

**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ**  
**ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ**

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ**  
**ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ ΚΑΙ ΑΣΦΑΛΕΙΑΣ**  
**ΤΡΟΦΙΜΩΝ**

Εργαστήριο μικροβιολογίας και βιοτεχνολογίας τροφίμων



**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**  
**ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΖΥΜΟΜΥΚΗΤΩΝ ΣΤΗΝ**  
**ΑΚΑΘΑΡΤΗ ΓΛΥΚΕΡΟΛΗ ΠΡΟΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΩΝ**  
**ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΥΨΗΛΗΣ ΠΡΟΣΤΙΘΕΜΕΝΗΣ ΑΞΙΑΣ**

Κανής Ι. Αρίσταρχος-Χρήστος

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ:

Σεραφείμ Παπανικολάου, Καθηγητής ΓΠΑ

ΑΘΗΝΑ 2020

**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ**

**ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ**

Εργαστήριο μικροβιολογίας και βιοτεχνολογίας τροφίμων

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΖΥΜΟΜΥΚΗΤΩΝ ΣΤΗΝ  
ΑΚΑΘΑΡΤΗ ΓΛΥΚΕΡΟΛΗ ΠΡΟΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΩΝ  
ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΥΨΗΛΗΣ ΠΡΟΣΤΙΘΕΜΕΝΗΣ ΑΞΙΑΣ**

“STUDY OF YEAST STRAIN GROWTH ON CRUDE GLYCEROL IN  
ORDER TO PRODUCE ADDED VALUE METABOLITES”

Κανής Ι. Αρίσταρχος-Χρήστος

Εξεταστική Επιτροπή:

Σεραφείμ Παπανικολάου, Καθηγητής ΓΠΑ

Ελευθέριος Δροσινός, Καθηγητής ΓΠΑ

Νικόλαος Στοφόρος, Καθηγητής ΓΠΑ

## Μελέτη της ανάπτυξης στελεχών ζυμομυκήτων στην ακάθαρτη γλυκερόλη προς παραγωγή μεταβολικών προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας

Τμήμα επιστήμης τροφίμων και διατροφής του ανθρώπου  
Εργαστήριο μικροβιολογίας και βιοτεχνολογίας τροφίμων

### ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο σκοπός της μελέτης ήταν η διεξαγωγή διερευνητικών πειραμάτων σχετικά με την ικανότητα ορισμένων ζυμομυκήτων να αναπτύσσονται καταναλώνοντας ως πηγή άνθρακα την ακάθαρτη βιομηχανική γλυκερόλη και να παράγουν μεταβολίτες υψηλής προστιθέμενης αξίας. Η ακάθαρτη γλυκερόλη είναι το κύριο παραπροϊόν της διαδικασίας παραγωγής βιοντίζελ και προκύπτει από την αντίδραση μετεστεροποίησης των τριγλυκεριδίων μαζί με μια αλκοόλη, προς παραγωγή νέων εστέρων και μιας νέας αλκοόλης. Τα τελευταία χρόνια, λόγω των πολιτικών που ακολουθούνται διεθνώς αναφορικά με την αύξηση της χρήσης των βιοκαυσίμων, έχει αυξηθεί ραγδαία και η παραγωγή της γλυκερόλης. Αυτό έχει ως συνέπεια την πτώση της αξίας της ακόμα και σε αρνητικά επίπεδα λόγω της υπερεπάρκειας που έχει δημιουργηθεί.

Τα στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη ανήκουν στα είδη *Pichia membranifaciens*, *Wickerhamomyces anomalus* (*Pichia anomala*), *Kazachstania humilis* και *Rhodosporidium toruloides*. Οι καλλιέργειες έλαβαν χώρα σε περιοριστικές σε άζωτο (N) συνθήκες, οι οποίες επάγουν τη σύνθεση λιπιδίων, πολυσακχαριτών και λοιπών δευτερογενών μεταβολιτών. Τα στελέχη του τελευταίου είδους (*R. toruloides*) καλλιεργήθηκαν ως μάρτυρες για την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων των υπολοίπων καθώς με βάση τα βιβλιογραφικά δεδομένα τα περισσότερα στελέχη του είδους αυτού είναι ελαιογόνα. Οι υγρές καλλιέργειες πραγματοποιήθηκαν σε αναδεδυόμενες κωνικές φιάλες Erlenmeyer των 250 mL σε υπόστρωμα ακάθαρτης γλυκερόλης αρχικής συγκέντρωσης 60 g/L. Η επώαση έγινε στις 180 στροφές ανά λεπτό, σε σταθερή θερμοκρασία 30°C και σε ρυθμιζόμενο pH 5-6. Κατά την διάρκεια των ζυμώσεων γινόταν μέτρηση της παραγωγής βιομάζας καθώς και άλλων κινητικών, όπως της παραγωγής λίπους, της κατανάλωσης του υποστρώματος, της παραγωγής πολυολών και ενδοπολυσακχαριτών. Η μέτρηση της βιομάζας γινόταν έπειτα από φυγοκέντρηση και ξήρανση του περιεχομένου της

φιάλης. Στη συνέχεια, από την ξηρή βιομάζα έγινε η εκχύλιση και ποσοτική μέτρηση του λίπους καθώς και ο προσδιορισμός των ενδοπολυσακχαριτών (IPS). Η παρακολούθηση της κατανάλωσης της γλυκερόλης και της παραγωγής πολυολών έγινε με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC). Τέλος, η ποιοτική ανάλυση των λιπιδίων έγινε αρχικά με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC) και στη συνέχεια, αφού έγινε μεθυλεστεροποίηση των λιπαρών οξέων, έγινε ανάλυση σε αέριο χρωματογράφο (GC).

Από τις διαδικασίες αυτές προέκυψαν τα παρακάτω δεδομένα. Οι σημαντικότερες παραγωγές βιομάζας προήλθαν από τα εξής στελέχη: *R. toruloides* 48190 (17,74 g/L), *P. membranifaciens* N3 (14,12 g/L), *W. anomalus* H7A (11,36 g/L) και *W. anomalus* H12B (10 g/L). Την μεγαλύτερη παραγωγή μικροβιακού λίπους σημείωσαν τα: *R. toruloides* 48190 (5,22 g/L) και *P. membranifaciens* N3 (2,31 g/L). Σημαντική παραγωγή πολυολών (αραβιτόλης) σημείωσαν μόνο τα στελέχη του *W. anomalus* και συγκεκριμένα το H7A (12,47 g/L), το H12B (11,45 g/L) και το H3A (9,03 g/L). Το μεγαλύτερο ποσοστό ενδοπολυσακχαριτών (IPS) επί της ξηρής βιομάζας βρέθηκε στα *R. toruloides* 17902 (14,8%) και *R. toruloides* 48190 (13,2%). Αν και η παραγωγή λίπους δεν ήταν μεγάλη σχεδόν σε καμία ζύμωση, η ανάλυση των μικροβιακών λιπιδίων έδωσε ενδιαφέροντα αποτελέσματα καθώς διαπιστώθηκε από την TLC πως τα κύρια συστατικά των μικροβιακών ελαίων είναι τα τριγλυκερίδια (TAGs). Τα λιπίδια των ζυμών αναλύθηκαν και ως προς τη σύστασή τους σε λιπαρά οξέα και παρατηρήθηκε ότι σε πολλές περιπτώσεις τα λιπίδια αυτά αποτελούνταν από C16 και C18 λιπαρά οξέα (κυρίως ελαϊκό και παλμιτικό οξύ). Με ενδιαφέρον εδείχθη ότι το λίπος ορισμένων στελεχών φαίνεται να αποτελείται σε μεγάλο ποσοστό από λιπαρά οξέα με αριθμό ανθράκων >18, και κυρίως από αραχιδικό οξύ (C20:0).

**Επιστημονική περιοχή:** Αξιοποίηση βιομηχανικής γλυκερόλης.

**Λέξεις κλειδιά:** *Pichia membranifaciens*, *Wickerhamomyces anomalus*, υγρή καλλιέργεια, γλυκερόλη, λίπος, αραβιτόλη

## **Study of yeast strain growth on crude glycerol in order to produce added value metabolites**

Department of food science and human nutrition

Laboratory of food microbiology and biotechnology

### **ABSTRACT**

The purpose of this study was to conduct a series of screening experiments regarding the ability of some yeast species to consume raw glycerol, as the carbon source, in order to produce added value metabolites. Raw glycerol is the main by-product of the biodiesel production industry and it derives from the transesterification reaction of triglycerides (TAGs) with an alcohol in order to produce another ester and another alcohol. Due to the policies of recent years, regarding biofuel use, the production of glycerol has increased tremendously. This has led to a drop in its value even to negative levels as a result of its abundance.

The strains used in this study belong to the species *Pichia membranifaciens*, *Wickerhamomyces anomalus* (*Pichia anomala*), *Kazachstania hulilis* and *Rhodosporidium toruloides*. The experiments took place in nitrogen (N) limited conditions which stimulate the biosynthesis of lipids, polysaccharides and other secondary metabolites. The strains of the later (*R. toruloides*) were cultivated as a control for evaluating the others as most strains of this species, according to the literature, are oleaginous. The experiments were conducted in Erlenmeyer shake flasks of 250 mL capacity and 60 g/L initial glycerol concentration, at 180 rpm and at a constant temperature of 30°C. The pH was maintained around 5-6 throughout the cultivation. During the experiments the production of biomass was measured along with the glycerol consumption and the production of single cell oils, polyols and intracellular polysaccharides (IPS). The dry biomass was measured after centrifuging and drying the content of the flasks. After that, the lipids were extracted and measured from the dry biomass as well as the IPS. Those were measured using DNS. The glycerol consumption and the polyol production were monitored using High Performance Liquid Chromatography (HPLC). The lipid analysis was done at first using Thin Layer Chromatography (TLC) and second, with Gas Chromatography (GC) after the methyl esterification of the fatty acids.

From all these methods the following data were extracted. The highest dry biomass values were achieved by the strains: *R. toruloides* 48190 (17.74 g/L), *P. membranifaciens* N3 (14.12 g/L), *W. anomalus* H7A (11.36 g/L) and *W. anomalus* H12B (10 g/L). The most notable lipid production was achieved by *R. toruloides* 48190 (5.22 g/L) and *P. membranifaciens* N3 (2.31 g/L). The polyol (arabitol) production was not particularly big but not negligible and was done by the *W. anomalus* strains and H7A (12.47 g/L), H12B (11.45 g/L) and H3A (9.03 g/L) in particular. The highest percentage of IPS in the dry biomass was found in *R. toruloides* 17902 (14.8%) and *R. toruloides* 48190 (13.2%). Even though the single cell oil values were not great in almost none of the experiments conducted, its analysis with TLC gave interesting results, as it revealed that it consists mainly by TAGs. The microbial lipids when analyzed in a GC revealed that in many cases, they consist of C16 and C18 fatty acids (mainly oleic and palmitic acids). It is also interesting that the lipids of some strains consist in large part of big chain fatty acids (C>18) and mainly of arachidic acid.

**Scientific area:** Utilization of crude glycerol.

**Key words:** *Pichia membranifaciens*, *Wickerhamomyces anomalus*, liquid culture, glycerol, single cell oil, arabitol

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η συγκεκριμένη πτυχιακή μελέτη έλαβε χώρα στο εργαστήριο μικροβιολογίας και βιοτεχνολογίας τροφίμων του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, στα πλαίσια του μεταπτυχιακού μου με τίτλο «Συστήματα Διαχείρισης Ποιότητας και Ασφάλειας Τροφίμων». Καταλυτική για την επιτυχή ολοκλήρωσή της ήταν ορισμένοι άνθρωποι τους οποίους θα ήθελα σε αυτό το σημείο να ευχαριστήσω προσωπικά.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον επιβλέποντα Καθηγητή μου κ. Σεραφείμ Παπανικολάου για την μετάδοση γνώσης, την καθοδήγηση κατά την διάρκεια της πειραματικής πορείας, της συγγραφής και την συνολική εποπτεία αυτής της προσπάθειας. Επίσης θέλω να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στην διδάκτορα Μαρκέλλα Τζιρίτα, η βοήθεια της οποίας ήταν καθοριστική σε όλα τα στάδια της μελέτης, τις υποψήφιες διδάκτορες Σαββούλα Μίχου και Ελένη Βασταρούχα, την κ. Ουρανία Καλαντζή (ΕΔΙΠ), αλλά και τα έτερα μέλη της εξεταστικής μου επιτροπής, τους Καθηγητές Ελευθέριο Δροσινό και Νικόλαο Στοφόρο.

Επιπλέον, οφείλω να ευχαριστήσω όλους τους συμφοιτητές και συναδέλφους μου με τους οποίους συνεργάστηκα άριστα και με τους οποίους ήρθα σε επαφή εντός και εκτός εργαστηρίου, δημιουργώντας φιλίες και πολύ καλές αναμνήσεις.

Τέλος, το μεγαλύτερο ευχαριστώ πρέπει να πω στην οικογένειά μου, οι θυσίες και η υπομονή της οποίας μου επέτρεψαν να ολοκληρώσω τις σπουδές μου στο αντικείμενο που επέλεξα και να είμαι σε θέση να παρουσιάσω ολοκληρωμένη αυτή τη μελέτη.

Χρήστος Κανής

Αθήνα, 2020

## Περιεχόμενα

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	10
1.1 Γλυκερόλη.....	10
1.1.1 Χρήσεις της γλυκερόλης .....	10
1.1.2 Παραγωγή γλυκερόλης .....	11
1.1.3 Ο μεταβολισμός της γλυκερόλης από τους μύκητες.....	16
1.2 Βιοντίζελ.....	19
1.2.1 Διαδικασία παραγωγής του βιοντίζελ .....	20
1.2.2 Το βιοντίζελ σήμερα .....	22
1.3 Ζύμες .....	24
1.3.1 <i>Pichia membranifaciens</i> .....	25
1.3.2 <i>Wickerhamomyces anomalus</i> .....	26
1.3.3 <i>Rhodosporidium toruloides</i> .....	27
1.4 Μεταβολικά προϊόντα.....	29
1.4.1 Λιπίδια.....	29
1.4.2 Ενδοπολυσακχαρίτες.....	33
1.4.3 Πολυόλες – Αραβιτόλη .....	36
1.4.4 Κιτρικό οξύ.....	38
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	41
2.1 Μικροοργανισμοί .....	41
2.1.1 Διατήρηση μικροοργανισμών.....	42
2.2.2 Παρασκευή υγρού εμβολίου.....	42
2.2 Θρεπτικό μέσο καλλιέργειας.....	42
2.3 Ανάλυση πειραματικών σταδίων.....	43
2.4 Αναλύσεις .....	44
2.4.1 Διόρθωση του pH.....	45
2.4.2 Προσδιορισμός βιομάζας .....	45
2.4.3 Προσδιορισμός ενδοπολυσακχαριτών (IPS) .....	45



2.4.4 Ποσοτικός προσδιορισμός ενδοκυτταρικού λίπους .....	47
2.4.5 Ποιοτική ανάλυση του λίπους σε χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC) .....	47
2.4.6 Μεθυλεστεροποίηση λιπαρών οξέων .....	48
2.4.7 Ποιοτική ανάλυση της σύνθεσης του λίπους σε αέριο χρωματογράφο (GC) .....	49
2.4.8 Ανάλυση με χρήση υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC) .....	49
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ .....	51
3.1 Ζύμωση του στελέχους <i>Pichia membranifaciens</i> N3 .....	54
3.2 Ζύμωση του στελέχους <i>Pichia membranifaciens</i> N9 .....	57
3.3 Ζύμωση του στελέχους <i>Pichia membranifaciens</i> N12 .....	59
3.4 Ζύμωση του στελέχους <i>Pichia membranifaciens</i> Δ8 .....	62
3.5 Ζύμωση του στελέχους <i>Pichia membranifaciens</i> Δ10 .....	64
3.6 Ζύμωση του στελέχους <i>Wickerhamomyces anomalus</i> H3A .....	65
3.7 Ζύμωση του στελέχους <i>Wickerhamomyces anomalus</i> H7A .....	68
3.8 Ζύμωση του στελέχους <i>Wickerhamomyces anomalus</i> H12B.....	70
3.9 Ζύμωση του στελέχους <i>Rhodospiridium toruloides</i> 48190.....	72
3.10 Ζύμωση του στελέχους <i>Rhodospiridium toruloides</i> 17902.....	75
3.11 Ανάλυση παραγόμενων μικροβιακών λιπιδίων .....	77
3.11.1 <i>P. membranifaciens</i> N12 .....	77
3.11.2 <i>W. anomalus</i> H12B .....	78
3.11.3 <i>R. toruloides</i> 48190.....	79
3.11.4 <i>R. toruloides</i> 17902.....	80
3.12 Ποιοτική ανάλυση λιπαρών οξέων με χρήση GC.....	81
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	83
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	91

## 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

### 1.1 Γλυκερόλη

Η γλυκερόλη ή αλλιώς γλυκερίνη αποτελεί την εμπειρική ονομασία της χημικής οργανικής ένωσης 1,2,3-προπανοτριόλης, μιας τρισθενούς αλκοόλης με χημικό τύπο  $\text{CH}_2\text{OH}-\text{CHOH}-\text{CH}_2\text{OH}$ . Η ονομασία γλυκερόλη προέρχεται από την ελληνική λέξη γλυκός καθώς τη χαρακτηρίζει η γλυκιά γεύση. Με τον όρο γλυκερίνη αναφέρονται περισσότερο τα εμπορικά παρασκευάσματα της γλυκερόλης σε νερό, όπου η συγκέντρωση της καθαρής γλυκερόλης υπερβαίνει το 95%. Την εμπειρική ονομασία γλυκερίνη την οφείλει στον Σεβρέλ (Chevreul) που πρώτος την ονομάτισε από τη γλυκιά γεύση της (Pagliaro et al. 2007).

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. Το ειδικό της βάρος είναι περίπου 1,26 g/mL, το μοριακό της βάρος είναι 92 g/mol, 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. Είναι μια τρισθενής αλκοόλη (τριόλη) η οποία, υπό την επίδραση ήπιων οξειδωτικών μέσων, μετατρέπεται σε γλυκερόζη, ενώ υπό την επίδραση ισχυρών οξειδωτικών μετατρέπεται σε γλυκερινικό οξύ. Θερμαινόμενη με  $\text{KHSO}_4$  σχηματίζει την ακόρεστη αλδεϋδη ακρολεΐνη (Paliagro and Rossi 2008). Στο νερό και στις αλκοόλες είναι διαλυτή ενώ είναι ελαφρά διαλυτή στους περισσότερους κοινούς διαλύτες όπως αιθέρα 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.

#### 1.1.1 Χρήσεις της γλυκερόλης

Η γλυκερίνη παρουσιάζει ένα ευρύ φάσμα χρήσεων, καθώς έχει πάνω από 1,500 γνωστές χρήσεις, 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.

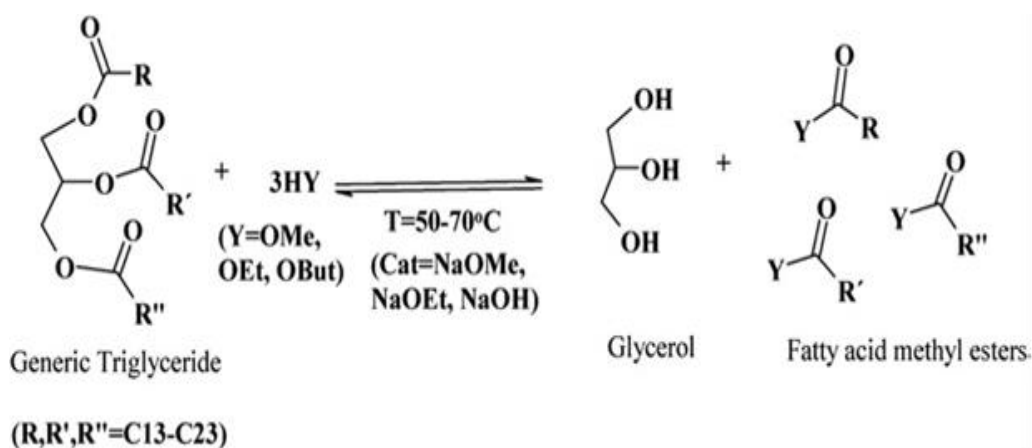
Σημαντική, επίσης, χρήση της γίνεται και ως υποκατάστατου της ζάχαρης σε διαβητικούς, ενώ χρησιμοποιείται με τη μορφή υπόθετου σαν καθαρτικό. Επιπλέον, χρησιμοποιείται στη θεατρική και κινηματογραφική σκηνοθεσία ως "τρικ" υποκαθιστώντας τα πραγματικά δάκρυα. Τέλος, είναι εξαιρετικά σταθερή υπό κανονικές συνθήκες αποθήκευσης, συμβατή με πολλές άλλες χημικές ουσίες, μη ερεθιστική σε διάφορες χρήσεις της και δεν έχει γνωστές αρνητικές περιβαλλοντικές επιπτώσεις (Pagliaro et al. 2007).

Γενικώς η γλυκερόλη μπορεί να αποτελεί υλικό εκκίνησης για την δημιουργία νέων προϊόντων (Pagliaro et al. 2007) μέσω χημικών μετατροπών. Με οξείδωση ή αναγωγή της γλυκερόλης παράγονται προϊόντα με τρία άτομα άνθρακα όπως είναι η δι-υδροξυακετόνη, το γαλακτικό οξύ, το πυροσταφυλικό οξύ, η προπανόλη, η ισοπροπανόλη, η ακετόνη, η ακρολεΐνη, η προπιοναλδεΐδη και το υδροξυ-πυροσταφυλικό (Claude 1999; Rahmat, Abdullah, and Mohamed 2010; da Silva, Mack, and Contiero 2009). Επίσης με την αντίδραση της γλυκερόλης με άλλα μόρια μπορούν να παραχθούν νέα προϊόντα. Ένα τέτοιο παράδειγμα αποτελεί η κατεργασία της γλυκερόλης παρουσία διοξειδίου του άνθρακα για την παραγωγή ανθρακικής γλυκερόλης (glycerol carbonate) (Pagliaro et al. 2007; Rahmat, Abdullah, and Mohamed 2010). Επιπλέον έχει καταγραφεί παραγωγή άλλων ουσιών όπως οργανικά οξέα, λιπίδια, πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFA), οργανικά οξέα, πολυόλες, κοκ από μικροβιακές ζυμώσεις σε γλυκερόλη (Athenaki et al., 2018; Papanikolaou and Aggelis, 2019). Τέλος, η γλυκερόλη έχει χρησιμοποιηθεί σε μερικές μελέτες για την παραγωγή καροτενοειδών. (Mantzouridou, Naziri, and Tsimidou 2008). Τα καροτενοειδή είναι γραμμικά μόρια που περιέχουν συζυγικά συστήματα διπλών δεσμών, στα οποία οφείλεται και το χρώμα τους. Είναι φυσικές χρωστικές, λιποδιαλυτές ουσίες και τα περισσότερα να αποτελούνται από C40 τερπενοειδή. Τα κυριότερα καροτενοειδή που παράγονται από ζύμες είναι η ασταξανθίνη, το β-καροτένιο, το λυκοπένιο και το τορουλένιο (Sandmann 2001).

### **1.1.2 Παραγωγή γλυκερόλης**

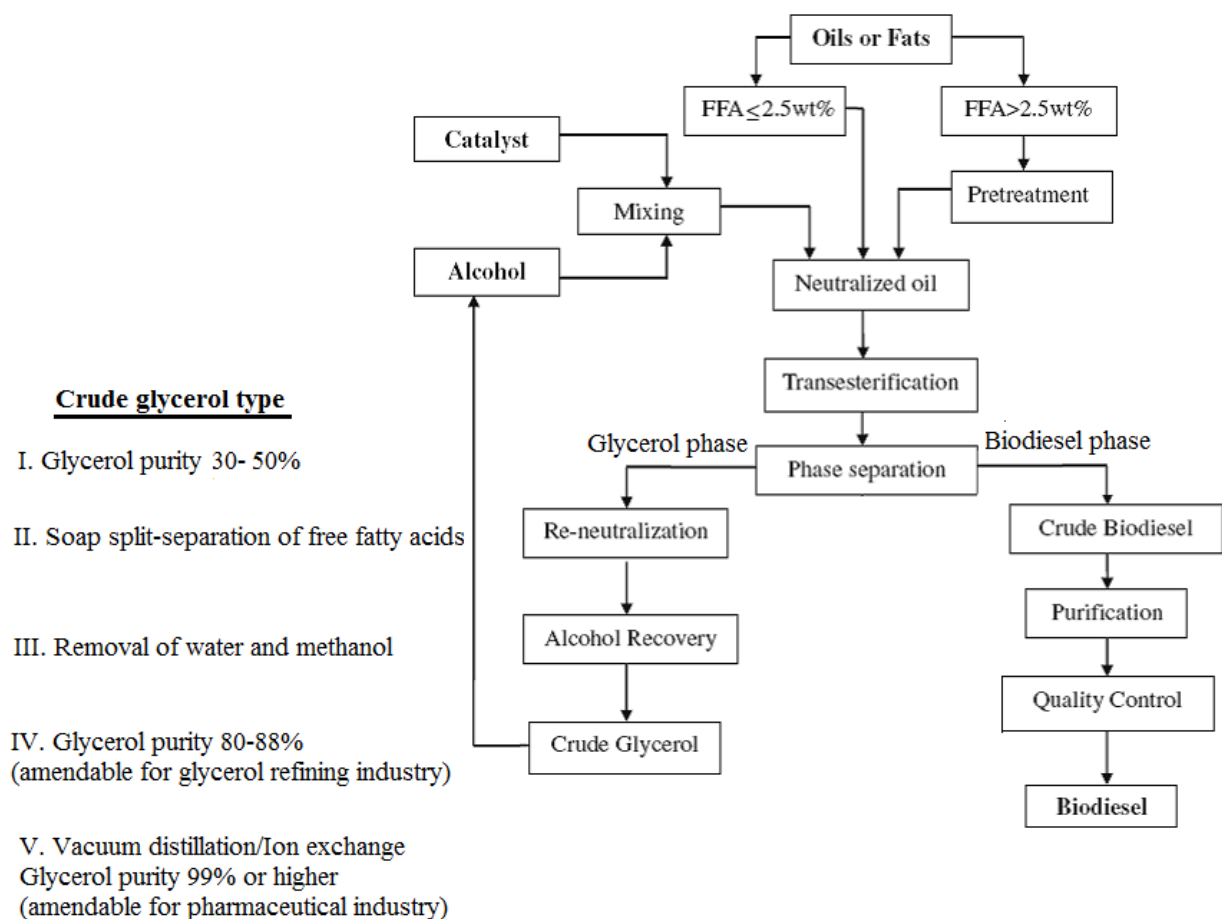
Η παραγωγή της γλυκερόλης επιτυγχάνεται είτε μέσω των μικροβιακών ζυμώσεων, με πιο γνωστή την περίπτωση της ζύμης *Saccharomyces cerevisiae* κατά την τέλεση της αλκοολικής ζύμωσης και συγκεκριμένα κατά τον σχηματισμό των

δευτερογενών μεταβολικών προϊόντων της αλκοολικής ζύμωσης μέσω της γλυκεροπυροσταφυλικής ζύμωσης. Παραδοσιακά, η γλυκερόλη παράγεται βιομηχανικά 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). Η αντικατάσταση όμως όλο και περισσότερο τα τελευταία έτη των σαπώνων με μη σαπωνοειδούς φύσεως απορρυπαντικά, έχει μειώσει σημαντικά την παραγωγή της γλυκερόλης από τη βιομηχανία σαπώνων σε παγκόσμιο επίπεδο. Τα τελευταία χρόνια η πλειονότητα της παγκόσμιας παραγωγής γλυκερόλης προέρχεται από ελαιοχημικές δραστηριότητες, από την βιομηχανία ποτών, την καλλιέργεια του φύκους *Dunalliella*, αλλά κυρίως από την παραγωγή βιοντίζελ. Στην διεργασία αυτή η γλυκερόλη αποτελεί παραπροϊόν σε ποσοστό περίπου 10%. Η σύνθεση του βιοντίζελ και η συνακόλουθη παραγωγή γλυκερόλης εμφανίζεται στο κατωτέρω σχήμα (**Σχήμα 1**) (Chatzifragkou and Papanikolaou 2012).



**Σχήμα 1.** Τυπική αντίδραση μετεστεροποίησης και παραγωγή γλυκερόλης ως υποπροϊόντος της διεργασίας (Chatzifragkou and Papanikolaou 2012).

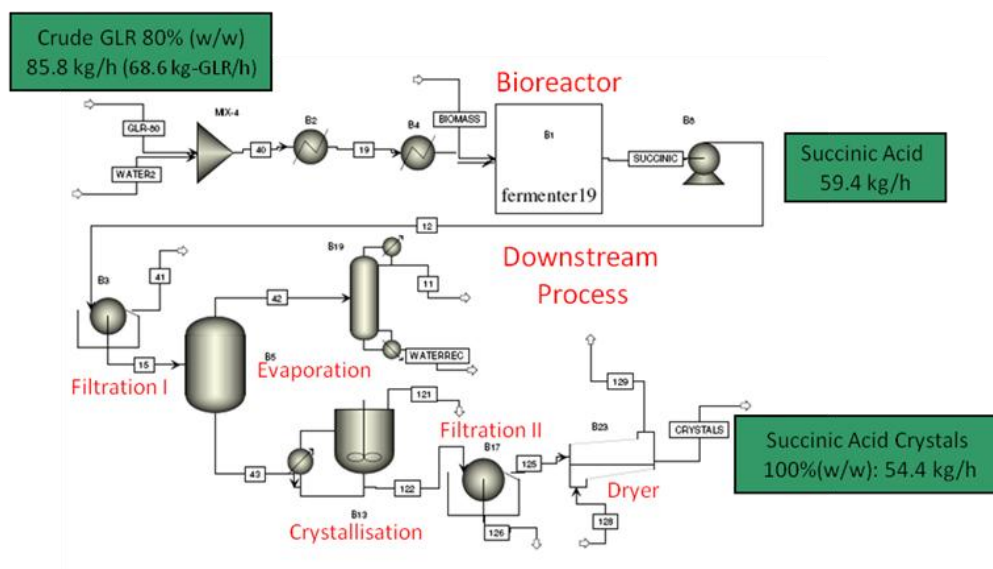
Το διάγραμμα ροής της σύνθεσης βιοντίζελ από εδώδιμα και μη εδώδιμα έλαια μέσω χημικής εστεροποίησης, και της αντίστοιχης παραγωγής γλυκερόλης φαίνεται κατωτέρω σχήμα (**Σχήμα 2**) Chatzifragkou and Papanikolaou 2012).



**Σχήμα 2.** Διάγραμμα ροής μετεστεροποίησης λιπαρών υλών προς παραγωγή βιοντίζελ και παραγωγή γλυκερόλης ως υποπροϊόντος της διεργασίας (Chatzifragkou and Papanikolaou 2012).

Λόγω της μεγάλης αύξησης στις παραγόμενες ποσότητες βιοντίζελ τα τελευταία έτη, έχει υπάρξει αναπόφευκτα και πολύ μεγάλη αύξηση στην παραγωγή ακάθαρτης γλυκερόλης ως το κύριο παραπροϊόν της διαδικασίας. Η πολύ μεγάλη αυτή παραγωγή γλυκερόλης έχει αντίκτυπο τόσο σε οικονομικό όσο και σε οικολογικό επίπεδο. Οι ποσότητες ακάθαρτης γλυκερόλης που συσσωρεύονται και παραμένουν ανεκμετάλλευτες, προκάλεσαν οικονομική κρίση στους τομείς παραγωγής και εμπορίας της γλυκερόλης (McCoy 2005; 2006). Το αποτέλεσμα ήταν να μειωθεί η τιμή της σε σημείο που κάποιες χρονιές (π.χ. το 2007) να θεωρείτο ως ένα τυπικό βιομηχανικό απόβλητο με σχεδόν μηδενική ή και αρνητική ακόμα αξία (Adhikari, Fernando, and Haryanto 2009). Συνήθως η γλυκερόλη που παράγεται δεν είναι καθαρή, αλλά περιέχει πλήθος προσμείξεων και υπολειμμάτων όπως αλκοόλες, βαρέα μέταλλα και ελεύθερα λιπαρά οξέα, άλατα και άλλες χημικές ουσίες που καθιστούν επιτακτικό τον καθαρισμό της προκειμένου η βιομηχανική γλυκερόλη να

αποτελέσει πρώτη ύλη για την παραγωγή προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας μέσω χημικών-βιοχημικών τεχνικών ή βιοτεχνολογικών διεργασιών. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η δυνατότητα αξιοποίησης της ακάθαρτης γλυκερόλης μέσω μικροβιακών ζυμώσεων για την παραγωγή προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας όπως είναι το κιτρικό οξύ, το ηλεκτρικό οξύ, το προπιονικό οξύ, το μικροβιακό λίπος, οι πολυόλες, η αιθανόλη, η δι-υδρόξυ-ακετόνη, τα πολύ-υδρόξυ-αλκανοϊκά οξέα και η 1,3-προπανοδιόλη (Amaral et al. 2009; André et al. 2010; Chatzifragkou et al. 2011; Chatzifragkou and Papanikolaou 2012; Fan, Burton, and Zhou 2010; Ito et al. 2005; Koller et al. 2005; Lee et al. 2004; Papanikolaou et al. 2008; Papanikolaou and Aggelis 2002; Pyle and Wen 2008; da Silva, Mack, and Contiero 2009; Yazdani and Gonzalez 2007) (Πίνακας 1.1).



**Σχήμα 3.** Διάγραμμα ροής παραγωγής και ανάκτησης - καθαρισμού του ηλεκτρικού οξέος χρησιμοποιώντας τη γλυκερόλη ως υλικό εκκίνησης.

Ένα σενάριο παραγωγής και ανάκτησης – καθαρισμού ενός μεταβολίτη υψηλής προστιθέμενης αξίας (ηλεκτρικό οξύ) χρησιμοποιώντας τη γλυκερόλη ως υλικό εκκίνησης, με διεργασίες μικροβιακής ζύμωσης, φαίνεται στο ανώτερο σχήμα (Koutinas et al 2014).

**Πίνακας 1.1.** Ενδεικτικά προϊόντα που παράγονται μέσω της ζύμωσης της γλυκερόλης (Yazdani and Gonzalez 2007; Papanikolaou and Aggelis 2009; Papanikolaou et al 2008; Chatzifragkou and Papanikolaou 2012; Koutinas et al 2014).

<b>Στέλεχος</b>	<b>Προϊόν</b>
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	
<i>K. oxytoca</i>	
<i>Clostridium butyricum</i>	1,3-Propanediol
<i>Citrobacter freundii</i>	
<i>Enterobacter agglomerans</i>	
<i>K. pneumoniae</i>	2,3-Butanediol
<i>Kluyvera cryocrescens</i>	
<i>K. pneumoniae</i>	
<i>K. oxytoca</i>	Ethanol
<i>C. freundii</i>	
<i>E. coli</i>	Lactic acid
<i>Anaerobiospirillum succiniciproducens</i>	Succinic acid
<i>Propionibacterium acidipropionic</i>	Propionic acid
<i>Serratia marcescens</i>	Prodiognosin
<i>Yarrowia lipolytica</i>	Citric acid
<i>Yarrowia lipolytica</i>	Mannitol
<i>Yarrowia lipolytica</i>	Arabitol
<i>Yarrowia lipolytica</i>	Erythritol
<i>Yarrowia lipolytica</i>	
<i>Rhodospiridium toruloides</i>	
<i>Lipomyces starkeyi</i>	Microbial oil
<i>Thamnidium elegans</i>	
<i>Mortierella isabellina</i>	

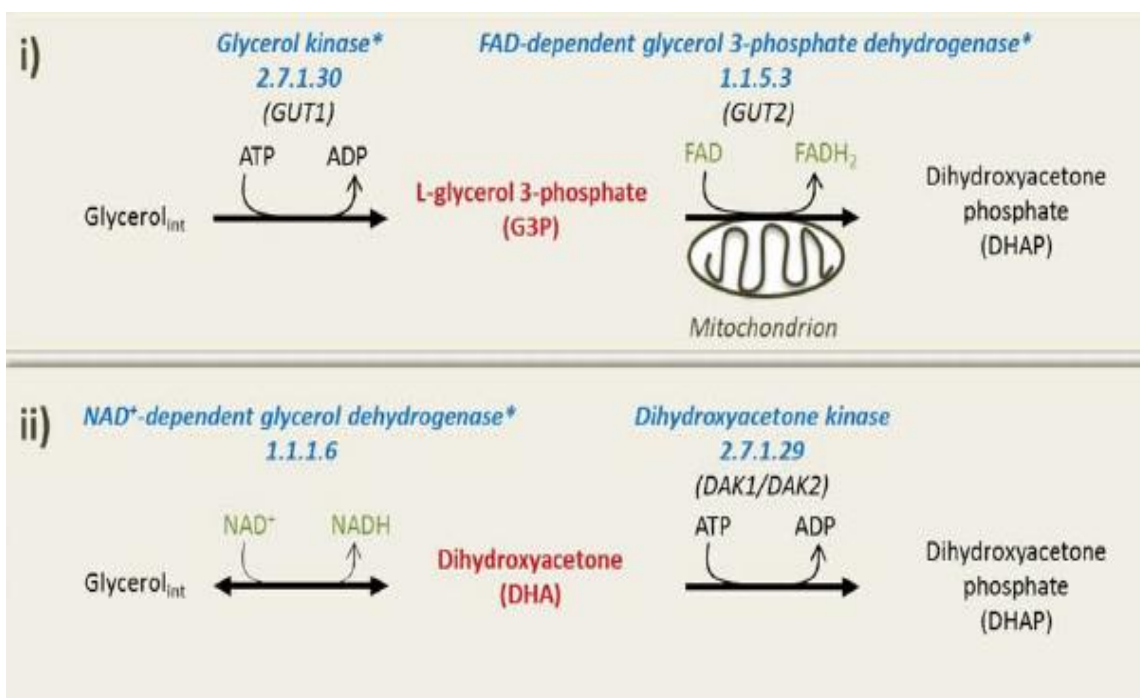
### 1.1.3 Ο μεταβολισμός της γλυκερόλης από τους μύκητες

Η ικανότητα των κυττάρων να καταβολίζουν την περιβαλλοντικώς διαθέσιμη γλυκερόλη ως πηγή άνθρακα έχει γίνει γνωστή από πλήθος μελετών. Χαρακτηριστικά αυτή η ικανότητα έχει αναφερθεί σε αρχαιοβακτήρια (Falb et al. 2008), ακόμη και σε ανθρώπινα κύτταρα (Hibuse et al. 2006). Ορισμένα είδη ζυμών και μυκήτων έχουν την ικανότητα να παράγουν και να αποθηκεύουν γλυκερόλη. Αυτό αποτελεί μηχανισμό αντοχής των συγκεκριμένων μικροοργανισμών στο ωσμωτικό στρες (Klein et al. 2017). Σύμφωνα με την βιβλιογραφία τα διάφορα είδη ζυμών, ακόμη και τα διαφορετικά στελέχη μέσα στο ίδιο είδος, παρουσιάζουν ιδιαιτερότητες ως προς την ικανότητά τους να καταναλώνουν την γλυκερόλη ως μοναδική πηγή άνθρακα (Kurtzman 2011). Ωστόσο, οι διαφορές αυτές μπορεί να οφείλονται και στα ποιοτικά χαρακτηριστικά του θρεπτικού υποστρώματος στο οποίο αναπτύσσεται η ζύμη και όχι αποκλειστικά στο είδος και το στέλεχος (Vasiliadis et al. 1987). Συγκεκριμένα έχει δειχθεί σε μελέτη με την ζύμη *Saccharomyces cerevisiae* ότι η προσθήκη αμινοξέων, νουκλεοβάσεων ή σύνθετων συμπληρωμάτων όπως πεπτόνη και εκχύλισμα ζύμης επηρεάζουν θετικά την κατανάλωση της γλυκερόλης όταν αυτή διατίθεται ως αποκλειστική πηγή άνθρακα στην καλλιέργεια (Merico et al. 2011; Swinnen et al. 2013). Επιπλέον έχει αποδειχθεί ότι σε ορισμένες ζύμες ο περιορισμός του αζώτου στο μέσο ανάπτυξης επηρεάζει θετικά τον ρυθμό κατανάλωσης της γλυκερόλης και μετατροπής της σε χρήσιμα μεταβολικά προϊόντα όπως λιπίδια και ενδοπολυσακχαρίτες (Diamantopoulou et al., 2020). Σε μελέτη συγκριτικής αξιολόγησης 42 ειδών ζυμών σε υπόστρωμα γλυκερόλης φάνηκε πως οι ζύμες *Cyberlindnera jadinii* και *Wickerhamomyces anomalus* παρουσίασαν τον μεγαλύτερο ρυθμό ανάπτυξης (Lages et al. 1999).

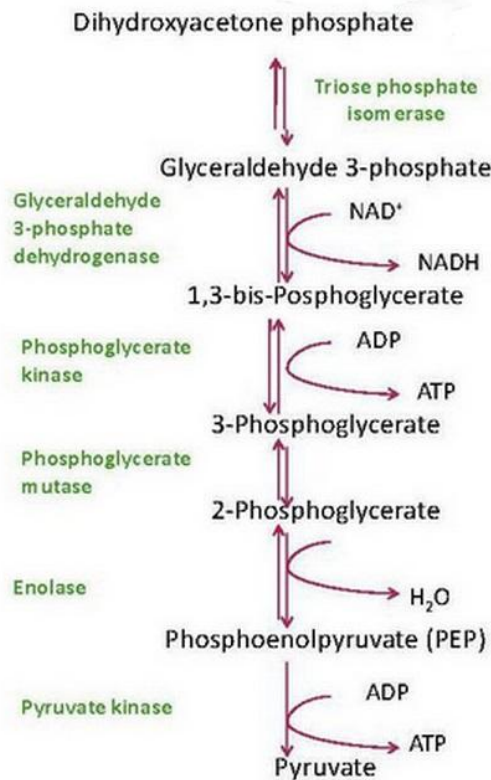
Παρομοίως με τα βακτήρια, έχουν αναφερθεί δύο μηχανισμοί καταβολισμού της γλυκερόλης από της ζύμες και τους μύκητες (Klein et al. 2017) (Σχήμα 1). Ο πρώτος αναφέρεται ως G3P μονοπάτι καθώς η γλυκερόλη φωσφορυλιώνεται και σχηματίζει 3-φωσφορική γλυκερόλη ως ενδιάμεσο προϊόν. Αυτός ο τρόπος μεταβολισμού είναι κοινός σε πολλούς μύκητες. Οι αντιδράσεις του είναι ενζυμικές και περιλαμβάνει μία κινάση της γλυκερόλης καθώς και το ένζυμο FAD-εξαρτώμενη αφυδρογονάση της 3-P-γλυκερόλης το οποίο βρίσκεται στην εσωτερική μεμβράνη του μιτοχονδρίου. Ο δεύτερος μηχανισμός καταβολισμού αναφέρεται ως DHA μονοπάτι. Αυτός ξεκινά με την οξειδωση της γλυκερόλης σε δι-υδροξυακετόνη



(DHA) μέσω του ενζύμου NAD<sup>+</sup>-εξαρτώμενη αφυδρογονάση της γλυκερόλης. Στη συνέχεια, αυτό το ενδιάμεσο προϊόν φωσφορυλιώνεται προς παραγωγή φωσφορικής δι-υδροξυακετόνης (DHAP) μέσω του ενζύμου DHA κινάση. Μόνο μία μελέτη έχει δείξει την ύπαρξη του συγκεκριμένου μονοπατιού σε ζύμη χρησιμοποιώντας τον *Schizosaccharomyces pombe* και καταδεικνύοντας το γονίδιο Gld1 ως υπεύθυνο για την παραγωγή του ενζύμου NAD<sup>+</sup>-εξαρτώμενη αφυδρογονάση της γλυκερόλης (Matsuzawa et al. 2010). Η DHAP που παράγεται και από τους δύο μηχανισμούς εισέρχεται στην συνέχεια στο μονοπάτι της EMP-γλυκόλυσης όπως αυτό παρουσιάζεται πιο κάτω. Στο σχήμα που ακολουθεί φαίνονται τα δύο μονοπάτια του μεταβολισμού.



**Σχήμα 4.** Δύο μηχανισμοί καταβολισμού της γλυκερόλης από της ζύμες και τους μύκητες.



**Σχήμα 5.** Παραγωγή ATP και πυροσταφυλικού από την φωσφορική δι-υδροξυακετόνη.

Η φωσφορική δι-υδροξυακετόνη που έχει παραχθεί, μετατρέπεται σε 6-P-γλυκεριναλδεΐδη η οποία με την σειρά της θα φωσφορυλιωθεί προς παραγωγή 1,3-διP-γλυκερικού οξέος. Αυτό θα αποφωσφορυλιωθεί και θα μετατραπεί σε 3-P-γλυκερικό παράγοντας και ένα μόριο ATP. Στη συνέχεια το προϊόν αυτό θα μετατραπεί σε φωσφοενολοπυροσταφυλικό (PEP) προκειμένου αντιδράσει προς παραγωγή πυροσταφυλικού αλλά και ενός επιπλέον μορίου ATP. Στο **Σχήμα 5** γίνεται απεικόνιση του μονοπατιού.

Σύμφωνα με την βιβλιογραφία οι αρχικές μελέτες για τους μηχανισμούς αυτούς βασίστηκαν στην *in vitro* εξέταση της δράσης των ενζύμων εκείνων που είναι υπεύθυνα για τις αντιδράσεις των μονοπατιών (Babel and Hofmann 1982; Tani and Yamada 1987). Με μελέτες τους στις οποίες μετρήθηκαν η παρουσία και η δράση των ενζύμων κινάση της γλυκερόλης και  $\text{NAD}^+$ -εξαρτώμενη αφυδρογονάση της γλυκερόλης για το G3P και DHA μονοπάτι αντίστοιχα, οι Tani και Yamada (1987) κατέταξαν τις ζύμες σε τρεις ομάδες. Οι μικροοργανισμοί της πρώτης ομάδας υποτέθηκε πως ακολουθούν το G3P μονοπάτι, της δεύτερης το DHA και της τρίτης πως ακολουθούν και τους δύο τρόπους.

Παρά το γεγονός ότι αυτός ο τρόπος αξιολόγησης φαίνεται να ανταποκρίνεται και στα *in vivo* δεδομένα, η μέτρηση της δράσης αποκλειστικά ενός ενζύμου δεν αποτελεί ασφαλές κριτήριο για τον τρόπο δράσης του μεταβολισμού ενός μικροοργανισμού (Klein et al. 2017). Η πιο ορθή μέθοδος είναι η εξέταση των επιπτώσεων που έχει σε έναν μικροοργανισμό η διαγραφή ή η υπερβολική έκφραση ενός γονιδίου που κωδικοποιεί ένα ένζυμο της μεταβολικής αλυσίδας. Για παράδειγμα η ανικανότητα ενός μικροοργανισμού να μεταβολίζει την γλυκερόλη, αν αφαιρεθεί από το DNA του το γονίδιο εκείνο που είναι υπεύθυνο για την παραγωγή του ενζύμου που καταλύει μια αντίδραση της γλυκερόλης όπως είναι η κινάση της γλυκερόλης (GK). Σχετικά πειράματα, χρησιμοποιώντας τον *S. Cerevisiae*, πραγματοποιήθηκαν και έδειξαν πως η διαγραφή του γονιδίου GTU1 που κωδικοποιεί το ένζυμο GK και του γονιδίου GTU2 που κωδικοποιεί την FAD-εξαρτώμενη αφυδρογονάση της 3-P-γλυκερόλης, οδήγησε στο να χάσει ο μικροοργανισμός πλήρως την ικανότητά του να καταναλώνει την γλυκερόλη (Pavliketal. 1993; SpragueandCronan 1977; Swinnenetal. 2013). Αυτό επιβεβαιώνει, τουλάχιστον για τον *S. cerevisiae* και τον *C. jadinii*, τα *in vitro* ευρήματα του Gancedo et al. (1968) σχετικά με το G3P μονοπάτι.

## 1.2 Βιοντίζελ

Το βιοντίζελ είναι ένα από τα κυριότερα βιοκαύσιμα που χρησιμοποιούνται μαζί με την βιοαιθανόλη, το βιοϋδρογόνο και το βιομεθάνιο. Ως βιοκαύσιμα χαρακτηρίζονται όλα τα στερεά, υγρά και αέρια καύσιμα που προέρχονται από την βιομάζα δηλαδή το βιοαποικοδομήσιμο κλάσμα προϊόντων, καταλοίπων και αποβλήτων αγροτο-βιομηχανικής προέλευσης. Σύμφωνα με τον ορισμό βιοντίζελ ονομάζεται κάθε φυτικό έλαιο ή ζωικό λίπος που έχει (ή μπορεί σχετικά εύκολα να αποκτήσει) συγκρίσιμες ιδιότητες ως καύσιμο με το ντίζελ και για το λόγο αυτό μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως βιολογικής προέλευσης υποκατάστατο του τελευταίου (Bozbas 2008; Krawezy 1996).

Αντίθετα με ό,τι έχει επικρατήσει στην καθημερινή γλώσσα, ο όρος βιοντίζελ 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. Η βιομάζα είναι ανανεώσιμη πηγή ενέργειας, αφού ανανεώνεται συνεχώς λόγω φωτοσυνθετικής ικανότητας των φυτικών οργανισμών (Van Gerpen et al., 2004). Τα βιοκαύσιμα είναι βιοαποικοδομήσιμα, δεν περιέχουν αρωματικές ενώσεις και οι εκπομπές αέριων ρύπων όπως οξειδίων του θείου, μονοξειδίου του άνθρακα, άκαυστων υδρογονανθράκων και αιθάλης, που προέρχονται από την καύση τους είναι πολύ χαμηλές.

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,

### **1.2.1 Διαδικασία παραγωγής του βιοντίζελ**

Οι πρώτες ύλες από τις οποίες παράγεται το βιοντίζελ είναι ο ηλίανθος, η ελαιοκράμβη, διάφορα σπορέλαια όπως φοινικέλαιο, βαμβακέλαιο, σογιέλαιο και χρησιμοποιημένα έλαια από εργοστάσια τροφίμων, εστιατόρια κλπ. Στην Ευρώπη συνήθως χρησιμοποιείται κραμβέλαιο, ενώ στην Βραζιλία έλαιο από σπέρματα σόγιας, ηλίανθου και φοινικέλαιο (da Silva, Mack, and Contiero 2009).

Το βιοντίζελ παράγεται μέσω της αντίδρασης μετεστεροποίησης των τριγλυκεριδίων, που αποτελούν το κύριο συστατικό των φυτικών και των ζωικών λιπών, με κάποια αλκοόλη μικρού μοριακού βάρους (συνήθως μεθανόλη, αιθανόλη ή βουτανόλη), ενώ παράγεται ακόμα γλυκερόλη, ως το κύριο παραπροϊόν της διεργασίας. Σαν μετεστεροποίηση γενικά ονομάζεται η αντίδραση ενός εστέρα με μία αλκοόλη για τον σχηματισμό ενός νέου εστέρα και μιας νέας αλκοόλης, σε μία διαδικασία παρόμοια της υδρόλυσης, με την διαφορά ότι η αλκοόλη παίρνει το ρόλο του νερού. Η αλκοόλη προστίθεται σε περίσσεια για να επιτευχθούν υψηλοί βαθμοί

μετατροπής σε βιοντίζελ. Κατά την στοιχειομετρία της αντίδρασης, για κάθε μόριο τριγλυκεριδίου χρειάζονται τρία μόρια αλκοόλης για να παραχθούν τρία μόρια εστέρων και ένα μόριο γλυκερόλης. Στην πραγματικότητα όμως χρησιμοποιείται μεγαλύτερη αναλογία αλκοόλης/ ελαίου από 3:1 με σκοπό την αύξηση της απόδοσης της αντίδρασης σε εστέρες.

Οι διεργασίες παραγωγής του βιοντίζελ πρώτης γενιάς βασίζονται έως σήμερα κυρίως σε αλκαλικούς καταλύτες όπως τα NaOH, KOH και CH<sub>3</sub>ONa και σπανιότερα σε ισχυρά οξέα όπως το H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Ο λόγος που προτιμάται η βασικός καταλυόμενη μετεστεροποίηση είναι το ότι είναι πολύ γρηγορότερη από την όξινη και γιατί οι βασικοί διαλύτες είναι λιγότερο διαβρωτικοί. Τα αλκοξείδια είναι ο βασικότερος και πιο αποδοτικός καταλύτης δίνοντας αποδόσεις σε βιοντίζελ 98% χρησιμοποιούμενος σε μικρή συγκέντρωση (0,5%). Ωστόσο τα NaOH και KOH είναι φθηνότερα και μπορούν να δώσουν εξίσου υψηλές αποδόσεις εφόσον χρησιμοποιηθούν σε ελαφρώς μεγαλύτερη συγκέντρωση (1-2%). Αρχικά τα έλαια, μετά από κατάλληλη επεξεργασία ραφινάρισματος, ώστε να απομακρυνθούν η λεκιθίνη, ο φώσφορος και τα ελεύθερα λιπαρά οξέα, θερμαίνονται στους 55°C με περίσσεια μεθανόλης και καταλύτη, και μετά από αντίδραση 2 ωρών το μίγμα αφήνεται σε ηρεμία. Το μίγμα μεθανόλης – γλυκερόλης είναι βαρύτερο, με συνέπεια να καθιζάνει στον πυθμένα, από όπου και απομακρύνεται. Το υπόλοιπο μίγμα υφίσταται αρχικά απόσταξη για να απομακρυνθεί η μεθανόλη, η οποία, λόγω υψηλού κόστους, επαναχρησιμοποιείται στην αντίδραση, ενώ ακολουθείται από βιοντίζελ και νερό, οπότε και ξηραίνεται υπό κενό (Paliagro and Rossi 2008). Τα μίγματα της ακάθαρτης γλυκερόλης περιέχουν γλυκερόλη σε ποσοστά που κυμαίνονται από 55% έως 90%, καθώς και νερό, μεθανόλη, ανόργανα άλατα (κατάλοιπα του εκάστοτε διαλύτη), ελεύθερα λιπαρά οξέα και πληθώρα άλλων οργανικών ενώσεων σε ποικίλες αναλογίες, ενώ το χρώμα τους είναι από κίτρινο έως σκούρο καφέ.

Τα τελευταία χρόνια η έρευνα και η τεχνολογία των βιοκαυσίμων έχει δημιουργήσει τα πρωτοποριακά βιοκαύσιμα δεύτερης γενιάς, τα οποία παράγονται με πρωτοποριακές διεργασίες και από περισσότερους τύπους βιομάζας όπως λιγνοκυτταρινούχα υποστρώματα, ξυλώδη φυτά, γεωργικά υπολείμματα ακόμα και απόβλητα. Ο στόχος της παραγωγής δεύτερης γενιάς βιοκαυσίμων είναι γενικότερα η χρήση βιομάζας μη εδώδιμων τμημάτων των καλλιεργειών, όπως φύλλα, βλαστοί και φλούδες, μη εδώδιμες καλλιέργειες όπως το γρασίδι, μίσχανθοι, δημητριακά μικρών

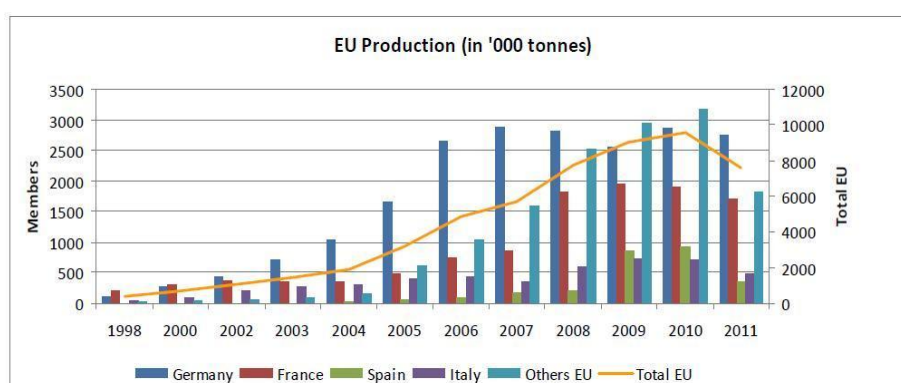
σιτηρών, καθώς επίσης και γεωργο-βιομηχανικά απόβλητα όπως πολτός φρούτων (Papanikolaou and Aggelis 2009, 2011a, 2011b). Τέλος, στα βιοκαύσιμα τρίτης γενιάς η χρησιμοποιούμενη πρώτη ύλη για την παραγωγή τους είναι τα φύκη, δηλαδή μικροφύκη και μακροφύκη, τα οποία καλλιεργούνται σε νερό και επομένως δεν απαιτούν αρόσιμες εκτάσεις, ενώ ταυτόχρονα έχουν υψηλές αποδόσεις (Costa and de Morais 2011; Lam and Lee 2012).

### **1.2.2 Το βιοντίζελ σήμερα**

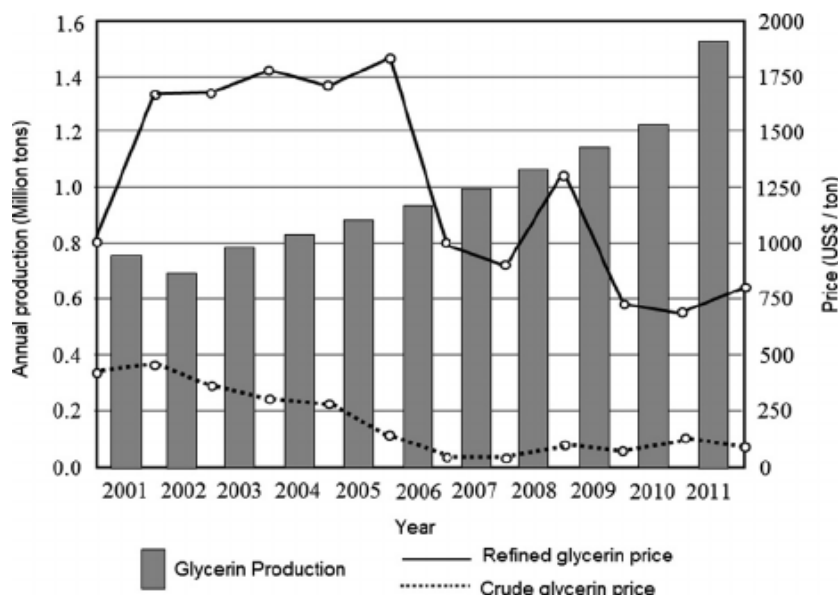
Η παραγωγή βιοντίζελ από το 2004 έως το 2008 σχεδόν τετραπλασιάστηκε εντός Ευρωπαϊκής Ένωσης, η οποία είναι η μεγαλύτερη παραγωγός βιοντίζελ, αυξανόμενη από 1,9 εκατομμύρια τόνους το 2004 σε 7,7 εκατομμύρια τόνους μέσα στο 2008 (European Biodiesel Board). Για το λόγο αυτό, αναμένεται εκθετική ανάπτυξη της παγκόσμιας αγοράς βιοντίζελ τις επρχόμενες δεκαετίες. Σύμφωνα με στοιχεία της Ευρωπαϊκής Επιτροπής Βιοντίζελ η παραγωγή του το 2016 εντός ΕΕ ξεπέρασε τα έντεκα εκατομμύρια τόνους. Σε ότι αφορά τα βιοκαύσιμα, στον τομέα των μεταφορών, το βιοντίζελ κατέχει την κυριότερη θέση καθώς μπορεί να χρησιμοποιηθεί είτε αναμεμιγμένο με συμβατικό ντίζελ σε διάφορες αναλογίες ή αυτούσιο με περιορισμένης έκτασης μετατροπές στους κινητήρες. Η Οδηγία 2003/30/ΕΚ της Ευρωπαϊκής Ένωσης, όριζε τη χρήση βιοκαυσίμων στον τομέα των μεταφορών, σε ποσοστό 2% για το 2005, με σκοπό να φτάσει το 5,75% μέχρι το 2010, Πρόσφατα σύμφωνα με την Οδηγία 2009/28/ΕΚ της Ευρωπαϊκής Ένωσης, έως το 2020 τα κράτη μέλη υποχρεούνται να καλύπτουν τουλάχιστον το 10% της κατανάλωσης ενέργειας στον τομέα των μεταφορών με ανανεώσιμες πηγές ενέργειας. Ως εκ τούτου, η παραγωγή βιοντίζελ, τόσο σε ευρωπαϊκό, όσο και σε παγκόσμιο επίπεδο, αυξήθηκε σημαντικά για να καλύψει τις ανάγκες της αγοράς (da Silva, Mack, and Contiero 2009). Σήμερα στην Ευρώπη, σύμφωνα με τα επίσημα στοιχεία του Ευρωπαϊκού Συμβουλίου Βιοντίζελ (European Biodiesel Board, EBB), λειτουργούν περίπου 250 μονάδες παραγωγής βιοντίζελ και η συνολική ετήσια παραγωγή για το 2010 ανήλθε στα 9,7 εκατομμύρια μετρικούς τόνους. Κυριότερες χώρες παραγωγής σε ευρωπαϊκό επίπεδο είναι η Γερμανία και η Γαλλία και ακολουθούν η Ισπανία και η Ιταλία, ενώ παγκοσμίως παράγεται στις ΗΠΑ, Αργεντινή, Βραζιλία, Μαλαισία και Ινδονησία (Wang 2019).

Η Ελλάδα εναρμόνισε την εθνική της νομοθεσία με την Οδηγία 2003/30/ΕΚ, σχετικά με την προώθηση της χρήσης βιοκαυσίμων ή άλλων ανανεώσιμων καυσίμων στις μεταφορές, το Δεκέμβριο του 2005, Σύμφωνα με τον Νόμο 3423/05 ορίζονται οι διάφοροι τύποι βιοκαυσίμων και τίθεται ως στόχος για το 2010 η κατανάλωση 5,75% βιοκαυσίμων ως ποσοστό στα καύσιμα μεταφορών.

Η παραγωγή βιοντίζελ στην Ευρώπη (δεδομένα έως το 2011) φαίνεται στο κατωτέρω γράφημα (European Biodiesel Board, 2011). Η συνακόλουθη πορεία της τιμής της γλυκερόλης φαίνεται στο κατωτέρω γράφημα (European Biodiesel Board, 2011).



Σχήμα 6. Ετήσια παραγωγή βιοντίζελ στην Ευρώπη (European Biodiesel Board, 2011).



Σχήμα 7. Ετήσια παγκόσμια παραγωγή γλυκερόλης και εξέλιξη τιμής της (European Biodiesel Board, 2011).

### 1.3 Ζύμες

Οι ζύμες είναι ευκαρυωτικοί μονοκύτταροι μικροοργανισμοί και ανήκουν στο βασίλειο των μυκήτων. Μέχρι σήμερα υπολογίζεται ότι έχουν αναγνωριστεί περίπου 1,500 είδη, τα οποία αποτελούν περίπου το 1% όλων των μυκήτων. Η λέξη ζύμη προέρχεται από ινδοευρωπαϊκή ρίζα και σημαίνει «αφρός» ή «φούσκα». Η χρήση των ζυμών χρονολογείται από την αρχαιότητα. Το 1680 ο Ολλανδός Antonie van Leeuwenhoek που θεωρείται ένας εκ των πρώτων θεμελιωτών της Μικροβιολογίας, παρατήρησε τα πρώτα κύτταρα μικροοργανισμών, πιθανώς ζύμες, αλλά δεν τις θεώρησε ζωντανούς οργανισμούς αλλά μάλλον σφαιρικές δομές. Το 1837, ο Schwann αναγνώρισε τις ζύμες ως μύκητες. Ενώ το 1857, ο Γάλλος μικροβιολόγος Louis Pasteur απέδειξε στο άρθρο του “Mémoire sur la fermentation alcoolique” ότι η αλκοολική ζύμωση διεξάγεται από ζώντες ζυμομύκητες και όχι από χημικό καταλύτη. Συγκεκριμένα, έδειξε ότι με διοχέτευση οξυγόνου στο ζωμό της ζύμης, η ανάπτυξη των κυττάρων θα μπορούσε να αυξηθεί, αλλά η ζύμωση παρεμποδίζεται, φαινόμενο το οποίο ονομάστηκε αργότερα «φαινόμενο Pasteur» (Barnett 2003).

Οι ζύμες μπορούν να αναπτυχθούν τόσο στο χερσαίο, όσο και στο υδάτινο και ατμοσφαιρικό περιβάλλον με το ιδανικό περιβάλλον αύξησης να αποτελούν υποστρώματα πλούσια σε σάκχαρα. Είναι χημειότροφοι μικροοργανισμοί και δεν χρειάζονται ηλιακή ενέργεια για να αναπτυχθούν. Μπορούν να καταναλώσουν πολλές πηγές άνθρακα (εξόζες: γλυκόζη, φρουκτόζη, δισακχαρίτες: σουκρόζη, μαλτόζη, πεντόζες: ριβόζη, ξυλόζη, αλκοόλες, οργανικά οξέα). Είναι είτε αερόβιοι είτε προαιρετικά αναερόβιοι μικροοργανισμοί και αναπτύσσονται καλύτερα σε περιβάλλον με ουδέτερο ή ελαφρώς όξινο pH. Αναφορικά με την θερμοκρασία, αναπτύσσονται σε μεγάλο εύρος θερμοκρασιών από  $-2$  με  $20$  °C (*Leucosporidium frigidum*) έως και  $28$  με  $45$  °C (*Candida slooffi*). Το μέγεθος των ζυμών ποικίλλει από  $1-3$   $\mu\text{m}$  ενώ μπορούν να αυξηθούν έως και τα  $40$   $\mu\text{m}$  και αναπαράγονται μέσω της διαδικασίας της μίτωσης. Οι ζύμες χρησιμοποιούνται παραδοσιακά σε πολλές διεργασίες της βιομηχανίας, όπως στην παραγωγή τροφίμων, αλκοολούχων ποτών, αρτοποιητικής βιομάζας, ζωοτροφών και μεταβολικών προϊόντων όπως ενζύμων, βιταμίνες, πολυσακχαρίτες, πολυόλες, λιπίδια, φωσφολιπίδια, κιτρικό οξύ, αιθανόλη, διοξείδιο του άνθρακα, και ενώσεις που συντίθενται με την εισαγωγή του ανασυνδυσμένου DNA σε ζυμομύκητες. Κάποια από αυτά τα προϊόντα παράγονται εμπορικά ενώ άλλα έχουν μεγάλη σημασία για τον τομέα της βιοτεχνολογίας.



**Πίνακας 1.2.** Στελέχη ζυμομύκητα και εφαρμογή σε βιομηχανίες.

Εφαρμογή	Στέλεχος ζυμομύκητα
Ζύμωση μύρας τύπου “ale”	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Διόγκωση ψωμιών και ζυμών (προζύμι)	<i>S. cerevisiae</i> , <i>Saccharomyces exiguus</i>
D – Αραβιτόλη (γλυκαντική ουσία)	<i>Candida diddensiae</i> , <i>Debaryomyces sp.</i>
Γαλακτωματοποιητές	<i>Yarrowia 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</i> , “ <i>Kluyveromyces fragilis</i> ”
Ζύμωση μύρας τύπου “lager”	“ <i>Saccharomyces carlsbergensis</i> ” (= <i>S. pastorianus</i> )
Μαννιτόλη (ενυδατική ουσία)	<i>Torulopsis mannitofaciens</i> , <i>Yarrowia lipolytica</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 shehataae</i> , <i>Pichia stiritis</i> , <i>Pichia segobiensis</i>
Παρασκευή κεφίρ	<i>Saccharomyces kefir</i>
Λαχανικά	<i>Guehomyces spp.</i>

Στον **Πίνακα 1,2** παρατίθενται ορισμένες ζύμες και οι πιθανές χρήσεις τους στις βιομηχανίες τροφίμων, ποτών και άλλων βιομηχανιών ζύμωσης (Demain 1998).

### 1.3.1 *Pichia membranifaciens*

Η ζύμη *P. membranifaciens* όπως και οι περισσότερες ζύμες απαντάται σε πολλά διαφορετικά περιβάλλοντα και συνθήκες καθώς παρουσιάζει αντοχή σε σχετικά μεγάλο εύρος συνθηκών. Γενετικά έχει βρεθεί πως το πιο κοντινό του είδος ζύμης είναι το *Issatchenkia orientalis* (Masih et al. 2001). Είναι μη παθογόνος μικροοργανισμός αλλά παρουσιάζει ερευνητικό ενδιαφέρον καθώς χαρακτηρίζεται ως “killer yeast”. Οι ζύμες αυτής της κατηγορίας έχουν την ικανότητα να παράγουν ορισμένες ουσίες πρωτεϊνικής φύσης οι οποίες είναι τοξικές έναντι άλλων ζυμών οι οποίες παρουσιάζουν ευαισθησία ενώ οι ίδιες ζύμες που τις παράγουν παρουσιάζουν ανοσία (Marquina et al. 2002). Οι τοξίνες αυτές διαφέρουν μεταξύ των μικροοργανισμών και των στελεχών τους καθώς και ως προς τα χαρακτηριστικά τους. Παρατηρείται ποικιλία ως προς το μοριακό μέγεθος των τοξινών αυτών, τα υπεύθυνα

γονίδια, το επίπεδο τοξικότητας καθώς και ως προς τους μηχανισμούς αναγνώρισης των κυττάρων. Συγκεκριμένα οι Belda et al. (2017) αναφέρουν τουλάχιστον δύο φαινοτύπους του *P. membranifaciens* με παραγωγή δύο σαφώς διαφορετικών τοξινών. Λόγω της τοξικής της ιδιότητας κατά άλλων μυκήτων, η ζύμη αυτή έχει μελετηθεί ως προς την ικανότητα να ελέγχει φυτοπαθολογικές ασθένειες. Συγκεκριμένα έχει διαπιστωθεί η μυκητοκτόνος δράση του *P. membranifaciens* ενάντια στο μικροοργανισμό *Botrytis cinerea* ο οποίος είναι υπεύθυνος για την «τεφρά σήψη» της αμπέλου, μιας από τις σημαντικότερες μυκητολογικές ασθένειες της συγκεκριμένης καλλιέργειας (Masih et al. 2001).

Σε ό,τι αφορά στη βιομηχανία τροφίμων, ο μικροοργανισμός *P. membranifaciens* μπορεί να επιβιώσει και να γίνει αλλοιογόνος μικροοργανισμός ακόμα και σε τρόφιμα που είναι αποθηκευμένα υπό ψύξη. Είναι επίσης ανθεκτικός στις υψηλές θερμοκρασίες, με μέγιστες θερμοκρασίες ανάπτυξης 32-37 °C αλλά και σε μέτριες συγκεντρώσεις αλατιού (NaCl), διοξειδίου του θείου (SO<sub>2</sub>) αλλά και ορισμένων οξέων. Η αντοχή του στις υψηλές θερμοκρασίες τον καθιστά μικροοργανισμό στόχο για τις θερμικές επεξεργασίες των χυμών φρούτων (Bevilacqua et al. 2009).

### 1.3.2 *Wickerhamomyces anomalus*

Η ζύμη αυτή είναι επίσης γνωστή με τα ονόματα *Pichia anomala* και *Hansenula anomala*. Μέχρι πριν μερικά χρόνια υπαγόταν στο γένος *Pichia* αλλά έπειτα από φυλογενετικές έρευνες, με σύγχρονους τρόπους προσδιορισμού με βάση το DNA, δημιουργήθηκε το γένος στο οποίο υπάγεται σήμερα. Από τα 100 είδη που περιλάμβανε αρχικά το γένος *Pichia*, έχουν διατηρηθεί μόνο 20, τα υπόλοιπα έχουν ταξινομηθεί σε πολλά νέα γένη έπειτα από την εξέταση του DNA τους. Πριν την εφαρμογή αυτών των σύγχρονων μεθόδων η ταξινόμηση των ειδών γινόταν με βάση χαρακτηριστικά όπως η κατανάλωση γλυκόζης, η αφομοίωση του αζώτου και η μορφολογία των ασκοσπορίων (Kurtzman 2011).

Και αυτός ο μικροοργανισμός παρουσιάζει μεγάλη προσαρμοστικότητα και έχει απομονωθεί από ένα μεγάλο περιβαλλοντικό εύρος. Συγκεκριμένα έχει βρεθεί σε άνθη φυτών, επιφάνειες φρούτων, ανθρώπινο ιστό, στο εσωτερικό εντόμων, σε μολυσμένα έλαια, σε υδρόβια οικοσυστήματα, σε υγρά απόβλητα αλλά και σε

γαλακτοκομικά προϊόντα, ψημένα και αλατισμένα τρόφιμα. Επίσης έχουν παρατηρηθεί μεγάλες διαφορές ανάμεσα στις διάφορες συνθήκες ανάπτυξης ως προς την μορφολογία των κυττάρων, τον μεταβολισμό, την αντοχή στο στρες και τις αντιμικροβιακές ιδιότητες. Σύμφωνα με τους Fredlund et al. (2002) η ζύμη μπορεί να αναπτυχθεί σε θερμοκρασίες από 3 έως 37 °C, σε εύρος pH από 2 έως 12 και σε ενεργότητα ύδατος έως και 0,85 (σε γλυκερόλη). Ως προς την ανάγκη διαθεσιμότητας οξυγόνου, αν και δεν είναι αυστηρά αναερόβιος μικροοργανισμός, έχει την ικανότητα να αναπτυχθεί και σε περιβάλλον με περιορισμένο οξυγόνο (Fredlund 2004). Τέλος αναφέρεται ότι το *W. anomalus* είναι οργανισμός “Crabtree negative” που σημαίνει ότι δεν κάνει αλκοολική ζύμωση παρουσία οξυγόνου και υψηλής συγκέντρωσης σακχάρων (Walker 2011).

Μια αξιοσημείωτη χρήση του *W. anomalus* για βιομηχανία ζωοτροφών είναι η ικανότητά του να απελευθερώνει αφομοιώσιμο φώσφορο από το φυτικό οξύ στο οποίο βρίσκεται σε μη διαλυτή μορφή, για τα μονογαστρικά ζώα (Olstorpe et al. 2009). Στην βιομηχανία τροφίμων αναφέρονται στην βιβλιογραφία αρκετές χρήσεις της ζύμης αυτής. Συγκεκριμένα έχει χρησιμοποιηθεί ως βελτιωτικό γεύσης (Lee et al. 2004), ως βιολογικό συντηρητικό κατά των αλλοιογόνων μυκήτων σε αποθηκευμένα φρούτα και δημητριακά (Jijakli 2010), ως προβιοτικό σε γαλακτοκομικά (Mo et al. 2004), ως μέσο αρωματισμού στην οινοποιεία (Erten and Campbell 1953) καθώς και στην ζυθοποιεία (Olstorpe et al. 2009).

Το είδος *W. anomalus* χαρακτηρίζεται επίσης ως “killer yeast” διότι και αυτό παρουσιάζει μυκητοκτόνες ιδιότητες. Σύμφωνα με την βιβλιογραφία η ζύμη χρησιμοποιήθηκε με επιτυχία κατά του φυτοπαθογόνου μύκητα *Botrytis cinerea* (Masih et al. 2000). Εκτός αυτού παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον το γεγονός ότι η τοξίνη K5 της συγκεκριμένης ζύμης παρουσίασε δράση κατά δερματόφυτων και συγκεκριμένα των *Microsporium* spp. και *Trichophyton* spp. (İzgülü et al. 2007). Αυτό καθιστά το *W. anomalus* έναν μικροοργανισμό με προοπτικές και στην ιατρική.

### **1.3.3 *Rhodosporidium toruloides***

Τα τελευταία χρόνια μεγάλο ερευνητικό ενδιαφέρον παρουσιάζουν τα είδη του γένους *Rhodosporidium* καθώς έχει αποδειχθεί η μεγάλη βιοτεχνολογική προοπτική που χαρακτηρίζουν αρκετά από αυτά όπως τα *R. diobovatum*, *R.*

*kratochvilovae*, *R. fluviale* και φυσικά το *R. toruloides* το οποίο είναι και το σημαντικότερο του γένους. Το ενδιαφέρον έγκειται στο γεγονός ότι αυτά τα είδη μπορούν να συνθέσουν και να αποθηκεύσουν λίπος έως και σε ποσοστό από 50 με 70% (Munch et al. 2015; Patel et al. 2015; Xu et al. 2012). Επίσης είναι γεγονός πως έχουν την δυνατότητα να προσαρμόζονται και να αναπτύσσονται σε ένα μεγάλο εύρος υποστρωμάτων με διαφορετικές πηγές άνθρακα, είναι ανθεκτικά στην παρεμποδιστική δράση διαφόρων συστατικών των ακάθαρτων υποστρωμάτων όπως η βιομηχανική γλυκερόλη και μπορούν να παράξουν, εκτός από μικροβιακά έλαια, προϊόντα προστιθέμενης αξίας όπως καροτενοειδή (Xu and Liu 2017; Diamantopoulou et al 2020).

Σύμφωνα με την βιβλιογραφία τα είδη αυτού του γένους μπορούν να καλλιεργηθούν σε γλυκερόλη και να παρουσιάσουν συγκρίσιμα αποτελέσματα ως προς την βιομάζα και το λίπος, με την αντίστοιχη καλλιέργεια σε γλυκόζη. Η ποιοτική σύνθεση της ακάθαρτης γλυκερόλης εξαρτάται από την διαδικασία παραγωγής της όπως για παράδειγμα οι διάφορες μέθοδοι παραγωγής βιοντίζελ. Σε έρευνα πάνω σε αυτού του είδους την γλυκερόλη φάνηκε πως η περιεκτικότητα σε μεθανόλη ίσως αποτελεί παρεμποδιστικό παράγοντα για την ανάπτυξη των ζυμών. Αντιθέτως, άλλα συστατικά όπως σάπωνες, ανόργανα άλατα κ.α., έδειξαν να μην παρεμποδίζουν την ανάπτυξη ή ακόμη και να επηρεάζουν θετικά την παραγωγή λίπους. Ορισμένα είδη του γένους έδειξαν ακόμη και καλύτερη ανάπτυξη βιομάζας και παραγωγή λίπους σε ακάθαρτη γλυκερόλη σε σύγκριση με την ανάπτυξη σε καθαρή (Xu et al. 2012). Σε άλλες εργασίες, οι ερευνητές μελέτησαν την ανάπτυξη του *R. toruloides* σε μίγμα γλυκόζης με γλυκερόλη. Σε αυτό παρατηρήθηκε το φαινόμενο της διφασικής ανάπτυξης της ζύμης κατά το οποίο η γλυκόζη καταναλώθηκε πρώτη και μόνο μετά την κατανάλωσή της ο μεταβολισμός του μικροοργανισμού στράφηκε προς την κατανάλωση της γλυκερόλης. Αυτό το φαινόμενο παρατηρείται όταν υπάρχουν δύο διαθέσιμες πηγές άνθρακα που η μία εκ των οποίων είναι πιο εύκολα καταναλώσιμη. Ως αποτέλεσμα σημειώθηκε πως η ανάπτυξη στο συγκεκριμένο μίγμα είχε διπλό όφελος καθώς υπήρξε και ικανοποιητική παραγωγή βιομάζας η οποία συνήθως παρατηρείται με την γλυκόζη αλλά και ικανοποιητική παραγωγή λιπιδίων η οποία παρατηρείται αντίστοιχα σε υπόστρωμα γλυκερόλης (Bommareddy et al. 2015, 2017). Αντίστοιχες παρατηρήσεις

έγιναν σε μελέτη των Diamantopoulou et al. (2020) με ικανοποιητική παραγωγή βιομάζας σε μίγμα γλυκερόλης και ξυλόζης σε βάρος όμως της παραγωγής λιπιδίων.

Μία από τις πρώτες αναφορές σε γενετική τροποποίηση του μεταβολισμού του *R. toruloides* έγινε από τον Zhang et al. (2016b). Με την χρήση της μεθόδου ATMT (*Agrobacterium tumefaciens* - mediated transformation) έγινε τροποποίηση στην έκφραση των γονιδίων ACC1 και DGA1 τα οποία κωδικοποιούν δύο ένζυμα που καταλύουν αντιδράσεις στον μηχανισμό βιοσύνθεσης των τριακυλογλυκερολών. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την πολύ μεγάλη αύξηση στην παραγωγή λίπους από τον συγκεκριμένο μικροοργανισμό. Αυτή η στρατηγική έχει εφαρμοστεί και στην ζύμη *Y. lipolytica* μεταξύ άλλων και είναι γνωστή ως “push and pull” (Tai and Stephanopoulos 2013). Η σύνθεση των λιπαρών οξέων ποικίλει αναλόγως του στελέχους της ζύμης. Τα κυριότερα λιπαρά οξέα που παράγει σύμφωνα με την βιβλιογραφία είναι το παλμιτικό (C16:0), το στεατικό (C18:0), το ελαϊκό (C18:1) και το λινολεϊκό (C18:2). Κάποια στελέχη μπορούν να παράγουν μικρές ποσότητες α-λινολενικού οξέος (C18:3) καθώς και λιπαρών οξέων με μήκος αλυσίδας μεταξύ 20 και 24 ατόμων άνθρακα, η συγκέντρωση των οποίων είναι κάτω από 6% (Xu and Liu 2017). Σε σύγκριση με άλλους ελαιογόνους μικροοργανισμούς, το είδος *R. toruloides* έχει το χαρακτηριστικό να παράγει και καροτενοειδή και να συγκαταλέγεται στους ελάχιστους μικροοργανισμούς που αποκαλούνται κόκκινες ζύμες (Mannazzu et al. 2015). Η απόδοση και το είδος των καροτενοειδών ουσιών εξαρτώνται από το στέλεχος, το μέσο ανάπτυξης και τις περιβαλλοντικές συνθήκες. Με την ανάπτυξη της βιοτεχνολογίας αυτές οι ουσίες θα μπορούσαν να αποτελέσουν ένα παραπροϊόν προστιθέμενης αξίας από την παραγωγή λίπους από την ζύμη αυτή.

## **1.4 Μεταβολικά προϊόντα**

### **1.4.1 Λιπίδια**

Τα λιπίδια είναι βιομόρια που δεν διαλύονται στο νερό αλλά μόνο σε μη πολικούς οργανικούς διαλύτες. Από χημικής άποψης μπορούν να ανήκουν σε αυτά πολλές κατηγορίες οργανικών ενώσεων όπως λίπη, κηροί, στερόλες, λιποδιαλυτές βιταμίνες, μονογλυκερίδια, διγλυκερίδια, τριγλυκερίδια, φωσφολιπίδια και άλλα. Οι κύριες βιολογικές λειτουργίες των λιπιδίων σχετίζονται με την αποθήκευση ενέργειας, ενώ αποτελούν το κύριο δομικό συστατικό των κυτταρικών μεμβρανών. Οι

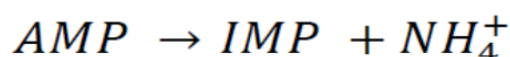
ουσίες αυτές είναι πολύ διαδεδομένες στη φύση και αποτελούν μία από τις κύριες θρεπτικές ύλες της διατροφής του ανθρώπου μαζί με τους υδατάνθρακες και τις πρωτεΐνες. Έχουν εφαρμογές στις βιομηχανίες τροφίμων, καλλυντικών, καυσίμων και στη νανοτεχνολογία.

### Βιοσύνθεση λιπιδίων

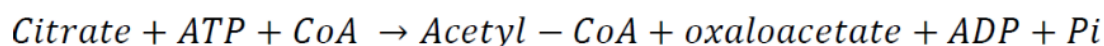
Όλοι οι μικροοργανισμοί είναι σε θέση να συνθέσουν λιπίδια για να εφοδιάσουν τις δομές τους (π.χ. μεμβράνες) καθώς και για διάφορους άλλους λειτουργικούς σκοπούς. Όμως μόνο οι ελαιογόνοι μικροοργανισμοί μπορούν να συσσωρεύουν λιπίδια στο εσωτερικό των κυττάρων τους σε σημαντικές ποσότητες, όταν οι συνθήκες καλλιέργειας ευνοούν την παραγωγή λιπιδίων (π.χ. καλλιέργεια σε πτωχά σε άζωτο και πλούσια σε σάκχαρα υποστρώματα) (Papanikolaou and Aggelis 2019). Ως ελαιογόνοι χαρακτηρίζονται οι μικροοργανισμοί οι οποίοι μπορούν να συσσωρεύσουν πάνω από 20% κατά βάρος λιπίδια. Αυτοί, σε αντίθεση με τους υπόλοιπους, δεν διαθέτουν ένα υπερδραστήριο σύστημα βιοσύνθεσης λιπαρών οξέων, αλλά μπορούν να παράγουν σημαντικές ποσότητες ακετύλο-συνενζύμου Α (acetyl-CoA), το οποίο είναι η βασική μονάδα βιοσύνθεσης λιπαρών οξέων. Η συσσώρευση λιπιδίων σε έναν μικροοργανισμό επιτυγχάνεται όταν χρησιμοποιείται ως πηγή άνθρακα γλυκόζη, ή κάποιο άλλο παρόμοια μεταβολιζόμενο συστατικό, ενώ παράλληλα επικρατούν συνθήκες περιοριστικές σε άζωτο. Αφού εξαντληθεί το άζωτο, περιορίζεται η αύξηση του μικροοργανισμού. Αυτό συμβαίνει διότι το άζωτο αποτελεί δομικό συστατικό των πρωτεϊνών και των νουκλεοτιδίων, ενώ η περίσσεια της πηγής άνθρακα (γλυκόζη ή άλλος υδατάνθρακας) που συνεχίζει να αφομοιώνεται από τα κύτταρα του μικροοργανισμού μετατρέπεται σε τριγλυκερίδια μέσα στην κυτταρική του μάζα (*de novo* συσσώρευση λιπιδίων). Στην περίπτωση που σαν πηγή άνθρακα χρησιμοποιούνται υδρόφοβα υποστρώματα (*ex novo* συσσώρευση λιπιδίων) όπως για παράδειγμα τα βιομηχανικά λίπη, τα φυτικά έλαια, τα ελεύθερα λιπαρά οξέα, εστέρες των λιπαρών οξέων κ.ά. τότε η συσσώρευση λιπιδίων είναι ανεξάρτητη από την εξάντληση της πηγής αζώτου στο μέσο ανάπτυξης του μικροοργανισμού. Τότε η συσσώρευση των λιπιδίων πραγματοποιείται ταυτόχρονα με την σύνθεση της βιομάζας του μικροοργανισμού (Papanikolaou and Aggelis 2011a; Ratledge 2004; Athenaki et al 2019).

Από διάφορες έρευνες, εξάγεται το συμπέρασμα ότι η ικανότητα ενός μικροοργανισμού να συσσωρεύει μεγάλες ποσότητες λιπιδίων στην κυτταρική του μάζα εξαρτάται από δύο παράγοντες: α) από την ικανότητα του μικροοργανισμού να παράγει συνεχώς ακέτυλο-συνένζυμο Α (acetyl-CoA) στο κυτταρόπλασμα του κυττάρου, το οποίο αποτελεί πρόδρομο μόριο για την σύνθεση των λιπαρών οξέων και β) την ικανότητα του μικροοργανισμού να παράγει επαρκή ποσότητα NADPH, το οποίο αποτελεί αναγωγικό μέσο για την βιοσύνθεση των λιπαρών οξέων (Beoroulos et al. 2009; Fakas 2017; Papanikolaou and Aggelis 2009).

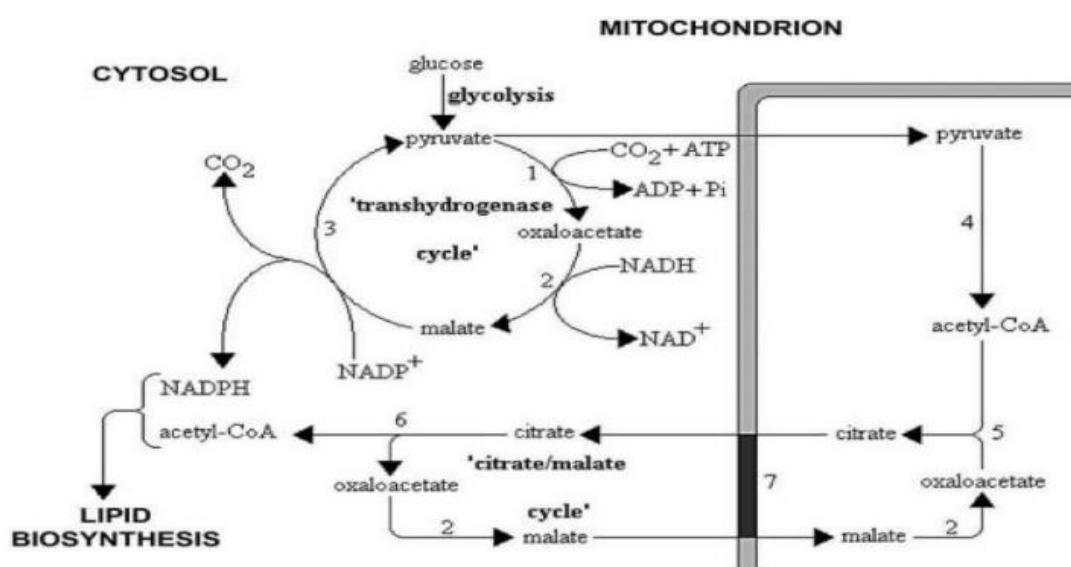
Μετά την εξάντληση του αζώτου από το μέσο ανάπτυξης του μικροοργανισμού ακολουθούν μία σειρά από αντιδράσεις που έχουν ως αποτέλεσμα την δημιουργία ακέτυλο-συνενζύμου Α. Έπειτα προκαλείται μία ταχεία μείωση της AMP (ενδοκυτταρικής μονοφωσφορικής αδενοσίνης) καθώς ο μικροοργανισμός διασπά την AMP σε μονοφωσφορική αδενοσίνη (IMP) με την βοήθεια του ενζύμου της AMP-απαμινάσης σύμφωνα με την παρακάτω βιοχημική αντίδραση:



Η βιοχημική αντίδραση αυτή έχει ως αποτέλεσμα την εξασφάλιση ιόντων  $NH_4^+$ , τα οποία αποτελούν συμπληρωματική πηγή αζώτου και βοηθούν στην βιοσύνθεση των κυττάρων ύστερα από τον περιορισμό του εξωκυτταρικού αζώτου. Η μείωση της ενδοκυτταρικής AMP αναστέλλει την δράση του ενζύμου της ισοκιτρικής αφυδρογονάσης (ICDH) με συνέπεια το κιτρικό οξύ να μην μεταβολίζεται και να συσσωρεύεται στο μιτοχόνδριο. Στην συνέχεια το κιτρικό οξύ εξέρχεται στο κυτταρόπλασμα και διασπάται από την ATP-κιτρική λυάση (δεν απαντάται στους μη-ελαιογόνους μικροοργανισμούς) σε ακέτυλο-συνένζυμο Α και οξαλοξικό οξύ σύμφωνα με την αντίδραση:



Όπου ADP είναι η δι-φωσφορική αδενοσίνη και Pi είναι το ορθοφωσφορικό ανιόν. Μέσω της ανεστραμμένης β-οξειδωσης, το ακετυλο-CoA θα δημιουργήσει τα ενδοκυτταρικά λιπαρά οξέα (Papanikolaou and Aggelis 2011; Ratledge 2004). Στο σχήμα που ακολουθεί φαίνεται ο κύκλος του μηλικού-κιτρικού (citrate/malate cycle) και ο κύκλος του Krebs (transhydrogenase cycle) μέχρι την παραγωγή του ακετυλο-CoA και του NADPH για την ελαιογένεση στους ελαιογόνους μικροοργανισμούς (Σχήμα 8).



Σχήμα 8. Απεικόνιση της ελαιογένεσης στα κύτταρα των ελαιογόνων μικροοργανισμών.

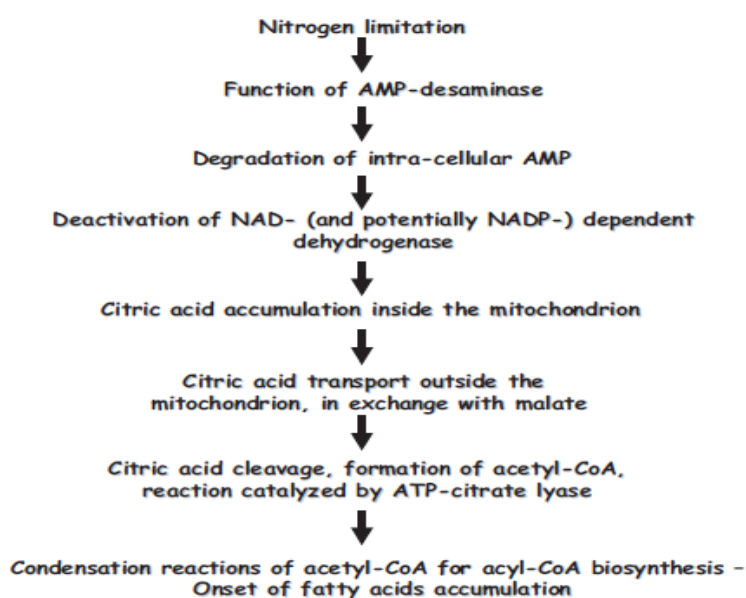
Για τη βιοσύνθεση των λιπαρών οξέων, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, είναι απαραίτητη και η παροχή επαρκούς ποσότητας NADPH, καθώς για τη σύνθεση 1 mol του λιπαρού οξέος C18 απαιτούνται 16 mol NADPH. Το μηλικό ένζυμο λειτουργεί ως προμηθευτής NADPH σύμφωνα με την ακόλουθη αντίδραση:



Η δράση του μηλικού ενζύμου απαντάται σε αρκετούς ελαιογόνους μικροοργανισμούς, όπου σχηματίζει ένα μεταβολικό σύμπλοκο, το οποίο σε συνδυασμό με την ATP κιτρική λύαση και την συνθάση των λιπαρών οξέων (FAS), εξασφαλίζει τη μετατροπή του acetyl-CoA σε λιπαρά οξέα. Στη συνέχεια, τα λιπαρά οξέα εστεροποιούνται με γλυκερόλη σε τριγλυκερίδια και ενσωματώνονται μέσω του ενδοπλασματικού δικτύου σε σταγονίδια λιπαρών οξέων. Τα ένζυμα που είναι



υπεύθυνα για τη συσσώρευση ελαίου στους ελαιογόνους μικροοργανισμούς είναι η ATP κιτρική λυάση και το μηλικό ένζυμο, τα οποία απαντώνται στην πλειονότητα αυτών των μικροοργανισμών (Ratledge 2004). Εξαίρεση αποτελεί το γεγονός ότι ορισμένες ελαιογόνες ζύμες παράγουν μεγάλες ποσότητες ενδοπολυσακχαριτών κατά την ισόρροπη φάση της αύξησης, ενώ υπάρχει και «interplay» σύνθεσης πολυσακχαριτών και λιπιδίων. Τα διαδοχικά βιοχημικά «βήματα» τα οποία χωρούν προκειμένου να λάβει χώρα η *de novo* βιοσύνθεση λιπαρών υλών στους ελαιογόνους μικροοργανισμούς, όπως παρουσιάστηκαν ανωτέρω, έχουν ως εξής (Papanikolaou and Aggelis 2011):



**Σχήμα 9.** *De novo* βιοσύνθεση λιπιδίων στους ελαιογόνους μικροοργανισμούς (Papanikolaou and Aggelis 2011).

#### 1.4.2 Ενδοπολυσακχαρίτες

Οι πολυσακχαρίτες είναι πολυμερή αποτελούμενα από μονοσακχαρίτες και ο γενικός χημικός τους τύπος είναι  $(C_6H_{10}O_5)_n$ , συνήθως με  $n > 100$ , Προκύπτουν από την ένωση περισσότερων από 10 μονοσακχαριτών με γλυκοσιδικό δεσμό, ο οποίος αναπτύσσεται μεταξύ του υδροξυλίου του C-1 του πρώτου σακχάρου και το υδροξύλιο ενός εκ των C-2, C-3, C-4 ή C-6 του επόμενου. Πολυσακχαρίτες όπως το άμυλο, το γλυκογόνο και η δεξτράνη αποτελούνται από αρκετές χιλιάδες μόρια D-γλυκόζης. Ο αριθμός των μονάδων μονοσακχαρίτη σε έναν πολυσακχαρίτη, που ονομάζεται βαθμός πολυμερισμού (BP), ποικίλλει. Μόνο λίγοι πολυσακχαρίτες

έχουν ΒΠ μικρότερο από 100, οι περισσότεροι έχουν ΒΠ εντός του εύρους 200-3000, Οι μεγαλύτεροι από αυτούς, όπως η κυτταρίνη, έχουν ΒΠ από 7000-15000, Επίσης, χρησιμεύουν ως αποταμιευτικές και δομικές ύλες σε ζωικούς και φυτικούς οργανισμούς. Εκτιμάται ότι περισσότερο από το 90% της σημαντικής μάζας υδατάνθρακα στη φύση είναι στη μορφή των πολυσακχαριτών. Πολυσακχαρίτες μπορούν να είναι γραμμικά ή διακλαδισμένα μόρια. Ο γενικός επιστημονικός όρος για τους πολυσακχαρίτες είναι ο όρος γλυκάνες (Belitz 2009; BeMiller et al. 1996).

Πολυμερή που έχουν μικρό μοριακό βάρος και αποτελούνται από δύο έως εννιά μονοσακχαρίτες καλούνται ολιγοσακχαρίτες. Οι πολυσακχαρίτες ανάλογα με το είδος των σακχάρων που τους αποτελούν διακρίνονται σε διάφορες κατηγορίες. Έτσι πολυσακχαρίτες, όπως το άμυλο ή η κυτταρίνη, όπου μετά από ενζυμική ή χημική υδρόλυση σχηματίζεται μόνο ένα είδος μονοσακχαρίτη (D- γλυκόζη) καλούνται "ομοπολυσακχαρίτες". Αντίθετα, πολυσακχαρίτες όπως οι πηκτίνες, όπου μετά από ενζυμική ή χημική υδρόλυση σχηματίζεται παραπάνω από ένα είδος μονοσακχαρίτη (το D- γαλακτουρονικό οξύ διακόπτεται ετεροπολυσακχαρίτες από μόρια ραμνόζης), καλούνται ετεροπολυσακχαρίτες.

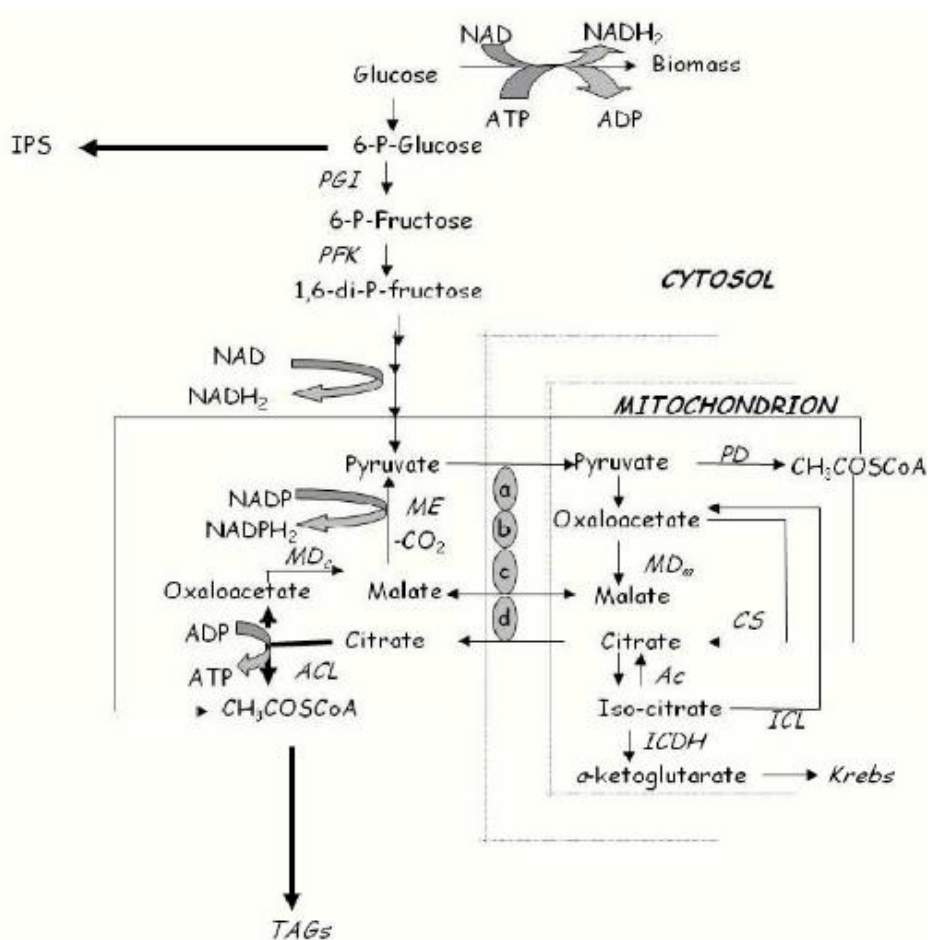
Πολλοί πολυσακχαρίτες, συμπεριλαμβανομένων του αμύλου, της κυτταρίνης και των πηκτινών, χρησιμοποιούνται ευρέως στις φαρμακευτικές βιομηχανίες αλλά και στις βιομηχανίες τροφίμων, καθώς και σε διάφορες ιατρικές εφαρμογές. Οι μύκητες έχουν ευρέως μελετηθεί για την παραγωγή πολυσακχαριτών (έξω- και ένδο- πολυσακχαριτών) και σε πολλές περιπτώσεις παρουσιάζουν φαρμακευτικές και θεραπευτικές δράσεις με αντικαρκινικές και ανοσολογικές ιδιότητες. Οι πολυσακχαρίτες που έχουν τις παραπάνω ιδιότητες ανήκουν στις ετερο-β-γλυκάνες (π.χ. λεντινάνη) (Tang and Zhong 2002). Αυτές οι β-γλυκάνες αποτελούνται από μόρια γλυκόζης ενωμένα με β-(1,3) γλυκοσιδικούς δεσμούς στα οποία συνδέονται με διακλαδώσεις μόρια γλυκόζης με γλυκοζιδικό δεσμό β-(1,6) (Fazenda et al. 2008; Seviour et al. 1992). Παρ' όλα αυτά η έκταση της διακλάδωσης διαφέρει σε πολλά είδη μυκήτων (e.g. *Botryosphaeria rhodina*, *Pleurotus eryngii*, *Pleurotus ostreatoroseus*, *Lentinula edodes*), με τη συχνότητα διακλάδωσης (ένα μόριο γλυκόζης) να εμφανίζεται κάθε τρία μόρια γλυκόζης της βασικής αλυσίδας, ενώ σε άλλα, όπως στο *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).

## Βιοσύνθεση ενδοπολυσακχαριτών

Οι πολυσακχαρίτες που παράγουν οι μύκητες προέρχονται είτε από υγρές καλλιέργειες βυθού είτε από ζυμώσεις στερεής κατάστασης. Η σύσταση των παραγόμενων πολυσακχαριτών επηρεάζεται σημαντικά από τις συνθήκες στις οποίες τελείται η ζύμωση και ακόμα περισσότερο επηρεάζεται από τη σύσταση του μέσου καλλιέργειας (Wu, Ding, and Zhang 2006). Η γνώση αυτών είναι απαραίτητη, έτσι ώστε να οδηγηθεί ο μεταβολισμός των μυκήτων προς την παραγωγή των επιθυμητών μεταβολιτών. Διάφορες μελέτες έχουν δείξει ότι 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) (Fang and Zhong 2002; Gern et al. 2008). Επιπλέον παράγοντες όπως το pH, η θερμοκρασία της ζύμωσης αλλά και ο αερισμός παίζουν σημαντικό ρόλο στη βιοσύνθεση των πολυσακχαριτών. Παρ' όλα αυτά, οι συνθήκες που ευνοούν την παραγωγή βιομάζας μπορεί να μην ευνοούν την συσσώρευση των πολυσακχαριτών (κυρίως των εξωπολυσακχαριτών) και αντιστρόφως (Diamantopoulou et al. 2014; Diamantopoulou et al. 2012a; Diamantopoulou et al. 2012b; Tang and Zhong 2002).

Οι ενδοπολυσακχαρίτες που παράγονται από τους ανώτερους μύκητες περιλαμβάνουν μονοσακχαρίτες (π.χ. φρουκτόζη), δισακχαρίτες (π.χ. τρεχαλόζη), πολυόλες (π.χ. μαννιτόλη), αλλά κυρίως πολυσακχαρίτες όπως γλυκογόνο, πολυουλάνες, β-γλυκάνες και άλλα (Diamantopoulou et al. 2014; Fang and Zhong 2002; Galiotou-Panayotou, Kalantzi, and Aggelis 1998; Seviour et al. 1992; Tang and Zhong 2002).

Από βιοχημικής πλευράς, σε πολλές βιβλιογραφικές μελέτες έχει βρεθεί και τονιστεί ότι ο περιορισμός σε άζωτο στην καλλιέργεια επιδρά θετικά στην συσσώρευση αυτών των συστατικών (ο μηχανισμός είναι παρόμοιος με αυτόν κατά την συσσώρευση λιπιδίων) εξαιτίας του θετικού αλλοστερικού ελέγχου του AMP, όπου απενεργοποιεί το ένζυμο 6-φωσφοροφρουκτοκινάση (6-PFK) έτσι ώστε να εξασφαλιστούν οι απαιτήσεις των κυττάρων σε άζωτο (Galiotou-Panayotou, Kalantzi, and Aggelis 1998; Papanikolaou and Aggelis 2011; Ratledge and Wynn 2002). Η παραπάνω κατάσταση μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα την συσσώρευση ενδοπολυσακχαριτών. Το υποθετικό σενάριο της συσσώρευσης των ενδοπολυσακχαριτών παρουσιάζεται στο **Σχήμα 10**.



**Σχήμα 10.** Απεικόνιση της συσσώρευσης των ενδοπολυσακχαριτών στα κύτταρα των μικροοργανισμών.

Τα τελευταία χρόνια πάντως έχει δείχθει ότι σε αρκετές περιπτώσεις ζυμών, παρά την παρουσία αζώτου στο μέσο ανάπτυξης, η συγκέντρωση των ενδοπολυσακχαριτών μπορεί να αυξηθεί σημαντικά (έως και άνω του 25% κατά βάρος) στα πρώιμα στάδια ανάπτυξης. Αυτό φάνηκε σε καλλιέργειες σε υπόστρωμα γλυκερόλης και παρομοίως μεταβολιζόμενων ουσιών σε μελέτες των Diamantopoulou et al. (2020) και Filippousi et al. (2019).

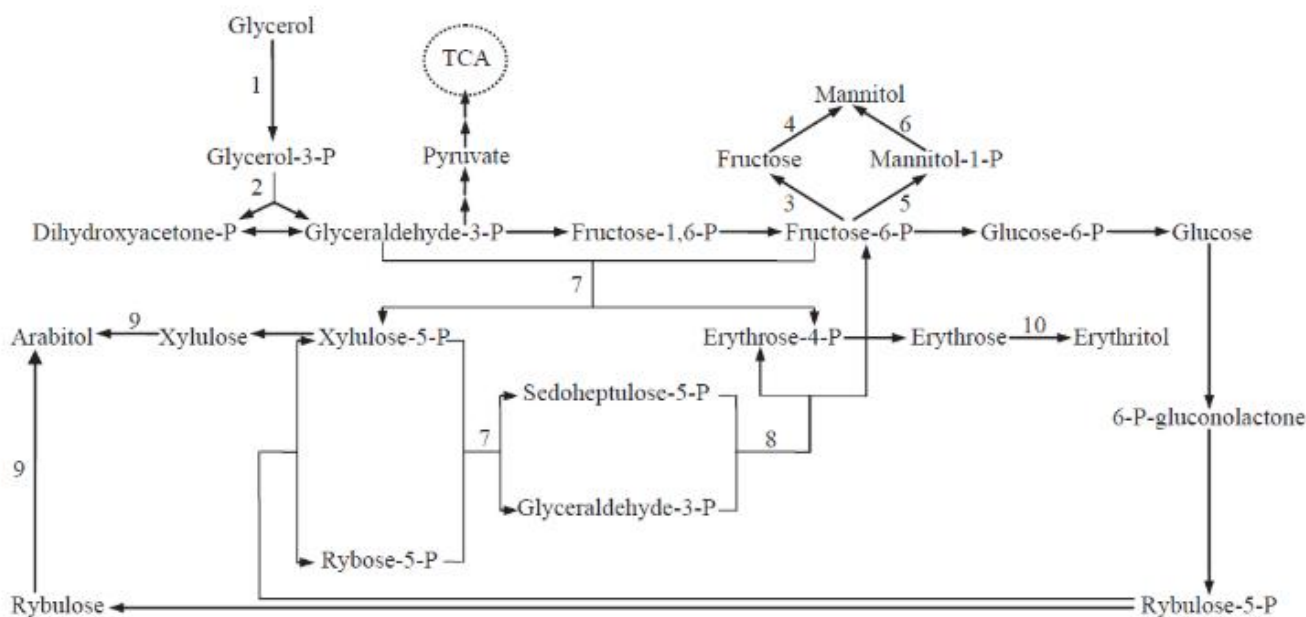
### 1.4.3 Πολυόλες – Αραβιτόλη

Οι πολυόλες είναι ενώσεις άνθρακα οι οποίες είναι γνωστές και ως σακχαρο-αλκοόλες. Στην πραγματικότητα δεν κατατάσσονται ούτε στα σάκχαρα ούτε στις αλκοόλες αλλά αποτελούν υδρογονωμένους υδατάνθρακες. Ο γενικός τύπος των πολυολών είναι  $H(HCHO)_n+1H$ . Μπορούν να έχουν λευκή κρυσταλλική μορφή,

μορφή σκόνης ή διαυγούς σιροπιού. Πολυόλες, όπως η σορβιτόλη (E420), ημανιτόλη (E421), ημαλιτόλη (E965), ηλακτιτόλη (E966), ηξυλιτόλη (E967) κ.α. αποτελούν γλυκαντικά πρόσθετα των τροφίμων (Ghosh and Sudha 2012). Σύμφωνα με τον Wennerholm et al. (1991) οι πολυόλες υπερτερούν ως γλυκαντικά σε σχέση με την ζάχαρη καθώς μεταβολίζονται λίγο έως καθόλου από τη μικροχλωρίδα του στόματος μειώνοντας την πιθανότητα ανάπτυξης ασθενειών. Επιπλέον ο μεταβολισμός τους από τον ανθρώπινο οργανισμό απαιτεί μικρότερη ποσότητα ινσουλίνης (Finer 1991).

Η αραβιτόλη και το πιο γνωστό της ισομερές, η ξυλιτόλη, είναι πολυόλες με 5 άτομα άνθρακα. Σε καθαρή μορφή έχουν λευκή κρυσταλλική δομή. Το σημείο ζέσης της αραβιτόλης είναι 103 °C και της ξυλιτόλης 93 °C. Η ξυλιτόλη είναι ήδη γνωστή εμπορικά και χρησιμοποιείται κυρίως σε εφαρμογές προϊόντων κατά της τερηδόνας όπως οδοντόπαστες και τσίχλες. Και οι δύο ουσίες είναι προϊόντα των βιοδιυλιστηρίων και θεωρούνται δομικές μονάδες για διάφορες άλλες χημικές ενώσεις της χημικής βιομηχανίας (Loman and Ju 2014). Σύμφωνα με το US Department of Energy η αραβιτόλη και η ξυλιτόλη είναι μεταξύ των 12 κορυφαίων ενώσεων που χαρακτηρίζονται ως δομικές μονάδες που προέρχονται από βιομάζα. Η ξυλιτόλη έχει προταθεί επίσης ως βάση για την δημιουργία βιοδιασπώμενων πολυμερών για βιοιατρικές εφαρμογές (Bruggeman et al. 2008; Bruggeman et al. 2010; García-Martín et al. 2004). Η αραβιτόλη ως ισομερές θεωρείται ότι έχει παρόμοιες δυνατότητες και η έρευνα ώστε να βρεθούν τρόποι να παραχθεί βιώσιμα από φθηνότερες και λιγότερο «καθαρές» πρώτες ύλες όπως η βιομηχανική ακάθαρτη γλυκερόλη, παρουσιάζουν μεγάλο ενδιαφέρον για την επιστήμη αλλά και την βιομηχανία.

Σύμφωνα με την βιβλιογραφία έχουν μελετηθεί αρκετοί μικροοργανισμοί ανθεκτικοί στο ωσμωτικό στρες για την ικανότητα παραγωγής αραβιτόλης από ζύμωση της γλυκερόλης. Μεταξύ αυτών είναι τα γένη *Pichia* (Bispingetal. 1996), *Wickerhamomyces* (VanEcketal. 1989) και *Debaryomyces* (Filippousi et al., 2019). Η συσσώρευση ουσιών όπως η αραβιτόλη, ημανιτόλη, η γλυκερόλη και η ερυθριτόλη βοηθούν το κύτταρο να διατηρήσει την ωσμωτική ισορροπία στην κυτταρική του μεμβράνη (Groleau etal. 1995). Στο **Σχήμα 11** απεικονίζονται τα βιομηχανικά μονοπάτια για την παραγωγή των διάφορων πολυολών από τους μικροοργανισμούς.



Σχήμα 11. Η παραγωγή πολυολών από τα μικροβιακά κύτταρα (Park et al., 2005).

#### 1.4.4 Κιτρικό οξύ

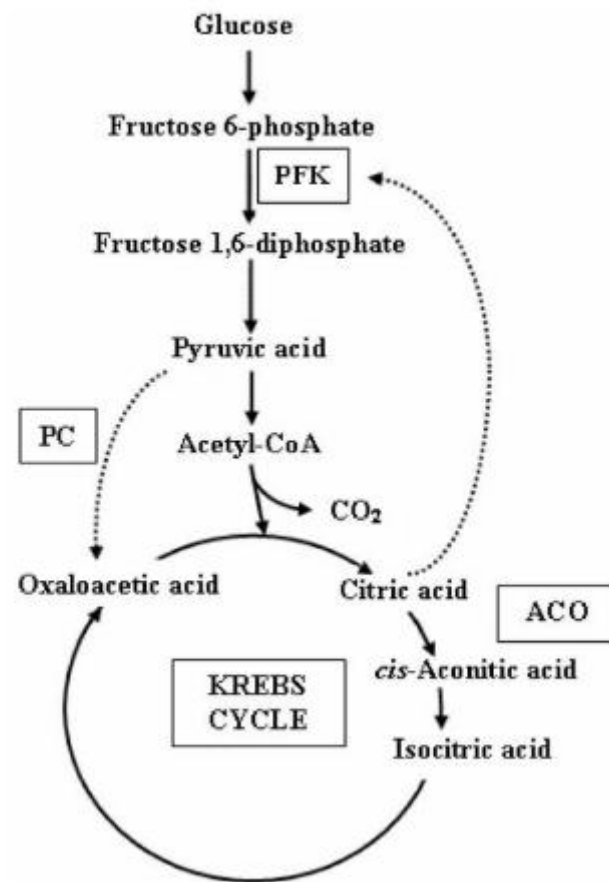
Το κιτρικό οξύ ( $C_6H_8O_7$ ) είναι ένα οργανικό οξύ του κύκλου των τρικαρβοξυλικών οξέων (TCA). Είναι ενδιάμεσο του κύκλου μεταβολισμού των σακχάρων στους ζωντανούς οργανισμούς, μεγάλης βιολογικής σημασίας, αφού αποτελεί μέρος της διαδικασίας κατά την οποία οι ζωντανοί οργανισμοί μετατρέπουν την τροφή σε ενέργεια. Βρίσκεται φυσικά σε πολλά εσπεριδοειδή φρούτα (π.χ. λεμόνια, πορτοκάλια), σε ανανάδες, στα αχλάδια, στα δαμάσκηνα, και σε ζωικούς μυς και οστά (Najafpour, Zinatizadeh, and Lee 2006; Roukas 2000). Η ονομασία του προέρχεται από τη λατινική λέξη “citrus”, το δέντρο κίτρο. Για πρώτη φορά απομονώθηκε από τον χυμό λεμονιού το 1784 από τον Carl Steele, έναν Σουηδό χημικό. Χρησιμοποιείται στην βιομηχανία τροφίμων, φαρμάκων, αρωμάτων και χημικών υλών ως ρυθμιστής οξύτητας ως αρωματικό συστατικό και για την δημιουργία αλάτων. Το κιτρικό οξύ είναι μία χημική ένωση με μεγάλη πρακτική σημασία και παράγεται σε τεράστιες ποσότητες σε παγκόσμιο επίπεδο. Μόνο το 2007 παράχθηκαν πάνω από 1,6 εκατομμύρια τόνοι κιτρικού οξέος (Berovic and Legisa 2007), με ένα μεγάλο ποσοστό αυτού (35-40%) να παράγεται στην Κίνα.

Για την παραγωγή του δεν χρησιμοποιούνται πλέον χημικές μέθοδοι, αφού κρίνονται μη οικονομικές και λιγότερο αποτελεσματικές έναντι της βιοτεχνολογικής παραγωγής του οξέος. Οι κακές αποδόσεις τελικού προϊόντος, η υψηλή αξία του

αρχικού υλικού εκκίνησης, τα πολλά ενδιάμεσα στάδια και οι επικίνδυνες χημικές ενώσεις που χρησιμοποιούνται στην διεργασία οδήγησαν την επιστημονική κοινότητα να αναζητήσει εναλλακτικούς τρόπους παραγωγής του κιτρικού οξέος, μέσω μικροβιακής ζύμωσης με χρήση στελεχών ανώτερων μυκήτων. Σε βιομηχανικό επίπεδο, η παραγωγή του κιτρικού οξέος είναι το κύριο βιοτεχνολογικό προϊόν που παράγεται με μικροβιακή ζύμωση (Berovic and Legisa 2007; Soccol et al. 2006). Σε συνθήκες υγρής καλλιέργειας βυθού έχουν χρησιμοποιηθεί στελέχη του είδους *Aspergillus niger* (Papanikolaou and Aggelis 2009; Soccol et al. 2006) και διάφορα στελέχη του είδους *Yarrowia lipolytica* σε διαφορετικά υποστρώματα.

### Βιοσύνθεση κιτρικού οξέος

Σε βιοχημικό επίπεδο, η βιοσύνθεση και παραγωγή του κιτρικού οξέος από μικροοργανισμούς ευνοείται, όταν η πηγή αζώτου εξαντληθεί εξω- και ενδοκυτταρικά (Morgunov et al. 2004; Papanikolaou and Aggelis 2011; Ratledge 2004). Η διεργασία παραγωγής και έκκρισης του κιτρικού οξέος στο μέσο της καλλιέργειας είναι στα πρώτα στάδια της ίδια με αυτήν της βιοσύνθεσης και συσσώρευσης των λιπιδίων από τους ελαιογόνους μικροοργανισμούς. Καθοριστικός παράγοντας για την παραγωγή και των δύο είναι η εξάντληση των πηγών αζώτου του κυττάρου στο μέσο της καλλιέργειας. Η μείωση του ενδοκυτταρικού AMP προκαλεί την παρεμπόδιση των ενζύμων NAD<sup>+</sup> και NADP<sup>+</sup> ισο-κιτρικής αφυδρογονάσης που είναι υπεύθυνα για την μετατροπή του ισο-κιτρικού οξέος σε α-κετογλουταρικό οξύ. Η παρεμπόδιση της δράσης αυτών των ενζύμων έχει σαν συνέπεια την συσσώρευση του κιτρικού οξέος στο μιτοχόνδριο του κυττάρου (Ratledge 2004; Ratledge and Wynn 2002). Όταν η συγκέντρωση του κιτρικού οξέος στο μιτοχόνδριο ξεπεράσει μία κρίσιμη τιμή, εξέρχεται στο κυτταρόπλασμα. Στο **Σχήμα 12** παρουσιάζεται η βιομηχανική παραγωγή του κιτρικού οξέος.



Σχήμα 12. Η παραγωγή του κιτρικού οξέος στα μικροβιακά κύτταρα.



## 2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 2.1 Μικροοργανισμοί

Οι μικροοργανισμοί που χρησιμοποιήθηκαν για το σκοπό της συγκεκριμένης μελέτης ανήκαν στα γένη *Pichia*, *Kazachstania*, *Wickerhamomyces* και *Rhodospiridium*. Όλα αποκτήθηκαν από το εργαστήριο Ποιοτικού Ελέγχου του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, ενώ τα στελέχη του γένους *Rhodospiridium* αποκτήθηκαν από την συλλογή του Agricultural Research Service Culture Collection (ARS, NRRL, <https://nrri.ncaur.usda.gov/>). Τα τελευταία χρησιμοποιήθηκαν ως θετικοί μάρτυρες για την παραγωγή μικροβιακών λιπιδίων. Στον **Πίνακα 2,1** παρουσιάζονται όλοι οι μικροοργανισμοί που χρησιμοποιήθηκαν με την αντίστοιχη πηγή από όπου συλλέχθηκαν.

**Πίνακας 2.1.** Στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα καθώς και το μέρος από όπου συλλέχθηκαν.

Στέλεχος	Προέλευση
<i>P. membranifaciens</i> Θ19	Εργαστήριο Ποιοτικού Ελέγχου, ΓΠΑ
<i>P. membranifaciens</i> N3	Εργαστήριο Ποιοτικού Ελέγχου, ΓΠΑ
<i>P. membranifaciens</i> Λ8	Εργαστήριο Ποιοτικού Ελέγχου, ΓΠΑ
<i>P. membranifaciens</i> Λ10	Εργαστήριο Ποιοτικού Ελέγχου, ΓΠΑ
<i>P. membranifaciens</i> N9	Εργαστήριο Ποιοτικού Ελέγχου, ΓΠΑ
<i>P. membranifaciens</i> N12	Εργαστήριο Ποιοτικού Ελέγχου, ΓΠΑ
<i>K. humilis</i> H2A	Εργαστήριο Ποιοτικού Ελέγχου, ΓΠΑ
<i>W. anomalus</i> H3A	Εργαστήριο Ποιοτικού Ελέγχου, ΓΠΑ
<i>W. anomalus</i> H7A	Εργαστήριο Ποιοτικού Ελέγχου, ΓΠΑ
<i>W. anomalus</i> H12B	Εργαστήριο Ποιοτικού Ελέγχου, ΓΠΑ
<i>R. toruloides</i> 48190	Agricultural Research Service Culture Collection
<i>R. toruloides</i> 17902	Agricultural Research Service Culture Collection

### **2.1.1 Διατήρηση μικροοργανισμών**

Οι μικροοργανισμοί διατηρήθηκαν σε στερεό υπόστρωμα YPD Agar (Yeast 10 g/L, Peptone 20 g/L, D-glucose 20 g/L, Agar 20 g/L) (Ryan, Poddar, and Cate 2016) σε κεκλιμένους δοκιμαστικούς σωλήνες (slants) οι οποίοι αποθηκεύτηκαν σε θερμοκρασία 4°C. Από αυτές τις στερεές καλλιέργειες λαμβάνονταν εμβόλια προς ανανέωση και εμβολιασμό υγρής προκαλλιέργειας όπως περιγράφεται στη συνέχεια.

### **2.2.2 Παρασκευή υγρού εμβολίου**

Για να προετοιμαστεί το εμβόλιο για την κυρίως καλλιέργεια έγινε αύξηση του μικροοργανισμού σε προκαλλιέργεια, η οποία πραγματοποιήθηκε σε κωνικές φιάλες τύπου Erlenmeyer των 250 mL πληρωμένες κατά το 1/5 του όγκου τους (μέχρι τα  $50 \pm 1$  mL). Το θρεπτικό μέσο της προκαλλιέργειας ήταν διάλυμα ακάθαρτης γλυκερόλης 20 g/L, yeast extract 10 g/L και πεπτόνης 10 g/L. Έπειτα η προκαλλιέργεια τοποθετήθηκε σε ανακινούμενη τράπεζα σε επωαστήρα τύπου ZHICHENG<sup>®</sup> ZHWY-211B Rocking Incubator σε σταθερές συνθήκες ανάδευσης ( $180 \pm 5$  rpm) και θερμοκρασίας ( $30 \pm 1$  °C) για 48 ώρες. Μετά το πέρας του 48ώρου διενεργήθηκαν μικροβιολογικοί έλεγχοι σε μικροσκόπιο για να διαπιστωθεί αν έχει μολυνθεί το εμβόλιο. Ύστερα η προκαλλιέργεια χρησιμοποιήθηκε για τον εμβολιασμό του θρεπτικού μέσου της κύριας καλλιέργειας κάτω από ασηπτικές συνθήκες. Ο όγκος εμβολίου που χρησιμοποιήθηκε ήταν 1 mL (2% v/v εμβόλιο –  $10^5$ - $10^7$  cfu) Αυτή η διαδικασία επαναλήφθηκε για όλες τις πειραματικές διαδικασίες πριν από κάθε κύρια καλλιέργεια του εκάστοτε στελέχους.

### **2.2 Θρεπτικό μέσο καλλιέργειας**

Οι καλλιέργειες πραγματοποιήθηκαν σε θρεπτικό μέσο που περιείχε ως μοναδική πηγή άνθρακα και ενέργειας βιομηχανική γλυκερόλη (καθαρότητας περίπου 90% κατά βάρος). Η καθαρότητα της γλυκερόλης ελήφθη υπόψη για τους υπολογισμούς των αρχικών συγκεντρώσεων υποστρώματος στα πειράματα που έλαβαν χώρα. Όλες οι ζυμώσεις πραγματοποιήθηκαν σε περιοριστικές συνθήκες ως προς την πηγή αζώτου (Papanikolaou and Aggelis 2002). Πιο συγκεκριμένα, ως πηγή άνθρακα χρησιμοποιήθηκε γλυκερόλη σε συγκέντρωση 60 g/L.

Ως πηγή αζώτου χρησιμοποιήθηκαν:

- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0,5 g/L (θειικό αμμώνιο)
- Yeast extract 0,5 g/L (εκχύλισμα ζύμης)

Ως στερεά άλατα χρησιμοποιήθηκαν:

- $\text{KH}_2\text{PO}_4$  7 g/L (άνυδρο φωσφορικό κάλιο)
- $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  2,5 g/L (άνυδρο φωσφορικό δι-νάτριο)
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1,5 g/L (ένυδρο θειικό μαγνήσιο)

Ως υγρά άλατα χρησιμοποιήθηκαν:

- $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0,15 g/L (ένυδρος 3-χλωριούχος σίδηρος)
- $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0,15 g/L (ένυδρο 2-χλωριούχο ασβέστιο)
- $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,02 g/L (ένυδρος θειικός ψευδάργυρος)
- $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  0,06 g/L (ένυδρο θειικό μαγγάνιο)

### 2.3 Ανάλυση πειραματικών σταδίων

Για τον σκοπό της παρούσας μελέτης όλα τα στελέχη ζυμών που χρησιμοποιήθηκαν, αφού αρχικά ανανεώθηκαν σε στερεό υπόστρωμα YPD Agar, αποθηκεύτηκαν σε κεκλιμένους σωλήνες (slants) με το ίδιο υπόστρωμα και διατηρήθηκαν στο ψυγείο σε θερμοκρασία 4°C.

Στη συνέχεια για τον εκάστοτε μικροοργανισμό υπό εξέταση πάρθηκε δείγμα σε ασηπτικές συνθήκες από τον δοκιμαστικό σωλήνα και εμβολιάστηκε σε 2 κωνικές φιάλες τύπου Erlenmeyer των 250 mL πληρωμένες κατά το 1/5 του όγκου τους (μέχρι τα  $50 \pm 1$  mL) με το θρεπτικό μέσο της προκαλλιέργειας. Οι φιάλες τοποθετήθηκαν σε ανακινούμενη τράπεζα προς επώαση σε σταθερές συνθήκες ανάδευσης ( $180 \pm 5$  rpm) και θερμοκρασίας ( $30 \pm 1$  °C) για 48 ώρες.

Μετά από 48 ώρες επώασης της υγρής προκαλλιέργειας πραγματοποιήθηκε μικροβιολογικός έλεγχος στο μικροσκόπιο για την διαπίστωση τυχόν παρουσίας

βακτηρίων ή άλλων μυκήτων. Εφόσον διαπιστώθηκε η καθαρότητα της προκαλλιέργειας έγινε ο εμβολιασμός των φιαλών της κυρίως καλλιέργειας οι οποίες ήταν του ίδιου τύπου. Για να γίνει η παρακολούθηση της εκάστοτε ζύμωσης, εμβολιάζονταν 14-16 φιάλες κυρίως καλλιέργειας οι οποίες αντιστοιχούσαν από δύο σε ένα σημείο (όλες οι αναλύσεις προέκυψαν από τον μέσο όρο των δύο φιαλών για το κάθε σημείο για λόγους επαναληψιμότητας). Η διαδικασία γινόταν σε ασηπτικές συνθήκες και οι εμβολιασμένες καλλιέργειες τοποθετούνταν στον ανακινούμενο επωαστήρα σε θερμοκρασία  $30 \pm 1$  °C και σε  $180 \pm 5$  rpm.

Η λήψη του κάθε σημείου της ζύμωσης γινόταν κάθε 24 ώρες για τις πρώτες μέρες του πειράματος και στη συνέχεια αναλόγως με την πορεία της και την κατανάλωση του υποστρώματος (γλυκερόλης) η λήψη δείγματος (εις διπλούν) γινόταν κάθε 48 ή και 72 ώρες έως ότου διαπιστωθεί η ολοκλήρωση της ζύμωσης. Μετά την λήψη των φιαλών από τον επωαστήρα, οι οποίες αντιστοιχούσαν σε κάποιο σημείο της ζύμωσης, πραγματοποιούνταν όλες οι μετρήσεις για τον σκοπό του πειράματος και οι οποίες περιγράφονται στη συνέχεια.

## 2.4 Αναλύσεις

Κατά την διάρκεια του κάθε πειράματος μετρήθηκαν τα εξής δεδομένα:

- Το pH του υγρού υποστρώματος
- Η παραγόμενη βιομάζα (X, g/L)
- Το καταναλωθέν θρεπτικό μέσο (γλυκερόλη) (Glol, g/L)
- Το παραγόμενο μικροβιακό λίπος (L, g/L)
- Οι παραγόμενοι ενδοπολυσακχαρίτες (IPS, g/L)
- Οι παραγόμενες πολυόλες (Ara, g/L)

Επίσης, πραγματοποιήθηκε ποιοτική ανάλυση του συνολικού παραγόμενου λίπους με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC), καθώς επίσης και ποιοτικός προσδιορισμός των λιπαρών οξέων που αποτέλεσαν το μικροβιακό λίπος με χρήση αέριας χρωματογραφίας (GC).

### 2.4.1 Διόρθωση του pH

Για τον προσδιορισμό του pH στο υγρό της ζύμωσης χρησιμοποιήθηκε πεχάμετρο (pH /mVmeter HI 8014-Hanna Instruments). Στην περίπτωση που η μετρηθείσα τιμή του pH ήταν κοντά στο επιθυμητό εύρος τιμών ~6 δεν γινόταν καμία ενέργεια, διαφορετικά διορθωνόταν η τιμή του pH, στις υπόλοιπες κωνικές φιάλες της καλλιέργειας, με κατάλληλη προσθήκη αποστειρωμένου διαλύματος καυστικού νατρίου (NaOH) 5M (Sarris et al. 2013).

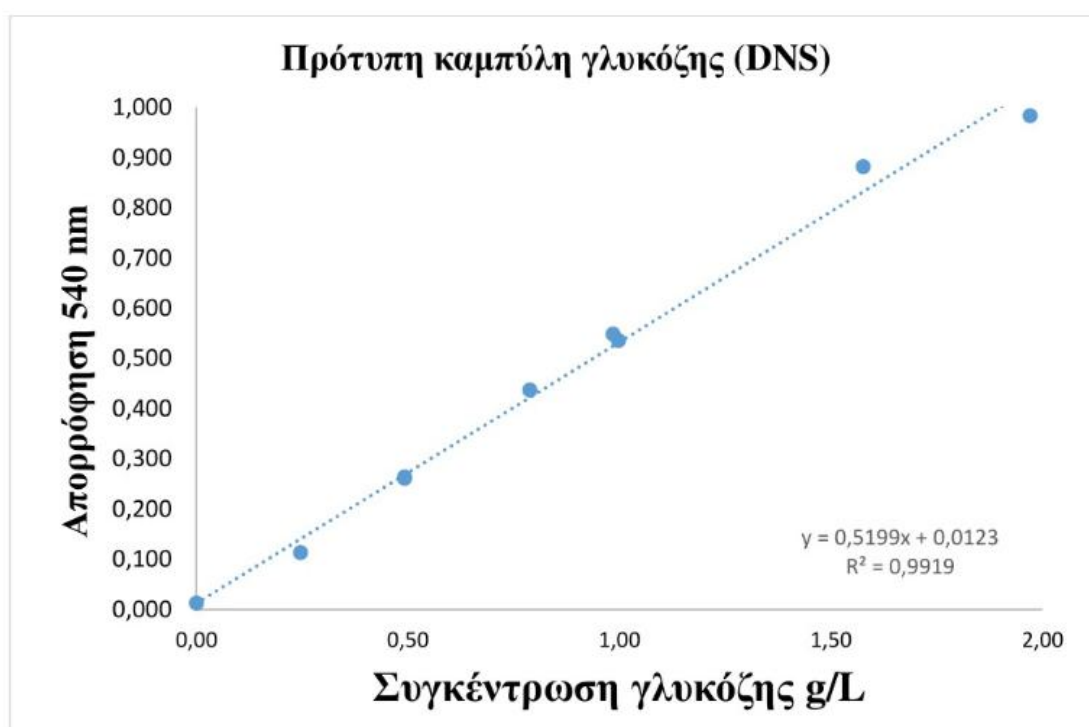
### 2.4.2 Προσδιορισμός βιομάζας

Αρχικά το υγρό ζύμωσης παραλαμβάνεται σε δοχεία τύπου falcon και φυγοκεντρείται σε συσκευή τύπου Universal 320R Hettich Centrifuge για 10 λεπτά, στις 9000 στροφές και στους 4°C, προκειμένου να διαχωριστεί η βιομάζα από το υπερκείμενο υγρό. Ακολουθεί έκπλυση με απιονισμένο νερό και στη συνέχεια δεύτερη φυγοκέντρωση υπό τις ίδιες συνθήκες. Η νωπή βιομάζα ύστερα, μεταφέρεται σε προζυγισμένα φιαλίδια McCartney, τα οποία τοποθετούνται σε φούρνο τύπου Gallenkamp oven BS OV-160 προς ξήρανση στους 80°C για 24 ώρες. Τέλος, μετά την ξήρανση, το φιαλίδιο ζυγίζεται σε αναλυτικό ζυγό τύπου KERN EW 420-3NM και από την διαφορά του βάρους υπολογιζόταν η παραγόμενη βιομάζα εκφραζόμενη σε g/L. Υπολογίστηκε επίσης ο συντελεστής απόδοσης της παραγόμενης βιομάζας,  $Y_{x/s}$  (g/g), το οποίο εκφράζεται ως η παραγόμενη βιομάζα (g/L) προς την καταναλωθείσα ποσότητα υποστρώματος (g/L).

### 2.4.3 Προσδιορισμός ενδοπολυσακχαριτών (IPS)

Στις καλλιέργειες που πραγματοποιήθηκαν, κατά την διάρκεια της παρούσας μελέτης, διενεργήθηκε ποσοτικός προσδιορισμός των παραγόμενων ενδοπολυσακχαριτών (IPS, Intracellular polysaccharides) και ποιοτικός προσδιορισμός των ενδοπολυσακχαριτών σε αντιπροσωπευτικό μέρος δειγμάτων, που προέκυψαν από τις καλλιέργειες. Η ολική συγκέντρωση των ενδοπολυσακχαριτών μετρήθηκε με την διαδικασία η οποία είναι βασισμένη σε ένα τροποποιημένο πρωτόκολλο μεθόδου, το οποίο εκδόθηκε από τους Liang et al. (2009). Η διαδικασία που ακολούθησε ήταν η εξής: 0,05 g ξηρής βιομάζας ελήφθησαν ως δείγμα από την συνολική βιομάζα που είχε παραχθεί. Αυτή η ποσότητα τοποθετήθηκε σε

δοκιμαστικούς σωλήνες και προστέθηκαν 10 mL HCl συγκέντρωσης 5M. Το μίγμα τοποθετήθηκε σε υδατόλουτρο για 30 λεπτά ώστε να πραγματοποιηθεί η όξινη υδρόλυση σε θερμοκρασία 80 °C. Μετά το πέρας του χρόνου αυτού στο μίγμα προστέθηκαν 10 mL NaOH συγκέντρωσης 5M ώστε να γίνει εξουδετέρωση και έγινε διήθηση με διπλό διηθητικό χαρτί σε άλλους δοκιμαστικούς σωλήνες ώστε να απομακρυνθούν όλα τα υπολείμματα βιομάζας. Από τα νέα υγρά δείγματα ελήφθη ποσότητα 0,5 mL και μεταφέρθηκε εκ νέου σε άλλο δοκιμαστικό σωλήνα μαζί με 0,5 mL αντιδραστηρίου DNS (3,5- δι-νιτροσαλικυλικού οξύ) (Miller 1959). Το νέο μίγμα τοποθετήθηκε για βρασμό στους 100 °C για 5 λεπτά και στη συνέχεια αφού ψύχθηκε σε θερμοκρασία δωματίου, προστέθηκαν 5 mL απιονισμένου νερού. Η συγκέντρωση του εκάστοτε δείγματος σε ανάγοντα σάκχαρα υπολογίστηκε από την πρότυπη καμπύλη αναφοράς και εκφράστηκε σε ισοδύναμη συγκέντρωση γλυκόζης (g L<sup>-1</sup>). Όλες οι απορροφήσεις μετρήθηκαν σε φασματοφωτόμετρο τύπου Hitachi U-2000 Spectrophotometer. Υπολογίστηκε επίσης ο συντελεστής απόδοσης των παραγόμενων ενδοπολυσακχαριτών,  $Y_{IPS/X}$  (g/g), ο οποίος εκφράζεται ως το ποσό των παραγόμενων ενδοπολυσακχαριτών (g/L) προς το ποσό παραγόμενη βιομάζα (g/L). Ενδεικτικά παρουσιάζεται η γραμμή αναφοράς προσδιορισμού της γλυκόζης με τη μέθοδο DNS.



Διάγραμμα 2.1. Καμπύλη αναφοράς της γλυκόζης με τη μέθοδο DNS.

#### 2.4.4 Ποσοτικός προσδιορισμός ενδοκυτταρικού λίπους

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

Αρχικά στο φιαλίδιο McCartney μέσα στο οποίο βρίσκεται η ξηρή βιομάζα, προστίθενται  $25 \pm 2$  mL από μίγμα διαλυτών χλωροφορμίου/μεθανόλης σε αναλογία  $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$  2:1 (Folch, Lees, and Stanley 1957). Για να αποφευχθεί η οξείδωση των λιπαρών οξέων του λίπους, το φιαλίδιο McCartney φυλάσσεται κλεισμένο αεροστεγώς στο σκοτάδι για 72 ώρες με στόχο την εκχύλιση του λίπους. Στη συνέχεια γίνεται διήθηση του περιεχόμενου του φιαλιδίου σε προζυγισμένη σφαιρική φιάλη για απομάκρυνση της βιομάζας. Ακολουθεί εξάτμιση υπό κενό του διηθήματος στους  $55^\circ\text{C}$ , με την βοήθεια περιστροφικού εξατμιστήρα τύπου Flash Evaporator-RotavaporR -114, ώστε να απομακρυνθούν οι διαλύτες και να παραμείνει στην σφαιρική φιάλη μόνο το μικροβιακό λίπος. Τέλος, η σφαιρική φιάλη ζυγίζεται με την βοήθεια ζυγού ακριβείας και από την διαφορά μάζας υπολογίζεται το παραγόμενο ενδοκυτταρικό λίπος σε g/L. Υπολογίστηκε επίσης ο συντελεστής απόδοσης του παραγόμενου λίπους,  $Y_{L/X}$  (g/g), ο οποίος εκφράζεται ως η παραγόμενη ποσότητα λίπους (g/L) προς την παραγόμενη βιομάζα (g/L).

#### 2.4.5 Ποιοτική ανάλυση του λίπους σε χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC)

Για την ανάλυση του παραγόμενου μικροβιακού λίπους χρησιμοποιήθηκε χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC). Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε σε πλάκες Silica Gel TLC χρησιμοποιώντας εξάνιο – διαιθυλαιθέρα – οξικό οξύ (αναλογία 70:28:2, v/v/v) για την κινητή φάση για τα ουδέτερα λιπαρά, όπως περιγράφεται από τους Ćirinytė et al (2009). Η κινητή φάση που χρησιμοποιήθηκε κάλυπτε απόσταση 8 cm. Τα δείγματα των μικροβιακών λιπιδίων που εκχυλίστηκαν από την ξηρά βιομάζα (βλ. προηγούμενα εδάφια) επαναδιαλυτοποιήθηκαν σε n-εξάνιο. Η επαναδιαλυτοποίηση έλαβε χώρα σε 2-3 mL εξανίου και οι κηλίδες απεικονίστηκαν σε θάλαμο ιωδίου. Τα πρότυπα που χρησιμοποιήθηκαν για την ταυτοποίηση των ουδέτερων λιπιδίων των δειγμάτων με τις αντίστοιχες αναλογίες ήταν τα εξής: Τριελαϊκή γλυκερόλη (Glycerol trioleate, TAG) 10 mg/mL, Χοληστερόλη (Cholesterol, CL), 10 mg/mL Παλμιτικό οξύ (Palmitic acid, FFA), 40 mg/mL. Άλλες μπάντες που τυχόν παρουσιάστηκαν στα δείγματα κατά την ανάλυση της TLC

αναγνωρίστηκαν σύμφωνα με την ανάλυση λιπιδίων όπως αναφέρονται στο Cyberlipid (<http://cyberlipid.gerli.com/>).

Ο συντελεστής κατακράτησης (Retention Factor– ) των λιπιδίων στα ανεπτυγμένα χρωματογραφήματα υπολογίστηκε ως εξής:

$$R_f = \frac{\text{Απόσταση που δένυσε η ουσία}}{\text{Απόσταση που δένυσε το μέτωπο του διαλύτη}}$$

#### 2.4.6 Μεθυλεστεροποίηση λιπαρών οξέων

Επειδή τα λιπαρά υλικά δεν είναι ιδιαίτερα πτητικά, είναι απαραίτητη η μετατροπή τους στους αντίστοιχους πτητικούς μεθυλικούς εστέρες (FAMES), προκειμένου να αναλυθούν μέσω αέριας χρωματογραφίας (GC), ώστε να γίνει ο προσδιορισμός της σύστασης των λιπαρών οξέων του ενδοκυτταρικού λίπους. Έτσι, τα λιπαρά οξέα του ενδοκυτταρικού λίπους μετατράπηκαν στους αντίστοιχους μεθυλεστέρες χρησιμοποιώντας τη μέθοδο που περιγράφεται από τους Morrison and Smith (1964) και τους Tzirita et al. (2019). Το ενδοκυτταρικό λίπος μεταφέρθηκε σε McCartney φιαλίδιο στο οποίο προστέθηκε 1 mL αντιδραστηρίου τριφθοριούχου βορίου-μεθανόλης (boron trifluoride-methanol complex, Sigma) για κάθε 4-16 mg δείγματος (η ποσότητα που κατά κύριο λόγο χρησιμοποιήθηκε σύμφωνα με το ενδοκυτταρικό λίπος των μικροοργανισμών ήταν 4-8 mL αντιδραστηρίου). Έπειτα από θέρμανση του μίγματος σε υδατόλουτρο στους 100°C για 1 ώρα, προστέθηκαν σε αυτό 3 mL νερού και 6 mL πεντάνιο. Μετά από ελαφριά ανάδευση το στρώμα πεντανίου, το οποίο περιέχει το μεθυλεστεροποιημένο δείγμα, μεταφέρθηκε σε καινούργιο φιαλίδιο και η διαδικασία της εκχύλισης επαναλήφθηκε άλλη μία φορά χρησιμοποιώντας επιπλέον 6 mL πεντανίου. Το πεντάνιο στη συνέχεια εξατμίστηκε υπό κενό του διηθήματος στους 55°C, με την βοήθεια περιστροφικού εξατμιστήρα τύπου Flash Evaporator- RotavaporR -114, και τα λιπαρά οξέα που συλλέχθηκαν διαλύθηκαν και αποθηκεύτηκαν σε 2 mL εξανίου για περαιτέρω ανάλυση στον αέριο χρωματογράφο.



#### 2.4.7 Ποιοτική ανάλυση της σύνθεσης του λίπους σε αέριο χρωματογράφο (GC)

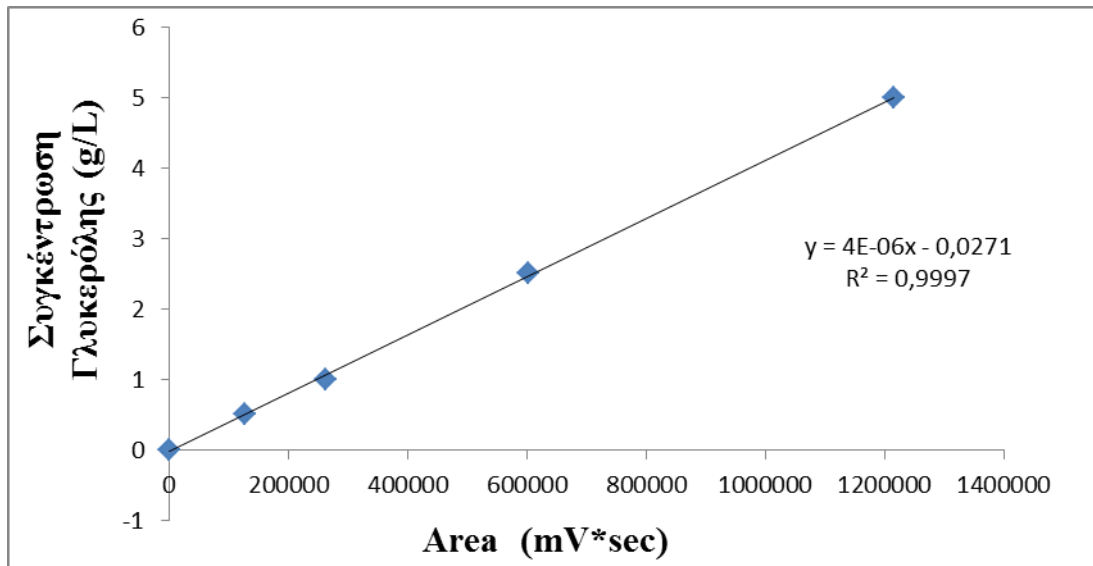
Προκειμένου να γίνει ο ποιοτικός προσδιορισμός της σύστασης του μικροβιακού λίπους, στα επιμέρους λιπαρά οξέα χρησιμοποιήθηκε αέριος χρωματογράφος Fisons GC8000 εξοπλισμένος με τριχοειδή στήλη CPWAX 52 CB μήκους 30 cm και με ανιχνευτή FID (Flame Ionization Detector). Το φέρον αέριο ήταν το He, του οποίου η ροή ήταν 2 mL/min (25°C). Στον εισαγωγέα του χρωματογράφου με την βοήθεια σύριγγας εγχέεται 1 μL δείγματος.

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

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

#### 2.4.8 Ανάλυση με χρήση υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC)

Ο προσδιορισμός των συγκεντρώσεων της γλυκερόλης, του κιτρικού οξέος και των πολυολών (αραβιτόλης, μαννιτόλης, ερυθριτόλης), σε δείγματα με υγρό της ζύμωσης, έγινε με την χρήση υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC). Χρησιμοποιήθηκε χρωματογράφος Waters Association 600E εξοπλισμένος με τριχοειδή στήλη Phenomenex Rezex ROA 30,0 cm × 7,8, Η στήλη αυτή με την οποία έγινε ο διαχωρισμός, διαθέτει συνδυασμό ανιχνευτών και UV (Waters 486) και RI (RI; Waters 410). Ως κινητή φάση (mobile phase) χρησιμοποιήθηκε διάλυμα θεικού οξέος H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5mM με ρυθμό ροής (flow rate) 0,5 mL/min σε θερμοκρασία T=60 °C και η διάρκεια της ανάλυσης ήταν 24 λεπτά. Η γλυκερόλη και οι πολυόλες ανιχνεύτηκαν από τον RI ανιχνευτή ενώ το κιτρικό οξύ από τον UV ανιχνευτή. Το κιτρικό οξύ υπερεκτιμάται από τον UV ανιχνευτή (λόγω συνεκτίμησης και του ισοκιτρικού οξέος) κατά ~5-10% και υπολογίζεται μέσω ενζυμικού προσδιορισμού ακριβέστερα. Η εύρεση των άγνωστων συγκεντρώσεων των προαναφερθέντων ενώσεων έγινε με την χρήση των αντίστοιχων καμπυλών αναφοράς των πρότυπων ουσιών. Ενδεικτικά εμφανίζεται η γραμμή αναφοράς της γλυκερόλης (Γράφημα 2).



Διάγραμμα 2.2. Πρότυπη καμπύλη προσδιορισμού γλυκερόλης.

### 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα μελέτη ερευνήθηκαν τα χαρακτηριστικά της αύξησης διαφόρων ζυμών κατά την καλλιέργειά τους σε υπόστρωμα τύπου γλυκερόλης, όπως αυτή παράγεται ως απόβλητο από τη βιομηχανία παραγωγής βιοντίζελ. Συγκεκριμένα έγιναν ζυμώσεις στελεχών από τα γένη *Pichia*, *Kazachstania*, *Rhodosporidium* και *Wickerhamomyces* και έγινε αξιολόγηση αυτών ως προς την ικανότητα μεταβολισμού της ακάθαρτης γλυκερόλης και παραγωγής προϊόντων προστιθέμενης αξίας όπως λιπίδια, ενδοκυτταρικοί πολυσακχαρίτες, οργανικά οξέα και πολυόλες.

Στην ενότητα αυτή παραθέτονται όλα τα αποτελέσματα των πειραμάτων, όπως οι κινητικές των ζυμώσεων καθώς και τα αποτελέσματα των διαφόρων αναλύσεων που πραγματοποιήθηκαν κατά τη διάρκεια της κάθε ζύμωσης. Στον Πίνακα 3,1 που ακολουθεί συγκεντρώνονται και παρουσιάζονται οι μέγιστες τιμές των παραμέτρων από τις αναλύσεις όλων των στελεχών.

Όπως φαίνεται από τον συγκεντρωτικό πίνακα, η μέγιστη παραγωγή βιομάζας παρατηρήθηκε για τη ζύμη *R. toruloides* 48190 μετά από 268 ώρες επώασης, με τιμή 17,74 g/L και μέγιστο συντελεστή απόδοσης βιομάζας 0,96 g/g. Η αμέσως επόμενη μέγιστη παραγωγή βιομάζας παρατηρήθηκε από τη ζύμη *P. membranifaciens* N3 μετά από 168 ώρες επώαση με τιμή 14,12 g/L και συντελεστή απόδοσης 0,66 g/g. Αμέσως επόμενη μεγάλη παραγωγή βιομάζας παρατηρήθηκε από τα στελέχη της ζύμης *W. anomalus* H3A και H7A με μέγιστη τιμή βιομάζας 11,66 g/L μετά από 168 ώρες και 11,36 g/L μετά από 240 ώρες επώασης, αντίστοιχα, με συντελεστή απόδοσης βιομάζας 0,3 g/g και για τα δύο στελέχη.

Η μέγιστη ποσότητα παραγόμενου λίπους παρατηρήθηκε από τον μικροοργανισμό *R. toruloides* 48190 μετά από 169 ώρες επώασης, με τιμή 5,22 g/L και μέγιστη απόδοση λίπους σε ξηρή βιομάζα 0,41 g/g, ακολουθούμενος από το στέλεχος *P. membranifaciens* N3 με 2,31 g/L στις 72 ώρες καλλιέργειας και απόδοση λίπους 0,27 g/g. Ακολουθεί το στέλεχος *P. membranifaciens* H3A με μέγιστη παραγωγή λίπους 1,32 /L σε χρόνο 168 ωρών και απόδοση επί της βιομάζας 0,11 g/g στον ίδιο χρόνο. Επιπλέον, το δεύτερο στέλεχος *R. toruloides* το 17902 παρουσίασε μέγιστη συγκέντρωση λίπους 1,11 g/L με συντελεστή απόδοσης 0,18 g/g στις 144 ώρες καλλιέργειας.

Όσον αφορά την παραγωγή πολυολών, κυρίως παρατηρήθηκε η παραγωγή αραβιτόλης. Αξιοσημείωτη ήταν η παραγωγή αραβιτόλης από τα στελέχη της ζύμης *W. anomalus* με κυρίαρχο το στέλεχος *W. anomalus* H7A με τιμή 12,47 g/L μετά από 240 ώρες επώασης. Αμέσως επόμενη μεγάλη παραγόμενη τιμή αραβιτόλης παρατηρήθηκε από το στέλεχος H12B με τιμή 11,45 g/L μετά από 216 ώρες επώασης, ακολουθούμενο από το στέλεχος H3A με τιμή 9,03 g/L μετά από 168 ώρες επώασης. Όσον αφορά την παραγωγή ενδοπολυσακχαριτών, όλα τα στελέχη παρουσίασαν ασήμαντες τιμές. Οι μέγιστες τιμές απόδοσης ενδοπολυσακχαριτών ως προς την ξηρή βιομάζα παρατηρήθηκε από τα στελέχη *P. membranifaciens* N9, N12 και τα στελέχη *R. toruloides* και κυμαινόταν μεταξύ 0,05 – 0,057 g/g.

Αξίζει, τέλος, να σημειωθεί ότι από τους μικροοργανισμούς που εξετάστηκαν τα στελέχη *K. humilis* H2A και *P. membranifaciens* Θ19 δεν μπόρεσαν να αναπτυχθούν στο μέσο καλλιέργειας.

**Πίνακας 3.1.** Συνολική παρουσίαση των μέγιστων τιμών των κινητικών δεδομένων των πειραμάτων όλων των στελεχών.

		<b>T (h)</b>	<b>X (g/L)</b>	<b>S<sub>con</sub> (g/L)</b>	<b>Y<sub>L/X</sub></b>	<b>L (g/L)</b>	<b>IPS %</b>	
<i>P. membranifaciens</i>	N3	α	72	8,42	17,97	0,27	2,31	2,48
		β	144	12,36	39,83	0,05	0,56	3,29
		γ	168	14,12	47,25	0,02	0,34	2,90
	N9	α	27	1,74	10,07	0,1	0,17	-
		β	120	5,42	26,38	0,07	0,39	11,25
		γ	216	6,56	41,22	0,03	0,21	8,51
	N12	α	27	1,52	16,78	0,23	0,35	-
		β	120	5,48	27,71	0,05	0,28	9,08
		γ	216	6,52	40,89	0,10	0,62	7,89
	Λ8	β	96	4,96	23,44	-	-	7,13
		γ	216	6,36	40,71	-	-	6,94
	Λ10	β	144	5,6	30,61	-	-	6,61
γ		216	6,24	41,34	-	-	6,34	
<i>W. anomalus</i>	H3A	α,γ	168	11,66	43,47	0,11	1,32	4,21
		β	216	11,52	50,63	0,05	0,56	5,48
	H7A	β	47	7,4	24,90	0,04	0,32	5,63
		γ	240	11,36	57,66	0,04	0,50	4,78
	H12B	α,β	27	4,58	16,19	0,14	0,63	5,84
		γ	240	10	52,15	0,07	0,66	3,93
<i>R. torulooides</i>	R.48	β	48	6,47	7,56	0,11	0,73	13,2
		α	169	12,72	46,61	0,41	5,22	8,72
		γ	268	17,74	59,81	0,24	4,40	7,52
	R.17	α	144	6,12	27,21	0,18	1,11	12,12
		β	196	7,42	28,80	0,11	0,86	14,8
		γ	268	9,16	35,23	0,09	0,89	13,92

Όπου: **T (h)**: ο χρόνος της ζύμωσης σε ώρες, **X (g/L)**: η παραγωγή βιομάζας, **S<sub>con</sub> (g/L)**: η καταναλωθείσα γλυκερόλη, **L (g/L)**: η παραγωγή λίπους, **Y<sub>L/X</sub>**: ο συντελεστής απόδοσης του λίπους ως προς την βιομάζα, **IPS%**: ο συντελεστής απόδοσης των ενδοπολυσακχαριτών ως προς την βιομάζα.

Επιπλέον,

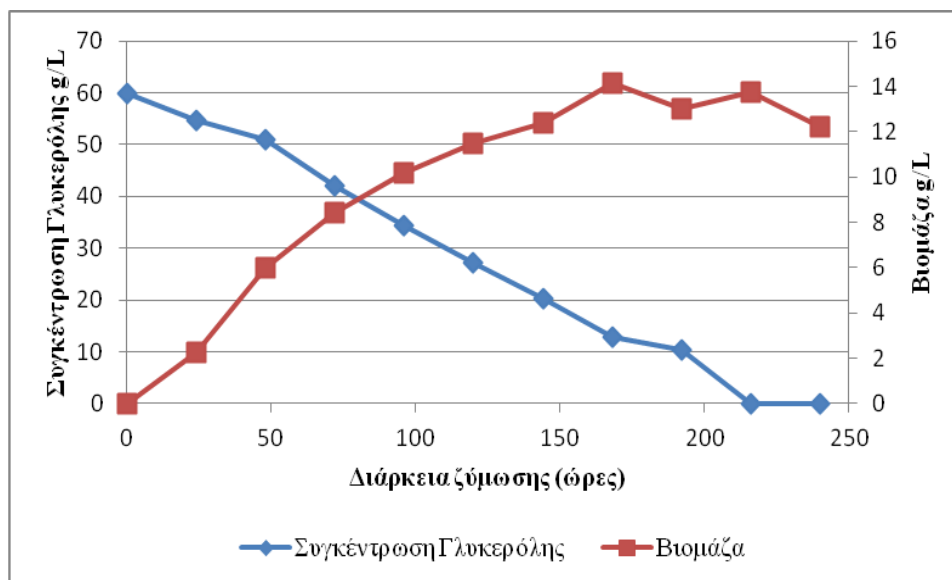
α: το σημείο στο οποίο μετρήθηκε ο μέγιστος συντελεστής απόδοσης λίπους.

β: το σημείο με το μέγιστο ποσοστό ενδοπολυσακχαριτών ως προς την βιομάζα.

γ: το σημείο της μέγιστης παραγωγής βιομάζας. g/L

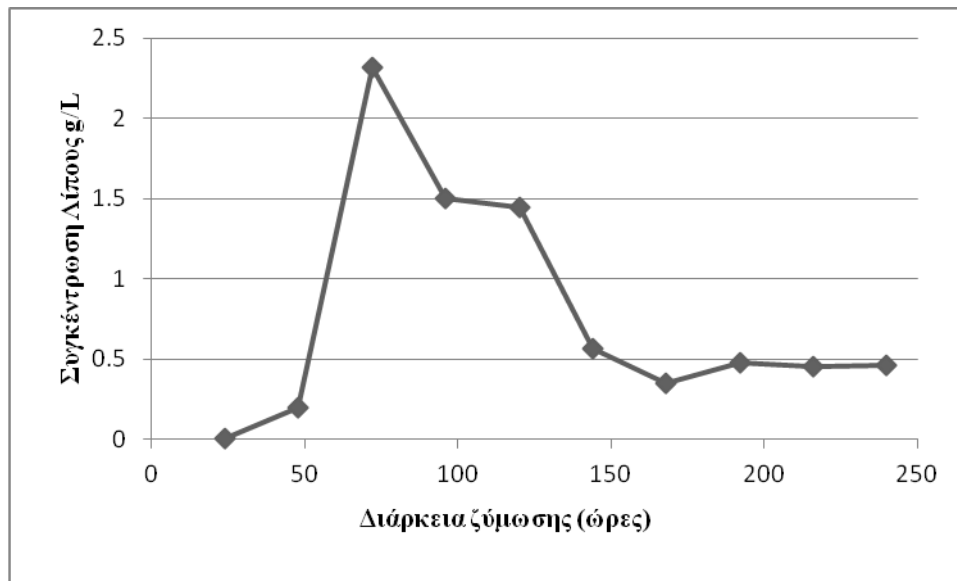
### 3.1 Ζύμωση του στελέχους *Pichia membranifaciens* N3

Όπως φαίνεται στο **Διάγραμμα 3.1** ο μικροοργανισμός καταναλώνει όλη τη γλυκερόλη στο τέλος της ζύμωσης, καθώς αυξάνεται σε βιομάζα φτάνοντας σε ένα μέγιστο και μπαίνει στη στατική φάση. Η μέγιστη συγκέντρωση βιομάζας ήταν  $X_{\max} = 14,1$  g/L (αντίστοιχος συντελεστής απόδοσης βιομάζας  $Y_{X/S} = 0,30$  g/g).

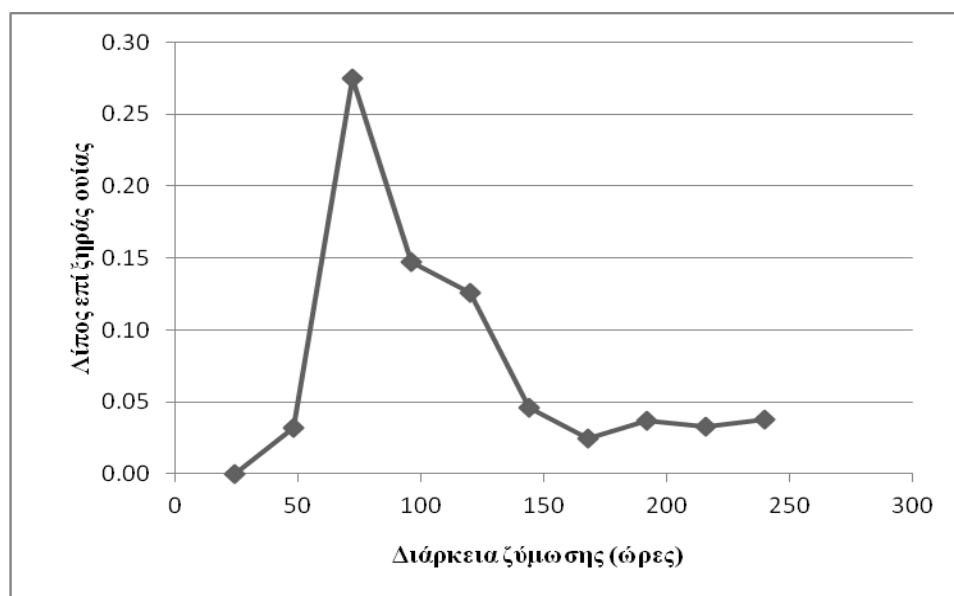


**Διάγραμμα 3.1.** Κινητικά δεδομένα της κατανάλωσης γλυκερόλης και της παραγωγής βιομάζας ως προς τον χρόνο για το στέλεχος *P. membranifaciens* N3,

Στο **Διάγραμμα 3.2** απεικονίζεται η κινητική παραγωγής του λίπους. Όπως φαίνεται στο διάγραμμα το στέλεχος παράγει λίπος (2,3 g/L) μετά από 72 ώρες καλλιέργειας, ενώ στη συνέχεια φαίνεται αργά να το καταναλώνει. Ίδια κινητική παρατηρήθηκε και για την απόδοση λίπους ως προς την ξηρή βιομάζα ( $Y_{L/X}$ ) (**Διάγραμμα 3.3**). Είναι ενδιαφέρον το γεγονός ότι φαίνεται να υπάρχει μια σχετική συσσώρευση ενδο-κυτταρικών λιπιδιακών αποθεμάτων ( $\approx 27\%$  λίπος επί ξηρής βιομάζας για  $T=72$  h μετά από τον εμβολιασμό) στα σχετικά πρώιμα στάδια της ζύμωσης (πιθανώς στις χρονικές εκείνες στιγμές το άζωτο μόλις είχε αποτελέσει το περιοριστικό στοιχείο της διεργασίας), ενώ η συσσώρευση λιπιδίων δεν συνεχίστηκε, δεδομένου ότι τα ενδο-κυτταρικά λιπίδια αποικοδομήθηκαν (βλ. διαγράμματα 3.2 και 3.3) παρά τη σχετικά υψηλή συγκέντρωση γλυκερόλης στο περιβάλλον της ζύμωσης.

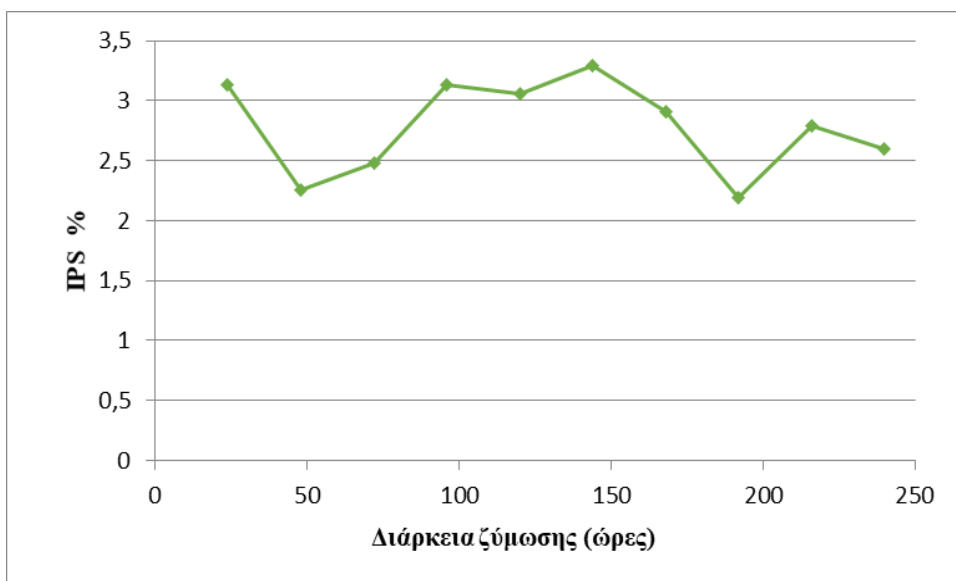


**Διάγραμμα 3.2.** Κινητικά δεδομένα της παραγωγής λιπιδίων ως προς τον χρόνο του στελέχους *P. membranifaciens* N3.



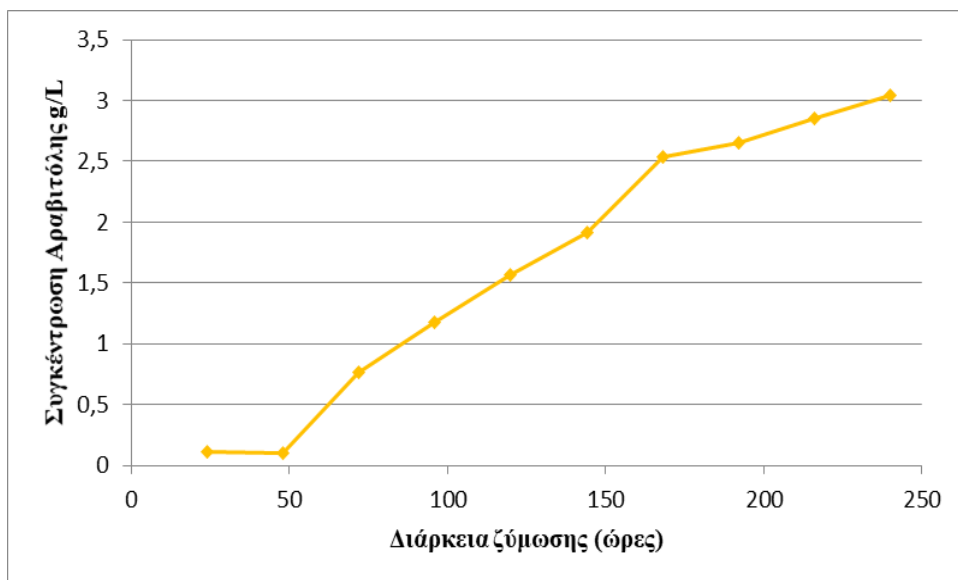
**Διάγραμμα 3.3.** Κινητικά δεδομένα του συντελεστή απόδοσης του λίπους ως προς τον χρόνο του στελέχους *P. membranifaciens* N3.

Στο **Διάγραμμα 3.4** παρουσιάζεται η κινητική παραγωγής ενδοπολυσακχαριτών. Όπως φαίνεται από τα διαγράμματα, οι τιμές είναι αρκετά χαμηλές.



**Διάγραμμα 3.4.** Κινητικά δεδομένα της παραγωγής ενδοπολυσακχαρητών ως προς τον χρόνο του στελέχους *P. membranifaciens* N3.

Στο **Διάγραμμα 3.5** απεικονίζεται η κινητική παραγωγής της αραβιτόλης. Όπως φαίνεται, η παραγωγή της αραβιτόλης έχει αυξητική πορεία η οποία ξεκινάει μετά από 50 ώρες και φτάνει σε ένα μέγιστο στο τέλος της ζύμωσης.

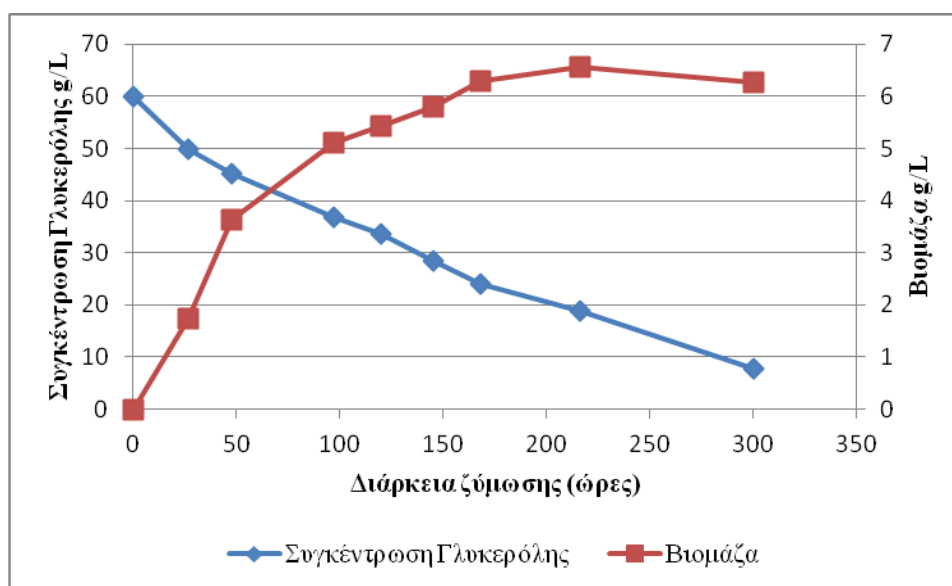


**Διάγραμμα 3.5.** Κινητικά δεδομένα της παραγωγής αραβιτόλης ως προς τον χρόνο του στελέχους *P. membranifaciens* N3.



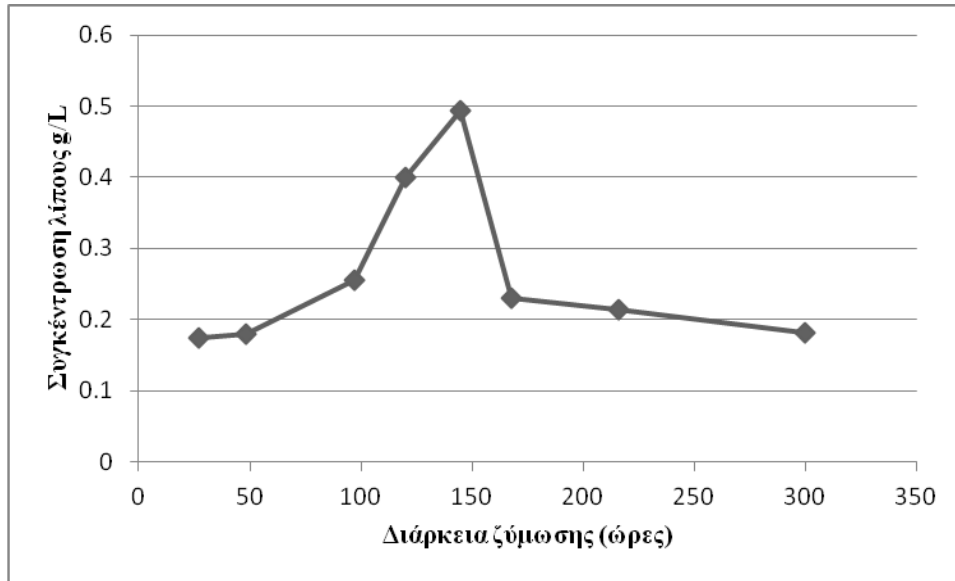
### 3.2 Ζύμωση του στελέχους *Pichia membranifaciens* N9

Στο **Διάγραμμα 3.6** απεικονίζεται η κινητική κατανάλωσης της γλυκερόλης και η κινητική παραγωγής βιομάζας από τον μικροοργανισμό *P. membranifaciens* N9, όπου φαίνεται η σταθερή κατανάλωση της γλυκερόλης καθώς ο μικροοργανισμός συνεχώς αυξάνεται μέχρι να εισέλθει και αυτός στη στατική φάση. Η μέγιστη παραγωγή βιομάζας ήταν  $X_{max}=6,56$  g/L μετά από χρόνο 216 ωρών.

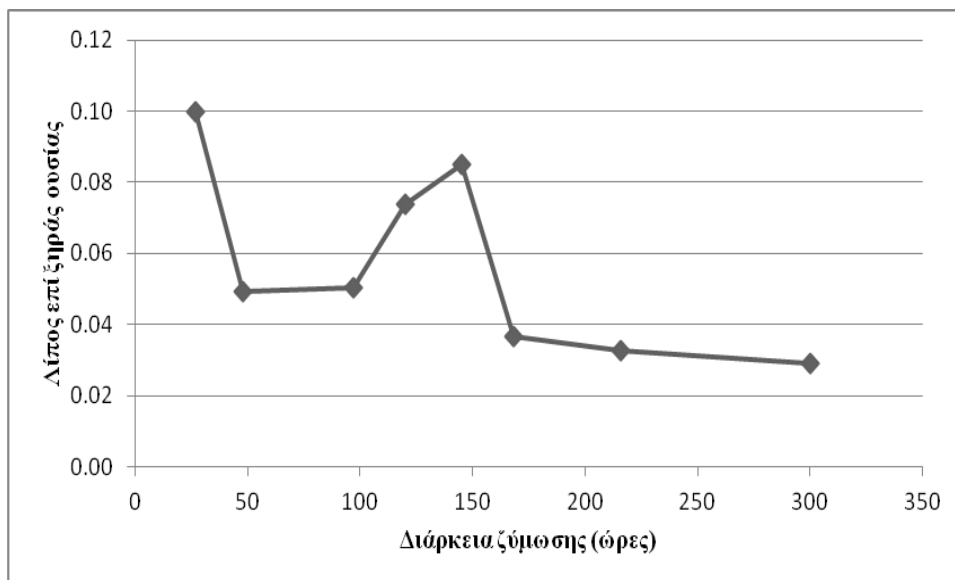


**Διάγραμμα 3.6.** Κινητικά δεδομένα της κατανάλωσης γλυκερόλης και της παραγωγής βιομάζας ως προς τον χρόνο για το στέλεχος *P. membranifaciens* N9.

Στο **Διάγραμμα 3.7** απεικονίζεται η κινητική παραγωγής ενδοκυτταρικού λίπους όπου φαίνεται πως ο μικροοργανισμός μετατρέπει το υπόστρωμα σε ελάχιστο λίπος φτάνοντας σε ένα μέγιστο μόλις 0,5 g/L. Η απόδοση σε λίπος ως προς την ξηρή βιομάζα είναι επίσης χαμηλή (**Διάγραμμα 3.8**).

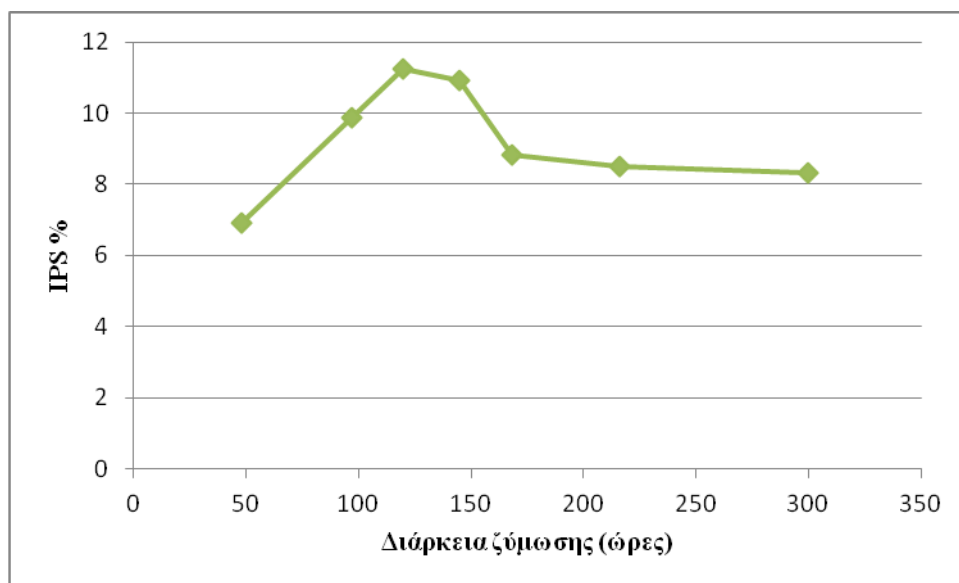


**Διάγραμμα 3.7.** Κινητικά δεδομένα της παραγωγής λιπιδίων ως προς τον χρόνο του στελέχους *P. membranifaciens* N9.

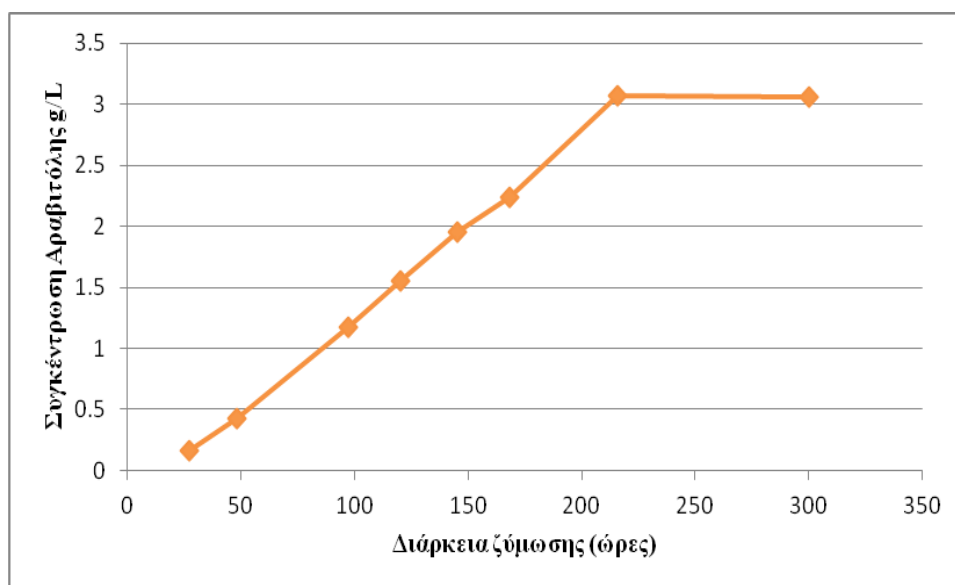


**Διάγραμμα 3.8.** Κινητικά δεδομένα του συντελεστή απόδοσης λίπους ως προς τον χρόνο του στελέχους *P. membranifaciens* N9.

Το στέλεχος *P. membranifaciens* N9 παρουσίασε ποσοστό ενδοπολυσακχαριτών 11,25% μετά από 120 ώρες ζύμωσης (**Διάγραμμα 3.9**). Αυτό το ποσοστό είναι και το μεγαλύτερο μεταξύ των στελεχών του *P. membranifaciens*. Ο μικροοργανισμός παρήγαγε σταθερά αραβιτόλη φτάνοντας μέγιστη τιμή 3 g/L μετά από 216 ώρες καλλιέργειας όπου παρέμεινε σταθερή μέχρι το τέλος της καλλιέργειας (**Διάγραμμα 3.10**).



**Διάγραμμα 3.9.** Κινητικά δεδομένα της παραγωγής ενδοπολυσακχαρητών ως προς τον χρόνο του στελέχους *P. membranifaciens* N9.

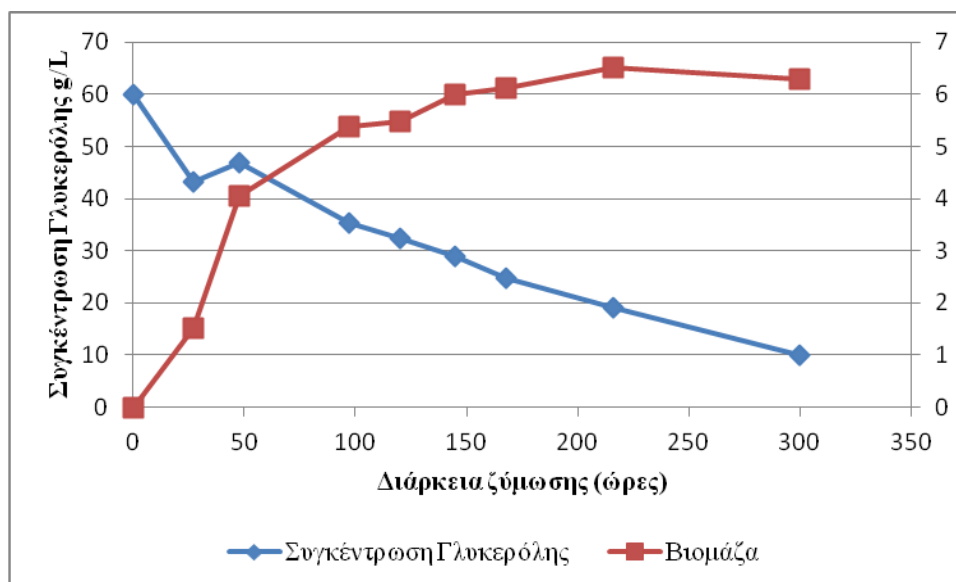


**Διάγραμμα 3.10.** Κινητικά δεδομένα της παραγωγής αραβιτόλης ως προς τον χρόνο του στελέχους *P. membranifaciens* N9.

### 3.3 Ζύμωση του στελέχους *Pichia membranifaciens* N12

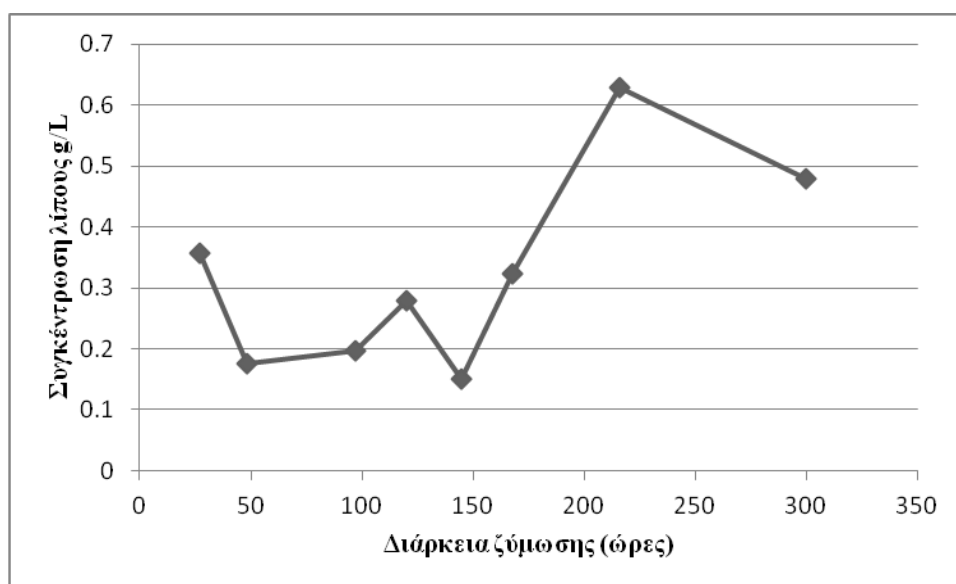
Ο μικροοργανισμός *Pichia membranifaciens* N12 κατανάλωσε αργά τη γλυκερόλη ενώ παρουσίασε γρήγορη παραγωγή βιομάζας μέχρι τις 97 ώρες συνεχίζοντας να αυξάνεται αργά μέχρι σχεδόν το τέλος της ζύμωσης. Η βιομάζα

έφτασε στο μέγιστο των 6,52 g/L μετά από 216 ώρες όπου και εισήλθε στη στατική φάση (Διάγραμμα 3.11).

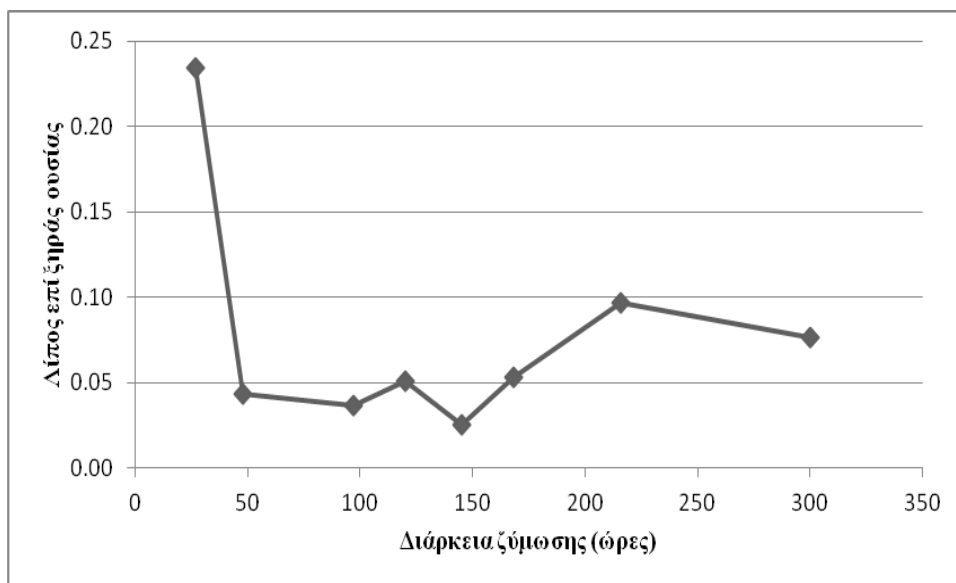


**Διάγραμμα 3.11.** Κινητικά δεδομένα της κατανάλωσης γλυκερόλης και της παραγωγής βιομάζας ως προς τον χρόνο του στελέχους *P. membranifaciens* N12.

Όπως φαίνεται στο Διάγραμμα 3.12 ο μικροοργανισμός συσσωρεύει αρχικά μικρή ποσότητα λιπιδίων και στη συνέχεια παρατηρείται αύξηση έως την μέγιστη συγκέντρωση των 0,62 g/L στις 216 ώρες ζύμωσης.

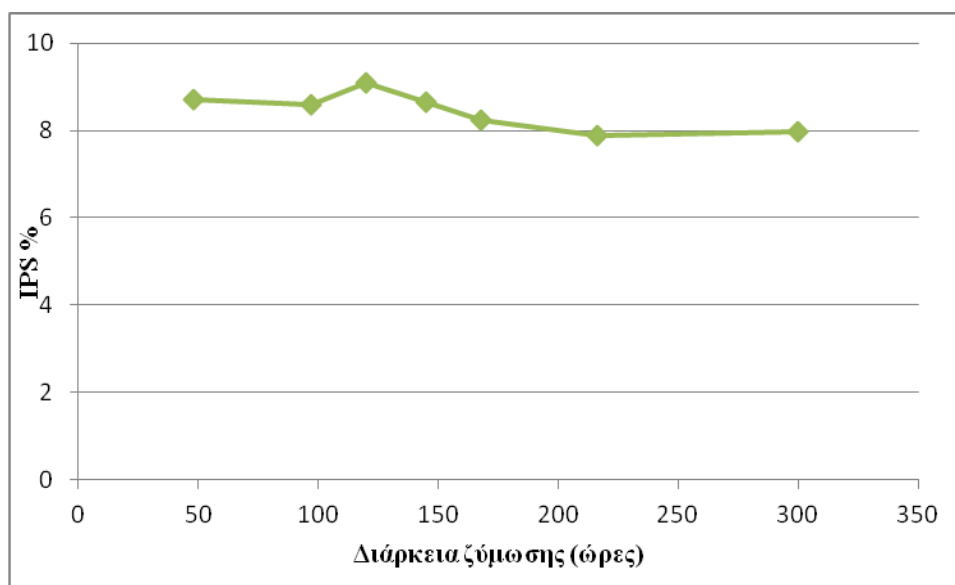


**Διάγραμμα 3.12.** Κινητικά δεδομένα της παραγωγής λίπους ως προς τον χρόνο του στελέχους *P. membranifaciens* N12.

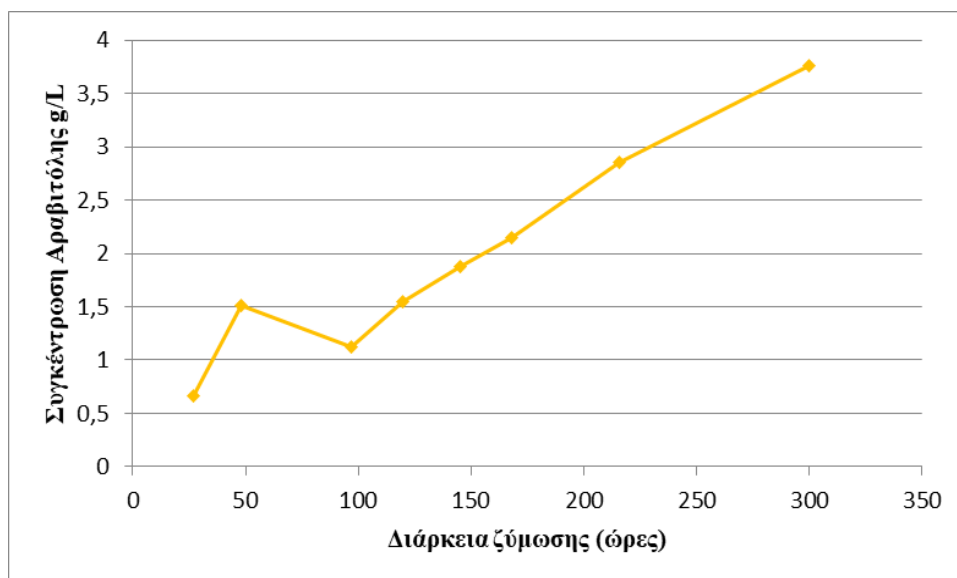


**Διάγραμμα 3.13.** Κινητικά δεδομένα του συντελεστή απόδοσης του λίπους ως προς τον χρόνο του στελέχους *P. membranifaciens* N12.

Το ποσοστό παραγωγής ενδοπολυσακχαριτών (IPS%) φαίνεται να μένει σταθερό μετά από 48 ώρες ζύμωσης με τιμή περίπου 9% (**Διάγραμμα 3.14**). Η παραγωγή της αραβιτόλης, όπως και στα προηγούμενα στελέχη, έτσι και από το στέλεχος *P. membranifaciens* N12 παρουσιάζει μια αυξητική πορεία φτάνοντας σε μέγιστη τιμή 3,75 g/L, στο τέλος της καλλιέργειας (**Διάγραμμα 3.15**).



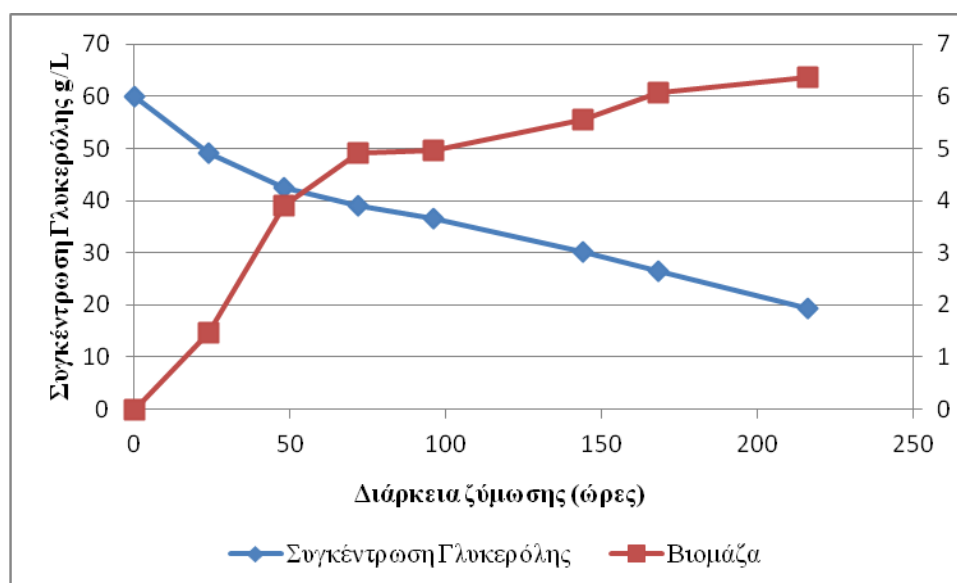
**Διάγραμμα 3.14.** Κινητικά δεδομένα της παραγωγής ενδοπολυσακχαριτών ως προς τον χρόνο του στελέχους *P. membranifaciens* N12.



**Διάγραμμα 3.15.** Κινητική της παραγωγής αραβιτόλης ως προς τον χρόνο του στελέχους *P. membranifaciens* N12.

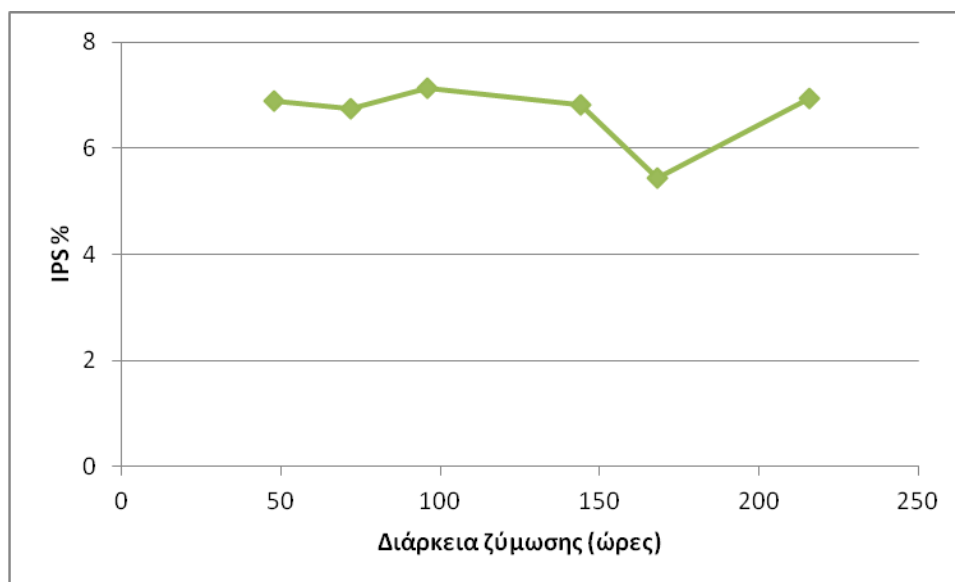
### 3.4 Ζύμωση του στελέχους *Pichia membranifaciens* Λ8

Το στέλεχος *P. membranifaciens* Λ8 φαίνεται επίσης να καταναλώνει αργά τη γλυκερόλη, ενώ η βιομάζα σταθερά αυξάνεται (**Διάγραμμα 3.16**). Η μέγιστη παραγωγή βιομάζας σημειώθηκε στο τέλος της ζύμωσης με  $X_{\max}=6,36$  g/L μετά από 216 ώρες. Το συγκεκριμένο στέλεχος δεν παρουσίασε παραγωγή ενδοκυτταρικού λίπους.

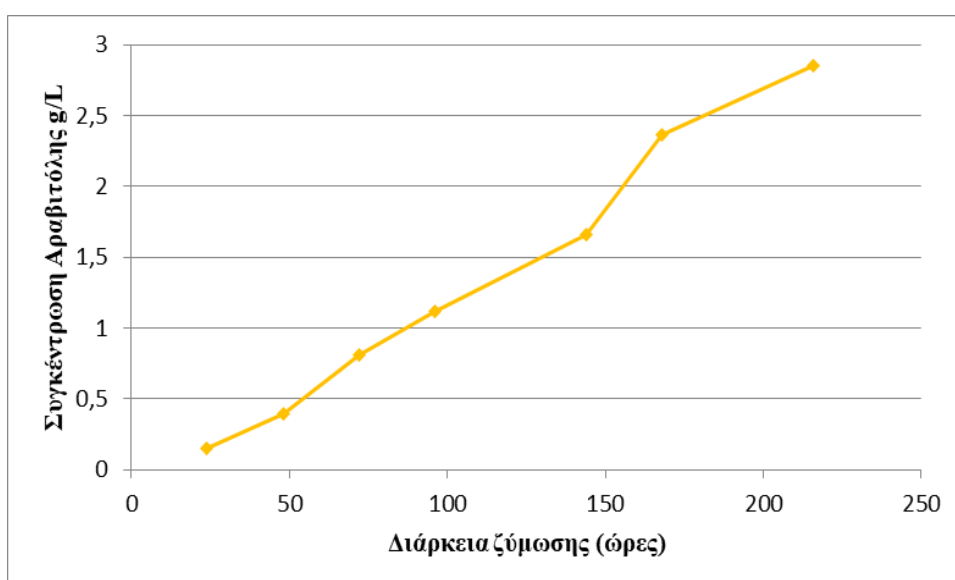


**Διάγραμμα 3.16.** Κινητική της κατανάλωσης γλυκερόλης και της παραγωγής βιομάζας ως προς τον χρόνο του στελέχους *P. membranifaciens* Λ8.

Η παραγωγή των ενδοπολυσακχαριτών ήταν επίσης χαμηλή με το ποσοστό να κυμαίνεται στο 7% στις 48 ώρες καλλιέργειας (Διάγραμμα 3.17). Το στέλεχος επίσης παρουσίασε μικρή παραγωγή αραβιτόλης η οποία ακολούθησε αυξητική πορεία φτάνοντας σε ένα μέγιστο 2,8 g/L στο τέλος της καλλιέργειας (Διάγραμμα 3.18).



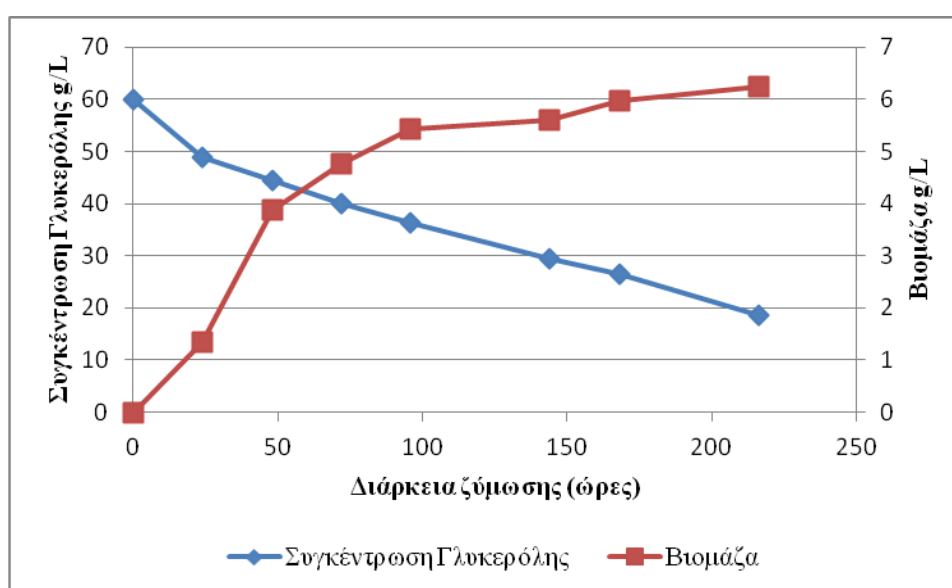
**Διάγραμμα 3.17.** Κινητικά δεδομένα της παραγωγής ενδοπολυσακχαριτών ως προς τον χρόνο του στελέχους *P. membranifaciens* Δ8.



**Διάγραμμα 3.18.** Κινητική της παραγωγής αραβιτόλης ως προς τον χρόνο του στελέχους *P. membranifaciens* Δ8.

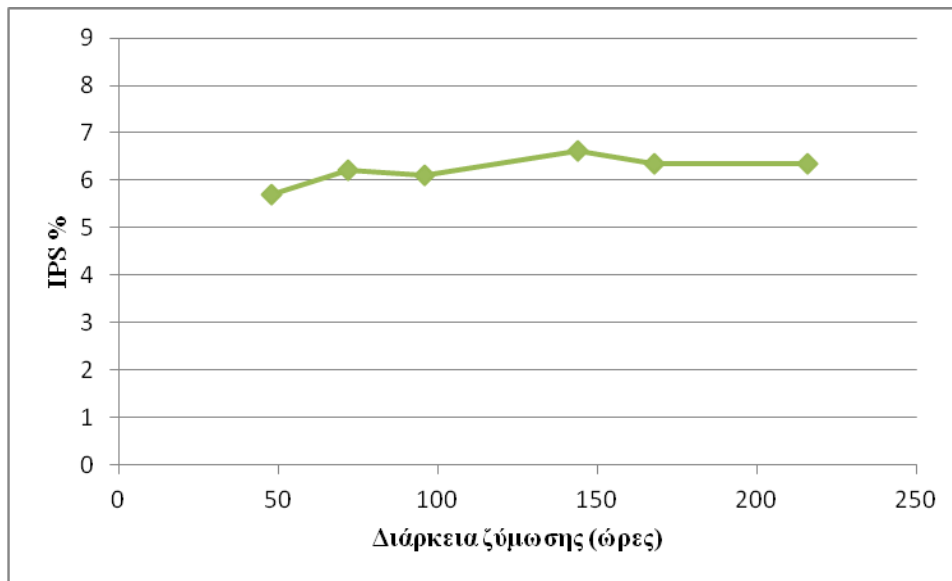
### 3.5 Ζύμωση του στελέχους *Pichia membranifaciens* Λ10

Ο μικροοργανισμός *P. membranifaciens* Λ10, ομοίως με το στέλεχος Λ8, παρουσίασε αργή κατανάλωση της γλυκερόλης με αυξητική πορεία βιομάζας φτάνοντας σε ένα μέγιστο περίπου 6 g/L επίσης στις 216 ώρες (**Διάγραμμα 3.19**). Ομοίως με το στέλεχος Λ8, ο μικροοργανισμός αυτός δεν παρήγαγε ενδοκυτταρικό λίπος. Το ποσοστό των παραγόμενων ενδοπολυσακχαριτών (IPS%) ήταν σταθερό και κυμαινόταν γύρω στο 6,6% (**Διάγραμμα 3.20**). Η παραγόμενη αραβιτόλη είχε επίσης αυξητική πορεία μέχρι το τέλος της ζύμωσης όπου έφτασε σε ένα μέγιστο 2,7 g/L (**Διάγραμμα 3.21**).

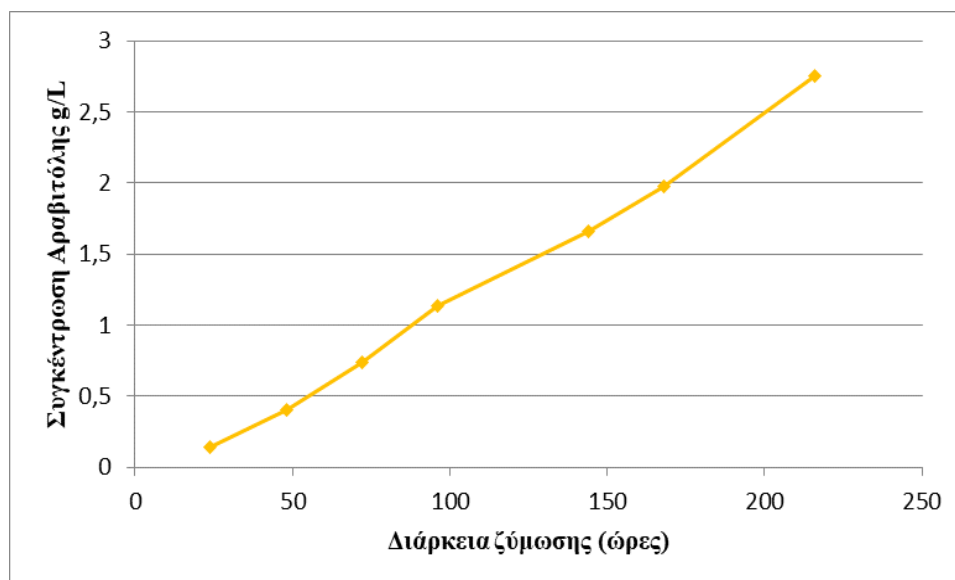


**Διάγραμμα 3.19.** Κινητική της κατανάλωσης γλυκερόλης και της παραγωγής βιομάζας ως προς τον χρόνο του στελέχους *P. membranifaciens* Λ10.





**Διάγραμμα 3.20.** Κινητική της παραγωγής ενδοπολυσακχαρητών ως προς του στελέχους *P. membranifaciens* Δ10.

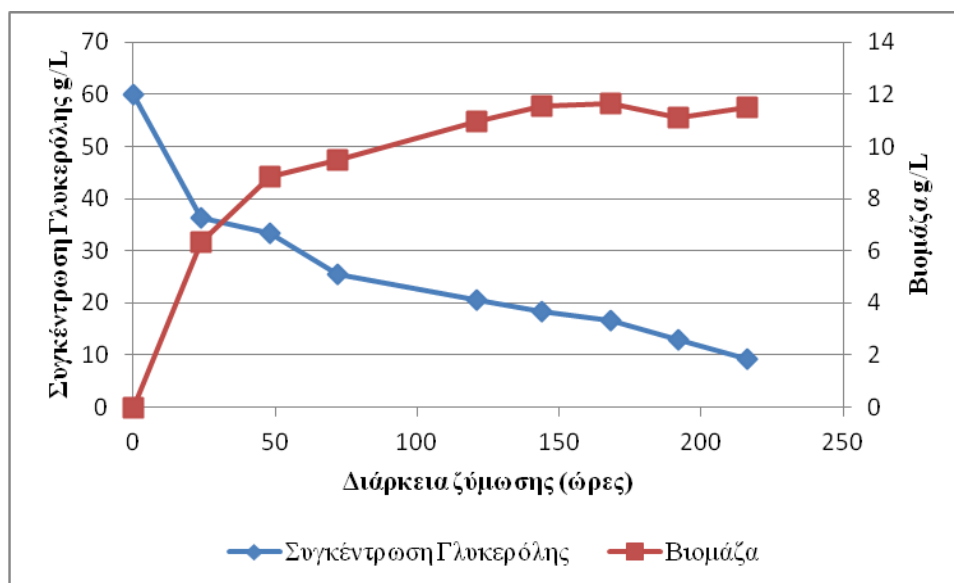


**Διάγραμμα 3.21.** Κινητική της παραγωγής αραβιτόλης ως προς τον χρόνο του στελέχους *P. membranifaciens* Δ10.

### 3.6 Ζύμωση του στελέχους *Wickerhamomyces anomalous* H3A

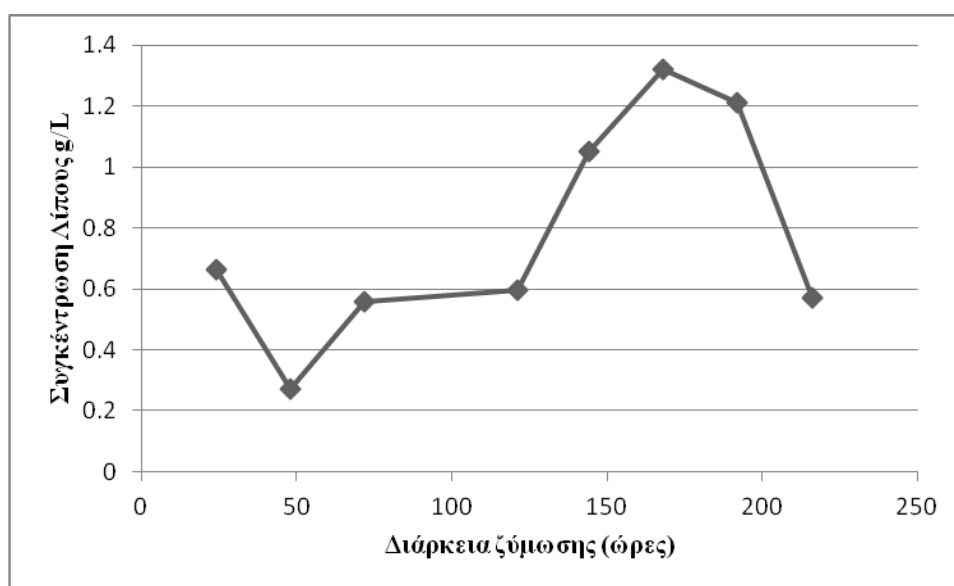
Το στέλεχος *W. anomalous* H3A κατανάλωσε γρήγορα αρκετή ποσότητα της γλυκερόλης έως τις 24 ώρες καλλιέργειας συνεχίζοντας μέχρι το τέλος της να καταναλώνει με πιο αργό ρυθμό. Ίδια πορεία φάνηκε να έχει και η παραγωγή βιομάζας η οποία περίπου μετά τις 24-48 ώρες αυξανόταν με πιο αργό ρυθμό μέχρι

την μέγιστη τιμή της  $X_{max}=11,66$  g/L στις 168 ώρες καλλιέργειας όπου και εισήλθε στην στατική φάση έως τις 216 ώρες. (Διάγραμμα 3.22).

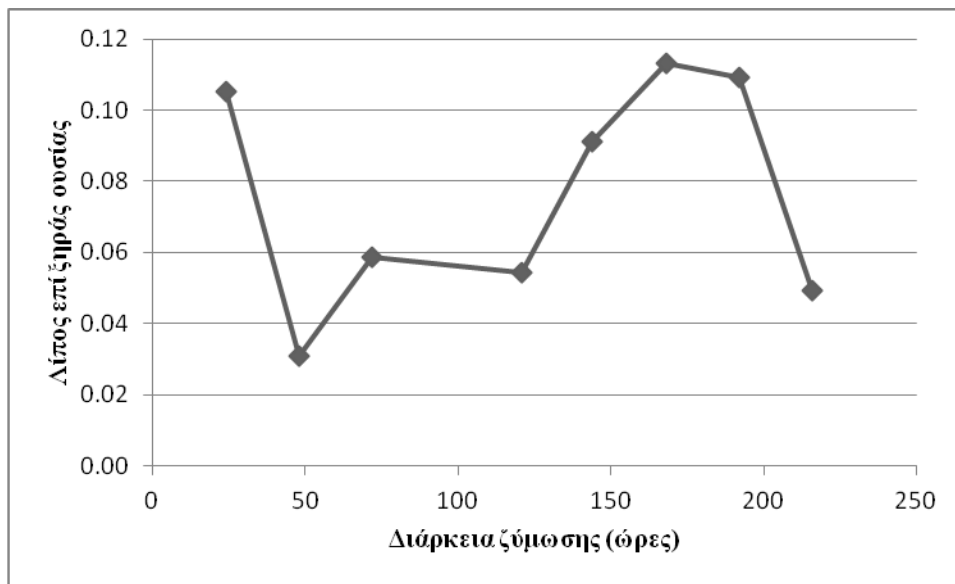


**Διάγραμμα 3.22.** Κινητική της κατανάλωσης γλυκερόλης και της παραγωγής βιομάζας ως προς τον χρόνο του στελέχους *W. anomalus* H3A.

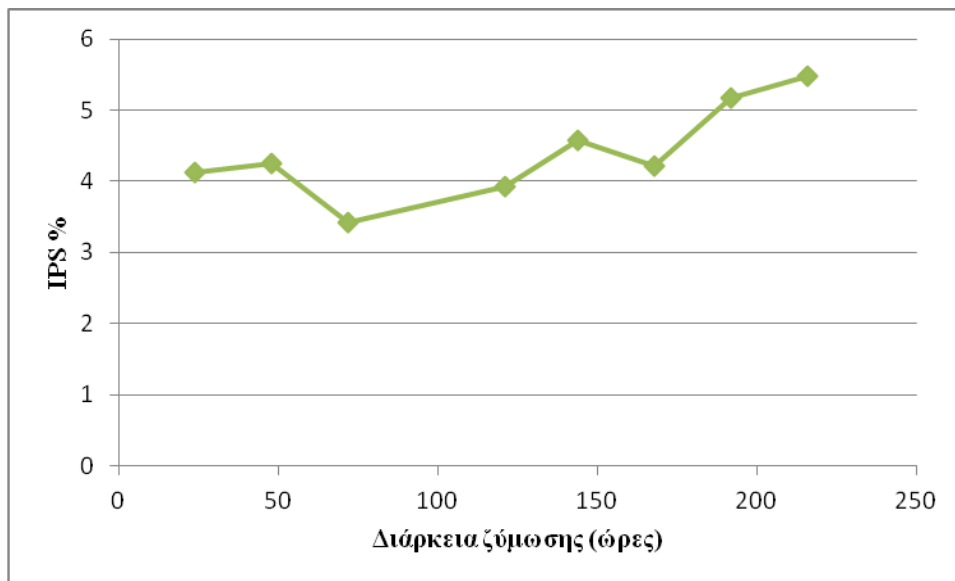
Ο μικροοργανισμός παρήγαγε ενδοκυτταρικό λίπος έπειτα από 168 ώρες ζύμωσης με μέγιστη τιμή 1,32 g/L το οποίο στη συνέχεια φαίνεται να το καταναλώνει (Διάγραμμα 3.23). Ίδια κινητική είχε και ο συντελεστής απόδοσης λίπους παρουσιάζοντας στην ίδια ώρα 0,11 g σε λίπος ως προς τα g ξηρής βιομάζας (Διάγραμμα 3.24).



**Διάγραμμα 3.23.** Κινητική της παραγωγής λίπους ως προς τον χρόνο του στελέχους *W. anomalus* H3A.

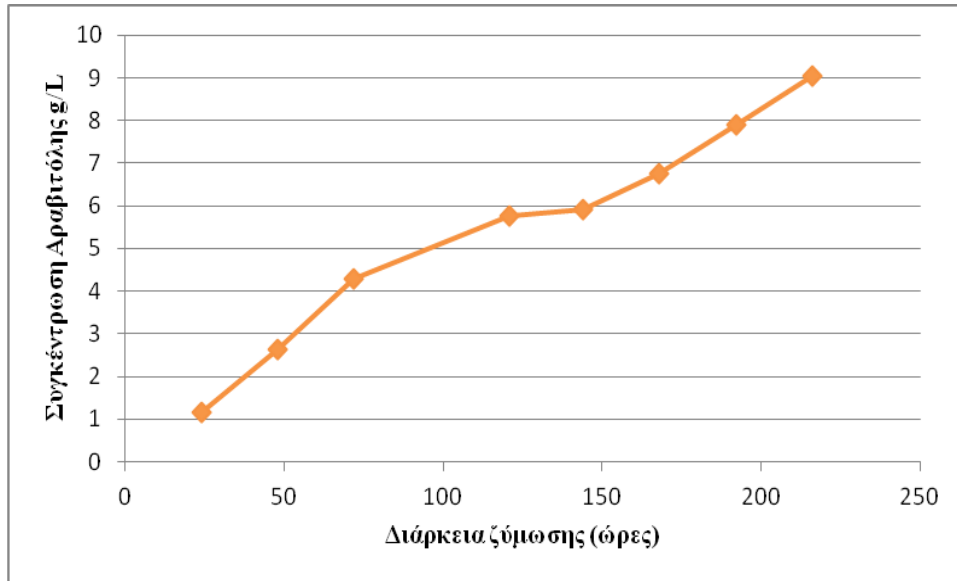


**Διάγραμμα 3.24.** Κινητική του συντελεστή απόδοσης λίπους ως προς τον χρόνο του στελέχους *W. anomalus* H3A.



**Διάγραμμα 3.25.** Κινητικά δεδομένα της παραγωγής ενδοπολυσακχαριτών ως προς τον χρόνο του στελέχους *W. anomalus* H3A.

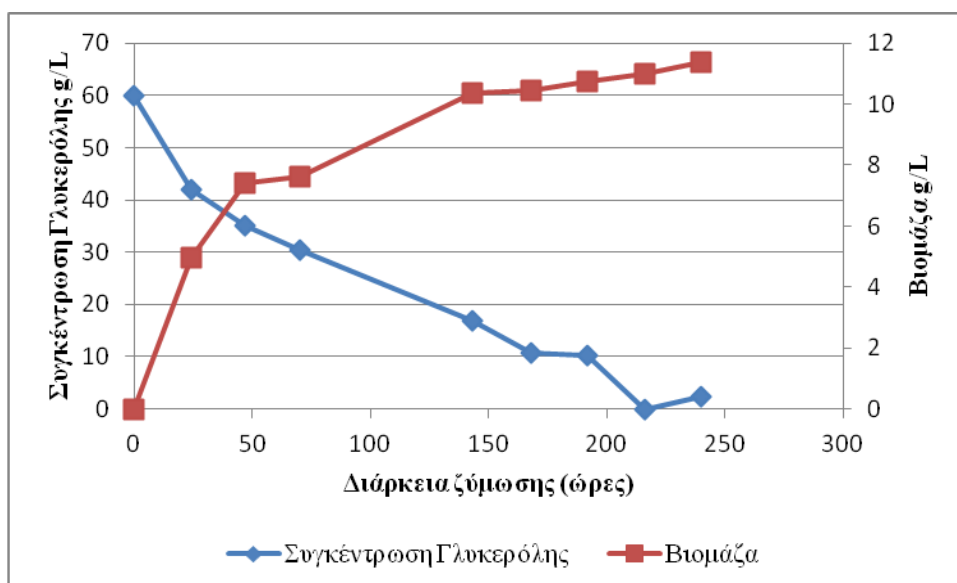
Η κινητική παραγωγής ενδοπολυσακχαριτών (IPS%), όπως παρουσιάζεται στο **Διάγραμμα 3.25**, φαίνεται να έχει μια σχεδόν σταθερή αυξητική πορεία με χαμηλές ωστόσο τιμές φτάνοντας στο 5,5% στο τέλος της καλλιέργειας. Τέλος, αξιοσημείωτη είναι η παραγωγή αραβιτόλης, η οποία έχει αυξητική πορεία μέχρι το τέλος της καλλιέργειας φτάνοντας σε μέγιστη τιμή 9 g/L στις 216 ώρες καλλιέργειας (**Διάγραμμα 3.26**).



**Διάγραμμα 3.26.** Κινητικά δεδομένα της παραγωγής αραβιτόλης ως προς τον χρόνο του στελέχους *W. anomalous* H3A.

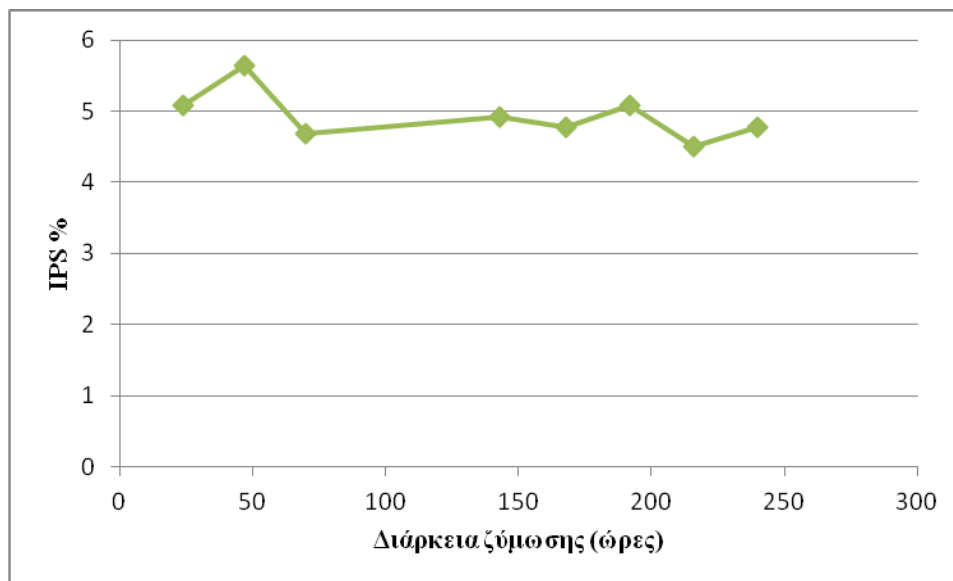
### 3.7 Ζύμωση του στελέχους *Wickerhamomyces anomalous* H7A

Το στέλεχος *W. anomalous* H7A κατανάλωσε όλο το υπόστρωμα μετά από 216 ώρες ζύμωσης. Αρχικά αυξανόταν σταθερά μέχρι τις 140 ώρες και στη συνέχεια ο ρυθμός αύξησής του έπεσε μέχρι το τέλος της ζύμωσης (Διάγραμμα 3.27). η μέγιστη τιμή παραγόμενης βιομάζας σημειώθηκε στις 240 ώρες καλλιέργειας και ήταν  $X_{max}=11,36$  g/L.

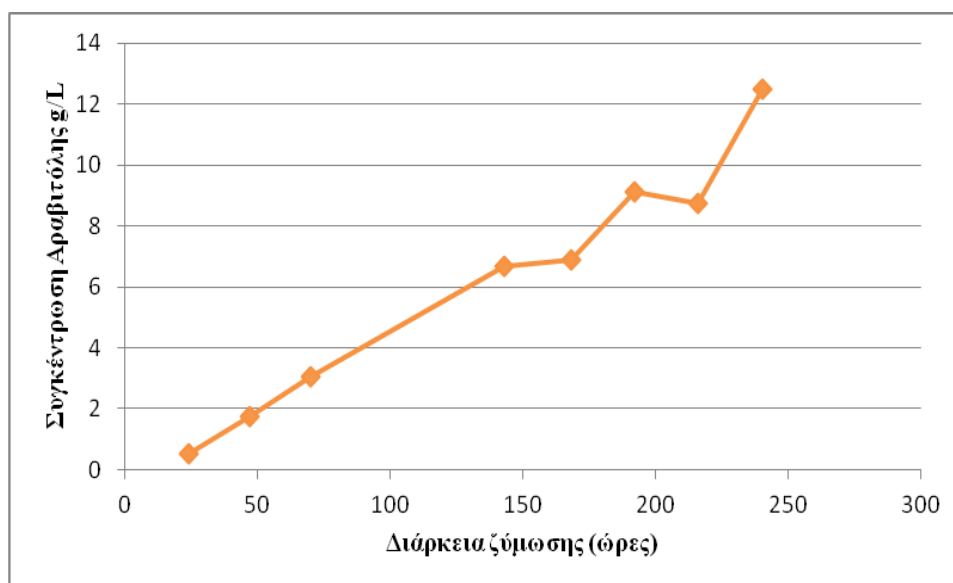


**Διάγραμμα 3.27.** Κινητική της κατανάλωσης γλυκερόλης και της παραγωγής βιομάζας ως προς τον χρόνο του στελέχους *W. anomalous* H7A.

Το στελέχος αυτό δεν παρήγαγε ενδοκυτταρικό λίπος, ενώ είχε χαμηλές τιμές ενδοπολυσακχαριτών (Διάγραμμα 3.8).



Διάγραμμα 3.28. Κινητική της παραγωγής ενδοπολυσακχαριτών ως προς τον χρόνο του στελέχους *W. anomalous* H7A.

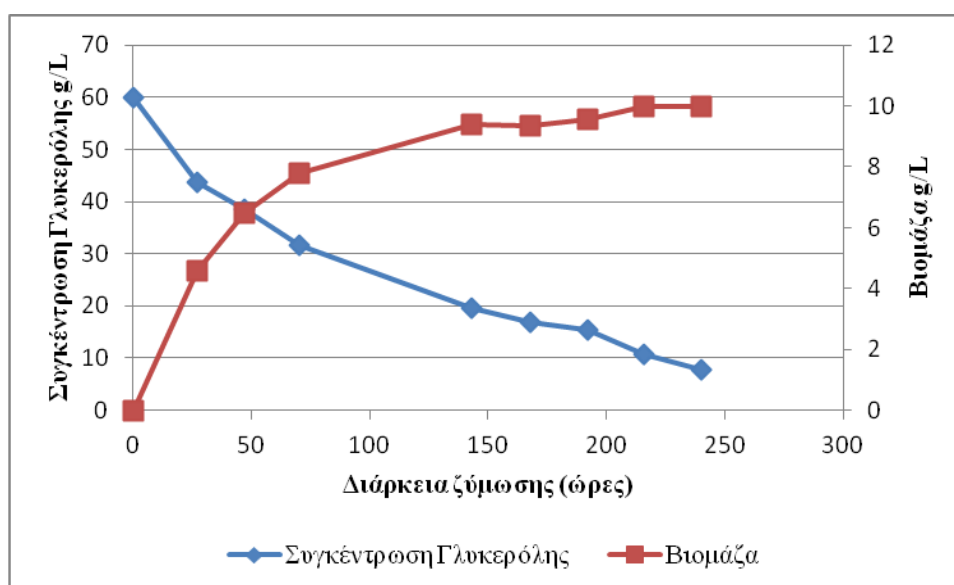


Διάγραμμα 3.29. Κινητικά δεδομένα της παραγωγής αραβιτόλης ως προς τον χρόνο του στελέχους *W. anomalous* H7A.

Αξιοσημείωτη είναι η μεγάλη παραγωγή αραβιτόλης η οποία είχε αυξητική πορεία μέχρι το τέλος της επώασης φτάνοντας στη μέγιστη τιμή 12,5 g/L (Διάγραμμα 3.29).

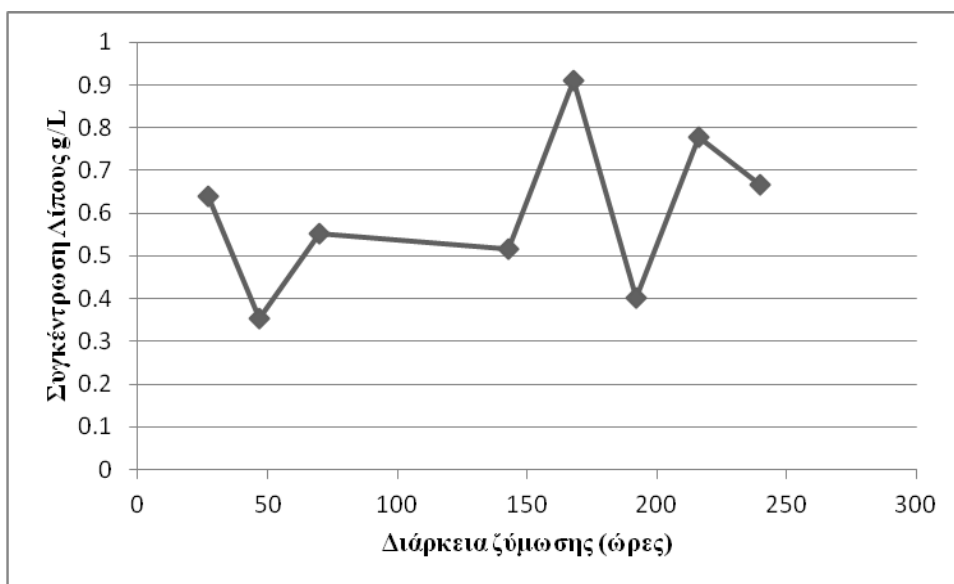
### 3.8 Ζύμωση του στελέχους *Wickerhamomyces anomalus* H12B

Το στέλεχος *W. anomalus* H12B παρουσίασε παρόμοιες κινητικές κατανάλωσης γλυκερόλης σε σχέση με την παραγωγή βιομάζας με τα προηγούμενα στελέχη του ίδιου είδους. Πιο συγκεκριμένα, η γλυκερόλη καταναλώθηκε σχεδόν όλη παρατηρώντας γρήγορη κατανόηση μετά από 143 ώρες, παρουσιάζοντας επίσης γρήγορη παραγωγή βιομάζας, συνεχίζοντας με πιο αργό ρυθμό την κατανόηση της γλυκερόλης και την παραγωγή βιομάζας (Διάγραμμα 3.30).

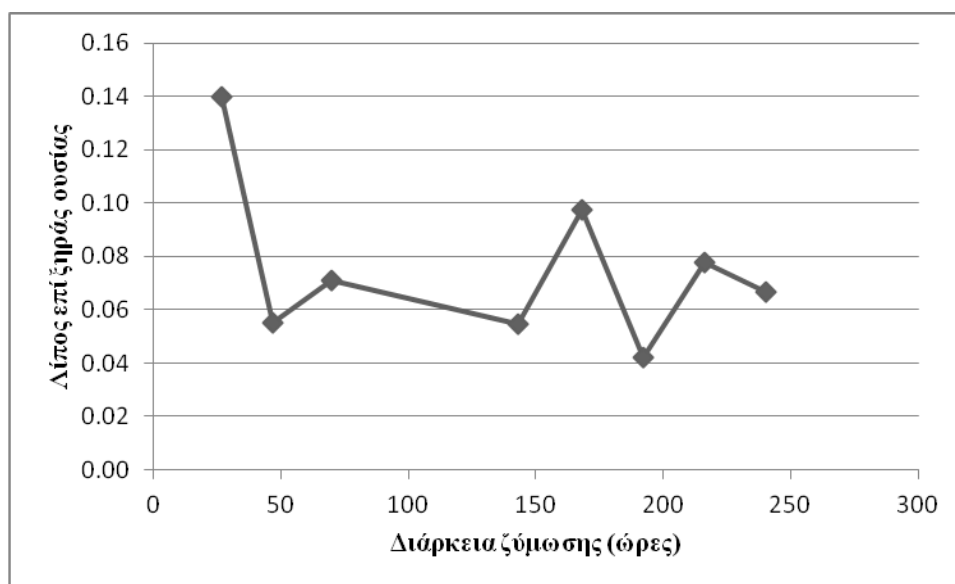


**Διάγραμμα 3.30.** Κινητική της κατανάλωσης γλυκερόλης και παραγωγής βιομάζας ως προς τον χρόνο του στελέχους *W. anomalus* H12B.

Στις 168 ώρες επώασης παρατηρήθηκε παραγωγή ενδοκυτταρικού λίπους με μέγιστη τιμή 0,9 g/L. Κατά τα άλλα η συσσώρευση λίπους παρέμεινε σε πολύ χαμηλά επίπεδα (Διάγραμμα 3.31).

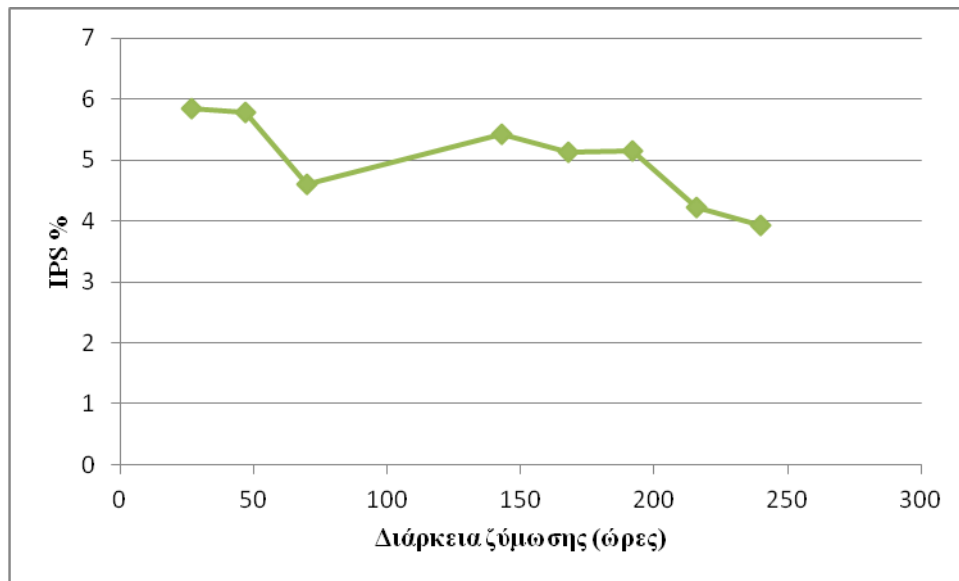


**Διάγραμμα 3.31.** Κινητική της παραγωγής λίπους ως προς τον χρόνο του στελέχους *W. anomalus* H12B.

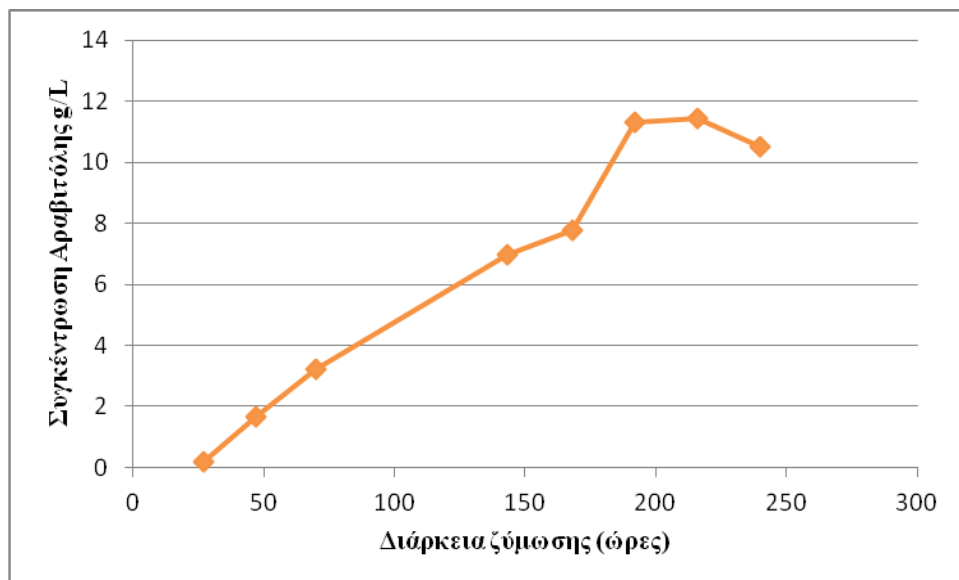


**Διάγραμμα 3.32.** Κινητική του συντελεστή απόδοσης λίπους ως προς τον χρόνο του στελέχους *W. anomalus* H12B.

Η παραγωγή ενδοπολυσακχαριτών (%) είχε φθίνουσα πορεία μετά από 27 ώρες επώασης όπου είχε την μέγιστη τιμή 5,8% (Διάγραμμα 3.33). Η παραγωγή αραβιτόλης ήταν επίσης σημαντική, παρόμοια με το στέλεχος H7A, όπου έφτασε μέγιστη τιμή 11,44 g/L μετά από 216 ώρες επώασης (Διάγραμμα 3.34).



**Διάγραμμα 3.33.** Κινητικά δεδομένα της παραγωγής ενδοπολυσακχαρητών ως προς τον χρόνο του στελέχους *W. anomalus* H12B.

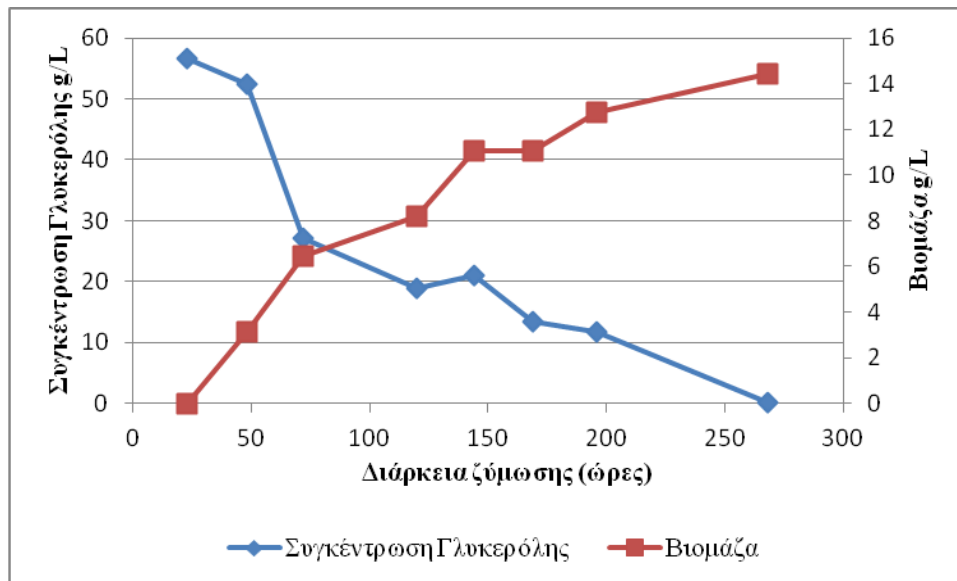


**Διάγραμμα 3.34.** Κινητική της παραγωγής αραβιτόλης ως προς τον χρόνο του στελέχους *W. anomalus* H12B.

### 3.9 Ζύμωση του στελέχους *Rhodospiridium toruloides* 48190

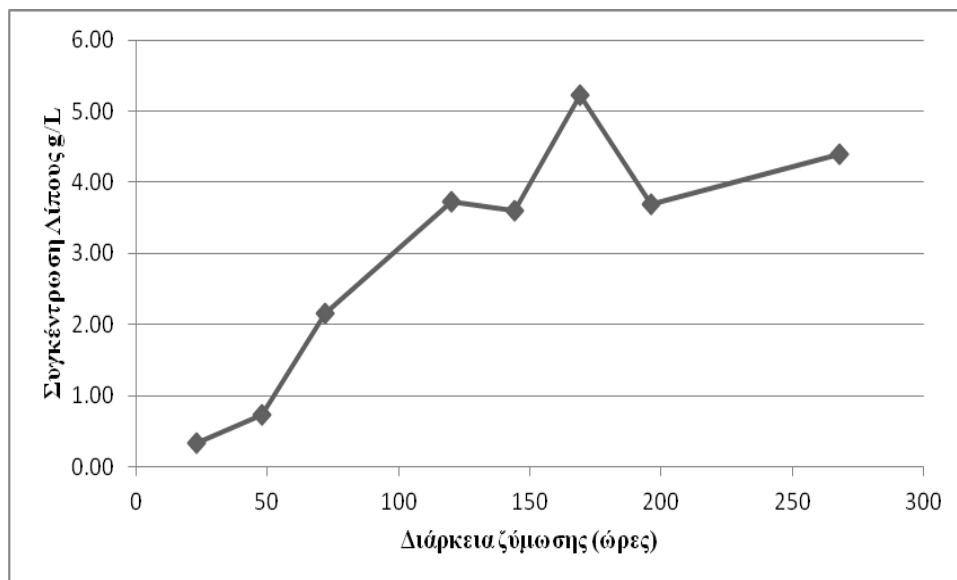
Το στέλεχος *R. toruloides* 48190 κατανάλωσε όλη τη γλυκερόλη στο τέλος της ζύμωσης μετά από 268 ώρες. Η γλυκερόλη φαίνεται να καταναλώνεται γρήγορα τις πρώτες 72 ώρες επώασης, ο μικροοργανισμός αυξάνεται σταθερά έως τις 268 ώρες από τον εμβολιασμό παράγοντας μέγιστη βιομάζα  $X_{max}=17,74$  g/L (Διάγραμμα 3.35).



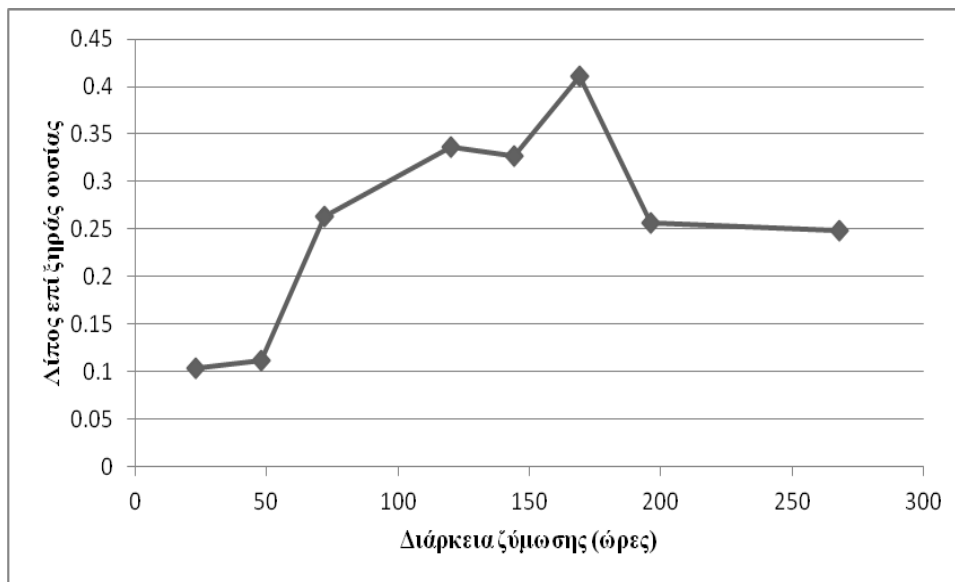


**Διάγραμμα 3.35.** Κινητικά δεδομένα της κατανάλωσης της γλυκερόλης και παραγωγής βιομάζας ως προς τον χρόνο του στελέχους *R. toruloides* 48190.

Ο συγκεκριμένος μικροοργανισμός παρουσίασε αυξητική πορεία παραγωγής ενδοκυτταρικού λίπους φτάνοντας μετά από 168 σε μέγιστη τιμή 5,22 g/L (**Διάγραμμα 3.36**). Η κινητική απόδοσης λίπους ως προς την ξηρή βιομάζα είχε το ίδιο μοτίβο με μέγιστη τιμή 0,41 g/g στις 168 ώρες επώασης (**Διάγραμμα 3.37**).

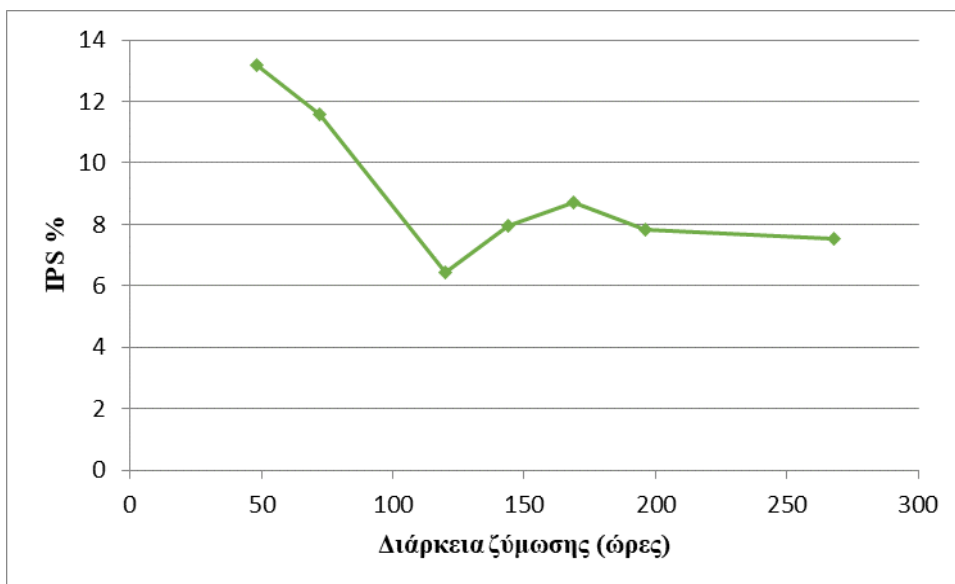


**Διάγραμμα 3.36.** Κινητικά δεδομένα της παραγωγής λίπους ως προς τον χρόνο του στελέχους *R. toruloides* 48190.



**Διάγραμμα 3.37.** Κινητικά δεδομένα του συντελεστή απόδοσης του λίπους ως προς τον χρόνο του στελέχους *R. toruloides* 48190.

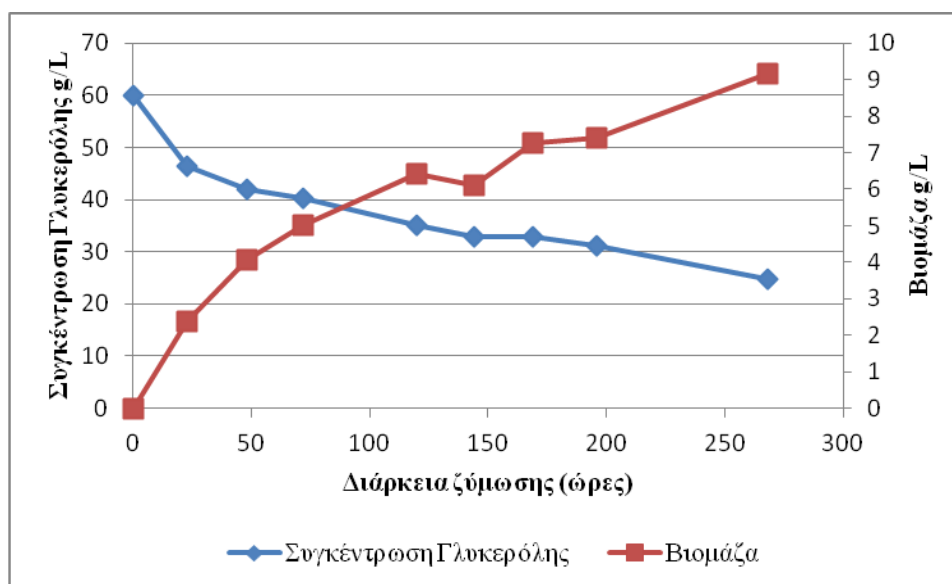
Το στέλεχος *R. toruloides* 48190 είχε μέγιστη παραγωγή ενδοπολυσακχαριτών, 13,2%, στις 48 ώρες ζύμωσης, ενώ στη συνέχεια μειώθηκε (Διάγραμμα 3.38).



**Διάγραμμα 3.38.** Κινητική της παραγωγής ενδοπολυσακχαριτών ως προς τον χρόνο του στελέχους *R. toruloides* 48190.

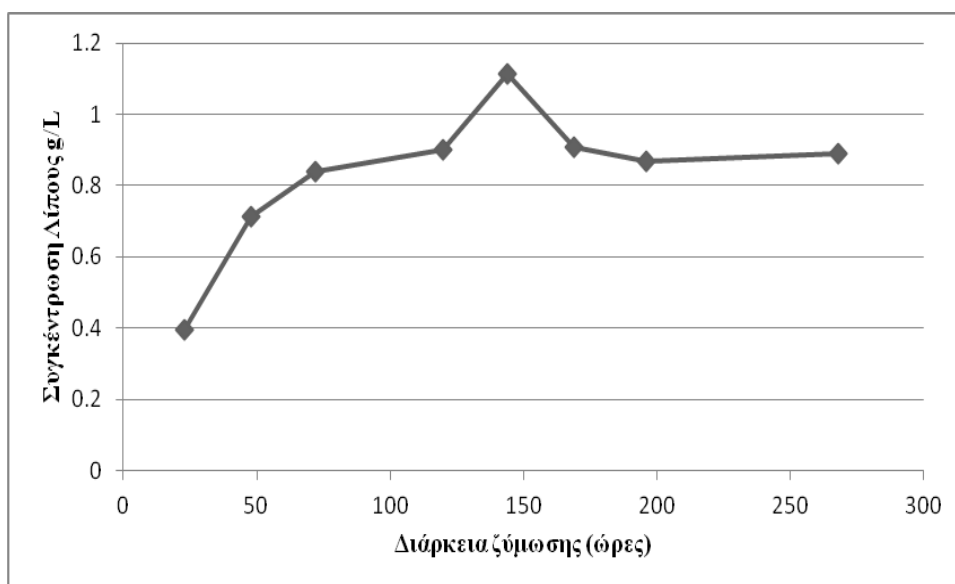
### 3.10 Ζύμωση του στελέχους *Rhodosporidium toruloides* 17902

Το στέλεχος *R. toruloides* 17902 κατανάλωσε με αρκετά αργό ρυθμό την γλυκερόλη καταναλώνοντας περίπου το 70% αυτής στο τέλος της επώασης (Διάγραμμα 3.39). Ωστόσο, η παραγόμενη βιομάζα είχε αυξητική πορεία φτάνοντας σε ένα μέγιστο  $X_{max}=9$  g/L στο τέλος της επώασης.

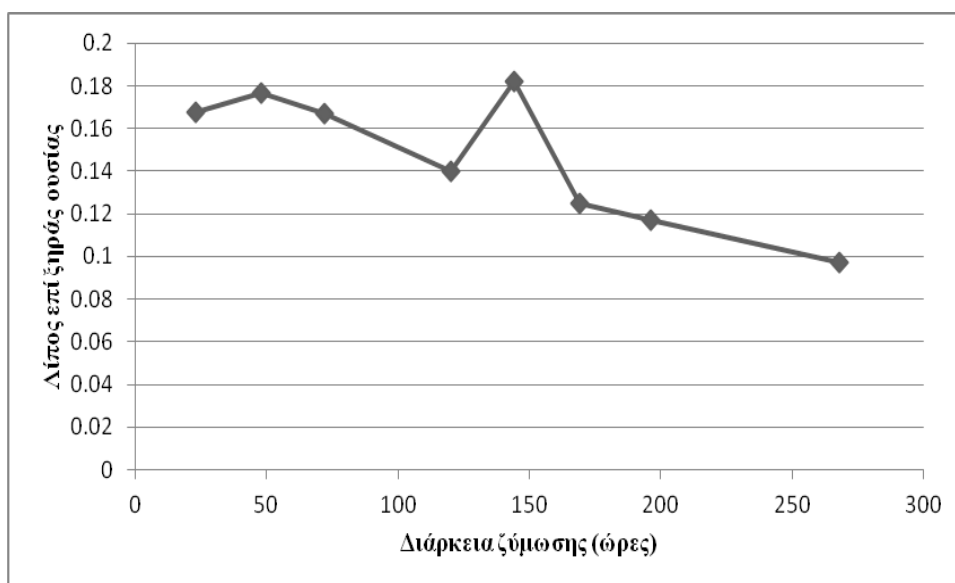


**Διάγραμμα 3.39.** Κινητικά δεδομένα της κατανάλωσης γλυκερόλης και της παραγωγής βιομάζας ως προς τον χρόνο του στελέχους *R. toruloides* 17902.

Ο μικροοργανισμός, επίσης, παρήγαγε μικρή ποσότητα ενδοκυτταρικού λίπους έχοντας αυξητική πορεία μέχρι τις 144 ώρες επώασης όπου έφτασε σε μέγιστη τιμή μόλις 1,1 g/L και απόδοση λίπους 0,18 g/g (Διάγραμμα 3.40 και Διάγραμμα 3.41, αντίστοιχα).



**Διάγραμμα 3.40.** Κινητική της παραγωγής λίπους ως προς τον χρόνο του στελέχους *R. toruloides* 17902.



**Διάγραμμα 3.41.** Κινητική του συντελεστή απόδοσης του λίπους ως προς τον χρόνο του στελέχους *R. toruloides* 17902.

Η παραγωγή ενδοπολυσακχαριτών από τον μικροοργανισμό ξεκίνησε από 11,4 g/L στις 48 ώρες επώασης και έφτασε σε ένα μέγιστο 14,8 g/L μετά από 169 ώρες επώασης (**Διάγραμμα 3.42**).

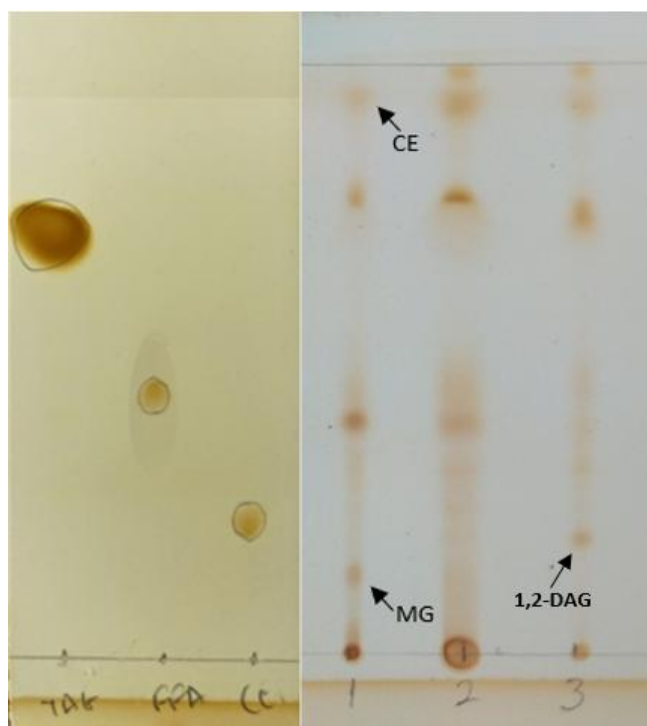


**Διάγραμμα 3.42.** Κινητική της παραγωγής ενδοπολυσακχαρητών ως προς τον χρόνο του στελέχους *R. toruloides* 17902.

### 3.11 Ανάλυση παραγόμενων μικροβιακών λιπιδίων

#### 3.11.1 *P. membranifaciens* N12

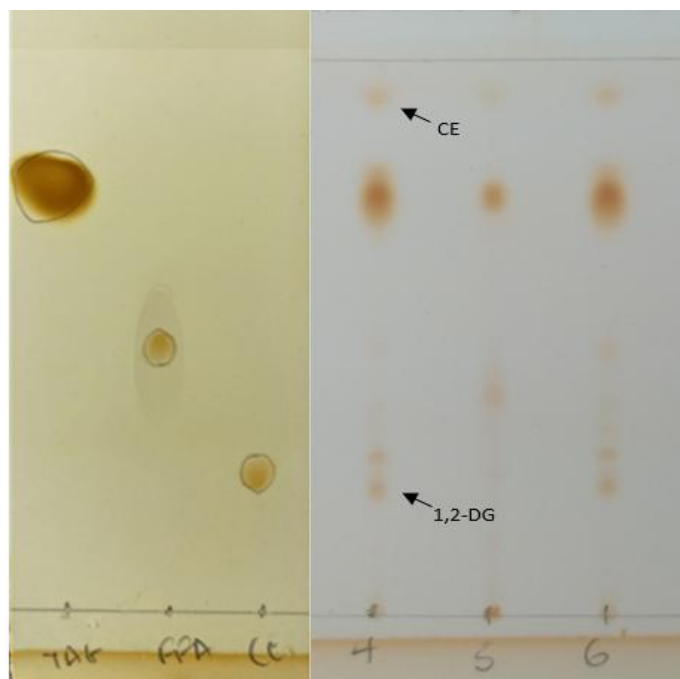
Η ανάλυση του παραγόμενου ενδοκυτταρικού λίπους του μικροοργανισμού *P. membranifaciens* N12 με TLC έγινε στις 48 ώρες, στις 120 ώρες και στις 216 ώρες επώασης, όπου είχε συνολικό ενδοκυτταρικό λίπος 0,18 g/L, 0,28 g/L και 0,63 g/L, αντίστοιχα. Η ανάλυση των κλασμάτων του παραγόμενου ενδοκυτταρικού λίπους, όπως φαίνεται στην **Εικόνα 3.1**, έδειξε την παρουσία τριγλυκεριδίων σε όλες τις ώρες ανάλυσης, καθώς επίσης και ελεύθερων λιπαρών οξέων κυρίως στις 48 και 120 ώρες. Σύμφωνα με την ανάλυση λιπιδίων στο Cyberlipid (<http://cyberlipid.gerli.com/>), παρατηρήθηκε επίσης παρουσία εστέρων χοληστερόλης σε όλες τις ώρες ανάλυσης, μονοακυλογλυκερόλης (MG) στις 48 ώρες ανάπτυξης του μικροοργανισμού, καθώς επίσης και 1,2-διακυλογλυκερόλης (1,2 DAG) μετά από 216 ώρες επώασης.



**Εικόνα 3.1** Ανάλυση μικροβιακού λίπους με TLC του μικροοργανισμού *P. membranifaciens* N12, TAG – Τριγλυκερίδια, FFA – ελεύθερα λιπαρά οξέα, CL – χοληστερόλη. Σημεία ανάλυσης: 1 – 48 ώρες, 2 – 120 ώρες, 3 – 216 ώρες. Επιπλέον αναγνωρισμένα σημεία: MG – μονοακυλγλυκερόλη, CE – εστέρες χοληστερόλης, 1,2-DAG – 1,2-διακυλγλυκερόλη.

### 3.11.2 *W. anomalus* H12B

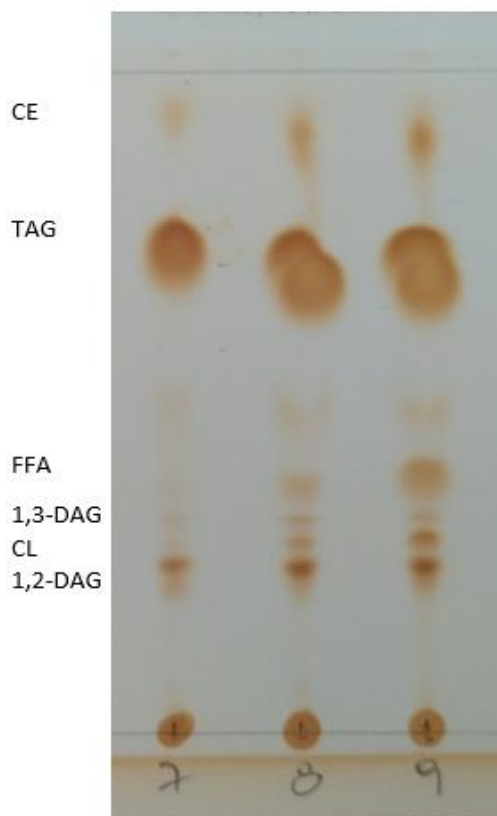
Η ανάλυση του παραγόμενου κυτταρικού λίπους του μικροοργανισμού *W. anomalus* H12B με TLC έγινε στις 70 ώρες, στις 168 ώρες και στις 240 ώρες επώασης, όπου είχε συνολικό ενδοκυτταρικό λίπος 0,55 g/L, 0,9 g/L και 0,67 g/L, αντίστοιχα. Η ανάλυση των κλασμάτων του παραγόμενου ενδοκυτταρικού λίπους έδειξε την παρουσία τριγλυκεριδίων σε όλες τις ώρες ανάλυσης (**Εικόνα 3.2**). Επίσης, στα δείγματα ανάλυσης ταυτοποιήθηκε αμυδρά η παρουσία ελεύθερων λιπαρών οξέων, κυρίως στις 168 ώρες ανάπτυξης του μικροοργανισμού. Στα δείγματα επιβεβαιώθηκε και η παρουσία χοληστερόλης κυρίως μετά από 70 και 240 ώρες ανάπτυξης του μικροοργανισμού, καθώς επίσης και 1,2-διακυλογλυκερόλες (1,2-DAG) στις ίδιες ώρες. Τέλος, οι ανώτερες μπάντες αφορούν εστέρες χοληστερόλης οι οποίες παρουσιάστηκαν σε όλα τα δείγματα ανάλυσης.



**Εικόνα 3.2** Ανάλυση μικροβιακού λίπους με TLC του μικροοργανισμού *W. anomalus* H12B. TAG – Τριγλυκερίδια, FFA – ελεύθερα λιπαρά οξέα, CL – χοληστερόλη. Σημεία ανάλυσης: 4 – 70 ώρες, 5 – 168 ώρες, 6 – 240 ώρες. Επιπλέον αναγνωρισμένα σημεία: 1,2-DAG – 1,2-διακυλογλυκερόλη, CE – εστέρες χοληστερόλης.

### 3.11.3 *R. toruloides* 48190

Η ανάλυση του παραγόμενου κυτταρικού λίπους του μικροοργανισμού *R. toruloides* 48190 με TLC έγινε στις 72 ώρες, στις 169 ώρες και στις 268 ώρες επώασης, όπου είχε συνολικό ενδοκυτταρικό λίπος 2,16 g/L, 5,22 g/L και 4,40 g/L, αντίστοιχα. Η ανάλυση των κλασμάτων του παραγόμενου ενδοκυτταρικού λίπους έδειξε έντονα την παρουσία τριγλυκεριδίων σε όλες τις ώρες ανάλυσης (**Εικόνα 3.3**). Στις 72 ώρες ανάπτυξης παρατηρήθηκε η παρουσία κυρίως 1,2-διακυλογλυκερόλης (1,2-DAG) και ελάχιστη η παρουσία 1,3-διακυλογλυκερόλης (1,3-DAG). Η έντονη παρουσία της 1,2-διακυλογλυκερόλης (1,2-DAG) συνεχίστηκε και στις υπόλοιπες ώρες ανάλυσης, ενώ παρουσιάστηκαν επίσης και τα ελεύθερα λιπαρά οξέα (FFA) και η χοληστερόλη, των οποίων η παρουσία έγινε πιο έντονη στις 268 ώρες επώασης.



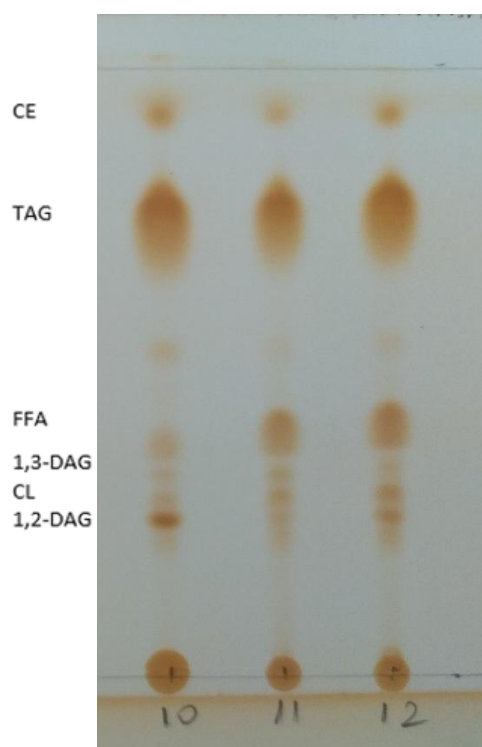
**Εικόνα 3.3** Ανάλυση μικροβιακού λίπους με TLC του μικροοργανισμού *R. toruloides* 48190, CE – εστέρες χοληστερόλης, TAG – Τριγλυκερίδια, FFA – ελεύθερα λιπαρά οξέα, 1,3-DAG – 1,3-διακυλογκερόλη, CL – χοληστερόλη, 1,2-DAG – 1,2-διακυλογκερόλη. Σημεία ανάλυσης: 7 – 72 ώρες, 8 – 169 ώρες, 9 – 268 ώρες (ανάλυση λιπιδίων σύμφωνα με το Cyberlipid (<http://cyberlipid.gerli.com/>)).

#### 3.11.4 *R. toruloides* 17902

Η ανάλυση του παραγόμενου ενδοκυτταρικού λίπους του μικροοργανισμού *R. toruloides* 17902 με TLC πραγματοποιήθηκε στις 72, 144 και στις 248 ώρες επώασης, όπου είχε συνολικό ενδοκυτταρικό λίπος 0,84 g/L, 1,11 g/L και 0,89 g/L, αντίστοιχα. Η ανάλυση των κλασμάτων του παραγόμενου ενδοκυτταρικού λίπους έδειξε έντονα την παρουσία τριγλυκεριδίων σε όλες τις ώρες ανάλυσης, καθώς και εστέρων χοληστερόλης (**Εικόνα 3.4**). Στις 72 ώρες ανάπτυξης παρατηρήθηκε η παρουσία κυρίως 1,2-διακυλογκερόλης (1,2-DAG), καθώς επίσης και 1,3-διακυλογκερόλης (1,3-DAG), ελεύθερα λιπαρά οξέα (FFA) και χοληστερόλης (CL). Στις 144 ώρες ανάπτυξης του μικροοργανισμού παρατηρήθηκε πιο έντονη η παρουσία ελεύθερων λιπαρών οξέων (FFA), καθώς ελαττώθηκε η ένταση της παρουσίας της 1,2-διακυλογκερόλης (1,2-DAG). Στο δείγμα αυτό παρατηρήθηκαν επίσης πάλι η 1,3-



διακυλογλυκερόλη (1,3-DAG) και η χοληστερόλη (CL). Έπειτα από 248 ώρες επώασης παρατηρήθηκε στην ανάλυση του παραγόμενου λίπους μείωση της έντασης της παρουσίας της 1,3-διακυλογλυκερόλης (1,3-DAG), καθώς στο δείγμα επίσης παρατηρήθηκε η παρουσία ελεύθερων λιπαρών οξέων, χοληστερόλης και 1,2-διακυλογλυκερόλης (1,2-DAG).



**Εικόνα 3.4** Ανάλυση μικροβιακού λίπους με TLC του μικροοργανισμού *R. toruloides* 17902, CE – εστέρες χοληστερόλης, TAG – Τριγλυκεριδια, FFA – ελεύθερα λιπαρά οξέα, 1,3-DAG – 1,3-διακυλογλυκερόλη, CL – χοληστερόλη, 1,2-DAG – 1,2-διακυλογλυκερόλη. Σημεία ανάλυσης: 10 – 72 ώρες, 11 – 144 ώρες, 12 – 248 ώρες (ανάλυση λιπιδίων σύμφωνα με το Cyberlipid (<http://cyberlipid.gerli.com/>)).

### 3.12 Ποιοτική ανάλυση λιπαρών οξέων με χρήση GC

Εκτός από την ανάλυση με την χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας σε ορισμένα δείγματα, πραγματοποιήθηκε και ανάλυση με αέριο χρωματογράφο. Με αυτή τη μέθοδο ήταν δυνατός ο ποιοτικός προσδιορισμός του παραγόμενου μικροβιακού λίπους και ο προσδιορισμός τις ποσοστιαίας αναλογίας των λιπαρών οξέων που το αποτελούν. Ακολουθεί συγκεντρωτικός πίνακας με τα ποσοστά των λιπαρών οξέων που ανιχνεύθηκαν στα στελέχη τα οποία εξετάστηκαν.

**Πίνακας 3.2.** Συγκεντρωτική παρουσίαση της σύστασης του μικροβιακού λίπους των στελεχών που αναλύθηκαν στον αέριο χρωματογράφο. Οι αναγραφόμενες τιμές αντιπροσωπεύουν ποσοστά επί της συνολικής ποσότητας των λιπιδίων.

Στέλεχος	C14:0	C16:0	C16:1	C17:0	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3	C20:0
<i>R. toruloides</i> 48190	3,45	40,25	6,39			43,36	6,36		
<i>R. toruloides</i> 17902		23,31				54,53	14,12	7,82	
<i>P. membranifaciens</i> N3		14,73		17,37		13,87	13,68		40,36
<i>P. membranifaciens</i> N12		12,17	13,53	26,39		12,94	12,77		22,20
<i>W. anomalus</i> H3A		8,99	8,37	38,24	6,58	9,64		5,87	22,31
<i>W. anomalus</i> H12B		14,84	4,53		3,48	7,34	19,84	7,36	42,61

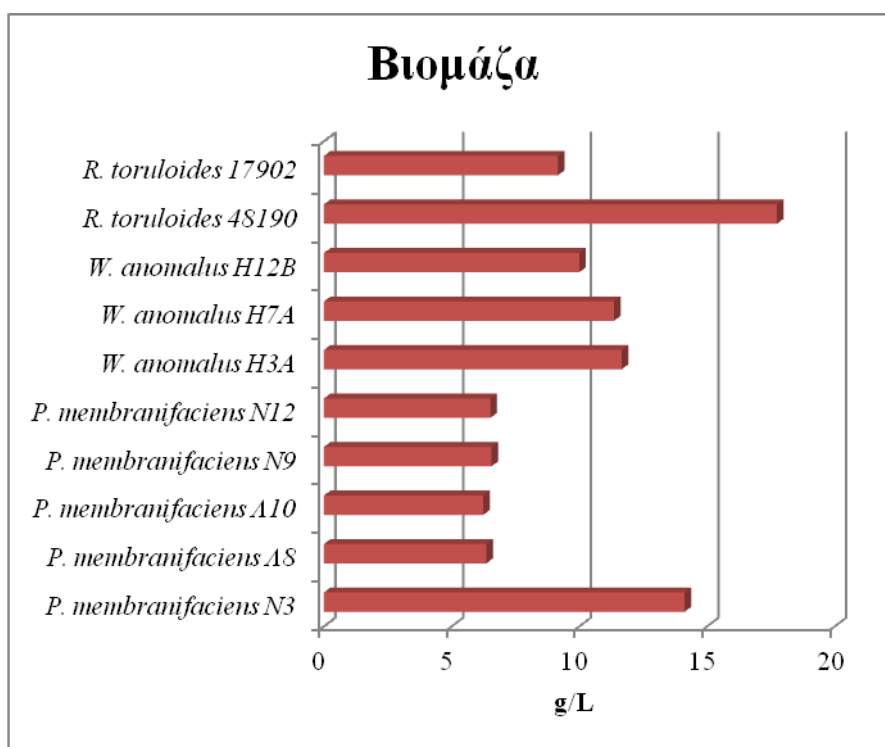
#### 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η παρούσα μελέτη είχε ως στόχο να διερευνήσει τις δυνατότητες διαφόρων ζυμών να μεταβολίζουν την ακάθαρτη γλυκερόλη, η οποία αποτελεί ένα σημαντικό «απόβλητο» πολλών βιομηχανικών διεργασιών (π.χ. των διεργασιών παραγωγής βιοντίζελ, σαπώνων, ελευθέρων λιπαρών οξέων και ελαιοχημικών υλικών, κλπ.) και να την μετατρέπουν σε προϊόντα ενδιαφέροντα για την βιομηχανία όπως λιπίδια και οργανικά οξέα. Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν στελέχη ζυμών από το Εργαστήριο Ποιοτικού Ελέγχου του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών καθώς και στελέχη του *R. toruloides* από την Agricultural Research Service Culture Collection. Όλα τα στελέχη καλλιεργήθηκαν στο ίδιο θρεπτικό μέσο με 60 g/L γλυκερόλη και στις ίδιες περιοριστικές σε άζωτο συνθήκες οι οποίες, σύμφωνα με την διεθνή βιβλιογραφία (Ratledge and Wynn 2002; Papanikolaou and Aggelis 2011; 2019), ευνοούν την παραγωγή και συσσώρευση μικροβιακού λίπους.

Από το σύνολο των στελεχών που αξιολογήθηκαν, τα περισσότερα έδειξαν αρκετά ικανοποιητική ανάπτυξη εντός της γλυκερόλης σημειώνοντας παραγωγή βιομάζας άνω των 10 g/L. Συγκεκριμένα την καλύτερη αύξηση και παραγωγή ξηράς συνολικής κυτταρικής βιομάζας έδειξε το στέλεχος *R. toruloides* 48190 με μέγιστη παραγωγή βιομάζας 17,74 g/L σε χρόνο ζύμωσης 268 ώρες. Ακολουθεί το *P. membranifaciens* N3 με 14,12 g/L και το *W. anomalus* H3A με 11,66 g/L στις 168 ώρες. Το στέλεχος H7A ακολουθεί με παραγωγή 11,36 g/L στις 240 ώρες. Επιπλέον το *W. anomalus* H12B συγκέντρωσε 10 g/L στις 240 ώρες και το *R. toruloides* 17902, 9,16 g/L στις 268 ώρες καλλιέργειας. Τέλος, τα *P. membranifaciens* N9, N12, Λ8 και Λ10 συγκέντρωσαν όλα περί τα 6,4 g/L σε χρόνο 216 ωρών. Εκτός των παραπάνω μελετήθηκαν και τα *P. membranifaciens* Θ19 και *K. humilis* H2A τα οποία όμως δεν παρουσίασαν καμία ανάπτυξη στο συγκεκριμένο θρεπτικό μέσο και επομένως οι κινητικές τους δεν παρουσιάστηκαν.

Σε ό,τι αφορά την κατανάλωση της γλυκερόλης από τους μικροοργανισμούς, η πορεία της οποίας παρακολούθηθηκε σε κάθε ζύμωση μέσω της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης, προέκυψε ότι οι περισσότεροι εξ' αυτών κατανάλωσαν από 40 g/L και άνω, έως και το σύνολό της δηλαδή 60 g/L. Πιο συγκεκριμένα παρατηρήθηκε ότι τα *R. toruloides* 48190, *P. membranifaciens* N3 και

*W. Anomalous* H7A κατανάλωσαν πλήρως την γλυκερόλη του υποστρώματος σε χρόνο 268, 216 και 216 ωρών αντίστοιχα. Ακολουθούν τα *W. anomalous* H3A, *W. anomalous* H12B, *P. membranifaciens* N9 και *P. membranifaciens* N12 τα οποία κατανάλωσαν όλα περί τα 50 g/L γλυκερόλης. Περίπου 40 g/L κατανάλωσαν τα στελέχη Λ8 και Λ10 του *P. membranifaciens* μετά από ζύμωση 216 ωρών και τέλος, το στέλεχος 17902 του *R. toruloides* κατανάλωσε 35 g/L γλυκερόλης στις 268 ώρες. Στη συνέχεια, παρατίθεται διάγραμμα με την συνολική παραγωγή βιομάζας όλων των μικροοργανισμών που σημείωσαν ανάπτυξη.



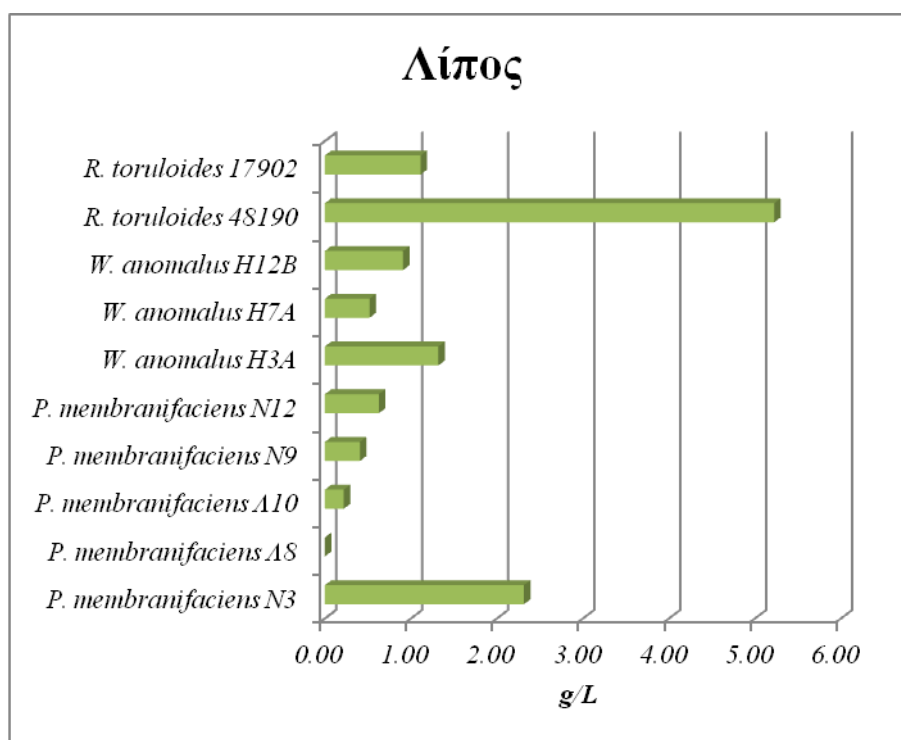
**Διάγραμμα 4.1.** Μέγιστη συγκέντρωση βιομάζας από τους μικροοργανισμούς σε g/L.

Ενδεικτικά αποτελέσματα παραγωγής ξηράς ουσίας κατά την καλλιέργεια συελεχών ζυμών στη γλυκερόλη, παρατίθενται στον πιο κάτω πίνακα (δεδομένα από Papanikolaou et al 2017).

**Πίνακας 4.1.** Παραγωγή ξηράς κυτταρικής μάζας (X, g/L) από ποικίλα στελέχη ζυμών καλλιεργούμενα στη γλυκερόλη υπό διάφορες συνθήκες καλλιέργειας ( $Y_{X/S}$ , g/g, είναι ο αντίστοιχος συντελεστής απόδοσης της παραγόμενης βιομάζας (δεδομένα από Papanikolaou et al 2017).

Στέλεχος	Τύπος καλλιέργειας	X (g/L)	$Y_{X/S}$ (g/g)
<i>Yarrowia lipolytica</i> A18	Fed-batch bioreactor	23,0	≈0,19*
<i>Yarrowia lipolytica</i> NCYC 3825	Fed-batch bioreactor	42,0	≈0,13*
<i>Yarrowia deformans</i> CBS 2071	Shake flasks	≈42-47 <sup>a</sup>	≈0,45*
<i>Yarrowia phangngensis</i> CBS 10407	Shake flasks	≈40-44 <sup>a</sup>	≈0,43*
<i>Yarrowia bubula</i> CBS 12934	Batch bioreactor	27,1	0,25
<i>Yarrowia porcina</i> CBS 12932	Batch bioreactor	26,8	0,25
<i>Rhodospiridium toruloides</i> Y4	Fed-batch shake flasks	21,1	0,54
<i>Lipomyces starkeyi</i> DSM 70296	Shake flasks	34,4	0,30
<i>Rhodospiridium toruloides</i> NRRL Y-27012	Shake flasks	30,1	0,26
<i>Pichia membranifaciens</i> LFMB 8	Shake flasks	28,4	0,38
<i>Yarrowia lipolytica</i> 4,29 SoAMY	Fed-batch bioreactor	69,1	0,22
<i>Yarrowia lipolytica</i> ATTC 8661	Batch bioreactor	24,3	0,81
<i>Yarrowia lipolytica</i> 8661 UV*1	Batch bioreactor	26,8	0,89
<i>Yarrowia lipolytica</i> Z	Batch bioreactor	17,2	0,44
<i>Yarrowia lipolytica</i> A-101	Batch bioreactor	20,1	0,67
<i>Yarrowia lipolytica</i> DiSVA	Shake flasks	25,7	0,56
<i>Yarrowia lipolytica</i> MUCL 28849	Fed-batch bioreactor	40,9	0,44
<i>Rhodotorula glutinis</i> BCRC 21418	Fed-batch bioreactor	39,2	n.d.
<i>Rhodospiridium fluviale</i> DMKU-RK 253	Batch bioreactor	14,2	≈0,26*
<i>Rhodotorula glutinis</i> CICC 31596	Fed-batch bioreactor	30,6	≈0,18*
<i>Yarrowia lipolytica</i> ACA YC 5029	Batch bioreactor	19,4	≈0,25
<i>Rhodospiridium toruloides</i> DSM 4444	Shake flasks	39,1	0,33

Αναφορικά με την παραγωγή μικροβιακού λίπους, μόνο δύο στελέχη έδειξαν να έχουν αξιοσημείωτη ικανότητα παραγωγής. Ο λόγος για τα *R. toruloides* 48190 και *P. membranifaciens* N3, Το πρώτο έδειξε μέγιστη παραγωγή λιπιδίων 5,22 g/L στις 168 ώρες καλλιέργειας. Το δεύτερο συγκέντρωσε 2,31 g/L στις 72 ώρες τα οποία όμως στη συνέχεια έδειξε να καταναλώνει. Ακολουθεί το *P. membranifaciens* H3A το οποίο παρήγαγε 1,32 g/L στις 168 ώρες τα οποία στη συνέχεια έδειξαν να καταναλώνονται και το *R. toruloides* 17902 με μόλις 1,11 g/L στις 144 ώρες καλλιέργειας. Τα υπόλοιπα στελέχη παρήγαγαν πολύ μικρές ποσότητες λιπιδίων. Ακολουθεί συγκεντρωτικό γράφημα με την μέγιστη παραγωγή λιπιδίων από τους μικροοργανισμούς.



Διάγραμμα 4.2. Μέγιστη συγκέντρωση μικροβιακού λίπους σε g/L.

Η ανάλυση του μικροβιακού λίπους στον αέριο χρωματογράφο παρουσίασε ενδιαφέροντα αποτελέσματα για ορισμένα στελέχη. Αρχικά, σε ότι αφορά τα στελέχη *R. toruloides*, φάνηκε πως το λίπος τους αποτελείται κυρίως από ελαϊκό (C18:1) και παλμιτικό οξύ (C16:0). Τα ευρήματα αυτά είναι σύμφωνα με τα βιβλιογραφικά δεδομένα για το *R. toruloides* σε καλλιέργειες βιομηχανικής γλυκερόλης

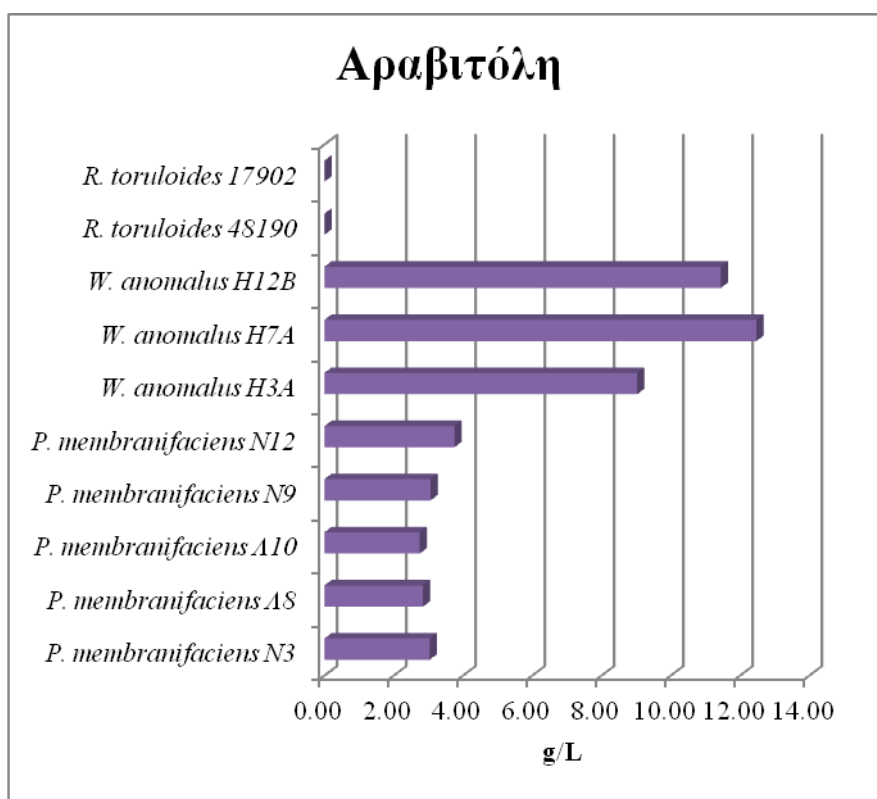
(Diamantopoulou et al., 2020; Papanikolaou et al., 2017; Tchakouteu et al., 2015). Η ανάλυση των *P. membranifaciens* και *W. anomalus* έχει ιδιαίτερο ενδιαφέρον καθώς φαίνεται να παράγουν μεγάλης ανθρακικής αλυσίδας λιπαρά οξέα (C20:0) σε υψηλά ποσοστά έως και 40%. Ενδιαφέρον παρουσίασαν επίσης και τα αποτελέσματα της χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδας (TLC) η οποία έδειξε πως και τα τρία είδη παράγουν μεταξύ άλλων σημαντικές ποσότητες τριγλυκεριδίων (TAG). Ακολουθεί συγκριτικός πίνακας με τα δεδομένα παραγωγής βιομάζας και μικροβιακού λίπους διαφόρων στελεχών του *Rhodospiridium toruloides* από μελέτες που έγιναν σε συνθήκες παρόμοιες με της παρούσας μελέτης.

**Πίνακας 4.2.** Συγκριτική παρουσίαση αποτελεσμάτων από μελέτες σε καλλιέργειες γλυκερόλης σε διάφορα στελέχη του *R. toruloides*. Όπου X (g/L) η μέγιστη παραγωγή βιομάζας και όπου L (g/L) η μέγιστη ποσότητα λίπους.

Στέλεχος	Υπόστρωμα	Τύπος καλλιέργειας	X (g/L)	L (g/L)	Αναφορά
<i>R. toruloides</i> DSM 4444	Glycerol 45 g/L	Shake flasks	12,7	4,9	Diamantopoulou et al. 2020
<i>R. toruloides</i> DSM 4444	Glycerol 70 g/L	Shake flasks	24,2	5,7	Papanikolaou et al. 2017
<i>R. toruloides</i> ATCC 10788	Glycerol 48,2 g/L	Shake flasks	10,34	3,51	Uprety et al. 2017
<i>R. toruloides</i> DSM 4444	Glycerol 30 g/L	Shake flasks	8,9	2,2	Tchakouteu et al. 2015
<i>R. toruloides</i> NRRL Y-27012	Glycerol 30 g/L	Shake flasks	11	2,83	Tchakouteu et al. 2015
<i>R. toruloides</i> Y4	Glycerol 50 g/L	Shake flasks	17,7	6,2	Yang et al. 2014
<i>R. toruloides</i>	Glycerol 50 g/L	Shake flasks	19,2	9,2	Xu et al. 2012
<i>R. toruloides</i> 48190	Glycerol 60 g/L	Shake flasks	17,74	5,22	Παρούσα μελέτη
<i>R. toruloides</i> 17902	Glycerol 60 g/L	Shake flasks	9,16	1,11	Παρούσα μελέτη

Ορισμένα στελέχη και συγκεκριμένα τα στελέχη του μικροοργανισμού *W.anomalus*, παρουσίασαν αξιοσημείωτη συγκέντρωση αραβιτόλης. Συγκεκριμένα το *W. anomalus* H7A, έπειτα από 240 ώρες συγκέντρωσε 12,47 g/L. Ακολουθεί το H12B

με 11,44 g/L μετά από 216 ώρες καλλιέργειας. Σημαντική ποσότητα συγκέντρωσε επίσης και το *W. anomalus* H3A με 9,03 g/L στις 216 ώρες. Από τα υπόλοιπα στελέχη που σημείωσαν ανάπτυξη στο υπόστρωμα τα *P. membranifaciens* N3, N9, N12, Δ8 και Δ10 σημείωσαν συγκέντρωση αραβιτόλης μεταξύ 2,7 και 3,7 g/L περίπου. Τέλος, τα δύο στελέχη *R. toruloides* τα οποία δοκιμάστηκαν δεν παρουσίασαν καμία παραγωγή της ουσίας. Ακολουθεί συγκεντρωτικό γράφημα με την παραγωγή αραβιτόλης από όλα τα στελέχη.



**Διάγραμμα 4.3.** Μέγιστη συγκέντρωση αραβιτόλης σε g/L.

Αναφορά σε παραγωγή αραβιτόλης από τον μικροοργανισμό *W. anomalus* έχει γίνει από τους Fredlund et al. (2004) σε καλλιέργεια σε γλυκόζη συγκέντρωσης 40 g/L. Η συγκεκριμένη μελέτη αποδίδει στην αραβιτόλη ιδιότητες που σχετίζονται με την ανάπτυξη ή και την επιβίωση του μικροοργανισμού σε συνθήκες περιορισμένου οξυγόνου. Είναι επίσης γνωστό από άλλες μελέτες πως η παραγωγή αραβιτόλης στο *W. anomalus* σχετίζεται και με την αντοχή στο οσμωτικό στρες (Bellinger and Larher, 1991). Σε μεγάλη μελέτη στην οποία έγινε screening πολλών



στελεχών μικροοργανισμών ως προς την ικανότητα παραγωγής πολυολών από γλυκερόλη, φάνηκε πως κυρίως τα γένη *Debaryomyces*, *Metschnikowia* και *Geotrichum* παρήγαγαν ως κύρια πολυόλη την αραβιτόλη σε συνθήκες παρόμοιες με της παρούσας μελέτης (Koganti et al., 2011). Σε αυτή φάνηκε πως στελέχη των προαναφερθέντων γενών παρήγαγαν αραβιτόλη σε συγκέντρωση από 6 έως και 12 g/L στους 30°C. Από τους ερευνητές αναφέρθηκε επίσης θετική συσχέτιση μεταξύ της αρχικής συγκέντρωσης γλυκερόλης στο θρεπτικό μέσο με την τελική παραγωγή αραβιτόλης, ενισχύοντας την θεωρία για τον ρόλο της συγκεκριμένης ουσίας στην ρύθμιση της ωσμωτικής πίεσης στο κύτταρο.

Ενδεικτικά αποτελέσματα παραγωγής αραβιτόλης κατά την καλλιέργεια στελεχών ζυμών σε διάφορες συνθήκες καλλιέργειας, παρατίθενται στον πιο κάτω πίνακα.

**Πίνακας 4.3.** Παραγωγή αραβιτόλης (g/L) από ποικίλα στελέχη ζυμών καλλιεργούμενα υπό διάφορες συνθήκες ζύμωσης.

Στέλεχος	Πηγή άνθρακα	Τύπος καλλιέργειας	(g/L)	Αναφορά
<i>Hansenula polymorpha</i> DSM 70277	Glucose	Batch-bioreactor	18,8	Escalante et al. (1990)
<i>Candida succiphila</i> Y-11998	Arabinose	Shake flasks	≈81	Dien et al. (1996)
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i> NRRL B-27,624	Glucose	Shake flasks	83,4	Saha et al. (2007)
<i>Debaryomyces hansenii</i> NRRL Y-7483	Glycerol	Shake flasks	14,5	Koganti et al. (2011)
<i>Debaryomyces hansenii</i> NRRL Y-7483	Glycerol	Batch bioreactor	40-43	Koganti and Ju (2013)
<i>Candida quercitrusa</i> NBRC 1022	Glycerol	Batch bioreactor	85,1	Yoshikawa et al. (2014)
<i>Debaryomyces hansenii</i> NRRL Y-7483	Soybean flour	Shake flasks	11,8	Loman et al. (2017)
<i>Debaryomyces</i> sp. FMCC Y <sub>69</sub>	Glycerol	Shake flasks	47,5	Filippousi et al (2019)
<i>Debaryomyces</i> sp. FMCC Y <sub>69</sub>	Glycerol	Batch-bioreactor	29,4	Filippousi et al (2019)

Συνοψίζοντας, βλέπουμε πως υπάρχει μεγάλη διαφοροποίηση μεταξύ των στελεχών που δοκιμάστηκαν σε όλες τις παραμέτρους. Ορισμένα δεν παρουσίασαν καμία ικανότητα ανάπτυξης στο θρεπτικό μέσο με κύρια πηγή άνθρακα την ακάθαρτη γλυκερόλη (*P. membranifaciens* Θ19, *K. humilis* H2A) και τα υπόλοιπα αναπτύχθηκαν σε ποικίλο βαθμό. Την μεγαλύτερη ανάπτυξη (παραγωγή βιομάζας και κατανάλωση γλυκερόλης) την παρουσίασαν πρώτα το *R. toruloides* 48190 και δευτερευόντως το *P. membranifaciens* N3, Τα συγκεκριμένα παρουσίασαν και την μοναδική ικανοποιητική παραγωγή μικροβιακού λίπους με την ίδια σειρά. Σημαντικό εύρημα αποτέλεσε επίσης και η παραγωγή αραβιτόλης, κυρίως από τα στελέχη του *W. anomalus* με συγκέντρωση έως και 12 g/L. Αυτός ο αριθμός μπορεί να μην είναι μεγάλος όμως αποτελεί την πρώτη αναφορά παραγωγής της ουσίας από τον συγκεκριμένο μικροοργανισμό στις συγκεκριμένες συνθήκες. Επιπλέον, η μέτρηση των ενδοπολυσακχαριτών (IPS) έδειξε ποσοστό άνω του 10% μόνο σε τρία στελέχη. Το μεγαλύτερο ποσοστό σημείωσε το *R. toruloides* 17902 με 14,8% ακολουθούμενο από το *R. toruloides* 48190 με 13,2% και το *P. membranifaciens* N9 με 11,25% επί της ξηράς ουσίας. Παραγωγή οργανικών οξέων όπως το κιτρικό δεν παρατηρήθηκε σε καμία από τις ζυμώσεις που έλαβαν χώρα. Αξίζει τέλος να σημειωθεί η πιθανή παραγωγή αραχιδικού οξέος (C20:0) ως σημαντικό συστατικό του λίπους από 4 από τα 6 στελέχη στα οποία έγινε ποιοτική ανάλυση αυτού.

Τα ευρήματα της παρούσας μελέτης είναι ενθαρρυντικά και ενδιαφέροντα σε ορισμένα σημεία καθώς μελετήθηκε η δυναμική στελεχών μικροοργανισμών άγνωστων ως προς τις ιδιότητες τους σχετικά με τον μεταβολισμό της ακάθαρτης γλυκερόλης. Αποδείχτηκε πως ορισμένα από αυτά μπορούν να την καταναλώσουν με μεγάλη επιτυχία και να παράξουν μεταβολικά προϊόντα όπως τα λιπίδια και οι πολυόλες τα οποία έχουν δυνητικά μεγάλη αξία για την βιομηχανία παραγωγής βιοντίζελ, την βιομηχανία τροφίμων κ.ά. Φαίνεται έτσι η ανάγκη για περαιτέρω μελέτη των πιο πολλά υποσχόμενων μικροοργανισμών, οι οποίοι μπορούν να δώσουν αξία σε ένα φαινομενικά ευτελές παραπροϊόν της βιομηχανίας όπως είναι η γλυκερόλη και να καταστήσουν περισσότερο βιώσιμη την βιοτεχνολογική παραγωγή προϊόντων προστιθέμενης αξίας.

## 5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Adhikari, Sushil, Sandun D. Fernando, and Agus Haryanto. 2009, “Hydrogen Production from Glycerol: An Update.” *Energy Conversion and Management* 50(10): 2600–2604.
- Amaral, Priscilla F. Fonseca, Tatiana Felix Ferreira, Gizele Cardoso Fontes, and Maria Alice Zarur Coelho. 2009, “Glycerol Valorization: New Biotechnological Routes.” *Food and Bioproducts Processing* 87(3): 179–86.
- André, Axel et al. 2010, “Biotechnological Conversions of Bio-Diesel Derived Waste Glycerol into Added-Value Compounds by Higher Fungi: Production of Biomass, Single Cell Oil and Oxalic Acid.” *Industrial Crops and Products* 31(2): 407–16.
- Athenaki, M., Gardeli, C., Diamantopoulou, P., Tchakouteu, S.S., Sarris, D., Philippoussis, A., Papanikolaou, S., 2018, Lipids from yeasts and fungi: physiology, production and analytical considerations. *J. Appl. Microbiol.* 124, 336–367.
- Babel, W., and K. H. Hofmann. 1982, “The Relation between the Assimilation of Methanol and Glycerol in Yeasts.” *Archives of Microbiology* 132(2): 179–84.
- Barnett, J. A. 2003, “Beginnings of Microbiology and Biochemistry: The Contribution of Yeast Research.” *Microbiology* 149(3): 557–67.
- Belda, Ignacio et al. 2017, “The Biology of *Pichia Membranifaciens* Killer Toxins.” *Toxins* 9(4): 112.
- Bellinger, Y., Larher, F., 1991, Salt tolerance and osmolyte composition of the yeast *Hansenula anomala* grown in the presence of fermentable or non-fermentable sources of carbon. *Sci. Aliments* 11, 37–48.
- Belitz, Hans. 2009, “(PDF) Food Chemistry 4th Edition by Belitz, W. Grosch, P. Schieberle (1) | Jingze Zhu - Academia.Edu.”
- BeMiller, James N., Roy L. Whistler, and F. O. Carbohydrates. 1996, “Food Chemistry.” *Edited by Owen R. Fennema. 3th ed. New York: Marcel Dekker: 158–221.*
- Beopoulos, Athanasios et al. 2009, “*Yarrowia Lipolytica* as a Model for Bio-Oil Production.” *Progress in Lipid Research* 48(6): 375–87.

- Berovic, Marin, and Matic Legisa. 2007, "Citric Acid Production." *Biotechnology annual review* 13: 303–43.
- Bevilacqua, A., C. Costa, M. R. Corbo, and M. Sinigaglia. 2009, "Effects of the High Pressure of Homogenization on Some Spoiling Micro-Organisms, Representative of Fruit Juice Microflora, Inoculated in Saline Solution." *Letters in Applied Microbiology* 48(2): 261–67.
- Bisping, B., U. Baumann, and R. Simmering. 1996, "Effects of Immobilization on Polyol Production by *Pichia Farinosa*." In *Progress in Biotechnology*, Elsevier, 395–401.
- Bommareddy, Rajesh Reddy, Wael Sabra, Garima Maheshwari, and An-Ping Zeng. 2015, "Metabolic Network Analysis and Experimental Study of Lipid Production in *Rhodosporidium Toruloides* Grown on Single and Mixed Substrates." *Microbial cell factories* 14(1): 36.
- Bommareddy, Rajesh Reddy, Wael Sabra, and An-Ping Zeng. 2017, "Glucose-mediated Regulation of Glycerol Uptake in *Rhodosporidium Toruloides*: Insights through Transcriptomic Analysis on Dual Substrate Fermentation." *Engineering in Life Sciences* 17(3): 282–91.
- Bozbas, Kahraman. 2008, "Biodiesel as an Alternative Motor Fuel: Production and Policies in the European Union." *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 12(2): 542–52,
- Bruggeman, Joost P. et al. 2008, "Biodegradable Xylitol-based Polymers." *Advanced materials* 20(10): 1922–27.
- Bruggeman, Joost P., Christopher J. Bettinger, and Robert Langer. 2010, "Biodegradable Xylitol-based Elastomers: In Vivo Behavior and Biocompatibility." *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 95(1): 92–104.
- Chatzifragkou, Afroditi et al. 2011, "Biotechnological Conversions of Biodiesel Derived Waste Glycerol by Yeast and Fungal Species." *Energy* 36(2): 1097–1108.
- Chatzifragkou, Afroditi, and Seraphim Papanikolaou. 2012, "Effect of Impurities in Biodiesel-Derived Waste Glycerol on the Performance and Feasibility of Biotechnological Processes." *Applied Microbiology and Biotechnology* 95(1): 13–27.
- Claude, Sylvain. 1999, "Research of New Outlets for Glycerol-recent Developments in France." *Lipid/Fett* 101(3): 101–4.

- Costa, Jorge Alberto Vieira, and Michele Greque de Morais. 2011, "The Role of Biochemical Engineering in the Production of Biofuels from Microalgae." *Bioresource Technology* 102(1): 2–9.
- Demain, Arnold L. 1998, "Microbial Natural Products: Alive and Well in 1998," *Nature biotechnology* 16(1): 3–4.
- Diamantopoulou, Panagiota, Seraphim Papanikolaou, Maria Kapoti, et al. 2012, "Mushroom Polysaccharides and Lipids Synthesized in Liquid Agitated and Static Cultures. Part I: Screening Various Mushroom Species." *Applied Biochemistry and Biotechnology* 167(3): 536–51.
- Diamantopoulou, Panagiota, Seraphim Papanikolaou, Eleni Katsarou, et al. 2012, "Mushroom Polysaccharides and Lipids Synthesized in Liquid Agitated and Static Cultures. Part II: Study of *Volvariella Volvacea*." *Applied Biochemistry and Biotechnology* 167(7): 1890–1906.
- Diamantopoulou, Panagiota et al. 2014, "Patterns of Major Metabolites Biosynthesis by Different Mushroom Fungi Grown on Glucose-Based Submerged Cultures." *Bioprocess and Biosystems Engineering* 37(7): 1385–1400.
- Diamantopoulou, P., Filippousi, R., Antoniou, D., Varfi, E., Xenopoulos, E., Sarris, D., Papanikolaou, S., 2020, Production of added-value microbial metabolites during growth of yeast strains on media composed of biodiesel-derived crude glycerol and glycerol/xylose blends. *FEMS Microbiol. Lett.* 367.
- Erten, Huseyin, and Iain Campbell. 1953, "The Production of Low-Alcohol Wines by Aerobic Yeasts." *Journal of the Institute of Brewing* 59(3): 207–15.
- Fakas, Stylianos. 2017, "Lipid Biosynthesis in Yeasts: A Comparison of the Lipid Biosynthetic Pathway between the Model Nonoleaginous Yeast *Saccharomyces Cerevisiae* and the Model Oleaginous Yeast *Yarrowia Lipolytica*." *Engineering in Life Sciences* 17(3): 292–302.
- Falb, Michaela et al. 2008, "Metabolism of Halophilic Archaea." *Extremophiles* 12(2): 177–96.
- Fan, Xiaohu, Rachel Burton, and Yongchang Zhou. 2010, "Glycerol (Byproduct of Biodiesel Production) as a Source for Fuels and Chemicals Mini Review." *The Open Fuels & Energy Science Journal* 3(1).

- Fang, Qing-Hua, and Jian-Jiang Zhong. 2002, "Submerged Fermentation of Higher Fungus *Ganoderma Lucidum* for Production of Valuable Bioactive Metabolites—Ganoderic Acid and Polysaccharide." *Biochemical Engineering Journal* 10(1): 61–65.
- Fazenda, Mariana L., Robert Seviour, Brian McNeil, and Linda M. Harvey. 2008, "Submerged Culture Fermentation of 'Higher Fungi': The Macrofungi." *Advances in applied microbiology* 63: 33–103.
- Filippousi, R., Antoniou, D., Tryfinopoulou, P., Nisiotou, A.A., Nychas, G.-J., Koutinas, A.A., Papanikolaou, S., 2019, 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.* 127, 1080–1100.
- Finer, N. 1991, "Sweeteners and Metabolic Disorders." In *Handbook of Sweeteners*, Springer, 225–47.
- Folch, J., M. Lees, and G.H.S. Stanley. 1957, "A Simple Method for Total Lipid Extraction and Purification." *J Biol Chem* 226: 497–509.
- Fredlund, Elisabeth et al. 2002, "Physiological Characteristics of the Biocontrol Yeast *Pichia Anomala* J121," *FEMS Yeast Research* 2(3): 395–402.
- Fredlund, Elisabeth et al. "Central Carbon Metabolism in the Biocontrol Yeast *Pichia Anomala*." : 54.
- Fredlund, E., Broberg, A., Boysen, M.E., Kenne, L., Schnürer, J., 2004, Metabolite profiles of the biocontrol yeast *Pichia anomala* J121 grown under oxygen limitation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 64, 403–409.
- Galiotou-Panayotou, Maria, Ourania Kalantzi, and George Aggelis. 1998, "Modelling of Simultaneous Production of Polygalacturonase and Exopolysaccharide by *Aureobasidium Pullulans*." *Antonie van Leeuwenhoek* 73(2): 155–62.
- Gancedo, C., J. M. Gancedo, and A. Sols. 1968, "Glycerol Metabolism in Yeasts." *European Journal of Biochemistry* 5(2): 165–72.
- García-Martín, María de Gracia et al. 2004, "Synthesis and Characterization of Linear Polyamides Derived from L-Arabinitol and Xylitol." *Macromolecules* 37(15): 5550–56.

- Gern, Regina Maria Miranda et al. 2008, “Alternative Medium for Production of *Pleurotus Ostreatus* Biomass and Potential Antitumor Polysaccharides.” *Bioresource Technology* 99(1): 76–82.
- Ghosh, Soma, and M. L. Sudha. 2012, “A Review on Polyols: New Frontiers for Health-Based Bakery Products.” *International Journal of Food Sciences and Nutrition* 63(3): 372–79.
- Groleau, Denis, Pierre Chevalier, and TLS Tse Hing Yuen. 1995, “Production of Polyols and Ethanol by the Osmophilic Yeast *Zygosaccharomyces Rouxii*.” *Biotechnology letters* 17(3): 315–20.
- Hibuse, Toshiyuki, Norikazu Maeda, Azumi Nagasawa, and Tohru Funahashi. 2006, “Aquaporins and Glycerol Metabolism.” *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* 1758(8): 1004–11.
- Ito, Takeshi et al. 2005, “Hydrogen and Ethanol Production from Glycerol-Containing Wastes Discharged after Biodiesel Manufacturing Process.” *Journal of bioscience and bioengineering* 100(3): 260–65.
- İzgülü, Fatih, Demet Altınbay, and Akif Emre Türeli. 2007, “In Vitro Activity of Panomycocin, a Novel Exo- $\beta$ -1, 3-glucanase Isolated from *Pichia Anomala* NCYC 434, against Dermatophytes.” *Mycoses* 50(1): 31–34.
- Jijakli, Haissam. 2010, “*Pichia Anomala* in Biocontrol for Fruits: 20 Years of Fundamental and Practical Research’s.”
- Klein, Mathias, Steve Swinnen, Johan M. Thevelein, and Elke Nevoigt. 2017, “Glycerol Metabolism and Transport in Yeast and Fungi: Established Knowledge and Ambiguities.” *Environmental Microbiology* 19(3): 878–93.
- Koller, Martin et al. 2005, “Production of Polyhydroxyalkanoates from Agricultural Waste and Surplus Materials †.” *Biomacromolecules* 6(2): 561–65.
- Krawezy, T. 1996, “Biodiesel—Alternative Fuel Makes in Roads but Hurdles Remain.” *Inform* 7(8): 800–815.
- Koganti, S., Kuo, T.M., Kurtzman, C.P., Smith, N., Ju, L.-K., 2011, Production of arabitol from glycerol: strain screening and study of factors affecting production yield. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 90, 257–267.

- Kurtzman, Cletus P. 2011, "Phylogeny of the Ascomycetous Yeasts and the Renaming of *Pichia Anomala* to *Wickerhamomyces Anomalus*." *Antonie van Leeuwenhoek* 99(1): 13–23.
- Lages, Fernanda, Magda Silva-Graça, and Candida Lucas. 1999, "Active Glycerol Uptake Is a Mechanism Underlying Halotolerance in Yeasts: A Study of 42 Species." *Microbiology* 145(9): 2577–85.
- Lam, Man Kee, and Keat Teong Lee. 2012, "Microalgae Biofuels: A Critical Review of Issues, Problems and the Way Forward." *Biotechnology advances* 30(3): 673–90.
- Lee, Sang Y., Soon H. Hong, Seung H. Lee, and Si J. Park. 2004, "Fermentative Production of Chemicals That Can Be Used for Polymer Synthesis." *Macromolecular bioscience* 4(3): 157–64.
- Loman, Abdullah Al, and Lu-Kwang Ju. 2014, "Arabitol Production from Glycerol by Fermentation." In *Soy-Based Chemicals and Materials*, ACS Symposium Series, American Chemical Society, 109–26.
- Mannazzu, Iliaria, Sara Landolfo, Teresa Lopes Da Silva, and Pietro Buzzini. 2015, "Red Yeasts and Carotenoid Production: Outlining a Future for Non-Conventional Yeasts of Biotechnological Interest." *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 31(11): 1665–73.
- Mantzouridou, Fani, Eleni Naziri, and Maria Z. Tsimidou. 2008, "Industrial Glycerol as a Supplementary Carbon Source in the Production of  $\beta$ -Carotene by *Blakeslea Trispora*." *Journal of agricultural and food chemistry* 56(8): 2668–75.
- Marquina, D., A. Santos, and J. Peinado. 2002, "Biology of Killer Yeasts." *International Microbiology* 5(2): 65–71.
- Masih, E. I. et al. 2001, "Characterisation of the Yeast *Pichia Membranifaciens* and Its Possible Use in the Biological Control of *Botrytis Cinerea*, Causing the Grey Mould Disease of Grapevine." *FEMS Microbiology Letters* 202(2): 227–32.
- Masih, Emmanuel Isaac, Isabelle Alie, and Bernard Paul. 2000, "Can the Grey Mould Disease of the Grape-Vine Be Controlled by Yeast?" *FEMS Microbiology Letters* 189(2): 233–37.



- Matsuzawa, Tomohiko et al. 2010, "The Gld1+ Gene Encoding Glycerol Dehydrogenase Is Required for Glycerol Metabolism in *Schizosaccharomyces Pombe*." *Applied microbiology and biotechnology* 87(2): 715–27.
- McCoy, M. 2005, "Mccoy: Drug Firms Report a Decent Quarter-Pfizer... - Μελετητής Google."
- McCoy, Michael. 2006, *Glycerin Surplus*. AMER CHEMICAL SOC 1155 16TH ST, NW, WASHINGTON, DC 20036 USA.
- Merico, Annamaria et al. 2011, "Generation of an Evolved *Saccharomyces Cerevisiae* Strain with a High Freeze Tolerance and an Improved Ability to Grow on Glycerol." *Journal of industrial microbiology & biotechnology* 38(8): 1037–44.
- Miller, Gail Lorenz. 1959, "Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar." *Analytical chemistry* 31(3): 426–28.
- Mo, Eun Kyoung, Jung Hyun Lee, Bao Jun Xu, and Chang Keun Sung. 2004, "Identification of Yeasts from Korean Feces and Prerequisite Characterization for Preparation of Probiotics." *Food Science and Biotechnology*.
- Morgunov, Igor G et al. 2004, "Pyruvic Acid Production by a Thiamine Auxotroph of *Yarrowia Lipolytica*." *Process Biochemistry* 39(11): 1469–74.
- Munch, Garret et al. 2015, "Lipid Production in the Under-Characterized Oleaginous Yeasts, *Rhodosporidium Babjevae* and *Rhodosporidium Diobovatum*, from Biodiesel-Derived Waste Glycerol." *Bioresource technology* 185: 49–55.
- Najafpour, G.D., A.A.L. Zinatizadeh, and L.K. Lee. 2006, "Performance of a Three-Stage Aerobic RBC Reactor in Food Canning Wastewater Treatment." *Biochemical Engineering Journal* 30(3): 297–302.
- Olstorpe, Matilda, Johan Schnürer, and Volkmar Passoth. 2009, "Screening of Yeast Strains for Phytase Activity." *FEMS Yeast Research* 9(3): 478–88.
- Pagliaro, Mario et al. 2007, "From Glycerol to Value-Added Products." *Angewandte Chemie International Edition* 46(24): 4434–40.
- Paliagro, M., and M. Rossi. 2008, "The Future of Glycerol: New Uses of a Versatile Raw Material." *RSC Green Chem* 5: 212–18.

- Papanikolaou, Seraphim et al. 2008, "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* 32(1): 60–71.
- Papanikolaou, S., Aggelis, G., 2019, Sources of microbial oils with emphasis to *Mortierella (Umbelopsis) isabellina* fungus. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 35, 63.
- Papanikolaou, S., Aggelis, G., 2003, Selective uptake of fatty acids by the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 105, 651–655.
- Papanikolaou, Seraphim, and George Aggelis. 2002, "Lipid Production by *Yarrowia Lipolytica* Growing on Industrial Glycerol in a Single-Stage Continuous Culture." *Bioresource Technology* 82(1): 43–49.
- Papanikolaou, Seraphim et al. 2009, "Biotechnological Valorization of Biodiesel Derived Glycerol Waste through Production of Single Cell Oil and Citric Acid by *Yarrowia Lipolytica*." *Lipid Technology* 21(4): 83–87.
- Papanikolaou, Seraphim et al. 2011, "Lipids of Oleaginous Yeasts. Part I: Biochemistry of Single Cell Oil Production." *European Journal of Lipid Science and Technology* 113(8): 1031–51.
- Papanikolaou, S., Kampsopoulou, E., Blanchard, F., Rondags, E., Gardeli, C., Koutinas, A.A., Chevalot, I., Aggelis, G., 2017, Production of secondary metabolites through glycerol fermentation under carbon-excess conditions by the yeasts *Yarrowia lipolytica* and *Rhodospiridium toruloides*. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 119, 1600507.
- Patel, Alok, Vikas Pruthi, Rajesh P. Singh, and Parul A. Pruthi. 2015, "Synergistic Effect of Fermentable and Non-Fermentable Carbon Sources Enhances TAG Accumulation in Oleaginous Yeast *Rhodospiridium Kratochvilovae* HIMPA1," *Bioresource technology* 188: 136–44.
- Pavlik, P., M. Simon, T. Schuster, and H. Ruis. 1993, "The Glycerol Kinase (GUT1) Gene of *Saccharomyces Cerevisiae*: Cloning and Characterization." *Current genetics* 24(1–2): 21–25.
- Philippoussis, ANTONIOS, and PANAGIOTA Diamantopoulou. 2011, "Agro-Food Industry Wastes and Agricultural Residues Conversion into High Value Products by

- Mushroom Cultivation.” In *Proceedings of the 7th International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products (ICMBMP7), France*, , 4–7.
- Pyle, Denver J., and Zhiyou Wen. 2008, “Production of Omega-3 Fatty Acid-Rich Microalgae from Biodiesel Derived Crude Glycerol: Effects of Glycerol Impurities on Algal Growth and DHA Production.” In *2008 Providence, Rhode Island, June 29–July 2, 2008*, American Society of Agricultural and Biological Engineers, 1.
- Rahmat, Norhasyimi, Ahmad Zuhairi Abdullah, and Abdul Rahman Mohamed. 2010, “Recent Progress on Innovative and Potential Technologies for Glycerol Transformation into Fuel Additives: A Critical Review.” *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 14(3): 987–1000.
- Ratledge, Colin. 2004, “Fatty Acid Biosynthesis in Microorganisms Being Used for Single Cell Oil Production.” *Biochimie* 86(11): 807–15.
- Ratledge, Colin, and James P. Wynn. 2002, “The Biochemistry and Molecular Biology of Lipid Accumulation in Oleaginous Microorganisms.” *Advances in applied microbiology* 51: 1–52.
- Roukas, T. 2000, “Citric and Gluconic Acid Production from Fig by *Aspergillus Niger* Using Solid-State Fermentation.” *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 25(6): 298–304.
- Ryan, Owen W., Snigdha Poddar, and Jamie HD Cate. 2016, “Crispr–Cas9 Genome Engineering in *Saccharomyces Cerevisiae* Cells.” *Cold Spring Harbor Protocols* 2016(6): pdb. prot086827.
- Sandmann, Gerhard. 2001, “Carotenoid Biosynthesis and Biotechnological Application.” *Archives of biochemistry and biophysics* 385(1): 4–12.
- Sarris, Dimitris et al. 2013, “Conversions of Olive Mill Wastewater-Based Media by *Saccharomyces Cerevisiae* through Sterile and Non-Sterile Bioprocesses: Bioconversions of Olive-Mill Wastewaters by *SaccharomycesCerevisiae*.” *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* 88(5): 958–69.
- Sarris, Dimitris, and Seraphim Papanikolaou. 2016, “Biotechnological Production of Ethanol: Biochemistry, Processes and Technologies.” *Engineering in Life Sciences* 16(4): 307–29.

- Seviour, R. J., S. J. Stasinopoulos, D. P.F. Auer, and P. A. Gibbs. 1992, "Production of Pullulan and Other Exopolysaccharides by Filamentous Fungi." *Critical Reviews in Biotechnology* 12(3): 279–98.
- da Silva, Gervásio Paulo, Matthias Mack, and Jonas Contiero. 2009, "Glycerol: A Promising and Abundant Carbon Source for Industrial Microbiology." *Biotechnology Advances* 27(1): 30–39.
- Soccol, Carlos R, Luciana P S Vandenberghe, Cristine Rodrigues, and Ashok Pandey. 2006, "New Perspectives for Citric Acid Production and Application." : 9.
- Sprague, G. F., and John E. Cronan. 1977, "Isolation and Characterization of *Saccharomyces Cerevisiae* Mutants Defective in Glycerol Catabolism." *Journal of bacteriology* 129(3): 1335–42.
- Swinnen, Steve et al. 2013, "Re-Evaluation of Glycerol Utilization in *Saccharomyces Cerevisiae*: Characterization of an Isolate That Grows on Glycerol without Supporting Supplements." *Biotechnology for biofuels* 6(1): 157.
- Tai, Mitchell, and Gregory Stephanopoulos. 2013, "Engineering the Push and Pull of Lipid Biosynthesis in Oleaginous Yeast *Yarrowia Lipolytica* for Biofuel Production." *Metabolic engineering* 15: 1–9.
- Tang, Ya-Jie, and Jian-Jiang Zhong. 2002, "Fed-Batch Fermentation of *Ganoderma Lucidum* for Hyperproduction of Polysaccharide and Ganoderic Acid." *Enzyme and Microbial Technology* 31(1–2): 20–28.
- Tani, Yoshiki, and Keiko Yamada. 1987, "Glycerol Metabolism in Methylotrophic Yeasts." *Agricultural and biological chemistry* 51(7): 1927–33.
- Tchakouteu, S.S., Kalantzi, O., Gardeli, Chr., Koutinas, A.A., Aggelis, G., Papanikolaou, S., 2015, Lipid production by yeasts growing on biodiesel-derived crude glycerol: strain selection and impact of substrate concentration on the fermentation efficiency. *J. Appl. Microbiol.* 118, 911–927.
- Van Eck, Johann H., Bernard A. Prior, and E. Vincent Brandt. 1989, "Accumulation of Polyhydroxy Alcohols by *Hansenula Anomala* in Response to Water Stress." *Microbiology* 135(12): 3505–13.
- Van Gerpen, Jon et al. 2004, "Biodiesel Production Technology." *National renewable energy laboratory* 1617: 80401–393.

- Vasiliadis, G. E., J. Sloan, J. H. Marshall, and J. W. May. 1987, "Glycerol and Dihydroxyacetone Metabolizing Enzymes in Fission Yeasts of the Genus *Schizosaccharomyces*." *Archives of microbiology* 147(3): 263–67.
- Walker, Graeme M. 2011, "Pichia Anomala: Cell Physiology and Biotechnology Relative to Other Yeasts." *Antonie van Leeuwenhoek* 99(1): 25–34.
- Wennerholm, K., C.-G. Emilson, and D. Birkhed. 1991, "Sweeteners and Dental Health." In *Handbook of Sweeteners*, Springer, 205–24.
- Wu, Jing, Zhong-Yang Ding, and Ke-Chang Zhang. 2006, "Improvement of Exopolysaccharide Production by Macro-Fungus *Auricularia Auricula* in Submerged Culture." *Enzyme and Microbial Technology* 39(4): 743–49.
- Xu, Jingyang et al. 2012, "Microbial Conversion of Biodiesel Byproduct Glycerol to Triacylglycerols by Oleaginous Yeast *Rhodospiridium Toruloides* and the Individual Effect of Some Impurities on Lipid Production." *Biochemical engineering journal* 65: 30–36.
- Xu, Jingyang, and Dehua Liu. 2017, "Exploitation of Genus *Rhodospiridium* for Microbial Lipid Production." *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 33(3): 54.
- Yazdani, Syed Shams, and Ramon Gonzalez. 2007, "Anaerobic Fermentation of Glycerol: A Path to Economic Viability for the Biofuels Industry." *Current Opinion in Biotechnology* 18(3): 213–19.
- Zhang, Shuyan et al. 2016, "Engineering *Rhodospiridium Toruloides* for Increased Lipid Production." *Biotechnology and Bioengineering* 113(5): 1056–66.