L^{-1} , 30 g L^{-1} , 50 g L^{-1} και 80 g L^{-1} .

		T (h)	X (g L^{-1})	GloI _{cons} (g L^{-1})	MI (g L^{-1})	Y _{X/S} (g g^{-1})	Y _{M/GLOL} (g g^{-1})	Y _{ΣP/GLOL} (g g^{-1})	Y _{L/X} (g g^{-1})	Y _{IPS/X} (g g^{-1})
	α,γ	144	14.23	35.86	13.48	0.40	0.38	0.55	0.18	0.15
40 g L⁻¹ glyc, 10 g L⁻¹ NaCl	β	168	14.15	38.13	14.58	0.37	0.38	0.58	0.16	0.16
	δ	48	8.79	20.55	10.06	0.43	0.49	0.65	0.13	0.53
40 g L⁻¹ glyc, 30 g L⁻¹ NaCl	α,β	192	10.27	40.00	11.93	0.26	0.30	0.60	0.18	0.41
	δ	168	8.89	39.16	11.28	0.23	0.29	0.58	0.23	0.47
40 g L⁻¹ glyc, 50 g L⁻¹ NaCl	α,β	192	7.63	37.48	9.80	0.20	0.26	0.60	0.16	0.22
	δ	48	4.79	13.82	0.00	0.35	0.00	0.04	0.10	0.29
40 g L⁻¹ glyc, 80 g L⁻¹ NaCl	α	192	8.90	37.35	8.67	0.24	0.23	0.55	0.24	0.19
	β	216	8.49	39.29	8.69	0.22	0.22	0.56	0.16	0.18
	γ	168	7.66	34.18	8.58	0.22	0.25	0.54	0.28	0.17
	δ	48	7.66	10.05	0.00	0.76	0.00	0.08	0.16	0.22

Όπου:

T(h): χρόνος ζύμωσης.

X (g L^{-1}): βιομάζα.

GloI_{cons} (g L^{-1}): καταναλωθέν υπόστρωμα.

MI (g L^{-1}): παραγωγή μαννιτόλης

Y_{X/S} (g g^{-1}): συντελεστής απόδοσης της παραχθείσας βιομάζας ως προς το καταναλωθέν υπόστρωμα.

Y_{M/GLOL} (g g^{-1}): συντελεστής απόδοσης της παραγόμενης μαννιτόλης ως προς το καταναλωθέν υπόστρωμα.

Y_{ΣP/GLOL} (g g^{-1}): συντελεστής απόδοσης των συνολικών παραγόμενων πολυολών ως προς το καταναλωθέν υπόστρωμα.

Y_{L/X} (g g^{-1}): συντελεστής απόδοσης του παραγόμενου λίπους ως προς την παραχθείσα βιομάζα.

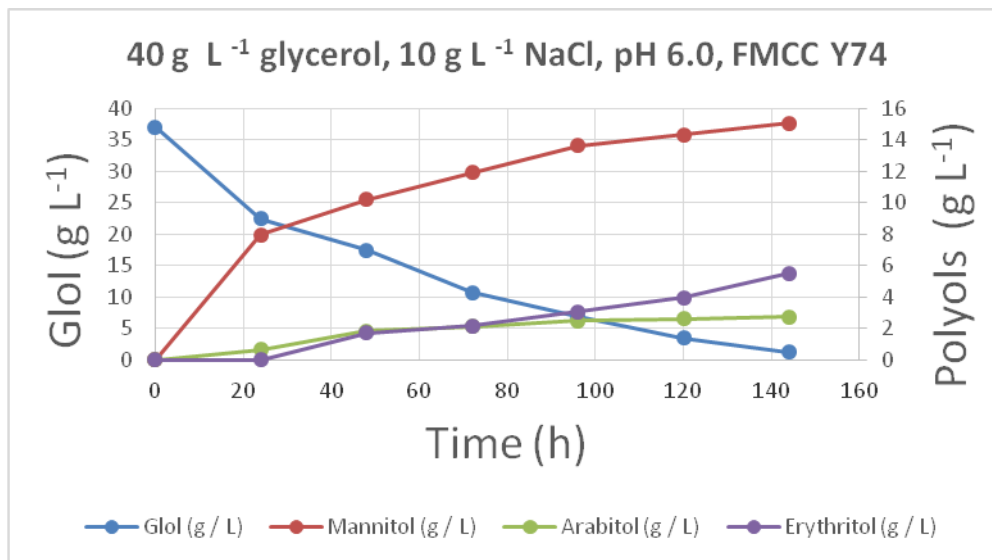
Y_{IPS/X} (g g^{-1}): οι παραγόμενοι ενδοπολυσακχαρίτες ως προς την παραχθείσα βιομάζα.

α: σημείο με την μέγιστη παραγωγή βιομάζας

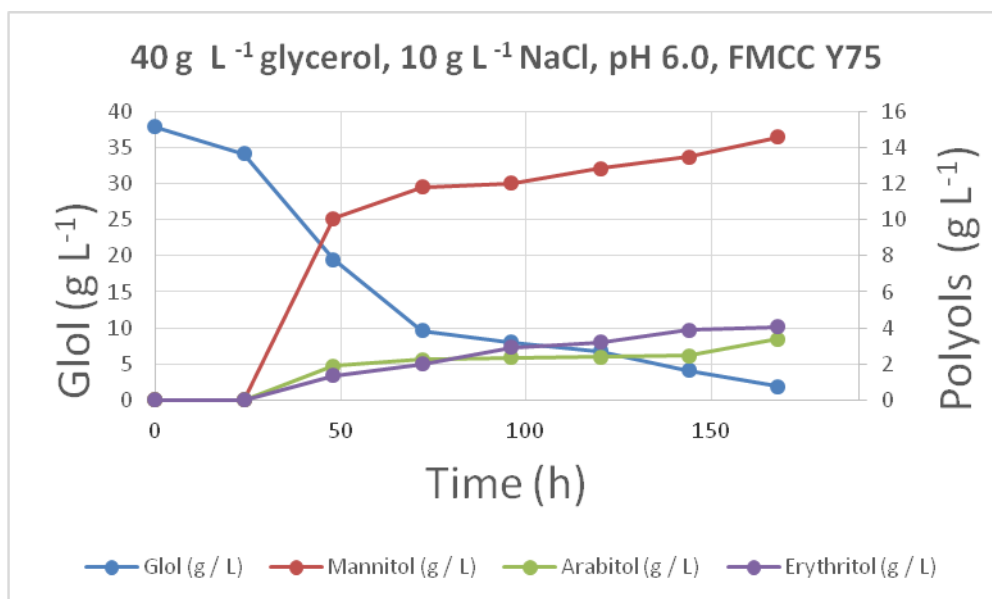
β: σημείο με την μέγιστη παραγωγή μαννιτόλης

γ: σημείο με τον μέγιστο ποσοστό λίπους επί ξηράς ουσίας (g g^{-1})

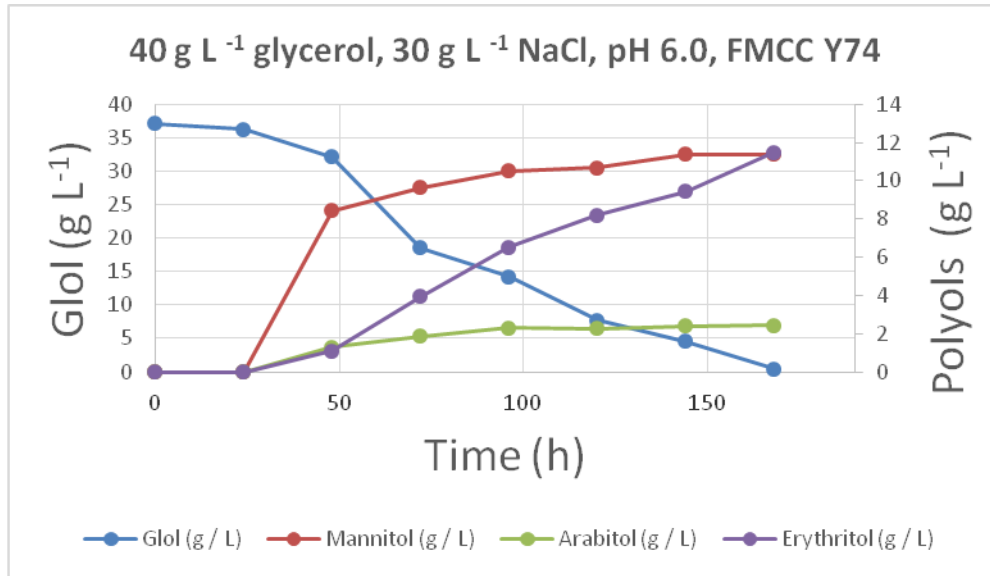
δ: σημείο με τον μέγιστο ποσοστό ενδοπολυσακχαριτών επί ξηράς ουσίας (g g^{-1})



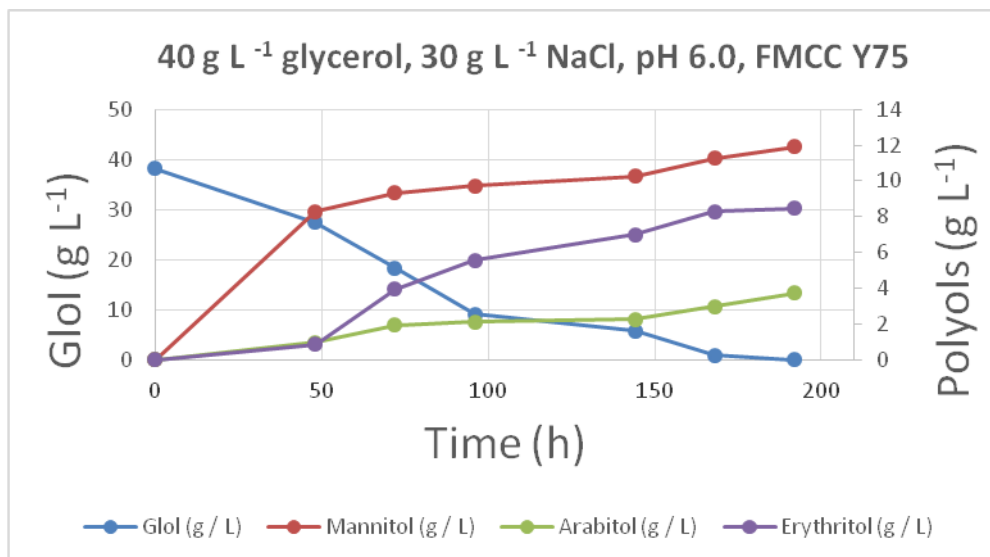
Διάγραμμα 3.10.: Κινητικά δεδομένα για την συμπεριφορά του στελέχους FMCC Y74 σε ασυνεχή καλλιέργεια αρχικής συγκέντρωσης 40 g L⁻¹, 10 g L⁻¹ NaCl και pH 6.0.



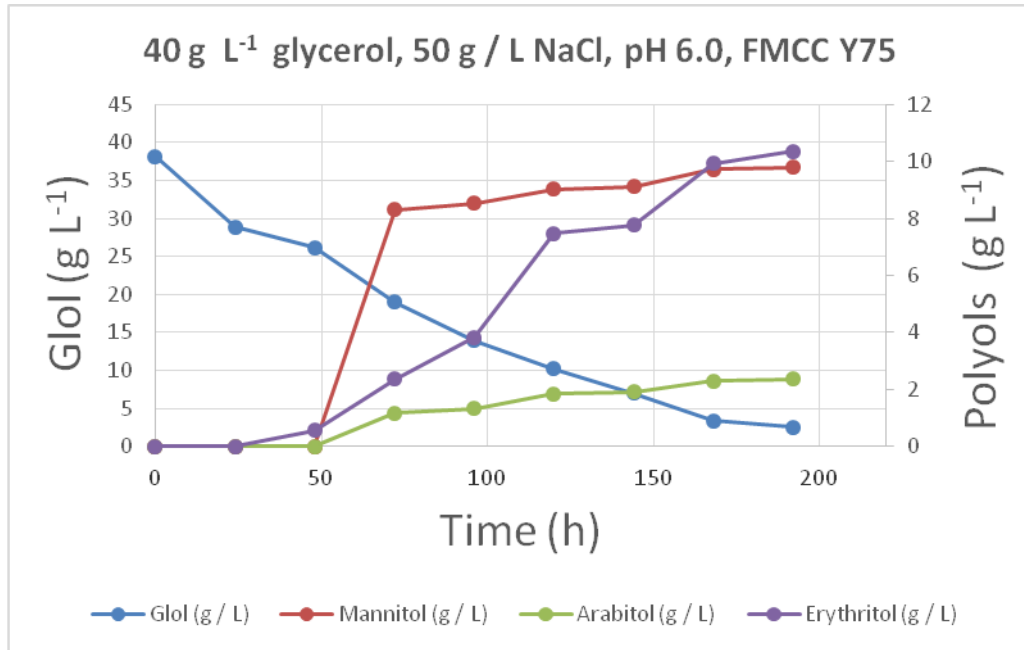
Διάγραμμα 3.11.: Κινητικά δεδομένα για την συμπεριφορά του στελέχους FMCC Y75 σε ασυνεχή καλλιέργεια αρχικής συγκέντρωσης 40 g L⁻¹, 10 g L⁻¹ NaCl και pH 6.0.



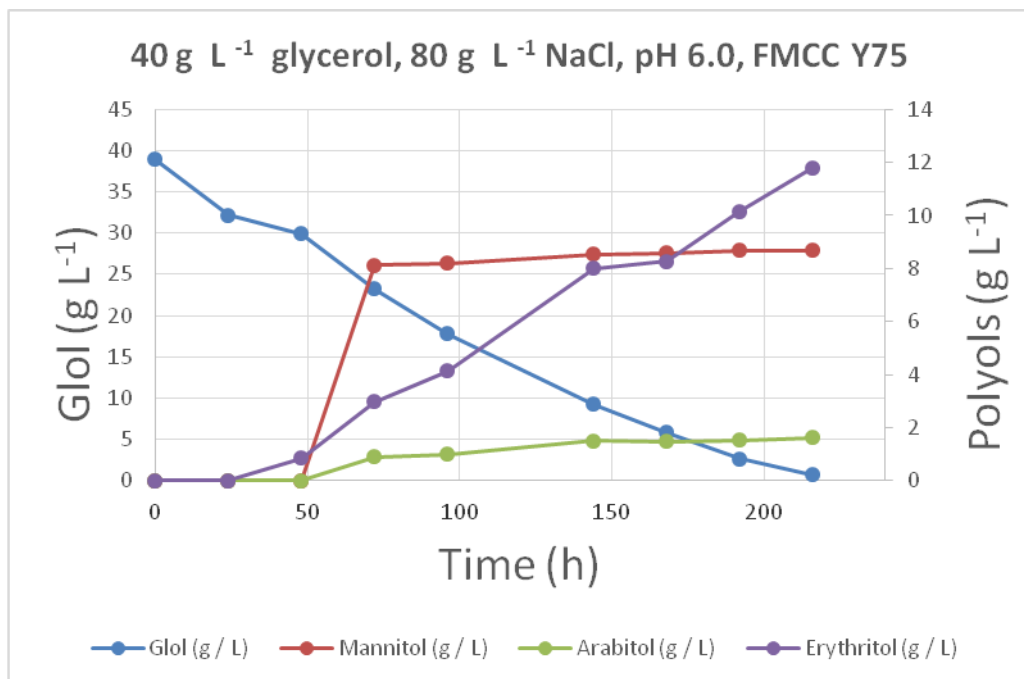
Διάγραμμα 3.12.: Κινητικά δεδομένα για την συμπεριφορά του στελέχους FMCC Y74 σε ασυνεχή καλλιέργεια αρχικής συγκέντρωσης 40 g L⁻¹, 30 g L⁻¹ NaCl και pH 6.0.



Διάγραμμα 3.13.: Κινητικά δεδομένα για την συμπεριφορά του στελέχους FMCC Y75 σε ασυνεχή καλλιέργεια αρχικής συγκέντρωσης 40 g L⁻¹, 30 g L⁻¹ NaCl και pH 6.0.



Διάγραμμα 3.14.: Κινητικά δεδομένα για την συμπεριφορά του στελέχους FMCC Y75 σε ασυνεχή καλλιέργεια αρχικής συγκέντρωσης 40 g L⁻¹ , 50 g L⁻¹ NaCl και pH 6.0.

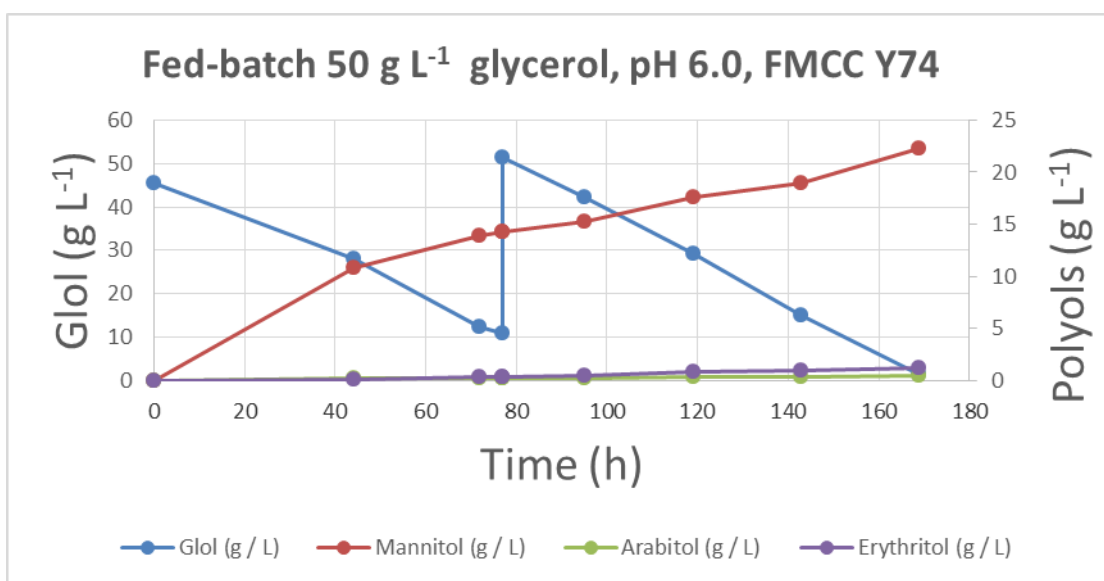


Διάγραμμα 3.15.: Κινητικά δεδομένα για την συμπεριφορά του στελέχους FMCC Y75 σε ασυνεχή καλλιέργεια αρχικής συγκέντρωσης 40 g L⁻¹ , 80 g L⁻¹ NaCl και pH 6.0.

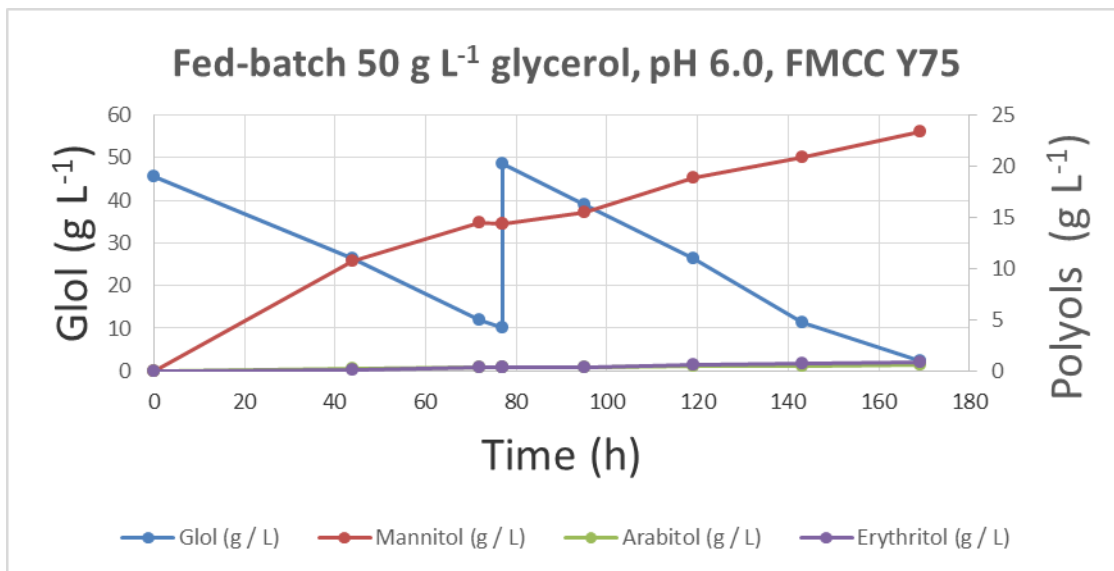
Στο τρίτο στάδιο εξετάστηκαν τα δυο στελέχη FMCC Y74 και FMCC Y75 σε υγρή καλλιέργεια ημισυνεχούς τύπου με υπόστρωμα βιομηχανικής γλυκερόλης αρχικής συγκέντρωσης 50 g L^{-1} και $\text{pH} = 6.0$. Όταν καταναλώθηκαν περίπου τα 35 g L^{-1} του υποστρώματος, προστέθηκαν 50 g L^{-1} στείρου υποστρώματος βιομηχανικής γλυκερόλης για να μελετηθεί η συμπεριφορά του μικροοργανισμού, καθώς και η παραγωγή των πολυολών.

Επίσης, στην παραγωγή πολυολών παρατηρήθηκε μέγιστη παραγωγή στο στέλεχος *Yarrowia lipolytica* FMCC Y74 για $\text{pH} 6.0$ στις 169 ώρες καλλιέργειας παραγωγή μαννιτόλης 23.29 g L^{-1} , ενώ στις ίδιες ώρες καλλιέργειας το στέλεχος FMCC Y75 είχε μέγιστη παραγωγή μαννιτόλης 22.28 g L^{-1} .

Στα παρακάτω διαγράμματα υποδεικνύονται οι τιμές που βρέθηκαν.



Διάγραμμα 3.16.: Κινητικά δεδομένα για την συμπεριφορά του στελέχους FMCC Y74 σε ημισυνεχή καλλιέργεια αρχικής συγκέντρωσης 50 g L^{-1} και $\text{pH} 6.0$.



Διάγραμμα 3.17.: Κινητικά δεδομένα για την συμπεριφορά του στελέχους FMCC Y54 σε ημισυνεχή καλλιέργεια αρχικής συγκέντρωσης 50 g L⁻¹ και pH 6.0.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η παρούσα μεταπτυχιακή μελέτη ως κύριο σκοπό είχε τη διερεύνηση των δυνατοτήτων του μικροοργανισμού *Yarrowia lipolytica* για τα στελέχη FMCC Y74 και FMCC Y75 και την ανάπτυξη τους σε υδρόφιλο υπόστρωμα χαμηλού κόστους, προκειμένου να παραχθούν μεταβολικά προϊόντα προστιθέμενης αξίας. Το υδρόφιλο αυτό υπόστρωμα αποτέλεσε η γλυκερόλη. Τα στελέχη του μικροοργανισμού αυτού θεωρούνται ελαιογόνα και το άζωτο αποτελούσε το περιοριστικό στοιχείο της αύξησης, πράγματι παρουσιάστηκε συσσώρευση μικροβιακού λίπους, κατόπιν προσθήκης υψηλής συγκεντρώσεως άλατος στα πραγματοποιηθέντα πειράματα.

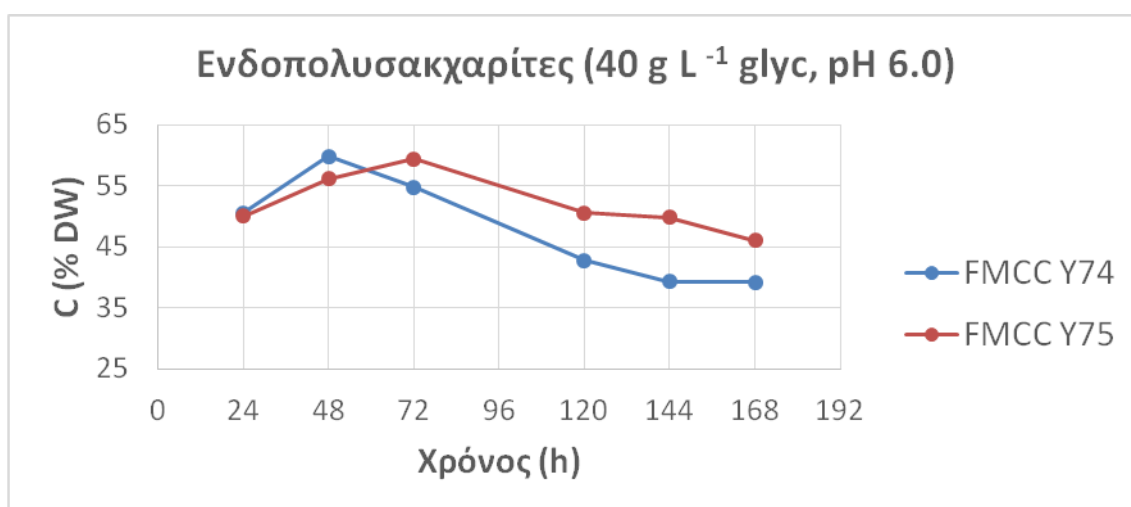
Ως γενικό συμπέρασμα, αξίζει να τονιστεί ότι τα στελέχη του μικροοργανισμού που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη, βρέθηκαν ικανά να αποικοδομήσουν την γλυκερόλη, ως πηγή άνθρακα και ενέργειας, ανεξαρτήτως των συγκεντρώσεων (40 g L^{-1} , 80 g L^{-1} , 130 g L^{-1} και 170 g L^{-1}) με απώτερο στόχο την παραγωγή πολυολών. Να σημειωθεί ότι τα στελέχη κρίθηκαν εξίσου ικανά να αναπτυχθούν ακόμα και στην περίπτωση παρουσίας NaCl (Tomaszewska *et al.*, 2012), ανεξαρτήτως των συγκεντρώσεων χλωριούχου νατρίου (10 g L^{-1} , 30 g L^{-1} , 50 g L^{-1} και 80 g L^{-1}).

Αναλυτικά, στο πρώτο πειραματικό στάδιο εξετάστηκαν τα δύο στελέχη FMCC Y74 και FMCC Y75 της ζύμης *Yarrowia lipolytica* στις εξής αρχικές συγκεντρώσεις υποστρώματος : 40 g L^{-1} , 80 g L^{-1} , 130 g L^{-1} και 170 g L^{-1} , για σταθερή τιμή pH 6.0. Τα δύο στελέχη συγκρίθηκαν ως προς την παραγωγή της βιομάζας τους, την παραγωγή τους σε πολυόλες (μαννιτόλη, ερυθριτόλη και αραβιτόλη), τους ενδοπολυσακχαρίτες και την παραγωγή τους σε μικροβιακό λίπος. Από τα αποτελέσματα που πάρθηκαν το στέλεχος FMCC Y74 έδωσε πιο ικανοποιητικές τιμές στα μεγέθη του συνόλου των πολυολών και ιδιαιτέρως της μαννιτόλης και των ενδοπολυσακχαριτών σε σχέση με το στέλεχος FMCC Y75. Αντιθέτως, στις μετρήσεις του μικροβιακού λίπους το στέλεχος FMCC Y75 φάνηκε να υπερτερεί. Τέλος, οι μετρήσεις της ξηρής μάζας κινούνταν σε παρόμοια επίπεδα και για τα δύο στελέχη.

Στα πρώτα στάδια της αύξησης και παρά τον περιορισμό σε άζωτο, παρατηρήθηκαν αξιοσημείωτες ποσότητες ενδοπολυσακχαριτών. Γεγονός που αντιτίθεται προς τις θεωρήσεις της βιβλιογραφίας (Ratledge, 1988; Papanikolaou & Aggelis, 2011a; 2011b) εφ'όσον θεωρείται ότι οι πολυσακχαρίτες συσσωρεύονται κατά τη στάσιμη φάση της αύξησης και η συγκέντρωση του αζώτου έχει κατέλθει ενός κρίσιμου ορίου. Από την

άλλη πλευρά όμως, άλλες (ελαιογόνες) ζύμες (π.χ. *Cryptococcus curvatus*, *Rhodosporidium toruloides*, κλπ) έχει δειχτεί ότι συσσωρεύουν σε αξιοσημείωτα ποσά ενδοπολυσακχαριτών στα πρώιμα στάδια αύξησης παρά την παρουσία αζώτου στο μέσο της ζύμωσης (Tchakouteu et al 2015; Diamantopoulou et al 2020). Αντιθέτως στην εξέλιξη των λιπιδίων, παρατηρήθηκε η τάση σύνθεσης κάποιας ποσότητας λιπιδίων στη στάσιμη φάση της αύξησης, όπως ακριβώς αναφέρεται στη βιβλιογραφία.

Στα επόμενο διαγράμμα δίνονται ενδεικτικά οι ενδοπολυσακχαρίτες των δύο στελεχών FMCC Y74 και FMCC Y75 σε ζυμώσεις αρχικής συγκέντρωσης 40 g L^{-1} γλυκερόλης σε τιμή pH 6.0.



Διάγραμμα 4.1.: Ενδοπολυσακχαρίτες για τα στελέχη FMCC Y74 και FMCC Y75 αρχικού υποστρώματος σε ζυμώσεις αρχικής συγκέντρωσης 40 g L^{-1} σε τιμή pH 6.0.

Πιο συγκεκριμένα, αξίζει να σημειωθεί ότι με την αύξηση της συγκέντρωσης του αρχικού υποστρώματος S_0 παρατηρήθηκαν μειούμενα τα ποσοστά των ενδοπολυσακχαριτών επί της ξηράς ουσίας. Αντιθέτως, άνοδος σημειώθηκε στην περίπτωση του ποσοστού των λιπιδίων επί της ξηράς ουσίας με την αύξηση της αρχικής συγκέντρωσης της γλυκερόλης.

Τα δυο στελέχη της ζύμης *Yarrowia lipolytica* δίνουν μέγιστη τιμή ενδοπολυσακχαριτών στις 48-72 ώρες ζύμωσης και μετά ακολουθεί πτώση. Το στέλεχος FMCC Y74 παράγαγε 4.32 g L^{-1} ενδοπολυσακχαριτών (ποσοστό ενδοπολυσακχαριτών επί ξηρής μάζας $C (\% \text{DW}) = 59.86$) στις 48 ώρες ζύμωσης. Το στέλεχος FMCC Y75 που στις 72 ώρες ζύμωσης είχε παράγει 6.21 g L^{-1} (ποσοστό

ενδοπολυσακχαριτών επί ξηρής μάζας C (%DW) = 56.37), σε συνθήκες pH 6.0 και σε αρχική συγκέντρωση υποστρώματος 40 g L⁻¹.

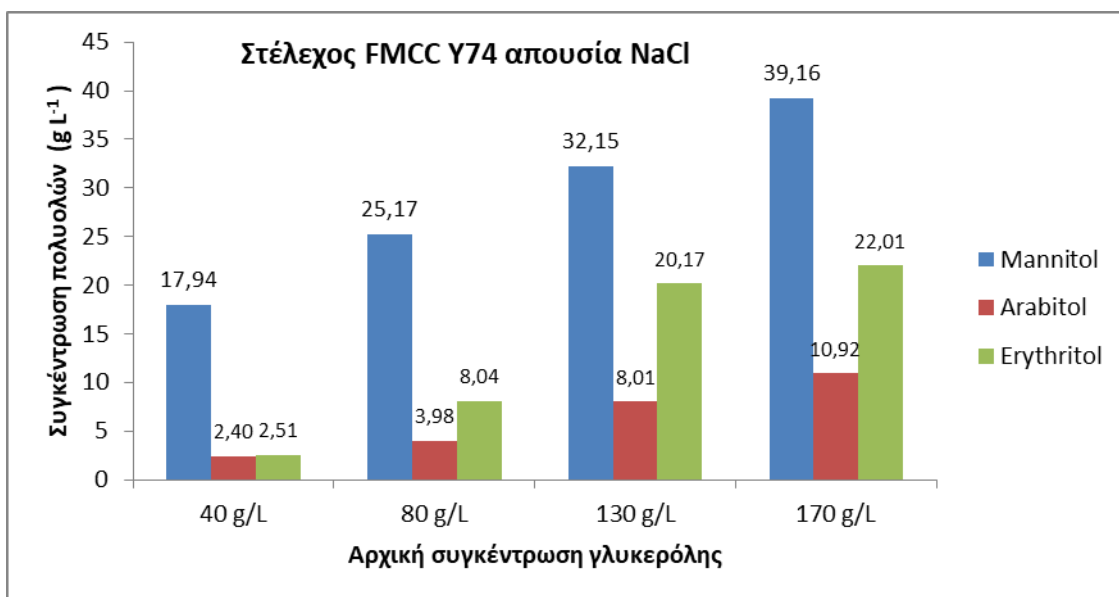
Ακόμα, τα δύο στελέχη μελετήθηκαν και ως προς την παραγωγή τους σε μικροβιακό λίπος. Υπολογίστηκε ο συντελεστής λίπους ως προς την παραχθείσα βιομάζα σε συνάρτηση με τον χρόνο. Ταύτιση της μέγιστης παραγωγής μικροβιακού λίπους της τάξεως του ~28.5 % παρατηρήθηκε και στα δυο στελέχη, σε συνθήκες pH 6.0 και σε αρχική συγκέντρωση υποστρώματος 130 g L⁻¹.

Αξιοσημείωτη είναι η παραγωγή πολυολών και ιδίως της μαννιτόλης που έφτασε τα 39.16 g L⁻¹ σε pH 6.0 και σε αρχική συγκέντρωση υποστρώματος 170 g L⁻¹ για το στέλεχος FMCC Y74 μέσα στις 552 ώρες της ζύμωσης, με το σύνολο των πολυολών να φτάνει τα 72,09 g L⁻¹. Αντίστοιχα, το στέλεχος FMCC Y75 στις 480 ώρες ζύμωσης είχε παράγει 38.14 g L⁻¹ μαννιτόλης και το σύνολο των πολυολών άγγιξε σχεδόν τα 68 g L⁻¹.(Αναλυτικά στα παρακάτω διαγράμματα 4.2 και 4.3)

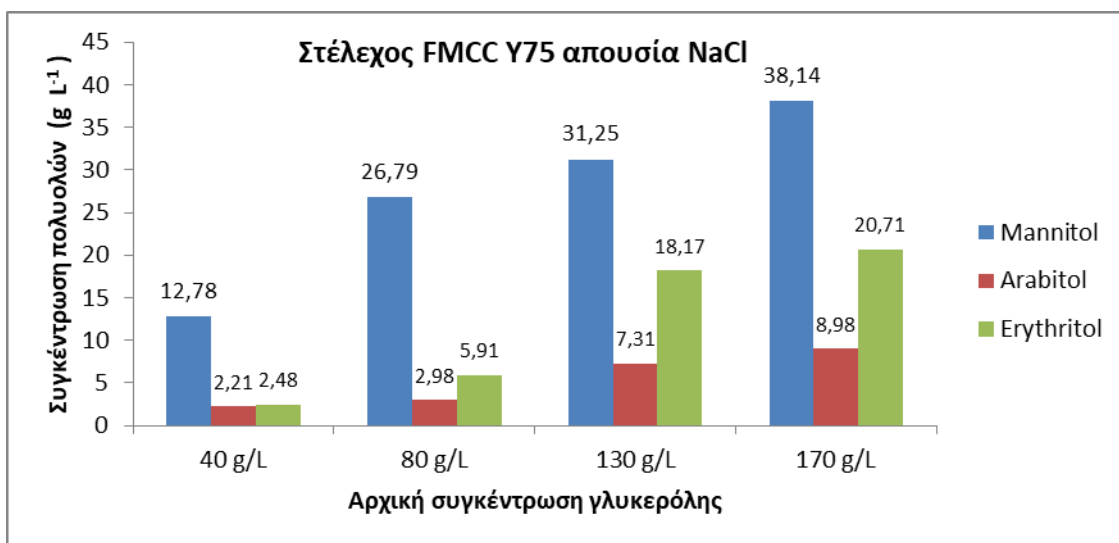
Συμπεραίνεται από το πρώτο πείραμα πως τα στελέχη:

- Αντέδρασαν ικανοποιητικά στην κατανάλωση του υποστρώματος βιομηχανικής γλυκερόλης.
- Δεν παρήγαγαν ικανοποιητικές ποσότητες μικροβιακού λίπους, σε αντίθεση με τις ποσότητες των ενδοπολυσακχαριτών που ήταν μεγαλύτερες.
- Παρήχθησαν ικανοποιητικές ποσότητες ξηρής βιομάζας.
- Καταναλώθηκε πλήρως το υπόστρωμα και παρήχθησαν πολυόλες σε υψηλές συγκεντρώσεις (κυρίως μαννιτόλη).

Στα επόμενα διαγράμματα δίνονται οι μέγιστες τιμές των πολυολών στις διαφορετικές συγκεντρώσεις.



Διάγραμμα 4.2.: Μέγιστες τιμές πολυολών για το στέλεχος FMCC Y74 σε διαφορετικές αρχικού υποστρώματος κάτω από τις ίδιες συνθήκες καλλιέργειας.



Διάγραμμα 4.3.: Μέγιστες τιμές πολυολών για το στέλεχος FMCC Y75 σε διαφορετικές αρχικού υποστρώματος κάτω από τις ίδιες συνθήκες καλλιέργειας.

Στο δεύτερο στάδιο πειραμάτων πραγματοποιήθηκαν ζυμώσεις αρχικής συγκέντρωσης υποστρώματος 40 g L⁻¹ σε pH 6.0. Σε υγρές κλειστές καλλιέργειες, μελετήθηκε η συμπεριφορά των στελεχών της ζύμης παρουσία χλωριούχου νατρίου NaCl σε συγκεντρώσεις 10 g L⁻¹, 30 g L⁻¹, 50 g L⁻¹ και 80 g L⁻¹.

Τα δύο στελέχη συγκρίθηκαν ως προς την παραγωγή της βιομάζας τους, την παραγωγή τους σε πολυόλες (μαννιτόλη, ερυθριτόλη και αραβιτόλη), τους ενδοπολυσακχαρίτες και την παραγωγή τους σε μικροβιακό λίπος. Από τα αποτελέσματα που πάρθηκαν, τα στελέχη FMCC Y74 και FMCC Y75 εμφάνισαν τιμές οι οποίες κινούνταν σε παρόμοια επίπεδα στα μεγέθη του συνόλου των πολυολών, του μικροβιακού λίπους, των ενδοπολυσακχαριτών και της ξηρής μάζας.

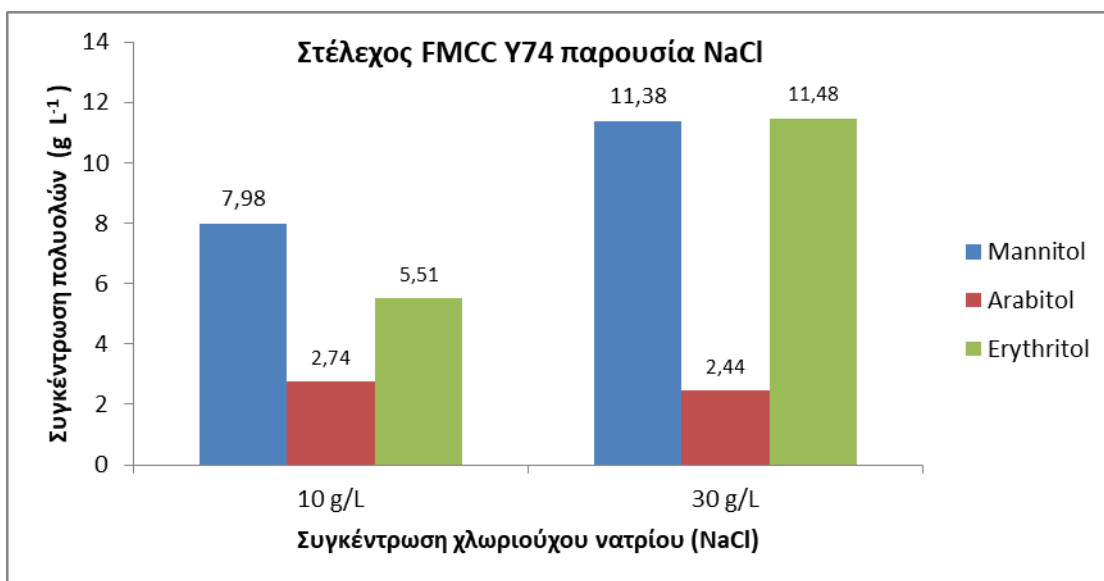
Πιο αναλυτικά, συμπεραίνεται από το δεύτερο πείραμα πως τα στελέχη:

- Τα στελέχη κατάφεραν να αναπτυχθούν παρουσία χλωριούχου νατρίου ανεξαρτήτως συγκεντρώσεως.
- Τα στελέχη αντέδρασαν ικανοποιητικά στην κατανάλωση του υποστρώματος βιομηχανικής γλυκερόλης, με μια επιβράδυνση στον χρόνο καταναλώσεώς της. Με την αύξηση της συγκέντρωσης του χλωριούχου νατρίου NaCl (10 g L^{-1} , 30 g L^{-1} , 50 g L^{-1} και 80 g L^{-1}), τόσο μεγαλύτερη ήταν η επιβράδυνση καταναλώσεως του υποστρώματος.
- Οι ποσοτητές ξηρής βιομάζας καθώς και των ενδοπολυσακχαριτών μειώθηκε με την αύξηση της συγκέντρωσης του χλωριούχου νατρίου NaCl στο υγρό μέσο των ζυμώσεων.
- Αξιοσημείωτη παραγωγή ερυθριτόλης παρατήρηθηκε με την αύξηση της συγκέντρωσης του χλωριούχου νατρίου NaCl. Φτάνοντας τη μέγιστη τιμή των 11.79 g L^{-1} σε αρχική συγκέντρωση υποστρώματος 40 g L^{-1} και παρουσία NaCl 80 g L^{-1} για το στέλεχος FMCC Y75 μέσα στις 216 ώρες της ζύμωσης.

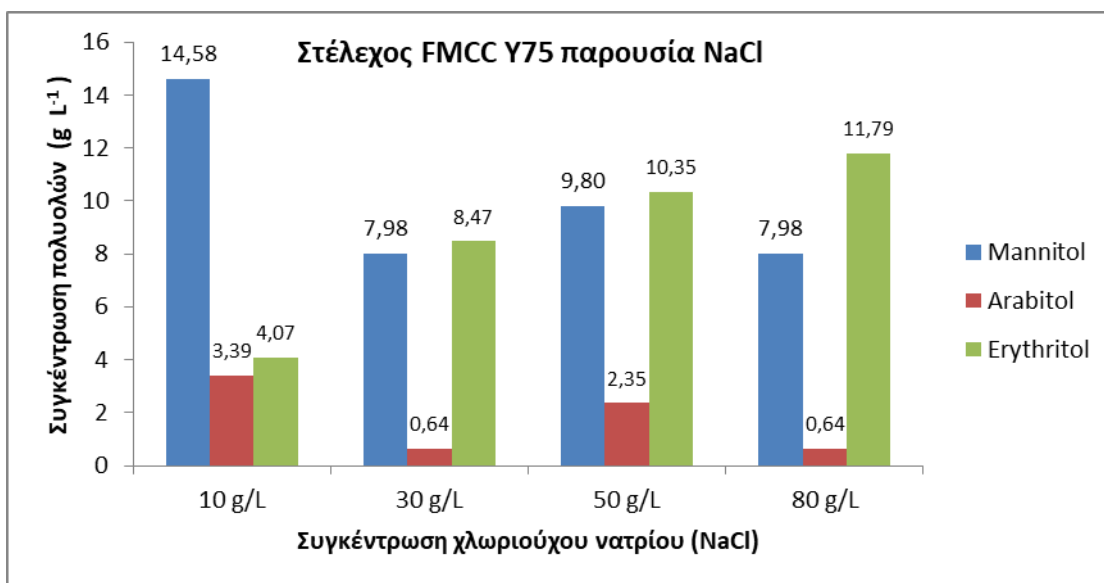
Σε σύγκριση με τα αποτελέσματα των πειραμάτων του πρώτου σταδίου (αρχικού υποστρώματος $S_0 = 40 \text{ g L}^{-1}$, $\text{pH} = 6.0$, απουσίας NaCl) και του δεύτερου σταδίου (αρχικού υποστρώματος $S_0 = 40 \text{ g L}^{-1}$, $\text{pH} = 6.0$, παρουσίας NaCl σε συγκεντρώσεις 10 g L^{-1} , 30 g L^{-1} , 50 g L^{-1} και 80 g L^{-1}), συμπεραίνεται ότι:

- Παρουσιάστηκε αύξηση στη παραγωγή ξηρής μάζας, καθώς η υψηλότερη τιμή στο δεύτερο σετ πειραμάτων ήταν 14.15 g L^{-1} για το στέλεχος FMCC Y75 στις 168 h με αρχικό υπόστρωμα 40 g L^{-1} παρουσίας 10 g L^{-1} NaCl . Να σημειωθεί ότι στο αντίστοιχο πείραμα του πρώτου σετ πειραμάτων, όμοιων επικρατούσων συνθηκών αλλά απουσίας NaCl η υψηλότερη τιμή παραγόμενης βιομάζας ήταν 11.99 g L^{-1} για το ίδιο στέλεχος στις 144 h.
- Παρουσιάστηκε αύξηση στη παραγωγή μικροβιακού λίπους, καθώς η υψηλότερη τιμή στο δεύτερο σετ πειραμάτων ήταν 33.17 g L^{-1} για το στέλεχος FMCC Y75 στις 168 h με αρχικό υπόστρωμα 40 g L^{-1} παρουσίας 80 g L^{-1} NaCl . Ενώ στο αντίστοιχο πείραμα του πρώτου σετ πειραμάτων, όμοιων επικρατούσων συνθηκών αλλά απουσίας NaCl η υψηλότερη τιμή παραγόμενου μικροβιακού λίπους ήταν 15.04 g L^{-1} για το ίδιο στέλεχος στις 144 h.
- Στη παραγωγή ενδοπολυσακχαριτών παρατηρείται μια μεγάλη απόκλιση αποτελεσμάτων ανάμεσα στα πειράματα του πρώτου σετ αρχικής συγκέντρωσης 40 g L^{-1} απουσίας NaCl και του δεύτερου σετ παρουσίας NaCl η οποία στηρίζεται στην ποσότητα του χλωριούχου νατρίου στο εκάστοτε πείραμα, η οποία θα αναλυθεί παρακάτω, αλλά ως γενικό συμπέρασμα προκύπτει ότι υπάρχει μεγαλύτερη παραγωγή ενδοπολυσακχαριτών όταν δεν υπάρχει στο υγρό μέσο της ζύμωσης NaCl .
- Στη παραγωγή πολυολών (μαννιτόλη, ερυθριτόλη και αραβιτόλη) παρατηρήθηκε μια ευνόηση στο συνολικό άθροισμά τους, όταν υπήρχε στο υγρό μέσο των ζυμώσεων 10 g L^{-1} έως και 30 g L^{-1} χλωριούχο νάτριο NaCl . Η παραγωγή του συνόλου των πολυολών ήταν της τάξεως ~ 2 με 3 g L^{-1} παραπάνω. Να σημειωθεί ότι ήταν αξιοσημείωτη η αύξηση της ερυθριτόλης και η μείωση της μαννιτόλης.

Στα επόμενα διαγράμματα δίνονται οι μέγιστες τιμές των πολυολών στις διαφορετικές συγκεντρώσεις χλωριούχου νατρίου.



Διάγραμμα 4.4.: Μέγιστες τιμές πολυολών για το στέλεχος FMCC Y74 σε διαφορετικές συγκεντρώσεις χλωριούχου νατρίου κάτω από τις ίδιες συνθήκες καλλιέργειας.

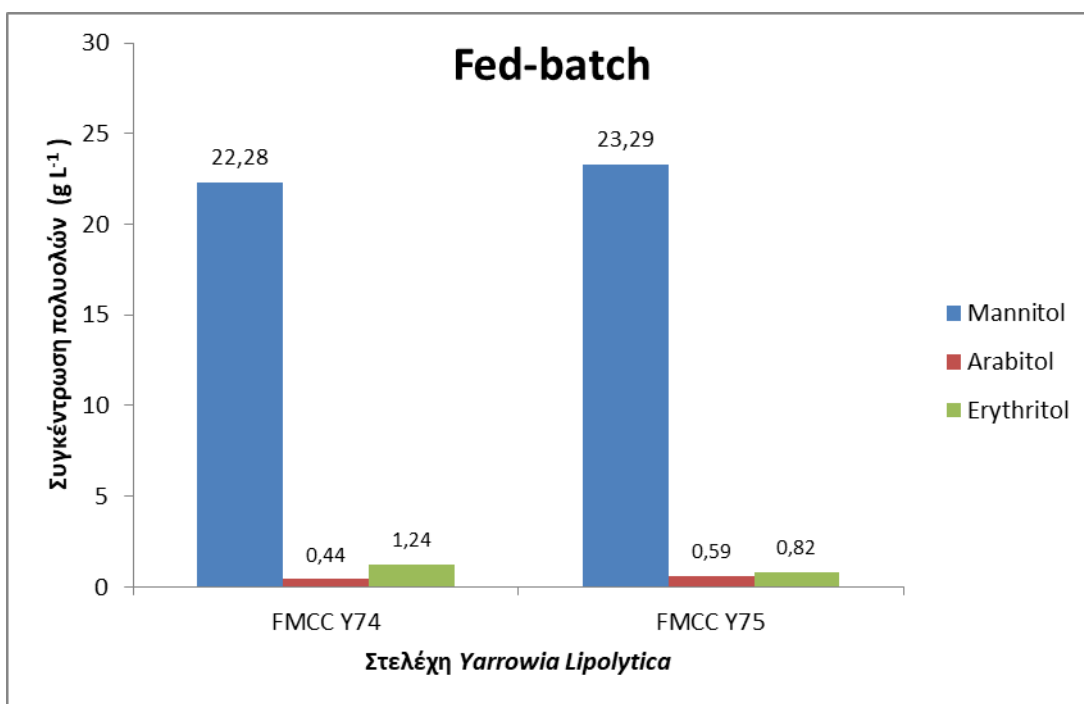


Διάγραμμα 4.5.: Μέγιστες τιμές πολυολών για το στέλεχος FMCC Y75 σε διαφορετικές συγκεντρώσεις χλωριούχου νατρίου κάτω από τις ίδιες συνθήκες καλλιέργειας.

Στο τρίτο στάδιο πειραμάτων, ολοκληρώνοντας την μελέτη, πραγματοποιήθηκαν ζυμώσεις αρχικής συγκέντρωσης υποστρώματος 50 g L^{-1} σε pH 6.0. Σε υγρές ημισυνεχείς καλλιέργειες, μελετήθηκε η συμπεριφορά των στελεχών FMCC Y74 και FMCC Y75. Όταν καταναλώθηκε το μεγαλύτερο μέρος του υποστρώματος (34.57 g L^{-1} και 34.47 g L^{-1} αντίστοιχα), προστέθηκαν στην υπάρχουσα καλλιέργεια 50 g L^{-1} καθαρής γλυκερόλης για να μελετηθεί η συμπεριφορά της ζύμης με αυτή την παρέμβαση.

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης έδειξαν πως μετά την εκ νέου προσθήκη του στείρου υποστρώματος συνεχίστηκε η αυξητική πορεία της παραγωγής των πολυολών. Πιο συγκεκριμένα, στη παραγωγή της μαννιτόλης σημειώθηκε κατακόρυφη αύξηση με αποτέλεσμα να παραχθούν ως και 23.29 g L^{-1} και 22.28 g L^{-1} για τα στελέχη FMCC Y74 και FMCC Y75 αντίστοιχα, στις 169 ώρες ζύμωσης. Η ερυθριτόλη και η αραβιτόλη παρουσίασαν μικρή αύξηση των τιμών τους.

Στο επόμενο διάγραμμα δίνονται οι μέγιστες τιμές των πολυολών για τα δύο στελέχη.



Διάγραμμα 4.6.: Μέγιστες τιμές πολυολών για τα στελέχη FMCC Y74 και FMCC Y75 σε ημισυνεχή καλλιέργεια αρχικής συγκέντρωσης 50 g L^{-1} και pH 6.0.

Στον παρακάτω πίνακα έγινε σύγκριση των παραγόμενων πολυολών της ζύμης *Yarrowia lipolytica* αυτής της μελέτης με δημοσιευμένα αποτελέσματα άλλων μελετών.

Στέλεχος	MI (g L ⁻¹)	Ery (g L ⁻¹)	Ara (g L ⁻¹)	Σp (g L ⁻¹)	Τύπος ζύμωσης	Αναφορές
<i>Yarrowia lipolytica</i> Wratislavia K1	6.8	11.3	0.9	19.0	flasks	Rakicka <i>et al.</i> , 2017
<i>Yarrowia lipolytica</i> AIB	11.7	11.7	2.9	26.3	flasks	Rakicka <i>et al.</i> , 2018
<i>Yarrowia lipolytica</i> AIB UTGUT1/1	13.8	16.2	5.5	35.5	flasks	Rakicka <i>et al.</i> , 2019
<i>Yarrowia lipolytica</i> AIB UTGUT1/2	16.7	6.7	7.5	30.9	flasks	Rakicka <i>et al.</i> , 2020
<i>Yarrowia lipolytica</i> AIB UTGUT1/3	7.6	14.6	7.0	29.2	flasks	Rakicka <i>et al.</i> , 2021
<i>Yarrowia lipolytica</i> Wratislavia K1	3.90	135.5	0.1	139.5	flasks	Mironczuk <i>et al.</i> , 2014
<i>Yarrowia lipolytica</i> CCY – 29- 26-3	2.63	22.97	2.33	27.93	flasks	Tomaszewska <i>et al.</i> , 2012
<i>Yarrowia lipolytica</i> A - 15	1.07	35.53	1.72	38.32	flasks	Tomaszewska <i>et al.</i> , 2013
<i>Yarrowia lipolytica</i> FMCC Y74	39.16	22.01	10.92	72.09	flasks	παρούσα εργασία
<i>Yarrowia lipolytica</i> FMCC Y75	38.14	20.71	8.98	67.83	flasks	παρούσα εργασία
<i>Yarrowia lipolytica</i> FMCC Y74 (παρουσία NaCl)	15.05	5.51	2.74	23.3	flasks	παρούσα εργασία
<i>Yarrowia lipolytica</i> FMCC Y75 (παρουσία NaCl)	14.58	4.07	3.39	22.04	flasks	παρούσα εργασία
<i>Yarrowia lipolytica</i> FMCCY74	22.28	1.24	0.43	23.95	fed - batch	παρούσα εργασία
<i>Yarrowia lipolytica</i> FMCCY75	23.29	0.82	0.59	24.7	fed - batch	παρούσα εργασία

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Aggelis G., Sourdis J., Prediction of lipid accumulation-degradation in oleaginous micro-organisms growing on vegetable oils. *Antonie van Leeuwenhoek* 1997, 72, 159-165.

Athenaki M., Gardeli C., Diamantopoulou P., Tchakouteu SS, Sarris D., Philippoussis A., Papanikolaou S. Lipids from yeasts and fungi: physiology, production and analytical considerations. *J Appl Microbiol.* 2018;124(2):336–367.

Aro, Eva Mari., “From First Generation Biofuels to Advanced Solar Biofuels.” 2016, *Ambio* 45 (1): 24– 31.

Barth, G., and Gaillardin C., 1997. “Physiology and Genetics of the Dimorphic Fungus *Yarrowia lipolytica*” 19.

Belitz, H. D., Grosch, W., & Schieberle, P. 2009. *Food chemistry. Food Chemistry* (Vol. 101).

Bellou, S., Makri A., Triantaphyllidou I, Papanikolaou S., and Aggelis G.. 2014. “Morphological and Metabolic Shifts of *Yarrowia lipolytica* Induced by Alteration of the Dissolved Oxygen Concentration in the Growth Environment,” 807–17.

Beopoulos, A., Cescut J., Haddouche R., Uribelarrea J.L., MolinaJouve C., and Nicaud J.M.. 2009. “*Yarrowia lipolytica* as a Model for Bio-Oil Production.” *Progress in Lipid Research*.

Chambers, Paul J, and Pretorius I., 2010. “Winemaking , Science and Yeast Research” 11 (12).

Chatzifragkou, A., Makri A., Belka A., Bellou S., Mavrou M., Mastoridou M., Mystrioti P., Onjaro G., Aggelis G., and Papanikolaou. S. 2011. “Biotechnological Conversions of Biodiesel Derived Waste Glycerol by Yeast and Fungal Species.”

Chatzifragkou, A., Papanikolaou, S., 2012. Effects of impurities in biodiesel derived waste glycerol on the performance and feasibility of biotechnological processes. *Applied Microbiology and Biotechnology*.

Claude, S, 1999, Research of new outlets of glycerol – recent developments in France.

CRC Handbook of Chemistry and Physics, 87th edn., Boca Raton (FL): 2006.

Da Silva G.P., Mack M., Contiero J., Glycerol: A promising and abundant carbon source for industrial microbiology. *Biotechnol Adv*, 2008, 27, 30-39.

Diamantopoulou P., Papanikolaou S., Kapoti M., Komaitis M., Aggelis G., Philippoussis A., Mushroom polysaccharides and lipids synthesized in liquid agitated and static cultures. Part I: Screening various mushroom species. *Appl Biochem Biotechnol*, 2012a, 167, 536-551.

Diamantopoulou P., Papanikolaou S., Katsarou E., Komaitis M., Aggelis G., Philippoussis A., Mushroom polysaccharides and lipids synthesized in liquid agitated and static cultures. Part II: Study of *Volvariella volvacea*. *Appl Biochem Biotechnol*, 2012b, 167, 1890-1906.

Diamantopoulou P., Papanikolaou S., Komaitis M., Aggelis G., Philippoussis A., Patterns of major metabolites biosynthesis by different mushroom fungi grown on glucose-based submerged cultures. *Bioproc Biosyst Eng*, 2014, 37, 1385-1400.

Fazenda M.L., Seviour R., Moniel B., Harvey L.M., Submerged culture fermentation of higher fungi: The macrofungi. *Avl Appl Microbiology*, 2008, 63, 33-103.

Fickers P., Benetti, P.H., Wache Y., Marty A., Mauersberger S., Smit M, Nicaud J-M., :Hydrophobic substrate utilization by the yeast *Yarrowia lipolytica*, and its potential applications. *FEMS Yeast Res* 2005, 5, 527-543.

Filippoussi R., Antoniou D., Tryfinopoulou P., Isolation, identification and screening of yeasts towards their ability to assimilate biodiesel-derived crude glycerol: microbial

production of polyols, endopolysaccharides and lipid. *J Appl Microbiol* 2019;**127**:1080–1100

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

Gern R.M.M., Wisbeck E., Rampinelli J.R., Ninow J.L., Furlan S.A., Alternative medium for production of *Pleurotus ostreatus* biomass and potential antitumor polysaccharides. *Bioresource Technology*, 2008, 99, 76-82.

Groenewald, 2014. *Yarrowia lipolytica* Safety assessment of an oleaginous yeast with a great industrial potential.

Holzschu D.L., Chandler F.W., Ajello L. & Ahearn, D.G.:. Evaluation of industrial yeasts for pathogenicity. *Sabouraudia*, 1979, 17, 71–78.

Kamzolova S.V., Finogenova T.V., Morgunov I.G., Chernyvsckaya O.G., 2005. Organic acid production by the Yeast *Yarrowia lipolytica*: A review of prospects.

Kamzolova S.V., Finogenova T.V., Lunina Yu. N., 2007. Characteristics of the growth on rapeseed oil and synthesis of citric and isocitric acids by *Yarrowia lipolytica* yeasts.

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

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

Makri A., Fakas S., Aggelis G., Metabolic activities of biotechnological interest in *Yarrowia lipolytica* grown on glycerol in repeated batch cultures, *Bioresour Technol*, 2010, 101, 2351-2358.

Maitland, Jr Jones, Organic Chemistry. W W Norton & Co Inc (Np), 1998, p.139.

Miller, G. L., Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*, 1959, 31(3), 426–428.

Pagliari M., Ciriminna R., Kimura H., Rossi M., Della Pina C., From Glycerol to Value-added Products. *Angewandte Chemie International Edition*, 2007, 46, 4434-4440.

Pagliari, M., Rossi, M. 2008. The future of glycerol: New usages for a versatile raw material.

Pagliari, M., Rossi, M.: Glycerol: properties and production. *The future of glycerol*, 2010, 20-21.

Papanikolaou S., Fakas S., Fick M., Chevalot I., Galiotou–Panayotou M., Komaitis M., Marc I., Aggelis, G., Biotechnological valorisation of raw glycerol discharged after bio–diesel (fatty acid methyl–esters) manufacturing process: production of 1,3–propanediol, citric acid and single cell oil. *Biomass and Bioenergy*, 2008, 32, 60–71.

Papanikolaou S., Microbial Conversion of Glycerol into 1,3-propanediol: Glycerol Assimilation, Biochemical Events Related with 1,3-propanediol Biosynthesis and Biochemical engineering of the process. In: Aggelis G (Editor) *Microbial Conversions of Raw Glycerol*, Nova Science Publishers Inc, 2009, 137-168.

Papanikolaou S., Aggelis G., Biotechnological valorization of biodiesel derived glycerol waste through production of single cell oil and citric acid by *Yarrowia lipolytica*. *Lipid Technology*, 2009, 21(4), 83-87.

Papanikolaou S., Aggelis G., *Yarrowia lipolytica*: A model microorganism used for the production of tailor-made lipids. *Eur J Lipid Sci Technol* 2010, 112, 639-654.

Papanikolaou S., Aggelis G., Lipids of oleaginous yeasts. Part I: Biochemistry of single cell oil production. *Eur J Lipid Sci Technol* 2011a, 113, 1031-1051.

Papanikolaou S., Aggelis G., Lipids of oleaginous yeasts. Part II: Technology and potential applications. *Eur J Lipid Sci Technol* 2011b, 113, 1052-1073.

Papanikolaou, S., Aggelis, G., Sources of microbial oils with emphasis to *Mortierella* (*Umbelopsis*) *isabellina* fungus. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2019, 35, 63

Rahmat, N., Abdullah, A.Z., and Mohamed, A.R. 2010. Recent progress on innovative and potential technologies for glycerol transformation into fuel additives: A critical review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 14, 987–1000.

Ray, Ramesh C, *Environment Studies*, and Joshi V., 2014. “Fermented Foods: Past, Present and Future,” no. November.

Sarris D., Galiotou – Panayotou M., Koutinas A.A., Komaitis M., Papanikolaou S., Citric acid, biomass and cellular lipid production by *Yarrowia lipolytica* strains cultivated on olive mill wastewater-based media. *J. Chem Technol Biotechnol*, 2011, 86, 1439-1448.

Sarris, D., Papanikolaou. S., “Biotechnological Production of Ethanol : Biochemistry , Processes and Technologies,” 2016, 307–29.

Shivaji.,2009, *Taxonomy of the species Bacillus aryabhatai*.

Stacey M., Barker S., *Uglevody zhivikh tkanei*. Moscow, (Translated from English.) *Khimiia uglevodov*. Moscow, 1967.

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

Tomaszewska, L., Rywinska, A., 2012, Production of erythritol and mannitol by *Yarrowia lipolytica* yeast in media containing glycerol.

Tryfinopoulou P, Tsakalidou E & Nychas GJE Characterization of *Pseudomonas* spp. associated with spoilage of gilt-head sea-bream stored under various conditions. *Appl Environ Microbiol* 2002;68:65–72

Van der Walt JP, & Van Arx, JA.,1980. The yeast genus *Yarrowia* gen. nov. *Antonie van Leeuwenhoek*, 46, 517–521.

Van Gerpen J., Shanks B, Pruszko R., Clements D., Knothe G., Biodiesel production technology. *National Renewable Energy Laboratory*, 2004, 510-36244.

Wickerham L.J., Kurtzman C.P., & Herman A.I.: Sexual reproduction in *Candida lipolytica*. *Science*, 1970, 167, 1141.

Wu J., Ding Z.Y., Zhang K.C., Improvement of exopolysaccharide production by macro fungus *Auricularia auricularia* submerged culture. *Enzyme and Microbial Technology*, 2006, 39, 743-749.

Yarrow D., Four new combinations in yeasts. *Antonie van Leeuwenhoek*, 1972, 38, 357–360.

Yin X, *et al.* 2012. Enhanced alpha-ketoglutaric acid production in *Yarrowia lipolytica* WSH-Z06 by regulation of the pyruvate carboxylation pathway.

Zinoviev, Sergey, Franziska Müller-langer, Piyali Das, and Nicols Bertero. “Next-Generation Biofuels: Survey of Emerging Technologies and Sustainability Issues,” 2010. 1106–33.