

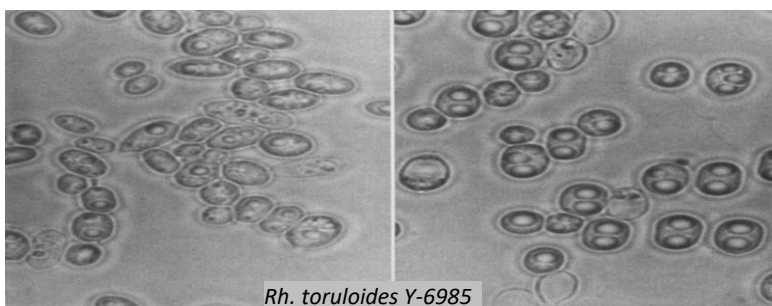
ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ, ΣΥΝΤΗΡΗΣΗ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΕΣ ΔΙΕΡΓΑΣΙΕΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ
ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΒΙΟΟΙΚΟΝΟΜΙΑΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**«Μελέτη της επιλογής νέων στελεχών ζυμών προς παραγωγή
μεταβολικών προϊόντων προστιθέμενης αξίας χρησιμοποιώντας την
ακάθαρτη γλυκερόλη ως υλικό εκκινήσεως»**

Πολυξένη Γ. Φέτση



Επιβλέπων καθηγητής: Σεραφείμ Παπανικολάου

ΑΘΗΝΑ

2020

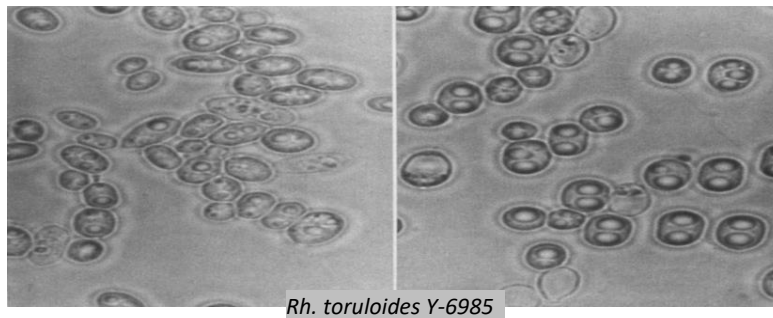
ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

«Μελέτη της επιλογής νέων στελεχών ζυμών προς παραγωγή μεταβολικών προϊόντων προστιθέμενης αξίας χρησιμοποιώντας την ακάθαρτη γλυκερόλη ως υλικό εκκινήσεως»

Study of the selection of new yeast strains for production value-added metabolic products using crude glycerol as starting material

Πολυξένη Γ. Φέτση



Rh. toruloides Y-6985

Εξεταστική επιτροπή:

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

Απόστολος Κουτίνας, Αναπληρωτής Καθηγητής Γ.Π.Α

Ευθυμία Τσακαλίδου, Καθηγήτρια Γ.Π.Α

Μελέτη της επιλογής νέων στελεχών ζυμών προς παραγωγή μεταβολικών προϊόντων προστιθέμενης αξίας χρησιμοποιώντας την ακάθαρτη γλυκερόλη ως υλικό εκκινήσεως

Τμήμα Επιστήμης και Διατροφής του Ανθρώπου

Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η διερεύνηση της ικανότητας δέκα διαφορετικών ζυμών, οι οποίες δεν έχουν χρησιμοποιηθεί στο παρελθόν, να αναπτύσσονται σε υδρόφιλο υπόστρωμα χαμηλού κόστους και συγκεκριμένα σε ακάθαρτη γλυκερόλη, η οποία είναι παραπροϊόν της βιομηχανικής παραγωγής βιοκαυσίμου (biodiesel). Πιο συγκεκριμένα, η ικανότητα των ζυμών να μεταβολίζουν την γλυκερόλη προς παραγωγή βιομάζας και δευτερογενών μεταβολιτών, όπως μικροβιακό λίπος και ενδοπολυσακχαρίτες κατάλληλα για χρήση στην φαρμακοβιομηχανία όσο και στην βιομηχανία τροφίμων, καθώς επίσης και πολυόλες όπως αραβιτόλη, ερυθριτόλη, μαννιτόλη.

Στην πειραματική διαδικασία χρησιμοποιήθηκαν τα στελέχη *Candida zeylanoides* 5266, *Pichia fermentans* 5265 και 5257, *Candida tartarivorans* 5224 και 5222, *Candida inconspicua* και 5293 και 5292, *Geotrichum candidum* 5274, *Rhodosporidium toruloides* Y-6985 και Y-1588. Με εξαίρεση τα στελέχη Rh. Toruloides Y-6985 και Y-1588 τα οποία προέρχονται από τη συλλογή στελεχών NRRL (Peoria, USA), και τα οποία χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες για την παραγωγή ενδοκυτταρικών λιπιδιακών αποθεμάτων, τα άλλα στελέχη είναι προερχόμενα από Ελληνικές πρώτες ύλες και δεν έχουν μελετηθεί ως προς την παραγωγή μεταβολιτών. Έγιναν υγρές καλλιέργειες ασυνεχούς τύπου σε αναδεδυόμενες φιάλες Erlenmeyer των 250 mL, χρησιμοποιώντας ως πηγή άνθρακα γλυκερόλη (καθαρότητας 85% κατά βάρος) στην ίδια συγκέντρωση (60 g/L) με περιοριστικό παράγοντα αύξησης το άζωτο σε ίδιες συνθήκες καλλιέργειας (30° C και pH 6). Έγινε προσδιορισμός του ξηρού βάρους βιομάζας με το στέλεχος *Rh. toruloides* Y-6985 να εμφανίζει τη μέγιστη ποσότητα η οποία ανήλθε στα 12,2g/L. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε εκχύλιση των λιπιδίων για ποσοτικό προσδιορισμό με τα στελέχη *Rh. toruloides* Y-6985 και *P. fermentans* 5257 να σημειώνουν τις μέγιστες συγκεντρώσεις (3,3-2,2g/L). Στο ενδοκυτταρικό λίπος των στελεχών με την μεγαλύτερη δυνατότητα

λιποσυσώρευσης πραγματοποιήθηκαν περαιτέρω αναλύσεις. Το ενδοκυτταρικό λίπος αναλύθηκε με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC) για την γενική κατανομή και ποιοτικό προσδιορισμό του ουδέτερου λίπους. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε ανάλυση με αέρια χρωματογραφία (GC) για τον προσδιορισμό της σύστασης των λιπαρών οξέων, έπειτα από την μετατροπή τους στους αντίστοιχους πτητικούς μεθυλικούς εστέρες (FAMES). Εξετάστηκε επίσης η παραγωγή ενδοπολυσακχαριτών, ο προσδιορισμός των οποίων έγινε με το αντιδραστήριο DNS και ο ποσοτικός προσδιορισμός τους με φωτόμετρο και χρήση της καμπύλης απορρόφησης. Η μέγιστη παραγωγή παρουσιάστηκε από το στέλεχος *G. candidum* 5274 και κυμάνθηκε στα 0,30 g/L. Η παραγωγή πολυολών (μαννιτόλης, ερυθριτόλης, αραβιτόλης) καθώς και η κατανάλωση σακχάρων προσδιορίστηκε ποιοτικά αλλά και ποσοτικά μέσω υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC). Παρατηρήθηκαν αξιοσημείωτες ποσότητες παραγωγής μαννιτόλης 3,41 g/L από το στέλεχος *P. fermentans* 5257, αραβιτόλης 6,22 g/L και ερυθριτόλης 8,12 g/L από το στέλεχος *G. candidum* 5274.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι δεν προσαρμόστηκαν όλα τα στελέχη στο θρεπτικό μέσο με την ίδια απόδοση. Παρατηρήθηκε διαφοροποίηση στον ρυθμό κατανάλωσης της γλυκερόλης άρα και στην παραγωγή βιομάζας, ενδοκυτταρικού λίπους, ενδοπολυσακχαριτών και τέλος των δευτερογενών μεταβολιτών.

Επιστημονική περιοχή: Διατροφή ανθρώπου

Λέξεις κλειδιά: ζύμη, ακάθαρτη γλυκερόλη, πολυόλες, ενδοκυτταρικό λίπος

Study of the selection of new yeast strains for the production of value-added metabolic products using crude glycerol as a starting material

Department of Human Science and Nutrition

Laboratory of Microbiology and Biotechnology

ABSTRACT

The purpose of this study is to investigate the ability of ten different yeasts, which have not been used in the past, to grow on a low-cost hydrophilic substrate, namely on crude glycerol, which is a by-product of industrial biodiesel production. More specifically, the ability of yeasts to metabolize glycerol to produce biomass and secondary metabolites, such as microbial fat and endopolysaccharides suitable for use in the pharmaceutical and food industries, as well as polyols such as arabitol, erythritol, mannitol.

The strains *Candida zeylanoides* 5266, *Pichia fermentans* 5265 and 5257, *Candida tartarivorans* 5224 and 5222, *Candida inconspicua* and 5293 and 5292, *Geotrichum candidum* 5274, *Rhodospidium toruloides* Y-6985 and Y-1588 were used in the experimental procedure. With the exception of *Rh. toruloides* strains Y-6985 and Y-1588 which come from the NRRL strain collection (Peoria, USA), and which were used as controls for the production of intracellular lipid stocks, the other strains are derived from Greek raw materials. and have not been studied in terms of metabolite production. Discontinuous liquid cultures were performed in 250 mL Erlenmeyer agitated flasks using as a carbon source glycerol (purity 85% by weight) at the same concentration (60 g / L) with growth limiting nitrogen under the same culture conditions (30 ° C and pH 6).). The dry weight of biomass was determined with the strain *R. toruloides* Y-6985 showing the maximum amount which amounted to 12,2 g / L. The lipids were then extracted for quantification with strains *Rh. toruloides* Y-6985 and *P. fermentans* 5257 reaching maximum concentrations (3,3-2,2 g / L). Further analyzes were performed on the intracellular fat of the strains with the highest potential for fat accumulation. Intracellular fat was analyzed by thin layer chromatography (TLC) for the general distribution and qualitative determination of neutral fat. Gas chromatography

(GC) analysis was then performed to determine the composition of the fatty acids, after conversion to the corresponding volatile methyl esters (FAMES). The production of endopolysaccharides, which were determined with the DNS reagent and quantified by photometer and using the absorption curve, was also examined. The maximum production was presented by strain *G. candidum* 5274 and ranged at 0,30 g / L. The production of polyols (mannitol, erythritol, arabitol) as well as the consumption of sugars were determined qualitatively and quantitatively by high performance liquid chromatography (HPLC). Significant amounts of 3,41 g / L mannitol were observed from *P. fermentans* strain 5257, arabitol 6,22 g / L and erythritol 8,12 g / L from *G. candidum* strain 5274.

The results showed that not all strains adapted to the nutrient medium with the same yield. There was a difference in the rate of glycerol consumption and therefore in the production of biomass, intracellular fat, endopolysaccharides and finally the secondary metabolites.

Scientific area: Human nutrition

Keywords: yeast, crude glycerol, polyols, intra-cellular fat, intra-cellular polysaccharides

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

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

Θα ήθελα αρχικά να ευχαριστήσω τον καθηγητή μου κ. Παπανικολάου Σεραφείμ για τις συμβουλές του καθ' όλη την διάρκεια της μελέτης αυτής, καθώς και για την άριστη συνεργασία μας. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα μου, Δρ. Μαρκέλλα Τζηρίτα, για την καθοδήγηση και βοήθειά της καθ' όλη τη διάρκεια της μεταπτυχιακής μου μελέτης, τόσο στο πειραματικό όσο και στο συγγραφικό κομμάτι. Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την κυρία Ουρανία Καλαντζή, καθώς και τις υποψήφιες διδακτορικούς Σέβη Μίχου και Ελένη Βασταρούχα για την βοήθειά τους και τις επιστημονικές τους συμβουλές. Δεν θα ήθελα να παραλείψω να ευχαριστήσω την καθηγήτρια Έφη Τσακαλίδου για την παραχώρηση από την συλλογή του εργαστηρίου Γαλακτοκομίας των στελεχών που μελετήθηκαν, καθώς επίσης και την κυρία Ευγενία Μανωλοπούλου για την ανανέωση και προετοιμασία των στελεχών αυτών.

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

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

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ABSTRACT.....	5
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	10
1.1 ΓΛΥΚΕΡΟΛΗ ΚΑΙ ΒΙΟΝΤΗΖΕΛ.....	13
1.1.1 Η ένωση “Γλυκερόλη”.....	13
1.1.2 Η γλυκερόλη ως παραπροϊόν της παραγωγής βιοντήζελ.....	14
1.2 ΖΥΜΕΣ, ΛΙΠΙΔΙΑ ΖΥΜΩΝ & ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΓΛΥΚΕΡΟΛΗΣ.....	18
1.2.1 Ζύμες.....	18
1.2.2 Λιπίδια ζυμών.....	21
1.2.3 Μεταβολισμός της γλυκερόλης στις ζύμες.....	25
1.3 ΠΑΡΑΓΩΜΕΝΑ ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΑ ΠΡΟΪΟΝΤΑ.....	28
1.3.1 Ενδοπολυσακχαρίτες (Intracellular Polysaccharides, IPS).....	28
1.3.2 Πολυόλες.....	30
1.3.3 Λιπίδια.....	36
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ.....	41
2.1 ΒΙΟΛΟΓΙΚΟ ΥΛΙΚΟ.....	42
2.2 ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ.....	43
2.2.1 Παρασκευή προκαλλιέργειας.....	43
2.2.2 Παρασκευή κυρίως καλλιέργειας.....	43
2.3 ΧΗΜΙΚΕΣ ΑΝΑΛΥΣΕΙΣ.....	45
2.3.1 Προσδιορισμός του pH στο μέσο ανάπτυξης των μικροοργανισμών.....	45
2.3.2 Προσδιορισμός βιομάζας.....	46
2.3.3 Προσδιορισμός ενδοπολυσακχαριτών (IPS).....	46
2.3.3.1 Ποσοτικός προσδιορισμός.....	47
2.3.4 Προσδιορισμός γλυκερόλης και πολυολών.....	47
2.3.5 Ποσοτικός προσδιορισμός ενδοκυτταρικού λίπους.....	47
2.3.5.1 Ανάλυση ενδοκυτταρικού λίπους με την μέθοδο TLC.....	48
2.3.5.2 Μεθυλεστεροποίηση.....	49
2.3.5.3 Ανάλυση με αέριο χρωματογράφο (GC).....	50
2.4 ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ.....	51
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	52
3.1 Αξιολόγηση (screening) των 10 στελεχών.....	54
3.1.1 Ζύμωση του στελέχους <i>Pichia fermentans</i> 5257.....	54

.....	57
3.1.2 Ζύμωση του στελέχους <i>Pichia fermentans</i> 5265	57
.....	60
3.1.3 Ζύμωση του στελέχους <i>C. zeylanoides</i> 5266	60
3.1.4 Ζύμωση του στελέχους <i>C. incospicua</i> 5292	63
3.1.5 Ζύμωση του στελέχους <i>C. incospicua</i> 5293	66
3.1.6 Ζύμωση του στελέχους <i>G. Candidum</i> 5274	69
.....	71
3.1.7 Ζύμωση του στελέχους <i>G. tartarivorans</i> 5222	72
3.1.8 Ζύμωση του στελέχους <i>G. tartarivorans</i> 5224	75
3.1.9 Ζύμωση του στελέχους <i>Rh. toruloides</i> Y-6985	78
.....	81
3.1.10 Ζύμωση του στελέχους <i>Rh. toruloides</i> Y-1588	81
3.2 Ανάλυση ενδοκυτταρικού λίπους με TLC.....	85
3.2.1 Μικροοργανισμός <i>Rh. toruloides</i> 1588.....	85
3.2.2 Μικροοργανισμός <i>Rh. toruloides</i> 6985.....	86
3.2.3 Μικροοργανισμός <i>Pichia fermentans</i> 5257.....	87
3.2.4 Μικροοργανισμός <i>Candida zeylanoides</i> 5266	88
3.2.5 Μικροοργανισμός <i>Candida tartarivorans</i> 5222	89
3.3 Ανάλυση ενδοκυτταρικού λίπους με GC.....	90
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΣΥΖΗΤΗΣΗ	91
4.1 Σύγκριση και αξιολόγηση (screening) των 10 στελεχών σε κωνικές φιάλες (S0 60 g/L).....	93
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	108

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τις τελευταίες δεκαετίες η αυξημένη ζήτηση πετρελαίου καθώς και η σταδιακή μείωση των αποθεμάτων και η συνεπακόλουθη αύξηση των τιμών αυτού, οδήγησαν στην ανάγκη εξεύρεσης εναλλακτικών τύπων καυσίμων όπως το βιοντήζελ και η βιοαιθανόλη, των οποίων η τάση παραγωγής είναι συνεχώς και συστηματικώς αυξητική. Το βιοντήζελ (αλκυλεστέρες λιπαρών οξέων προερχόμενοι από μετεστεροποίηση διαφόρων τύπων λιπών και ελαίων, συνήθως χαμηλού ή και μηδενικού κόστους) στον τομέα των μεταφορών κατέχει κύρια θέση καθώς μπορεί να χρησιμοποιηθεί είτε αναμεμιγμένο με συμβατικό πετρέλαιο σε διάφορες αναλογίες ή αυτούσιο με περιορισμένης έκτασης μετατροπές στους κινητήρες (*Papanikolaou & Aggelis 2009*). Άμεση συνέπεια της αυξημένης παραγωγής βιοντήζελ είναι η συσσώρευση αντίστοιχα μεγάλων ποσοτήτων ενός «απόβλητου» απόνευρου πλούσιου σε γλυκερόλη, το οποίο όταν συμπυκνώνεται αποτελεί την ακάθαρτη γλυκερόλη. Τις τελευταίες δεκαετίες έχει παρατηρηθεί ραγδαία αύξηση στις ποσότητες της ακάθαρτης γλυκερόλης ως συνέπεια της πολύ μεγάλης αύξησης της παραγωγής βιοντήζελ. Η τεράστια παραγωγή γλυκερόλης έχει αντίκτυπο τόσο σε οικονομικό όσο και σε περιβαλλοντικό επίπεδο. Η τιμή της έχει μειωθεί τόσο ώστε να θεωρείται πολύ χαμηλού κόστους υπόλειμμα ή και απόβλητο (*Adhikari et al., 2009*). Ενδεικτικά η τιμή της ακάθαρτης γλυκερόλης το 2007 ήταν 0,0 \$/kg και χρησιμοποιούνταν μόνο για την παραγωγή βιοαερίου (*Papanikolaou & Aggelis, 2009*).

Η γλυκερόλη τα τελευταία χρόνια, μελετάται επισταμένως ως ένα πολλά υποσχόμενο χαμηλού κόστους υπόστρωμα, χρησιμοποιούμενο σε πληθώρα βιοτεχνολογικών εφαρμογών. Στόχος της μελέτης αυτής είναι η αξιοποίηση της ακάθαρτης γλυκερόλης κατά τη χρήση της ως υλικό εκκίνησης ποικίλων ευκαρυωτικών μικροοργανισμών (ζυμών τις περισσότερες περιπτώσεις απομονωμένων από Ελληνικής προέλευσης τρόφιμα και γεωργικά προϊόντα) με ταυτόχρονη κινητική ανάλυση της παραγωγής μεταβολικών προϊόντων τα οποία παράγονται. Τα προϊόντα αυτά, οποία θα μπορούσαν ενδεχομένως να είναι συστατικά πολύ υψηλής προστιθέμενης αξίας, χρησιμοποιούμενα στις βιομηχανίες τροφίμων, φαρμάκων και καυσίμων.

1.1 ΓΛΥΚΕΡΟΛΗ ΚΑΙ ΒΙΟΝΤΗΖΕΛ

1.1.1 Η ένωση “Γλυκερόλη”

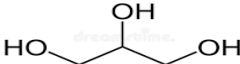
Η γλυκερίνη ή γλυκερόλη, φέρεται η χημική οργανική ένωση προπανοτριόλη η οποία αποτελείται από τρία άτομα άνθρακα όπου ο πρώτος και ο τελευταίος συνδέονται με δύο άτομα υδρογόνου και μια ρίζα υδροξυλίου, ενώ ο μεσαίος με ένα άτομο υδρογόνου και ένα υδροξύλιο, όπως περιγράφεται στο συντακτικό τύπο: $\text{HOCH}_2\text{-CHOH-CH}_2\text{OH}$.

Ειδικότερα στην αγγλική και γαλλική ορολογία ο όρος «γλυκερόλη» χαρακτηρίζει την καθαρή χημική ένωση, ενώ ο όρος «γλυκερίνη» αποδίδεται περισσότερο στα διάφορα εμπορικά παρασκευάσματα, όπου η περιεχόμενη καθαρή ουσία είναι περισσότερη του 95%. Την εμπειρική ονομασία γλυκερίνη την οφείλει στον Σεβρέλ (Chevreul) που πρώτος την ονομάτισε από τη γλυκιά γεύση της.

Η γλυκερίνη ανακαλύφθηκε από τον Σέελε (Scheele) το 1779. Πρόκειται για ουσία ημίρρευστη σε κανονική θερμοκρασία με σημείο τήξης τους $17\text{ }^\circ\text{C}$, και σημείο ζέσεως τους $290\text{ }^\circ\text{C}$ όπου και παρατηρείται ταυτόχρονη αποσύνθεση. Χαμηλότερα των $17\text{ }^\circ\text{C}$ βρίσκεται σε κατάσταση ιξώδους μορφής (πυκνόρρευστο) με ειδικό βάρος περίπου 1,265. 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. Στον Πίνακα 1.1.1-1 παρουσιάζονται τα γενικά χαρακτηριστικά της γλυκερίνης. Θερμαινόμενη με KHSO_4 σχηματίζει την ακόρεστη αλδεΐδη ακρολεΐνη. Η γλυκερίνη παρέχει εστέρες, τα λεγόμενα γλυκερίδια, εκ των οποίων σημαντικότερα είναι τα λιπίδια που σχηματίζονται με τα λιπαρά οξέα. Αναμιγνύεται εύκολα με το νερό και την αιθυλική αλκοόλη και διαλύεται με ακετόνη, πλην όμως είναι αδιάλυτη στον κοινό αιθέρα. Βιομηχανικά η γλυκερίνη παρασκευάζεται ως ακατέργαστο υποπροϊόν υδρόλυσης λιπών και ελαίων κατά την παραγωγή λιπαρών οξέων ή σαπώνων. Η προκύπτουσα «ακατέργαστη γλυκερίνη» υποβάλλεται στη συνέχεια σε καθαρισμό και στη συνέχεια σε απόσταξη, ώστε να περιοριστεί η περιεκτικότητα σε νερό μέχρι ποσοστού 3%, προκειμένου έτσι να χρησιμοποιηθεί σε φαρμακευτικά ή βιομηχανικά προϊόντα. (Pagliaro et al., 2010).

Η γλυκερίνη παρουσιάζει ένα ευρύ φάσμα χρήσεων, μεταξύ των οποίων είναι η χρήση της ως διαλύτης, μέσω διαβροχής, ως πλαστικοποιητής, ως 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 (Pagliaro et al., 2010).

Πίνακας 1.1.1-1: Γενικά χαρακτηριστικά γλυκερόλης (Papanikolaou, 2013).

Γενικά χαρακτηριστικά		Συντακτικός τύπος
Χημική ονομασία	1,2,3-προπανοτριόλη	<p style="text-align: center;">Glycerol</p> 
Μοριακός τύπος	C ₃ H ₈ O ₃	
Μοριακή μάζα	92,10g/mol	
Χημικές ιδιότητες		Φυσικές ιδιότητες
Σημείο τήξης	17,8 °C	Άχρωμη
Σημείο βρασμού	290 °C	Αοσμη
Σημείο ανάφλεξης	177 °C	Διαυγής
Ειδικό βάρος	1.26 (20 °C)	Υγροσκοπική
Πυκνότητα	1.261 g/mL	Ημίρρευστη

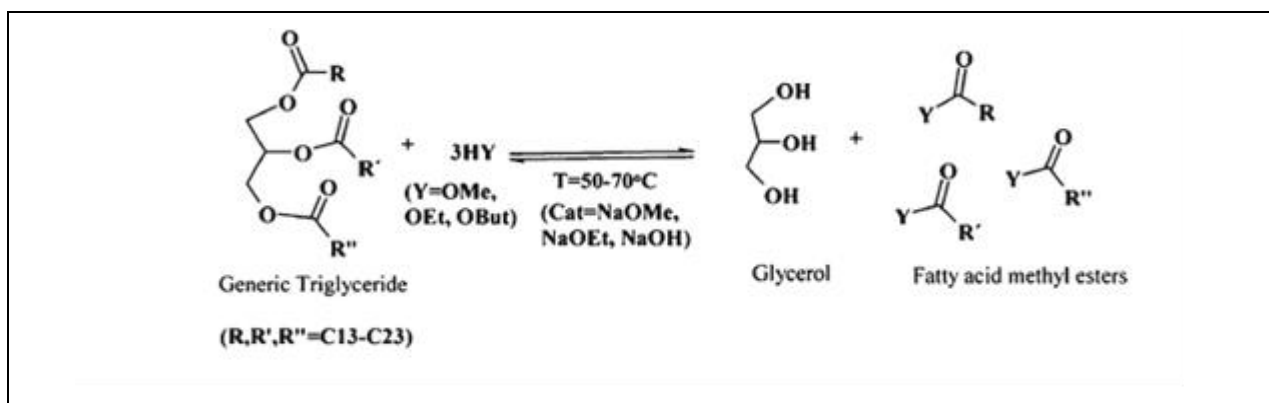
1.1.2 Η γλυκερόλη ως παραπροϊόν της παραγωγής βιοντήζελ

Η γλυκερόλη είναι μια απλή χημική ένωση που δύναται να αφομοιωθεί από αρκετούς ευκαρυωτικούς και προκαρυωτικούς μικροοργανισμούς. Παρόλα αυτά μέχρι πρότινος δε χρησιμοποιούνταν ως υπόστρωμα σε βιοτεχνολογικές εφαρμογές καθώς οι περιορισμένες ποσότητες που παράγονταν ως παραπροϊόν στις βιομηχανίες παραγωγής αλκοόλης και σαπωνοποιίας διοχετεύονταν μετά από καθαρισμό στη φαρμακοβιομηχανία (Barbirato et al., 1998; Papanikolaou et al., 2000; Husing et al., 2003; Hirschmann et al., 2005) ή σε άλλες βιομηχανίες (καλλυντικών, χρωμάτων, τροφίμων, καπνού κ.α.), για την παραγωγή πληθώρας προϊόντων αλλά χρησιμοποιούνταν και ως πρώτη ύλη για την παραγωγή χημικών (Wang et al.,

2001; Johnson & Tacconi, 2007; Pagliaro et al., 2007). Μάλιστα οι παραγόμενες ποσότητες ήταν αρκετά περιορισμένες, όπως φανερώνουν ερευνητικές εργασίες που αποσκοπούσαν στη παραγωγή γλυκερόλης μέσω βιολογικών ή χημικών διεργασιών (Wang et al., 2001). Την τελευταία όμως δεκαπενταετία η κατάσταση έχει αντιστραφεί δραματικά. Παρά το γεγονός ότι η δραστηριότητα παραγωγής σαπωνοποιίας περιορίστηκε δραστικά, προς όφελος αυτής των βιομηχανιών απορρυπαντικών, η γλυκερόλη θεωρείται πλέον ένα φτηνό, συχνά μηδενικού κόστους υπόστρωμα, λόγω της εφαρμογής σε μεγάλη κλίμακα παραγωγής μεθυλεστέρων μεγάλης αλειφατικής αλυσίδας (βιοντήζελ) από φυτικά έλαια, διεργασία που οδηγεί στην παράπλευρη παραγωγή μεγάλων ποσοτήτων γλυκερόλης.

Η μείωση των αποθεμάτων των συμβατικών καυσίμων, που έχει ως συνέπεια την αύξηση των τιμών τους στις διεθνείς αγορές και ρύπανση του περιβάλλοντος που συνοδεύει τη χρήση τους, καθιστά επιτακτική την παραγωγή των βιο-καυσίμων σε μεγάλη κλίμακα όπως άλλωστε έχει επιβληθεί και από την Ευρωπαϊκή οδηγία EU 2003/30/EC που προέβλεπε ότι μέχρι το 2010 το 5,75% των καυσίμων θα έπρεπε να προέρχεται από βιο-καύσιμα.

Το βιοντήζελ παράγεται μέσω μετεστεροποίησης λιπαρών υλών (φυτικής ή ζωικής προέλευσης) με μεθανόλη ή αιθανόλη σε αλκαλικό περιβάλλον, με συνηθέστερα χρησιμοποιούμενους καταλύτες το NaOH ή KOH, αντίδραση κατά την οποία παράγεται γλυκερόλη σε ποσοστό 10% επί του παραγόμενου προϊόντος (Εικόνα 1.1.2-1) (Meesters et al., 1996; Papanikolaou et al., 2000, 2002a; González–Pajuelo et al., 2004; Mu et al., 2006; Da Silva et al., 2009).

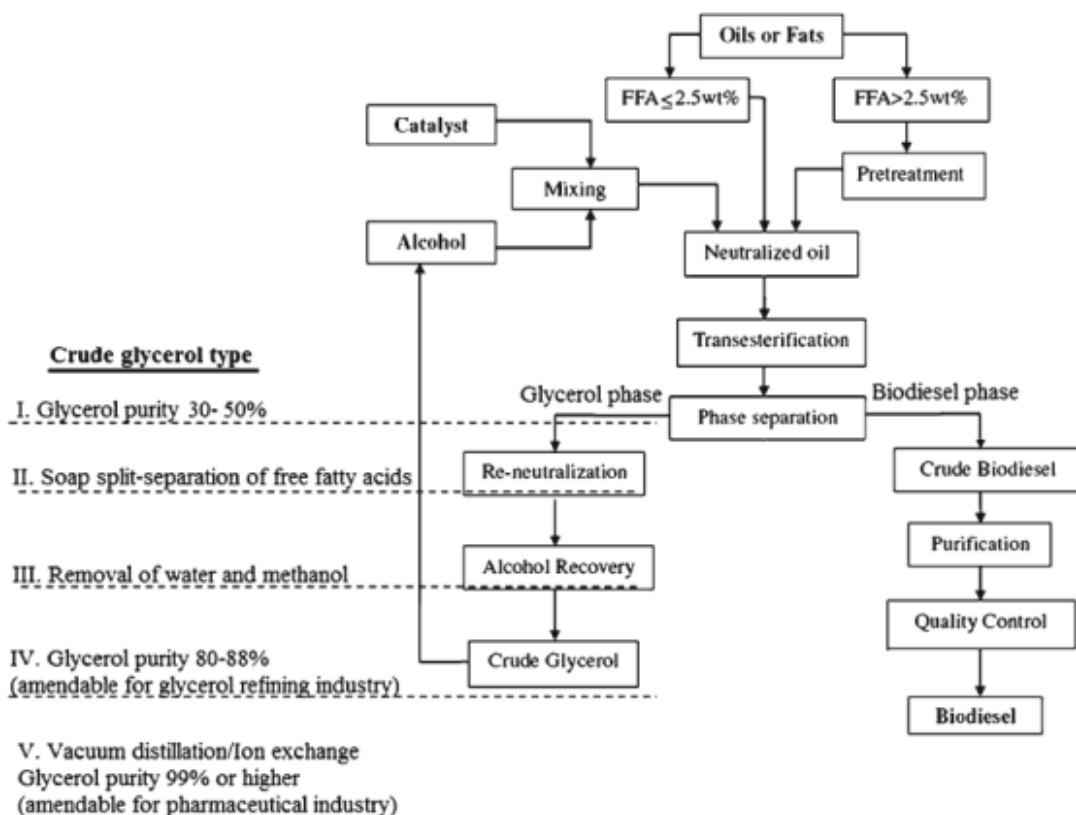


Εικόνα 1.1.2-1: Χημική αντίδραση μετεστεροποίησης της γλυκερόλης με αιθανόλη (Chatzifragkou & Papanikolaou et al., 2012).

Η παραγωγή της γλυκερόλης μπορεί να πραγματοποιηθεί κυρίως σύμφωνα με τις κατωτέρω μεθόδους:

- I. Μέσω μικροβιακών ζυμώσεων από πληθώρα μικροοργανισμών, όπως βακτήρια, ζύμες, μύκητες και άλγη (*Vijaikishore & Karanth 1986; Rehm, 1996; Wang et al., 2001; Taherzadeh et al., 2002*),
- II. Μέσω χημικής σύνθεσης από την βιομηχανία πετροχημικών
- III. Μπορεί να ανακτηθεί ως παραπροϊόν της υδρόλυσης των λιπών και ελαίων κατά την παραγωγή σαπώνων ή λιπαρών οξέων (*Wang et al., 2001; Taherzadeh et al., 2002; Peters, 2007; Behr et al., 2008*).
- IV. Ως παραπροϊόν της παραγωγής του βιολογικού πετρελαίου (βιοντήζελ) (Εικόνα 1.1.2-2) (*Chatzifragkou & Paranikolaou, 2012*).
- V. Συμπληρωματικές ποσότητες υποπροϊόντων - απόνερων τύπου «γλυκερόλης» ενδέχεται να δημιουργηθούν στο άμεσο μέλλον λόγω της πολύ υψηλής ενδοκυτταρικής συσσώρευσης γλυκερόλης (σε ποσότητες έως περίπου 85% κ.β.) σε διάφορα είδη μικροφυκών όπως του γένους *Dunaliella* sp. (*Clomburg & Gonzalez 2012*). Σε μερικές από τις προαναφερθείσες περιπτώσεις, μπορεί να παραχθούν ισοδύναμες ποσότητες γλυκερόλης στο νερό της τάξεως των 7,8 mol/L (ισοδύναμο με περίπου 720 g γλυκερόλης ανά λίτρο νερού) (*Clomburg & Gonzalez 2012*).

Το διάγραμμα ροής της παραγωγής βιοντίζελ μέσω χημικής εστεροποίησης και της συνακόλουθης σύνθεσης γλυκερόλης εμφανίζεται κατωτέρω.



Εικόνα 1.1.2.-2 Παραγωγή βιοντίζελ και παραλαβή γλυκερόλης ως παραπροϊόν. (Chatzifragkou & Papanikolaou, 2012)

Η αλματώδης συνεπώς ανάπτυξη των βιομηχανιών της παράγωγης βιοντίζελ διοχέτευσε στην αγορά τεράστιες ποσότητες γλυκερόλης που παράγοντα ως παραπροϊόν στις ανωτέρω βιομηχανίες (Zeng & Biebl, 2002; Hirschmann et al., 2005). Ήδη από το 2007 μερικοί χιλιάδες τόνοι γλυκερόλης είχαν αποθηκευτεί στην Ευρώπη με αποτέλεσμα τον μηδενισμό της εμπορικής της αξίας. Ως άμεση συνέπεια αρκετές ευρωπαϊκές βιομηχανίες παραγωγής βιοντίζελ αντιμετωπίζουν προβλήματα διάθεσης της γλυκερόλης, η οποία συσσωρεύεται λόγω της πτώσης της τιμής της (Willke & Vorlop, 2004; Dharmadi et al., 2006). Φυσικά οι βιομηχανίες όπου παραγόταν γλυκερόλη μέσω χημικών διεργασιών διέκοψαν τη λειτουργία τους (Deckwer, 1995; Dharmadi et al., 2006), αφού σε πολλές χώρες της δυτικής Ευρώπης (όπως στη Γερμανία) η γλυκερόλη

αντιμετωπίζεται ήδη ως ένα πολύ χαμηλού κόστους υποπροϊόν το οποίο προορίζεται για την παραγωγή βιο-αερίου.

Συμπερασματικά, η αξιοποίηση της γλυκερόλης μέσω κλασικών μεθόδων και διεργασιών είναι σήμερα ανεπαρκής να απορροφήσει τις τεράστιες ποσότητες που παράγονται και επομένως θα πρέπει να ανευρεθούν νέοι τρόποι αξιοποίησής της. Ας σημειωθεί ότι η αξιοποίηση της γλυκερόλης είναι εκτός των άλλων ζωτικής σημασίας για τη βιωσιμότητα των βιομηχανιών, βιοντήζελ δεδομένου ότι η αξιοποίηση της θα μειώσει σημαντικά το κόστος παραγωγής του παραγόμενου βιοντήζελ. (*Yuste & Dorado, 2006*).

1.2 ΖΥΜΕΣ, ΛΙΠΙΔΙΑ ΖΥΜΩΝ & ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΓΛΥΚΕΡΟΛΗΣ

1.2.1 Ζύμες

Οι ζύμες είναι μονοκύτταροι ευκαρυωτικοί μικροοργανισμοί που ανήκουν στο βασίλειο των μυκήτων. Υπολογίζεται ότι μέχρι σήμερα, έχουν αναγνωρισθεί πάνω από 1500 είδη ζυμών που αποτελούν σχεδόν το 1% των μυκήτων (*Barnett, 2000*).

Οι ζύμες, οι οποίες στην πραγματικότητα είναι μύκητες των οποίων το μυκήλιο περιορίζεται στο ένα κύτταρο, είναι μικροοργανισμοί που αναπτύσσονται συνήθως σε συνθήκες αυξημένης υγρασίας και αποτελούν αντικείμενο εντατικής έρευνας σε παγκόσμιο επίπεδο ως μια πολλά υποσχόμενη πηγή βιοδραστικών ουσιών, βιοκαυσίμων, οργανικών οξέων, τροφίμων, κλπ (*Copetti 2019; Sun et al., 2019; Papanikolaou & Aggelis 2019*). Στο Βασίλειο των μυκήτων απαριθμούνται 1,0-1,5 εκατομμύρια διαφορετικά είδη, εκ των οποίων μόνο οι 98.000 έχουν μελετηθεί. Επίσης, από τις 33.500 βιοδραστικές ουσίες που παράγονται από μικροοργανισμούς, περίπου οι 15.600 προέρχονται από τους μύκητες. Από την άλλη πλευρά, ο αριθμός των ζυμών (ζυμομυκήτων) που έχουν αναγνωρισθεί, ως έχει δημοσιευτεί μέχρι σήμερα, ανέρχεται περίπου στα 1.500 είδη αυτών,

με πάρα πολλά είδη να παραμένουν ακόμη άγνωστα. Οι ζυμομύκητες είναι μονοκύτταροι οργανισμοί οι οποίοι εξελίχθηκαν από πολυκύτταρους μύκητες, με κάποια είδη να μπορούν να αναπτύξουν πολυκυτταρικές μορφές με την όψη ίνας, αποτελούμενες από συνδεδεμένα κύτταρα, γνωστά ως ψευδοϋφές. Το μέγεθος των ζυμομυκήτων είναι ποικίλο και εξαρτάται από το είδος και το περιβάλλον. Συνήθως έχουν διάμετρο 3-4 μm, αν και κάποια είδη φτάνουν τα 40 μm. Οι περισσότεροι ζυμομύκητες αναπαράγονται ασεξουαλικά με μίτωση, αν και πολλοί μπορούν με ασύμμετρο διαχωρισμό γνωστό και ως εκβλάστηση (*Barnett, 1976*).

Πολλά στελέχη μυκήτων αλλά και αρκετά στελέχη ζυμών έχουν μελετηθεί ως προς την παραγωγή σημαντικών βιοδραστικών ενώσεων οι οποίες προσδίδουν σημαντικές επιδράσεις στην υγεία του καταναλωτή όπως αντικαρκινική, αντιμικροβιακή και αντιυπερτασική δράση, ενίσχυση του ανοσοποιητικού συστήματος, υψηλή περιεκτικότητα σε αντιοξειδωτικές ουσίες, και κατά συνέπεια εντάσσονται στην κατηγορία των «υπερτροφών» (superfoods) (*Li et al., 2018*). Επιπρόσθετα, πολλοί τέτοιοι μικροοργανισμοί (ζύμες και μύκητες) αναπτύσσονται και συνεισφέρουν στη γεύση τυριών, αλλαντικών και συναφών προϊόντων και βοηθούν στην προστασία τους ενώ ωριμάζουν (*McAuliffe et al., 2019*). Οι ειρημένοι μικροοργανισμοί είναι γνωστό πως στερούνται χλωροφύλλης και αδυνατούν να συνθέσουν οργανικές ενώσεις αυτοτρόφως. Για την ανάπτυξή τους απορροφούν τις απαραίτητες οργανικές ενώσεις από ζωντανούς ή νεκρούς οργανισμούς και γι' αυτό και θεωρούνται το «βιολογικό εργαστήριο αποδόμησης των οργανικών ουσιών».

Ως αναφέρθηκε, οι ζύμες είναι μύκητες που έχουν έντονη τάση να υπάρχουν ως διαχωρισμένα κύτταρα. Μια εργασία η οποία πραγματοποιήθηκε για την ταυτοποίηση των ζυμών, απαριθμεί 434 είδη, ταξινομημένα σε 41 γένη. Σε γενικές γραμμές, τα γένη διακρίνονται από :

- ✓ την εμφάνισή τους στο μικροσκόπιο
- ✓ τον τρόπο με τον οποίο τα νέα κύτταρα σχηματίστηκαν από τα παλιά
- ✓ το εάν ή όχι έχει παρατηρηθεί σεξουαλική αναπαραγωγή και, εάν ναι, τα χαρακτηριστικά αυτής της αναπαραγωγής.

Πρακτικές εκτιμήσεις μπορεί να κάνουν τέτοια χαρακτηριστικά σημαντικά όταν επιλέγεται μια ζύμη για τις χημικές ικανότητές της (*Barnett, 1976*).

Οι ζύμες χρησιμοποιούνται σε πολλές βιομηχανικές διεργασίες, όπως στην παραγωγή αλκοολούχων ποτών, προϊόντων αρτοποιίας, τροφίμων, ζωοτροφών και σε διάφορα μεταβολικά προϊόντα. Η τελευταία κατηγορία περιλαμβάνει ένζυμα, βιταμίνες, πολυσακχαρίτες, καροτενοειδή, πολυόλες, λιπίδια και πολλές άλλες ενώσεις. Ορισμένες από τις παρούσες και πιθανές χρήσεις των ζυμών στις βιομηχανίες τροφίμων, ποτών και άλλων βιομηχανιών ζύμωσης φαίνονται στον πίνακα 1.1.2-1.

Πίνακας 1.2.1-1: Ζύμες και οι χρήσεις τους σε βιομηχανίες ποτών, τροφίμων και ζυμώσεων.

Application	Yeast
Ale fermentation	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Bread and dough leavening	<i>S. cerevisiae</i> , <i>Saccharomyces exiguus</i> , " <i>Saccharomyces rosei</i> "
D-Arabitol (sweetener)	<i>Candida diddensiae</i> , <i>Debaryomyces sp.</i>
Mannitol	<i>Yarrowia lipolytica</i>
Erythritol	<i>Yarrowia lipolytica</i>
Citric acid	<i>Yarrowia lipolytica</i>
Emulsifier	<i>Candida lipolytica</i>
Ethanol fermentation	<i>S. cerevisiae</i> , <i>Pichia sp.</i>
Fish and poultry feeds	<i>Phaffia rhodozyma</i>
Fodder and single cell protein	<i>Candida utilis</i> , <i>Yarrowia lipolytica</i> , <i>Pichia sp.</i>
Single cell oil	<i>Yarrowia lipolytica</i> , <i>Rhodospiridium sp.</i> , <i>Cryptococcus curvatus</i> , <i>Lipomyces starkeyi</i> ,
Lactose and milk fermentation	<i>Candida pseudotropicalis</i> , <i>Kluyveromyces fragilis</i> , <i>Kluyveromyces lactis</i>
Lager beer fermentation	<i>Saccharomyces carlsbergensis</i>
Mannitol (humectant)	<i>Torulopsis mannitofaciens</i>
Shoyu, Miso	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>

Wine fermentation	<i>S. cerevisiae</i>
Xylitol (sweetener)	<i>Torulopsis Candida</i>
D-Xylose fermentation	<i>Candida shehatae, Pachysolen tannophilus, Pichia stipitis, Pichia segobiensis</i>

(Demain et al., 1998; Papanikolaou & Aggelis 2010; Sarris & Papanikolaou 2016)

1.2.2 Λιπίδια ζυμών

Πολλοί μικροοργανισμοί είναι σε θέση να συσσωρεύσουν λιπίδια κάτω από ειδικές συνθήκες καλλιέργειας. Οι μικροοργανισμοί αυτοί που έχουν την ικανότητα να λιποσυσσωρεύουν καλούνται ελαιογόνοι μικροοργανισμοί. Ως ελαιογόνοι νοούνται μικροοργανισμοί, οι οποίοι όταν αναπτύσσονται σε συγκεκριμένες συνθήκες περιβάλλοντος, μπορούν να συσσωρεύσουν λίπος εντός των κυττάρων τους σε ποσοστά μεγαλύτερα από 20% κατά βάρος της επί της ξηράς ουσίας. Επίσης μερικοί από αυτούς είναι ικανοί να συσσωρεύουν ενδοκυτταρικό λίπος σε ποσοστά έως και 70% κ.β. επί της ξηράς ουσίας (Ratledge, 2002). Τα εν λόγω λιπίδια είναι γνωστά ως μονοκυτταρικά έλαια (SCO-Single Cell Oil), χαρακτηρισμός που προσδιορίζει με σαφήνεια την προέλευσή τους από μικροοργανισμούς.

Τα μικροβιακά λιπίδια μπορεί, στις περισσότερες περιπτώσεις, να μοιάζουν στη σύσταση και δομή με τα φυτικά έλαια. Συνίστανται από τριγλυκερίδια (TAGs), που αποτελούν το κυρίαρχο κλάσμα αυτών, αντιπροσωπεύοντας το 55-80% (w/w) των συνολικών κυτταρικών ελαίων (Papanikolaou et al., 2001; Fakas et al., 2006; Fakas et al., 2007), μαζί με τις ποσότητες των ελευθέρων λιπαρών οξέων και σε μικρότερο βαθμό από στερόλες και άλλα πολικά κλάσματα όπως φωσφολιπίδια, γλυκολιπίδια, κ.α. (Papanikolaou & Aggelis, 2011). Τα μικροβιακά τριγλυκερίδια είναι συνήθως φυτικού τύπου καθώς η θέση sn2 είναι εστεροποιημένη με ακόρεστο λιπαρό οξύ (Ratledge, 1994; Ratledge & Wynn, 2006).

Η ικανότητα παραγωγής SCO των ζυμών έχει συγκριθεί με αυτήν άλλων ελαιογόνων μικροοργανισμών, χρησιμοποιώντας μια ποικιλία υποστρωμάτων χαμηλού κόστους, όπως τα γεωργικά υπολείμματα, τα απόβλητα τροφίμων και τα βιομηχανικά παραπροϊόντα. Το προφίλ των λιπιδίων του παραγόμενου SCO από ζύμες περιλαμβάνει κυρίως TAG και μικρότερες ποσότητες φωσφολιπιδίων, σφιγγολιπιδίων, στερολών και ελεύθερων λιπαρών οξέων (*Ratledge and Hopkins, 2006; Subramaniam et al., 2010*). Σύνοψη αποτελεσμάτων σχετικά με την καλλιέργεια ζυμών σε διάφορες πηγές άνθρακα και την παραγωγή λιπιδίων από αυτές παρουσιάζεται στον κατωτέρω πίνακα (δεδομένα παρουσιαζόμενα από *Paranikolaou & Aggelis 2011*).

Πίνακας 1.2.2-1: Καλλιέργεια ζυμών σε διάφορες πηγές άνθρακα για την παραγωγή λιπιδίων. (Paranikolaou & Aggelis 2011).

Microorganism	Culture mode	Carbon source	X (g/L)	Lipid (% , w/w)
<i>Candida</i> sp. 107	Single-stage continuous	Glucose	18.1	37.3
<i>Cryptococcus curvatus</i>	”	Glucose	13.5	29.0
”	”	Sucrose	16.0	28.0
”	”	Lactose	18.0	31.0
”	”	Xylose	15.0	37.0
<i>Cryptococcus albidus</i>	Shake flasks	Xylose	7.3	33.0
”	”	Glucose	8.2	40.1
”	”	Maltose	8.2	37.7
”	”	Lactose	6.5	26.3
”	”	Glycerol (pure)	1.4	43.8
<i>Rhodospiridium toruloides</i>	”	Glucose	8.0	42.5
”	”	Fructose	7.0	27.0
”	”	Glycerol (pure)	5.81	34.4
”	Batch bioreactor	Glucose	12.5	42.9

”	”	Fructose	8.7	39.8
”	”	Xylose	8.3	42.2
<i>Apiotrichum curvatum</i> ^b	Single-stage continuous	Whey	24.1	37.4
”	”	”	20.8	44.3
”	”	”	21.2	43.4
<i>Cryptococcus curvatus</i>	Batch bioreactor	”	21.6	36.0
”	Continuous-recycling	”	85.0	35.0
<i>Candida curvata</i>	Single-stage continuous	Lactose	20.0	40.0
<i>Apiotrichum curvatum</i>	Batch bioreactor	Glucose	n.r. ^c	35.5
”	Single-stage continuous	”	14.5	45.6
<i>Cryptococcus curvatus</i>	Batch bioreactor	Prickly pear juice	10.9	45.8
”	”	”	11.1	43.2
”	Fed-batch bioreactor	Glycerol (pure)	118.0	25.0
”	Fed-batch air-lift bioreactor	”	91.0	32.0
<i>Yarrowia lipolytica</i>	Single-stage continuous	Glucose	9.2	25.0
”	Single-stage continuous	Glycerol (raw)	8.1	43.0
<i>Rhodospiridium toruloides</i>	Fed-batch bioreactor	Glucose	106.5	68.1
”	Shake flasks	Glucose & sewage sludge	9.4	68.0
<i>Lipomyces starkeyi</i>	”	Glucose & xylose	20.5	61.5
<i>Trichosporon fermentans</i>	”	Glucose	24.1	56.6
”	”	Sucrose	19.5	62.6
”	”	Xylose	17.1	57.8

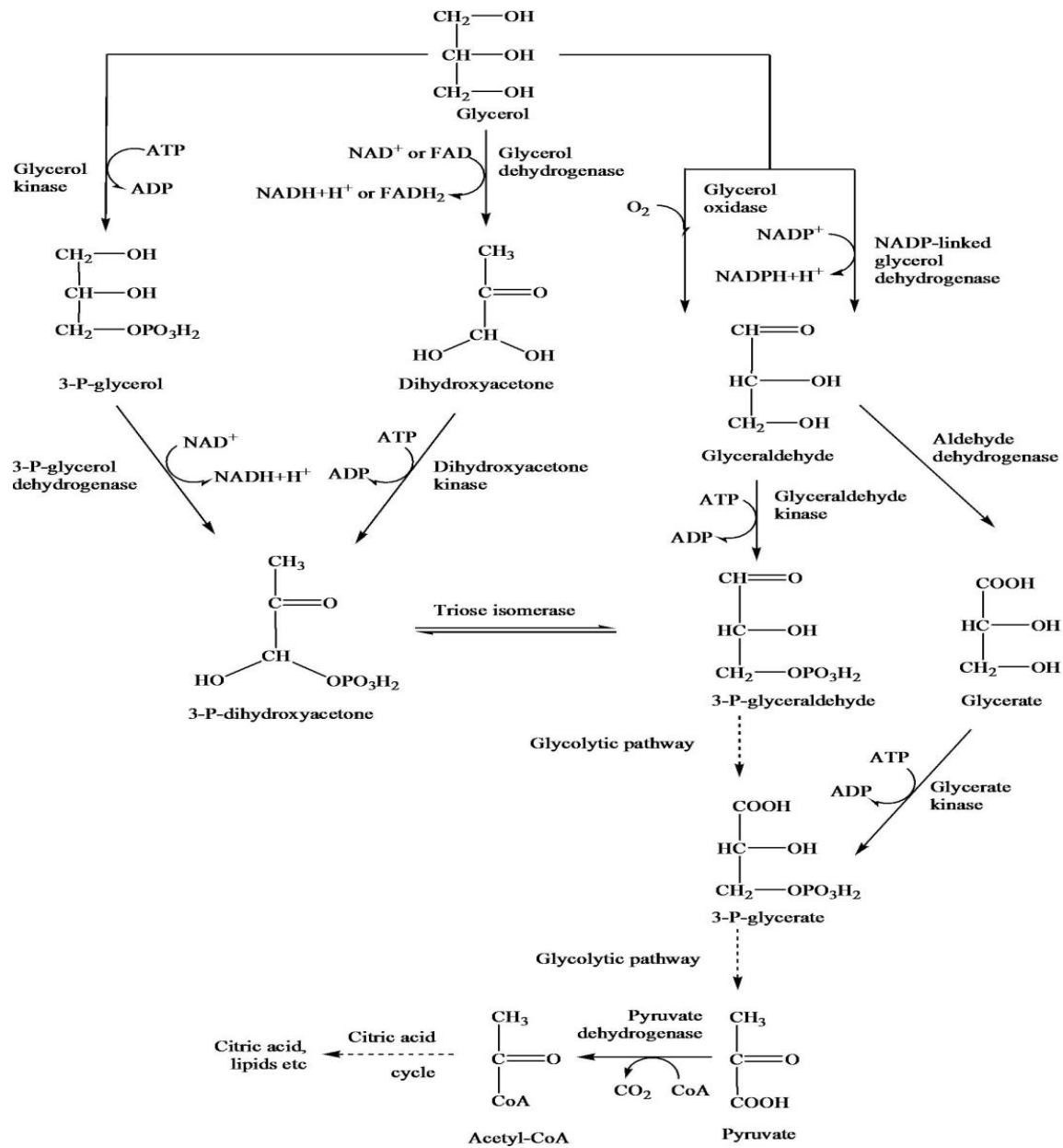
”	”	Lactose	16.9	49.6
”	”	Fructose	21.5	40.7
”	”	Molasses	36.4	35.3
<i>Yarrowia lipolytica</i>	”	Glycerol (raw)	6.5	30.7
<i>Rhodospiridium toruloides</i>	”	Glucose	15.0	62.0
<i>Trichosporon fermentans</i>	”	Rice straw hydrolysate	28.6	40.1
”	”	Mannose	22.7	50.4
”	”	Galactose	23.6	59
”	”	Cellobiose	15.8	65.6
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	Shake-flasks	Starch hydrolysate	21.8	53.0
<i>Cryptococcus curvatus</i>	Fed-batch bioreactor	Glycerol (raw)	32.9	52.9
<i>Yarrowia lipolytica</i>	Fed-batch bioreactor	Glycerol (pure)	4.7	23.1
<i>Rhodospiridium toruloides</i>	Shake-flasks	Glucose	19.9	63.3
”	Fed-batch bioreactor	Jerusalem artichoke extract	39.6	56.5
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	”	Inulin hydrolysate	14.4	49.0
”	Fed-batch bioreactor	Jerusalem artichoke hydrolysate	19.5	52.1
<i>Yarrowia lipolytica</i>	Shake-flasks	Inulin	13.3	48.3

1.2.3 Μεταβολισμός της γλυκερόλης στις ζύμες

Αν και η γλυκερόλη είναι πολικό μόριο μπορεί να διαπεράσει την κυτταροπλασματική μεμβράνη με παθητική διάχυση. Μάλιστα σύμφωνα με παλαιότερες μελέτες σε ορισμένους μικροοργανισμούς όπως στη ζύμη *Saccharomyces cerevisiae*, η παθητική διάχυση θεωρούνταν ως ο μόνος μηχανισμός μέσω του οποίου γίνεται η μεταφορά της γλυκερόλης στο εσωτερικό του κυττάρου (Sutherland et al., 1997). Η παθητική διάχυση είναι ένα φαινόμενο το οποίο λαμβάνει χώρα αυθόρμητα, χωρίς κατανάλωση ενέργειας, βασική μάλιστα προϋπόθεση μεταφοράς κάποιας ουσίας με το μηχανισμό αυτό είναι η προς διακίνηση ουσία να βρίσκεται σε διαφορετικές συγκεντρώσεις εκατέρωθεν της μεμβράνης (Romano, 1986). Η παθητική διάχυση αν και είναι ένας σημαντικός αυτορρυθμιζόμενος μηχανισμός πρόσληψης θρεπτικών συστατικών μπορεί να λειτουργήσει και ως συμπληρωματικός μηχανισμός σε άλλα συστήματα όπως η διευκολυνόμενη διάχυση.

Δύο είναι οι κύριες μεταβολικές οδοί που εμπλέκονται στον αερόβιο καταβολισμό της γλυκερόλης (Εικόνα 1.2.2-1) :

- η οδός της φωσφορυλίωσης, που είναι και η πιο κοινή
- η οξειδωτική οδός



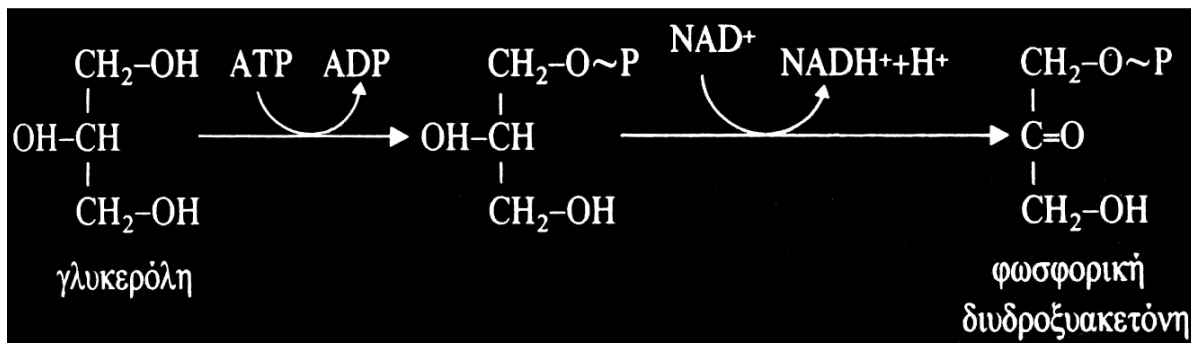
Εικόνα 1.2.3-1: Μεταβολικές οδοί αερόβιου καταβολισμού της γλυκερόλης (Fakas et al., 2009b).

Η οδός της φωσφορυλίωσης απαντάται κυρίως στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς και περιλαμβάνει την φωσφορυλίωση της γλυκερόλης προς 3-P-γλυκερόλη από την κινάση της γλυκερόλης. Η 3-P- γλυκερόλη στη συνέχεια οξειδώνεται προς 3-P-διυδροξυακετόνη, αντίδραση

η οποία καταλύεται από NAD^+ εξαρτώμενη αφυδρογονάση (Courtright, 1975b; Sprague & Cronan, 1977; Ermakova & Morgunov, 1987). Στην οξειδωτική οδό η γλυκερόλη αρχικά οξειδώνεται προς διυδροξυακετόνη, η οποία στη συνέχεια φωσφορυλιώνεται σε 3-P-διυδροξυακετόνη (Rush et al., 1957; Tom et al., 1978). Συνήθως οι μικροοργανισμοί χρησιμοποιούν μια εκ των δύο μεταβολικών οδών, ωστόσο έχει βρεθεί ότι ο μύκητας *Neurospora crassa* χρησιμοποιεί και τις δύο οδούς (Tom et al., 1978). Επίσης ορισμένοι μικροοργανισμοί χρησιμοποιούν μια άλλη οδό κατά την οποία η γλυκερόλη οξειδώνεται με τη μεσολάβηση μιας NADP^+ εξαρτώμενης αφυδρογονάσης προς γλυκεραλδεΐδη (Vasiliadis et al., 1987). Στη συνέχεια η γλυκεραλδεΐδη μπορεί να μετατραπεί είτε σε 3-P-γλυκεραλδεΐδη, είτε σε γλυκερικό οξύ και στη συνέχεια σε 3-P-γλυκερικό οξύ (Viswanath-Reddy et al., 1977).

Κατά μια άλλη μεταβολική οδό που χρησιμοποιείται από τα στελέχη των γενών *Aspergillus*, *Neurospora* και *Penicillium*, η γλυκερόλη οξειδώνεται σε D-γλυκεραλδεΐδη και υπεροξείδιο του υδρογόνου παρουσία μοριακού οξυγόνου με την μεσολάβηση της οξειδάσης της γλυκερόλης (Uwajima et al., 1984; Lin et al., 1996). Χαρακτηριστικό αυτής της οδού είναι η μη εξάρτησή της από NAD^+ ή FAD^+ (Uwajima et al., 1984).

Συμπερασματικά, ανεξάρτητα από την οδό που χρησιμοποιείται η γλυκερόλη μετατρέπεται τελικά σε ενδιάμεσα μόρια της γλυκολιτικής οδού, έπειτα σε πυροσταφυλικό οξύ και τελικά σε ακετυλο-συνένζυμο Α (ακέτυλο CoA).



Εικόνα 1.2.3-2: Μετατροπή γλυκερόλης για είσοδό της στο γλυκολιτικό μονοπάτι (Diamantidis, 1994).

1.3 ΠΑΡΑΓΩΜΕΝΑ ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΑ ΠΡΟΪΟΝΤΑ

1.3.1 Ενδοπολυσακχαρίτες (Intracellular Polysaccharides, IPS)

Ο πολυσακχαρίτης, είναι μια αλυσίδα πολυμερούς που σχηματίζεται από αφυδάτωση αλδόζης ή κετόζης για να σχηματίσουν γλυκοσιδικούς δεσμούς και συνδέονται με γραμμικούς ή διακλαδισμένους γλυκοσιδικούς δεσμούς. Ο πολυσακχαρίτης δεν είναι μόνο ένα δομικό υπόστρωμα και υλικό αποθήκευσης ενέργειας των κυττάρων, αλλά και μία από τις βασικές ουσίες που εμπλέκονται στον μεταβολισμό των ζωντανών οργανισμών. Συμμετέχει στην αναγνώριση και ρύθμιση μεταξύ των κυττάρων, την μεταφορά και μετάδοση κυτταρικών βιολογικών πληροφοριών, την ανοσοαπόκριση και μεταφορά πρωτεϊνών. Επομένως, οι βιολογικές δραστηριότητες των πολυσακχαριτών αποκτούν όλο και περισσότερη σπουδαιότητα. Γενικά, οι φυσικοί πολυσακχαρίτες ταξινομούνται σε ζωικούς πολυσακχαρίτες, φυτικούς πολυσακχαρίτες και μικροβιακούς πολυσακχαρίτες. Σύμφωνα με αναφορές, οι πολυσακχαρίτες αυτοί έχουν καλή βιολογική δραστηριότητα και η εφαρμογή τους αποτελεί ενδιαφέρον. Η βιολογική δραστηριότητα των πολυσακχαριτών δεν επηρεάζεται μόνο από την πηγή, αλλά επίσης σχετίζεται στενά με τη δομή των πολυσακχαριτών. Επίσης έχει διαπιστωθεί ότι οι πολυσακχαρίτες από ζώα, φυτά και μικροοργανισμούς έχουν δραστηριότητα κατά της ακτινοβολίας. (Wang *et al.*, 2020).

Πιο συγκεκριμένα οι μικροβιακοί πολυσακχαρίτες έχουν καλή βιολογική δράση, ικανότητα ζελατινοποίησης και βιοσυμβατότητα. Επιπλέον, ο κύκλος παραγωγής μικροοργανισμών είναι σύντομος, και οι περιορισμοί των εποχών και των περιοχών δεν επηρεάζουν την ανάπτυξη των μικροοργανισμών. Ως εκ τούτου, ο τομέας αυτός παρουσιάζει μια ευρεία προοπτική ανάπτυξης. Τέλος μελέτες έχουν δείξει ότι η παρουσία της β - D -γλυκάνης είναι το κλειδί για την εξαιρετική βιολογική δραστηριότητα μικροβιακών πολυσακχαριτών (Wang *et al.*, 2020).

Σε ένα σχετικά περιορισμένο αριθμό μελετών έχει αξιολογηθεί η παραγωγή ενδοκυτταρικών πολυσακχαριτών, σε διάφορες συνθήκες καλλιέργειας (Πίνακας 1.3.1-1)

Πίνακας 1.3.1-1: Παραγωγή πολυολών με τη χρήση διαφορετικών ζυμών, υποστρωμάτων και τύπων καλλιέργειας.

IPS (g/L)	Y _{IPS/X} (%, w/w)	Substrate	Cultivation type	Yeast strain	Reference
11.0	41.2	Lactose	Shake flasks	<i>Cryptococcus curvatus</i> NRRL Y-1511	<i>Tchakouteu et al.,</i> (2015a)
10.9	41.2	Sucrose	»	»	»
11.1	28.8	Cheese-whey	»	»	»
9.9	27.8	Molasses	»	»	»
6.7	28.9	Crude glycerol	»	<i>Lipomyces starkeyi</i> DSM 70296	<i>Tchakouteu et al., 2015b</i>
n.i.†	≈17.0	Pure glycerol	»	<i>Yarrowia lipolytica</i> H222	<i>Bhutada et al., 2017</i>
»	≈12.0	Glucose	»	»	»
»	≈12.0	»	»	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> WT	»
≈6	≈45	»	»	<i>Yarrowia lipolytica</i> ACA- DC 50109	<i>Dourou et al., 2017</i>
6.6	51.6	Crude glycerol	»	<i>Yarrowia lipolytica</i> FMCC Y75	<i>Filippousi et al., 2019</i>
8.4	62.2	»	»	<i>Cryptococcus curvatus</i> NRRL Y-1511	»
3.7	41.1	»	»	<i>Rhodospodium</i> <i>kratochvilovae</i> FMCC Y71	»
7.1	33.0	»	»	<i>Debaryomyces</i> sp. FMCC Y68	»
13.9	45.5	»	Batch reactor	<i>Debaryomyces</i> sp. FMCC Y69	»
≈4.5	≈45††	Glucose	Shake flasks	<i>Yarrowia lipolytica</i> ACA- DC 50109	<i>Daskalaki et al., 2019</i>
≈3	≈32†††	Glucose	»	»	»
3.8	34.0	Crude glycerol	»	<i>Yarrowia lipolytica</i> ACA- DC 5029	<i>Sarris et al., 2019</i>

2.4	20.8	Glycerol/O.M.W.&	»	»	»
2.6	31.9	»	»	<i>Yarrowia lipolytica</i> ACA-DC 5031	<i>Tziritza et al., 2019</i>
11.0	62.8	»	»	<i>Metschnikowia</i> sp. V.V.-D4	<i>Diamantopoulou et al., 2020</i>

‡: n.i.: Μη αναφερόμενο στη δημοσίευση

‡‡: Πρώιμη φάση, αρχικό στέλεχος

‡‡‡: Πρώιμη φάση, στέλεχος που έχει υποστεί προσαρμοστική εξέλιξη

&: O.M.W. is the olive-mill wastewater

IPS: Ενδοπολυσακχαρίτες, $Y_{IPS/X}$: Ποσοστό πολυσακχαριτών επί ξηράς ουσίας.

1.3.2 Πολυόλες

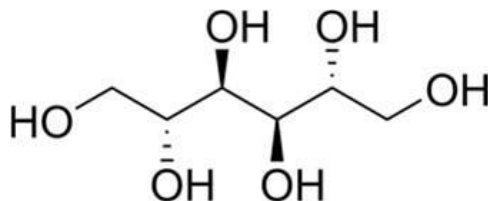
Οι πολυόλες είναι αλκοόλες που περιέχουν πολλαπλές υδροξυλομάδες, δηλαδή πολυαλκοόλες, όπως για παράδειγμα η μαννιτόλη ($C_6H_{14}O_6$), η ερυθριτόλη ($C_4H_{10}O_4$) και η αραβιτόλη ($C_5H_{12}O_5$). Ουσιαστικά είναι αλδόζες ή κετόζες, οι οποίες με αναγωγικά μέσα, ανάγονται στο σημείο της καρβονυλικής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

Η μαννιτόλη είναι μια αλκοόλη με έξι άτομα άνθρακα και προέρχεται από D-μαννόζη (Εικόνα 1.3.2-1). Η μαννιτόλη διανέμεται ευρέως στη φύση, εμπεριέχεται σε ελαιόδεντρα, πλατάνια, φρούτα και λαχανικά. Επιπλέον, ένας μεγάλος αριθμός μυκήτων και βακτηρίων μπορούν να παράγουν αυτήν την πολυόλη από γλυκόζη, φρουκτόζη, σακχαρόζη και άλλα σάκχαρα. Στην Εικόνα 1.3.2-2 παρουσιάζονται κάποια πιθανά μεταβολικά μονοπάτια παραγωγής και μετατροπής της μαννιτόλης. Ακόμη και σε υψηλές θερμοκρασίες (150–170 °C), η μαννιτόλη δεν αντιδρά με πρωτεΐνες. Όπως και άλλες πολυόλες η μαννιτόλη απελευθερώνει νερό όταν θερμαίνεται με πυκνό

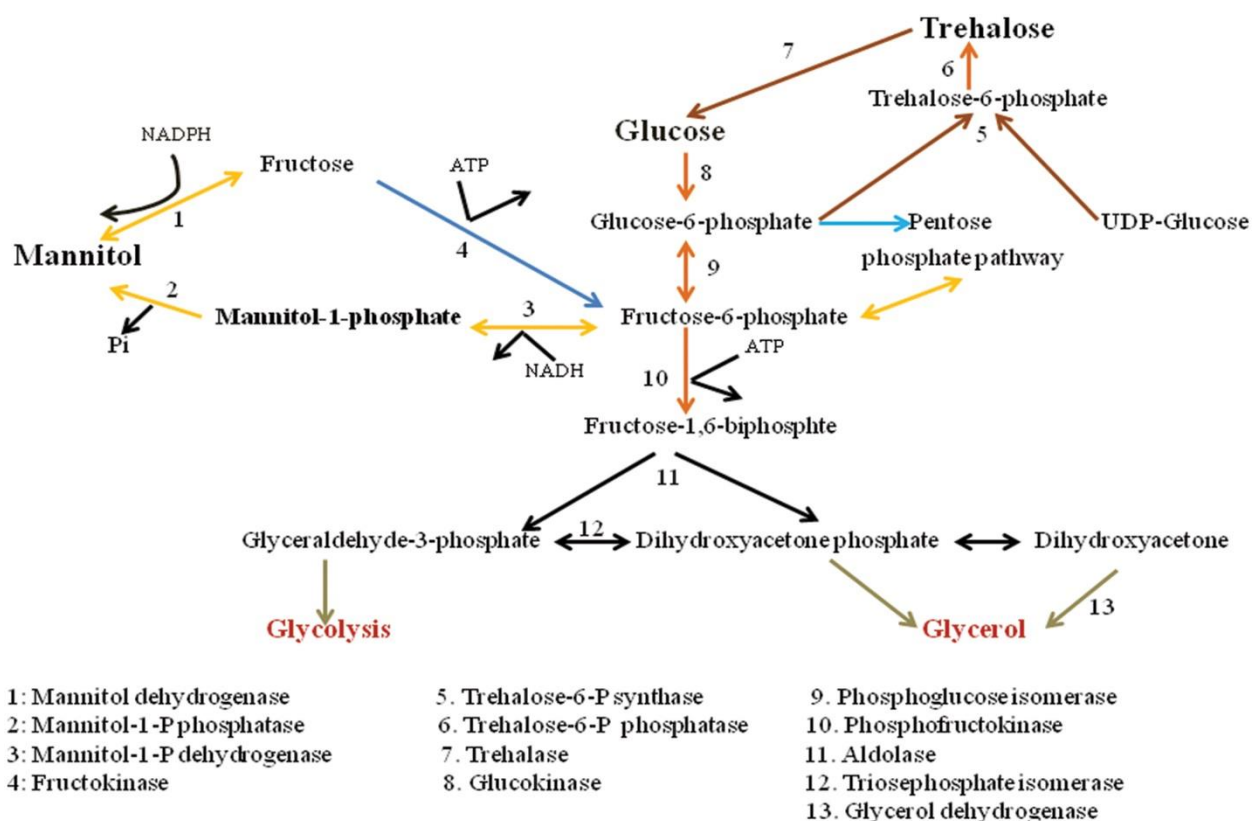
θεικό ή υδροχλωρικό οξύ καθώς και δεν μπορεί να υποστεί ζύμωση από ζύμες. Είναι μια λευκή κρυσταλλική σκόνη που αποδίδει περίπου τη μισή γλυκύτητα από ότι η σακχαρόζη. Μεταξύ των εμπορικά χρησιμοποιούμενων υποκατάστατων ζάχαρης, η μαννιτόλη είναι το λιγότερο διαλυτό στο νερό. (Schiweck et al., 2012).

Στην βιομηχανία τροφίμων η μαννιτόλη χρησιμοποιείται κυρίως για να κονιοποιήσει στην επιφάνεια τσίγλας χωρίς ζάχαρη σε συνδυασμό με την ανάμιξη με άλλες πολυόλες, χρησιμοποιείται συνήθως σε συγκεντρώσεις 5-10%. Επιπλέον, η ποιότητα της σκληρής καραμέλας με βάση τη σορβιτόλη ή τη μαλτιτόλη μπορεί να βελτιωθεί με την προσθήκη μαννιτόλης. Χάρη στη μη υγροσκοπικότητά της, η μαννιτόλη χρησιμοποιείται ως σκόνη και γλυκαντική ουσία σε γλυκά διαβητικών, επειδή οι υγροσκοπικές πολυόλες είναι ακατάλληλες για το σκοπό αυτό.

Η φαρμακευτική βιομηχανία είναι ο μεγαλύτερος καταναλωτής μαννιτόλης. Λόγω της χαμηλής χημικής αντιδραστικότητας και υγροσκοπικότητας, η μαννιτόλη χρησιμοποιείται στην παραγωγή ιατρικών δοσολογιών όπως δισκία, κόκκους και άλλα, τόσο ως οργανικός όσο και ως ανόργανος παράγοντας (Schiweck et al., 2012).



Εικόνα 1.3.2-1: Συντακτικός τύπος μαννιτόλης



Εικόνα 1.3.2-2 : Πιθανά μεταβολικά μονοπάτια παραγωγής και μετατροπής της μαννιτόλης

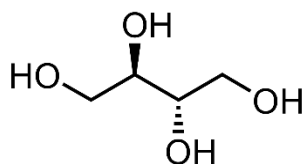
(Meena et al., 2015)

Η **ερυθριτόλη** είναι μια φυσική πολυόλη, που υπάρχει σε διάφορα φρούτα, λαχανικά, και προϊόντα που έχουν υποστεί ζύμωση. Σε σύγκριση με τη σακχαρόζη, παρουσιάζει γλυκύτητα 60-70% ανάλογα με το σύστημα τροφίμων. Ως χύμα γλυκαντικό της νεότερης γενιάς, η ερυθριτόλη λαμβάνει όλο και περισσότερη προσοχή. Σε αντίθεση με άλλες πολυόλες, συνδυάζει την μοναδικότητα του να μην έχει καθόλου θερμίδες και ταυτόχρονα να κατέχει υψηλή πεπτική αποδοχή. Στον Πίνακα 1.3.2-1 παρουσιάζονται κάποια τρόφιμα στα οποία εμφανίζεται φυσικά η ερυθριτόλη στις αντίστοιχες περιεκτικότητες.

Η ερυθριτόλη είχε γίνει στόχος για έρευνα και βιομηχανική εφαρμογή από τις αρχές της δεκαετίας του 1980, και εμπορευματοποιήθηκε κατά τη διάρκεια της δεκαετίας του 1990 στην Ιαπωνική

αγορά. Ήταν η πρώτη πολυόλη που παράχθηκε βιομηχανικά με μια διαδικασία ζύμωσης. (Schiweck *et al.*, 2012).

Η χημική δομή της ερυθριτόλης είναι άκυκλος υδατάνθρακας που αποτελείται από τέσσερα άτομα άνθρακα, όπου το καθένα φέρει μια ομάδα υδροξυλίου (Εικόνα 1.3.2-3). Όπως η ξυλιτόλη, σορβιτόλη, μαννιτόλη και γλυκερόλη ανήκει χημικά στην ομάδα των μονοσακχαριτών. Όσον αφορά τις οργανοληπτικές ιδιότητες, η ερυθριτόλη έχει καθαρή γεύση παρόμοια με τη σακχαρόζη. Ακόμη, η ερυθριτόλη δεν μεταβολίζεται στο ανθρώπινο σώμα, εξαιτίας του μικρού μοριακού της μεγέθους, απορροφάται στο λεπτό έντερο και εκκρίνεται αμετάβλητη αφού περάσει από τα νεφρά. Λόγω των πολλών πλεονεκτημάτων της, υπάρχουν πολυάριθμες εφαρμογές χρήσης της όπως ποτά, επιτραπέζια γλυκαντικά, φαρμακευτικά προϊόντα, βιομηχανία τροφίμων κ.α. (Schiweck *et al.*, 2012).



Εικόνα 1.3.2-3: Συντακτικός τύπος ερυθριτόλης

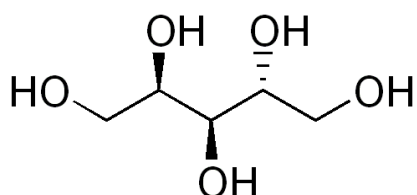
Πίνακας 1.3.2-1: Φυσική εμφάνιση ερυθριτόλης σε διάφορα τρόφιμα.

<i>Τρόφιμα</i>	<i>Περιεκτικότητα σε ερυθριτόλη</i>
Κρασί	130–300 mg/L
Σάκε	1550 mg/L
Σάλτσα σόγιας	910 mg/L
Πεπόνι	22–47 mg/kg
Αχλάδι	0–40 mg/kg
Σταφύλια	0–42 mg/kg

Η **αραβιτόλη** είναι μια σημαντική πολυόλη και χρησιμοποιείται ευρέως στις βιομηχανίες τροφίμων και θεραπευτικών προϊόντων λόγω του ότι έχει γλυκύτητα παρόμοια με τη σακχαρόζη, αλλά χαμηλή περιεκτικότητα σε θερμίδες σε σύγκριση με αυτή και την ξυλιτόλη (μόνο 0,2 kcal/g), καθώς και την ικανότητα να απορροφάται αργά από το ανθρώπινο πεπτικό σύστημα (Wiater, 2015; Loman & Ju, 2015). Μπορεί να είναι ένα πιθανό υποκατάστατο της ξυλιτόλης και άλλων αντι-καρδιογόνων πολυολών όπως η σορβιτόλη και η ερυθριτόλη, οι οποίες μπορεί να επεκτείνουν τη χρήση τους στην στοματική υγιεινή, στη φαρμακευτική βιομηχανία και σε προϊόντα διαβητικών ασθενών (Park et al., 2014; Runnel et al., 2013; Varzakas et al., 2012). Επιπλέον, η αραβιτόλη έχει χρησιμοποιηθεί ως πολλά υποσχόμενη πρώτη ύλη για τη βιοσύνθεση ορισμένων προϊόντων προστιθέμενης αξίας, όπως ξυλιτόλη, αραβινοϊκό οξύ, προπυλένιο, ανοσοκατασταλτικά λιπίδια, σκευάσματα ζιζανιοκτόνων και φάρμακα κατά των παθογόνων μικροοργανισμών (Koganti & Ju, 2013; Yoshikawa et al., 2014; Zhang et al., 2018). Λαμβάνοντας υπόψιν την σημασία της αραβιτόλης, αυτή έχει συμπεριληφθεί στις κορυφαίες 12 χημικές ουσίες που βασίζονται στη βιομάζα από την ομάδα των πολυολών. Στην Εικόνα 1.3.2-4 παρουσιάζεται η ο συντακτικός τύπος της αραβιτόλης.

Με τις ραγδαίες εξελίξεις στα βιολογικά διυλιστήρια καθώς και την διαθεσιμότητα υποστρωμάτων, όπως γλυκόζη, ή αποβλήτων που προέρχονται από διυλιστήρια, όπως γλυκερόλη, πραγματοποιούνται παραγωγές βιομηχανικά πολύτιμων προϊόντων όπως τα συστατικά τροφίμων

και παράλληλα γίνεται αξιοποίηση των φθηνών αυτών υποστρωμάτων αλλά και αποβλήτων. Τις τελευταίες δεκαετίες, η αραβιτόλη έχει βιοσυνθεθεί από διαφορετικές προερχόμενες από πηγές υποστρωμάτων συμπεριλαμβανομένων της γλυκόζης, ξυλόζης, ακατέργαστης γλυκερόλης (Yoshikawa et al., 2014), και ανάμεικτων σακχάρων που λαμβάνονται από υδρολύματα βιομάζας (γλυκόζη, γαλακτόζη, φρουκτόζη, ξυλόζη, αραβινόζη) (Loman et al., 2018). Μέχρι σήμερα, έχει αναφερθεί μεγάλη ποικιλία μικροοργανισμών, κυρίως οσμώφιλων ζυμών για την παραγωγή αραβιτόλης συμπεριλαμβανομένων των ειδών *Candida* και *Pichia* (Kordowska, 2015).



Εικόνα 1.3.2-4: Συντακτικός τύπος αραβιτόλης

Οι ειρημένες πολυόλες παράγονται από διάφορα στελέχη και είδη ζυμών, όταν αυτά καλλιεργούνται σε υποστρώματα τύπου «γλυκερόλης». Η ζύμη *Yarrowia lipolytica* έχει επισταμένως μελετηθεί σχετικά με τις δυνατότητες της στην παραγωγή των προϊόντων αυτών. Ενδεικτικές τιμές αναφέρονται στον πιο κάτω πίνακα:

Πίνακας 1.3.2-2: Παραγωγή πολυολών από διαφορετικά στελέχη της ζύμης *Yarrowia lipolytica* σε διαφορετικού τύπου καλλιέργειες.

Strain	<i>Ery</i> (g/L)	<i>Ml</i> (g/L)	<i>Ara</i> (g/L)	<i>Pol</i> (g/L)	$Y_{Pol/S}$ (g/g)	Cultivation type	Reference
Wratislavia 1.31#†	132.0	23.0	-	155.0	0.52	Fed-batch reactor	Rymowicz et al., 2009
Wratislavia K1†	170.0	12.0	-	182.0	0.60	Fed-batch reactor	Rymowicz et al., 2009
A-15&	71.0	8.0	1.8	80.8	0.50	Batch reactor	Tomaszewska et al., 2012

A UV [†] 1†	63.0	8.8	9.2	81.0	0.50	Batch reactor	Tomaszewska et al., 2012
Wratislavia K1†	80.0	2.6	0.3	82.9	0.51	Batch reactor	Tomaszewska et al., 2012
Wratislavia K1†	135.5	3.9	0.1	139.5	0.58	Repeated-batch reactor	Mirończuk et al., 2014
Wratislavia 1.31†	26.2	16.8	3.7	46.7	0.36	Batch reactor	Tomaszewska et al., 2014
Wratislavia K1†	40.7	15.1	2.9	58.7	0.40	Batch reactor	Tomaszewska et al., 2014
MK1†	79.5	2.7	0.4	82.6	0.55	Batch reactor	Mirończuk et al., 2015
MK1†	177.3	2.2	-	179.5	0.67	Repeated-batch reactor	Mirończuk et al., 2015
FCY 218†	80.6	n.i.	n.i.	80.6	0.53	Batch reactor	Carly et al., 2017
HA 1251 ^{&¶}	≈4	≈32	≈5	≈41	n.i.	Batch reactor	Egermeier et al., 2017
ACA YC 5030 ^{&¶}	35.5	32.1	-	67.6	0.49	Batch flasks	Papanikolaou et al., 2017
AIB ^{&}	56.7	12.6	6.0	75.3	0.49	Fed-batch reactor	Rakicka et al., 2017
AIB pADUTGUT1†	82.2	11.0	7.5	100.7	0.67	Fed-batch reactor	Rakicka et al., 2017
ACA-DC 5029 ^{&¶}	15.6	10.5	3.4	29.5	0.39	Batch flasks	Sarris et al., 2019

†: Mutant or genetically modified *Yarrowia lipolytica*; &: Wild-type *Yarrowia lipolytica*; ¶: Fermentations in which the medium pH remained between 4.5-6.0 throughout the culture (in all other trials, medium pH was ≈3.0-3.5)

1.3.3 Λιπίδια

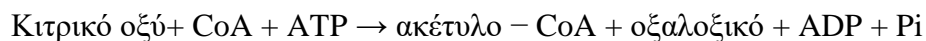
Όλοι οι ζωντανοί οργανισμοί πρέπει να μπορούν να συνθέσουν μια ελάχιστη ποσότητα λιπιδίων για τις μεμβράνες τους και άλλους δομικούς και λειτουργικούς ρόλους, μόνο έναν σχετικά μικρό ποσοστό μικροοργανισμών είναι σε θέση να συσσωρεύουν λιπίδια παραπάνω περίπου 20% της μάζας των κυττάρων τους όπου λειτουργεί ως αποθηκευτικό υλικό. Τα βακτήρια, γενικά, δεν παράγουν τριακυλογλυκερόλες αλλά αντ' αυτού παράγουν πολυ-β-υδροξυ-βουτυρικά και -αλκανοϊκά ως πολυμερή αποθήκευσης. Συνεπώς, η συσσώρευση λιπών απαντάται μόνο σε

μερικές ζύμες και μύκητες μαζί με έναν αριθμό φυκών. Αυτοί οι μικροοργανισμοί ονομάζονται ελαιογόνοι. Το μονοπάτι βιοσύνθεσης των λιπαρών οξέων στους περισσότερους ελαιογόνους μικροοργανισμούς είναι οι ίδιο με εκείνο των μη ελαιογόνων. Υπάρχει, ωστόσο, μια κρίσιμη διαφορά μεταξύ αυτών. (Retledge, 2002; Retledge & Wynn, 2006).

Προκειμένου να επιτευχθεί συσσώρευση λιπιδίων σε έναν μικροοργανισμό, πρέπει αυτός να αναπτυχθεί σε ένα μέσο με περίσσεια υποστρώματος άνθρακα και περιοριστική ποσότητα αζώτου. Έτσι, όταν ο οργανισμός αναπτύσσεται, εξαντλεί γρήγορα την παροχή αζώτου, αλλά συνεχίζει να αφομοιώνει την πηγή άνθρακα. Στη συνέχεια στρέφεται απευθείας σε σύνθεση λιπιδίων με την συγκέντρωση των τριακυλογλυκερολών που έχουν προκύψει εντός του κυττάρου. Η συσσώρευση του ενδοκυτταρικού λίπους μπορεί φτάσει πάνω από το 70% της κυτταρικής βιομάζας, αλλά όχι σε κάθε ελαιογόνο μικροοργανισμό. Οι μη ελαιογόνοι μικροοργανισμοί, εξ ορισμού, δεν συσσωρεύουν λιπίδια. Όταν τοποθετούνται στο ίδιο μέσο ανάπτυξης με περιορισμό αζώτου, οι μη ελαιογόνοι μικροοργανισμοί τείνουν είτε να σταματήσουν τον περαιτέρω πολλαπλασιασμό των κυττάρων τους, είτε εάν συνεχίζουν να αφομοιώνουν το διαθέσιμο υπόστρωμα υδατανθράκων, τότε αυτό μετατρέπεται σε διάφορους πολυσακχαρίτες, συμπεριλαμβανομένου του γλυκογόνου. Συσσώρευση ενδοκυτταρικού λίπους, πέρα από ένα πολύ μικρό επίπεδο (συνήθως λιγότερο από 10% της βιομάζας), δεν συμβαίνει. Η παραγωγή λιπιδίων συνδέεται με :

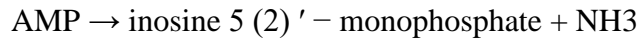
- ✧ την ικανότητα συνεχούς παραγωγής ακετύλο-CoA απευθείας στο κυτοσόλιο του κυττάρου ως απαραίτητο πρόδρομο μόριο για τη συνθετάση λιπαρών οξέων (FAS)
- ✧ την ικανότητα παραγωγής επαρκούς τροφοδοσίας NADPH ως απαραίτητο αναγωγικό που χρησιμοποιείται στη βιοσύνθεση λιπαρών οξέων.

Ο σχηματισμός ακετύλο-CoA σε ελαιογόνους μικροοργανισμούς έχει αποδοθεί στην παρουσία ATP κιτρική λύασης που δεν φαίνεται να εμφανίζεται στην πλειοψηφία των μη ελαιογόνων μικροοργανισμών :



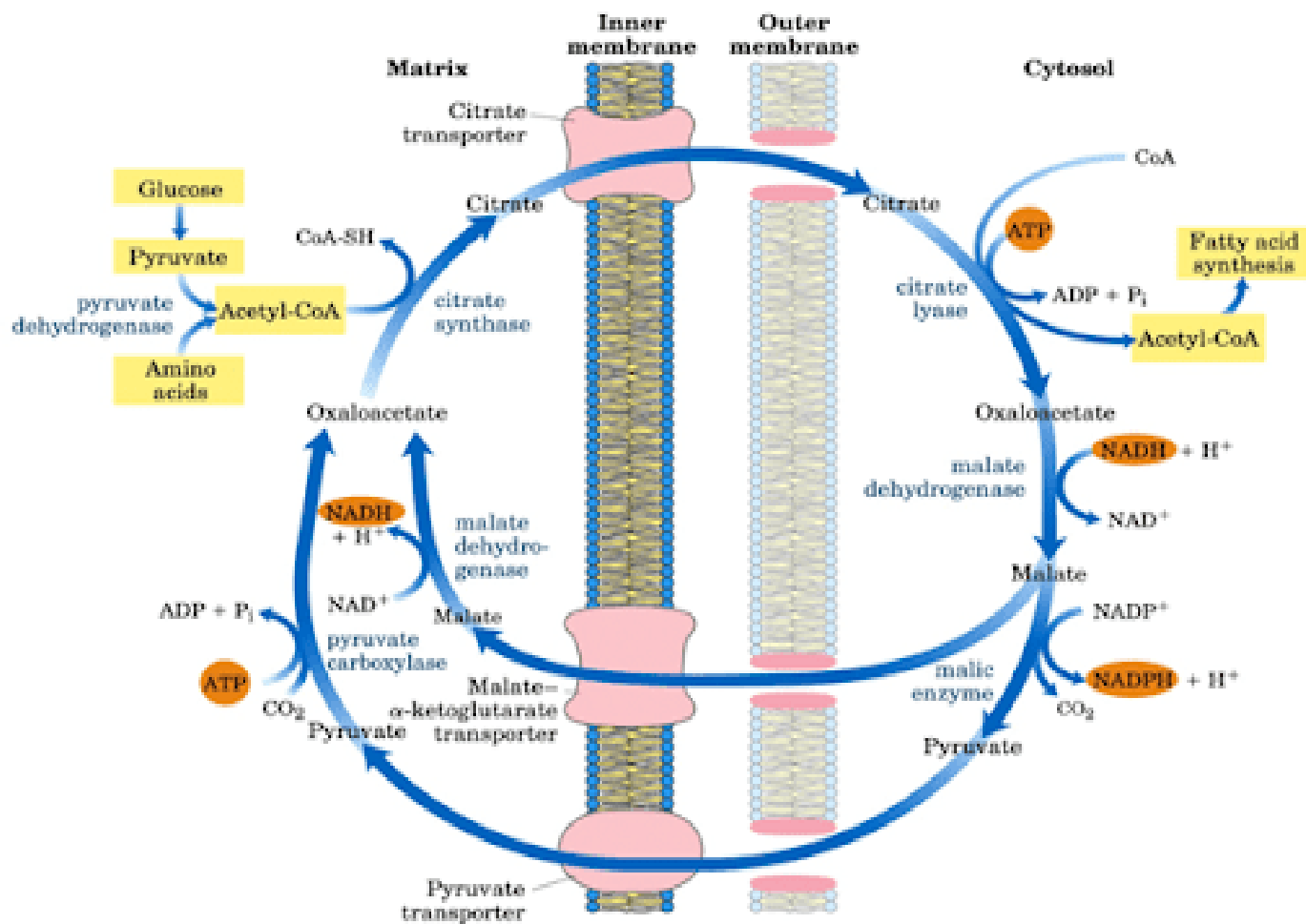
Για να λειτουργεί αποτελεσματικά, το υπόστρωμά του ενζύμου, δηλαδή το κιτρικό οξύ, πρέπει από μόνο του να διατίθεται εύκολα και επιπλέον να είναι διαθέσιμο στο κυτοσόλιο του κυττάρου όπου πραγματοποιείται η σύνθεση λιπαρών οξέων. Το κιτρικό οξύ συντίθεται ως μέρος του κύκλου τρικαρβοξυλικών οξέων (TCA) εντός του μιτοχονδρίου του κύτταρο. Το χαρακτηριστικό

που υπάρχει μόνο στους ελαιογόνους μικροοργανισμούς και επιτρέπει την συσσώρευση κιτρικού οξέος, είναι ότι η δραστηριότητα της ισοκιτρικής αφυδρογονάσης ως συστατικό του κύκλου TCA η οποία εξαρτάται από την παρουσία AMP. Η συγκέντρωση του ίδιου του AMP ρυθμίζεται από τη δραστηριότητα της AMP απαμινάσης

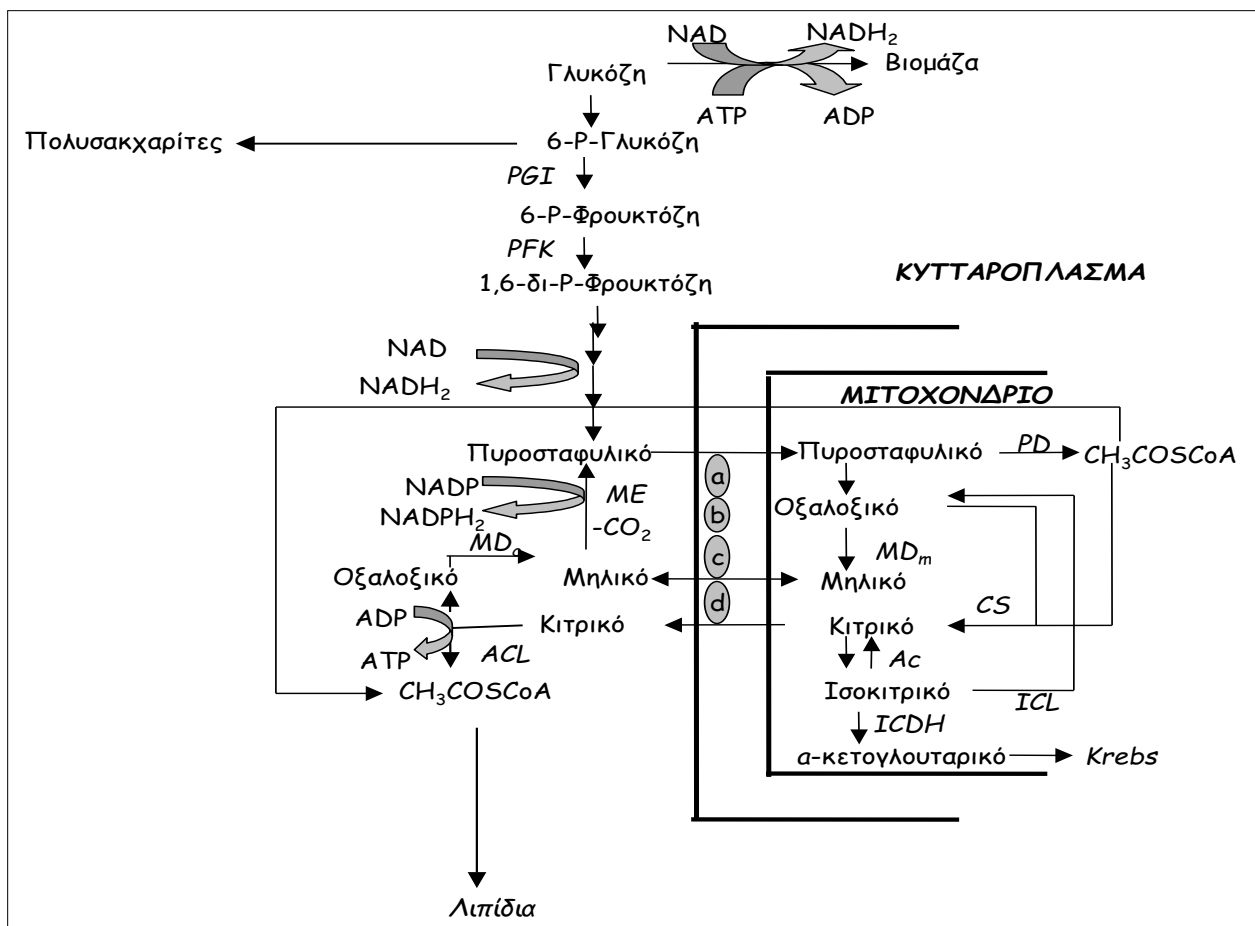


Ο περιορισμός του αζώτου στην καλλιέργεια ενός ελαιογόνου μικροοργανισμού προκαλεί μια σειρά αντιδράσεων που οδηγούν στον σχηματισμό του ακέτυλο-CoA (Εικόνα 1.3.3-1, Εικόνα 1.3.3-2):

- ✧ Κατά την έναρξη της εξάντλησης του αζώτου, εμφανίζονται ελαιώδη κύτταρα με αυξημένη δραστηριότητα της AMP απαμινάσης, η οποία είναι πέντε φορές μεγαλύτερη από ό,τι στα κύτταρα πριν από τον περιορισμό του N.
- ✧ Η αυξημένη δραστηριότητα της AMP απαμινάσης μειώνει την περιεκτικότητα AMP στο κύτταρο, συμπεριλαμβανομένου του περιεχομένου του στο μιτοχόνδριο.
- ✧ Το μειωμένο περιεχόμενο σε AMP στο μιτοχόνδριο σταματά την δράση της αφυδρογονάσης του ισοκιτρικού στα κύτταρα, η οποία εξαρτάται αυστηρά από την ποσότητα σε AMP
- ✧ Ως αποτέλεσμα, το ισοκιτρικό δεν μπορεί να μεταβολιστεί. Έτσι συσσωρεύεται και στη συνέχεια ισορροπείται εύκολα με κιτρικό οξύ με τη βοήθεια του ενζύμου ακονιτάση.
- ✧ Επομένως, το κιτρικό συσσωρεύεται στο μιτοχόνδριο.
- ✧ Υπάρχει ένα αποτελεσματικό σύστημα εκροής κιτρικών στη μιτοχονδριακή μεμβράνη για την εξαγωγή κιτρικού σε αντάλλαγμα με μηλικό.
- ✧ Το κιτρικό εισέρχεται στο κυτοσόλιο και διασπάται για να δώσει ακέτυλο-CoA και οξαλοξικό.
- ✧ Το ακέτυλο-CoA χρησιμοποιείται για τη βιοσύνθεση λιπαρών οξέων.
- ✧ Το οξαλοξικό μετατρέπεται μέσω αφυδρογονάσης μηλικού σε μηλικό, το οποίο στη συνέχεια χρησιμοποιείται ως αντίθετο στο σύστημα εκροής κιτρικών (Retledge, 2002; Retledge & Wynn, 2006).



Εικόνα 1.3.3-1: Απεικόνιση του κύκλου κιτρικού-μηλικού στην παροχή ακέτυλο-CoA και NADPH, για λιπογένεση στους ελαιογόνους μικροοργανισμούς. (Wikipedia)



Εικόνα 1.3.3-2: Σύνοψη βιοσύνθεσης μεταβολικών προϊόντων στα μυκηλία. Η ροή άνθρακα με το ισομερές πάχος των βελών φαίνεται ισοσκελισμένη τόσο προς τα ενδοκυτταρικά λιπίδια, όσο και προς τα ενδοκυτταρικά πολυσακχαρίδια, όσο και προς τον κύκλο του Krebs. Ένζυμα: ACL: ATP-κιτρική λυάση, PGI: Ισομεράση της φωσφορογλυκόζης, PFK: Φωσφοροφρουκτοκινάση, ICDH: Ισοκιτρική αφυδρογονάση, PD: Πυροσταφυλική αποκαρβοξυλάση, CS: Κιτρική συνθάση, ICL: Ισοκιτρική λυάση (Zhong & Tang, 2004; Papanikolaou & Aggelis, 2011α)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 ΒΙΟΛΟΓΙΚΟ ΥΛΙΚΟ

Στη παρούσα ερευνητική μελέτη χρησιμοποιήθηκαν 10 στελέχη ζυμών τα οποία παρατίθενται στον πίνακα 2.1.

Η διατήρηση των στελεχών γινόταν σε κεκλιμένους σωλήνες πληρωμένους με θρεπτικό μέσο YPDA (Yeast Peptone Dextrose Agar) στους 4°C. Το θρεπτικό υλικό περιείχε 10 g/L γλυκόζη, 10 g/L yeast extract, 10 g/L πεπτόνη και 20 g/L άγαρ. Προκειμένου να διατηρηθεί η ζωτικότητα τους πραγματοποιούνταν ανανεώσεις σε τακτά χρονικά διαστήματα, ενώ πριν από κάθε εμβολιασμό του θρεπτικού μέσου τα στελέχη ανανεώνονταν προκειμένου να είναι ηλικίας περίπου 3 ημερών. Τα στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν (γένους *Candida*, *Pichia* και *Geotrichum*) χορηγήθηκαν από το εργαστήριο Γαλακτοκομίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, καθώς και κάποια (τα στελέχη του γένους *Rhodosporidium*) από τη συλλογή του Agricultural Research Service Culture Collection (ARS, NRRL, <https://nrml.ncaur.usda.gov/>) τα οποία και χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες για την παραγωγή ενδοκυτταρικού λίπους (Patel et al., 2020, Saini et al., 2020). Στο πίνακα 2.1-1 παρουσιάζονται όλα τα στελέχη ζυμών που χρησιμοποιήθηκαν.

Πίνακας 2.1-1: Στελέχη ζυμών που χρησιμοποιήθηκαν για την παρούσα μελέτη.

Γένος	Είδος	Στέλεχος	Προέλευση
<i>Candida</i>	<i>zeylanoides</i>	5266	Στάκα
		5265	Στάκα
<i>Pichia</i>	<i>fermentans</i>	5257	Τυρί φέτα
		5222	Ελιές Καλαμών
<i>Candida</i>	<i>tartarivorans</i>	5224	
		5292	Γιαούρτι
<i>Candida</i>	<i>incospicua</i>	5293	Ξινόγαλα
		5274	Γιαούρτι
<i>Rhodosporidium</i>	<i>toruloides</i>	6895	Έδαφος
		1588	

2.2 ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ

2.2.1 Παρασκευή προκαλλιέργειας

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

2.2.2 Παρασκευή κυρίως καλλιέργειας

Το θρεπτικό μέσο της κυρίως καλλιέργειας περιείχε ως μοναδική πηγή άνθρακα και ενέργειας ακάθαρτη βιομηχανική γλυκερόλη σε συγκέντρωση 60 g/L. Η βιομηχανική γλυκερόλη περιείχε 2% μονογλυκερίδια, διγλυκερίδια και ελεύθερα λιπαρά οξέα, 3% NaCl, 1% μεθανόλη, 3% νερό και ήταν καθαρότητας 95%. Όλες οι ζυμώσεις πραγματοποιήθηκαν υπό περιοριστικές σε άζωτο συνθήκες (*Paranikolaou et al., 2001*). Ως πηγές αζώτου χρησιμοποιήθηκαν θειικό αμμώνιο 0,5 g/L και yeast extract σε συγκέντρωση 0,5 g/L. Τέλος, προστέθηκαν τα άλατα που παρουσιάζονται στον πίνακα 2.2 :

Πίνακας 2.2.2-1: Σύσταση μεταλλικών αλάτων (Paranikolaou et al., 2001).

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

*MnSO₄*H₂O: ένυδρο θεικό μαγγάνιο, MgSO₄*7H₂O: ένυδρο θεικό μαγνήσιο, ZnSO₄*7H₂O: ένυδρος θειικός ψευδάργυρος, CaCl₂*2H₂O: ένυδρο 2-χλωριούχο ασβέστιο, FeCl₃*6H₂O: ένυδρος 3-χλωριούχος σίδηρος, KH₂PO₄ :άνυδρο φωσφορικό κάλιο, Na₂HPO₄ :άνυδρο φωσφορικό δι-νάτριο.*

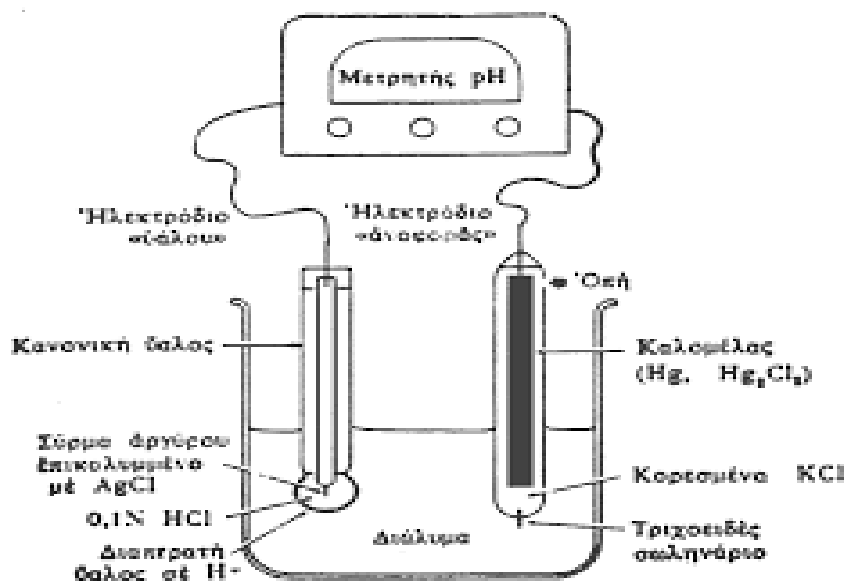
Όλες οι καλλιέργειες πραγματοποιήθηκαν με περιριστικό στο άζωτο παράγοντα. Αφού παρασκευάστηκαν οι κυρίως καλλιέργειες και προστέθηκαν όλα τα συστατικά και το απιονισμένο νερό, μοιράστηκαν σε κωνικές φιάλες των 250 ml, ακολούθησε αποστείρωση και στη συνέχεια οι κωνικές εμβολιάζονταν με 1 ml από τις προκαλλιέργειες υπό ασηπτικές συνθήκες. Τέλος, οι κωνικές τοποθετούνται σε ανακινούμενο επωαστικό θάλαμο, για επώαση σε σταθερές συνθήκες ανάδευσης 180 ± 5 rpm και θερμοκρασία στους 28 ± 1 °C.

Το pH ελεγχόταν σε τακτά χρονικά διαστήματα (24 h) και πραγματοποιούνταν διόρθωση εάν αυτό ήταν απαραίτητο, υπό ασηπτικές συνθήκες, για την διατήρησή του σε τιμή $6 \pm 0,2$.

2.3 ΧΗΜΙΚΕΣ ΑΝΑΛΥΣΕΙΣ

2.3.1 Προσδιορισμός του pH στο μέσο ανάπτυξης των μικροοργανισμών

Η μέτρηση της τιμής του pH της καλλιέργειας γινόταν με πεχάμετρο (pH/mV meter HI 8014-Hanna Instruments) (Εικόνα 2.3.1-1). Εφόσον η μετρηθείσα τιμή ήταν εντός του επιθυμητού εύρους τιμών δεν γινόταν καμία ενέργεια, ενώ σε αντίθετη περίπτωση διορθωνόταν η τιμή του pH, στις υπόλοιπες κωνικές φιάλες καλλιέργειας, με προσθήκη κατάλληλης ποσότητας αποστειρωμένου διαλύματος υδροχλωρίου (HCL) ή καυστικού νατρίου (NaOH) ανάλογα, συγκέντρωσης 5M (Sarris *et al.*, 2011).



Εικόνα 2.3.1-1 Πιθανή διάταξη πεχάμετρου για μέτρηση pH (Wikipedia)

2.3.2 Προσδιορισμός βιομάζας

Έπειτα από παραλαβή του υγρού ζύμωσης σε falcon tube φυγοκεντρείται σε τύπου Universal 320R Hettich Zentrifugen για 10 λεπτά, στις 9000 στροφές και στους 4°C, προκειμένου να διαχωριστεί η βιομάζα από το υπερκείμενο υγρό. Μετά από έκπλυση με απιονισμένο νερό, ακολούθησε δεύτερη φυγοκέντρωση στις ίδιες συνθήκες. Στη συνέχεια, η νωπή βιομάζα μεταφέρεται σε προζυγισμένα φιαλίδια McCartney, τα οποία τοποθετούνται σε φούρνο τύπου Gallenkamp oven BS OV-160 προς ξήρανση στους 70°C για 26±2 ώρες. Τέλος, μετά την ξήρανση, το φιαλίδιο ζυγίζεται σε αναλυτικό ζυγό τύπου KERN EW 420-3NM και από την διαφορά του βάρους υπολογιζόταν η παραγόμενη βιομάζα εκφραζόμενη σε g/L.

2.3.3 Προσδιορισμός ενδοπολυσακχαριτών (IPS)

Σε όλες τις ζυμώσεις που πραγματοποιήθηκαν, μετρηθήκαν ποσοτικά οι παραγόμενοι ενδοπολυσακχαρίτες, με μία διαδικασία βασισμένη σε ένα τροποποιημένο πρωτόκολλο μεθόδου, σύμφωνα με τους Liang et al., (2009).

Αρχικά, παραλαμβάνονται $0.05 \pm 0,001\text{g}$ ξηρής βιομάζας, τα οποία τοποθετούνται σε δοκιμαστικό σωλήνα. Γίνεται προσθήκη 10 ml υδροχλωρικού οξέος συγκέντρωσης (HCl, 2M) και ακολουθεί υδρόλυση του διαλύματος στους 100°C για 30 λεπτά. Στη συνέχεια, προστίθενται 10 ml υδροξειδίου του νατρίου (NaOH 2M), προκειμένου να γίνει εξουδετέρωση και ακολουθεί διήθηση με διπλό διηθητικό χαρτί με στόχο να απομακρυνθεί η βιομάζα και το διήθημα να καταστεί διαυγές.

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

2.3.3.1 Ποσοτικός προσδιορισμός

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

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

2.3.4 Προσδιορισμός γλυκερόλης και πολυολών

Ο προσδιορισμός της γλυκερόλης και των πολυολών (αραβιτόλης, μαννιτόλης και ερυθριτόλης) έγινε με την χρήση της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC) και η εύρεση των αγνώστων συγκεντρώσεων έγινε με την χρήση των αντίστοιχων καμπύλων αναφοράς των πρότυπων ουσιών.

2.3.5 Ποσοτικός προσδιορισμός ενδοκυτταρικού λίπους

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

- I. Το φιαλίδιο McCartney μέσα στο οποίο βρίσκεται η ξηρή βιομάζα συμπληρώνεται μέχρι επάνω με μίγμα διαλυτών χλωροφορμίου/μεθανόλης σε αναλογία $\text{CHCl}_3 /$

CH₃OH 2:1. (Folch et al., 1957; Papanikolaou et al., 2001). Το φιαλίδιο McCartney φυλάσσεται κλεισμένο αεροστεγώς στο σκοτάδι, προκειμένου να αποφευχθεί η οξείδωση των λιπαρών οξέων του λίπους για πέντε με έξι ημέρες, με στόχο την εκχύλιση του λίπους.

- II. Διήθηση του περιεχόμενου του φιαλιδίου σε προζυγισμένη σφαιρική φιάλη για απομάκρυνση της βιομάζας.
- III. Εξάτμιση υπό κενό του διηθήματος στους 40°C με την βοήθεια περιστροφικού εξατμιστήρα τύπου Flash Evaporator- Rotavapor R-114, έτσι ώστε να απομακρυνθούν οι διαλύτες και να παραμείνει στην σφαιρική φιάλη μόνο το μικροβιακό λίπος.
- IV. Τέλος, η σφαιρική φιάλη ζυγίζεται με την βοήθεια ζυγού ακριβείας και από την διαφορά μάζας υπολογίζεται το παραγόμενο ενδοκυτταρικό λίπος σε g/L.

2.3.5.1 Ανάλυση ενδοκυτταρικού λίπους με την μέθοδο TLC

Για την ανάλυση του παραγόμενου μικροβιακού λίπους χρησιμοποιήθηκε χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC - Thin Layer Chromatography). Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε σε πλάκες Silica Gel TLC χρησιμοποιώντας εξάνιο, διαιθυλαιθέρα και οξικό οξύ (αναλογία 70:28:2, v/v/v) για την κινητή φάση για τα ουδέτερα λιπαρά, όπως περιγράφεται από τους Cipinytė et al (2009). Η κινητή φάση που χρησιμοποιήθηκε κάλυπτε απόσταση 8 cm. Τα δείγματα ήταν αραιωμένα σε 2 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,

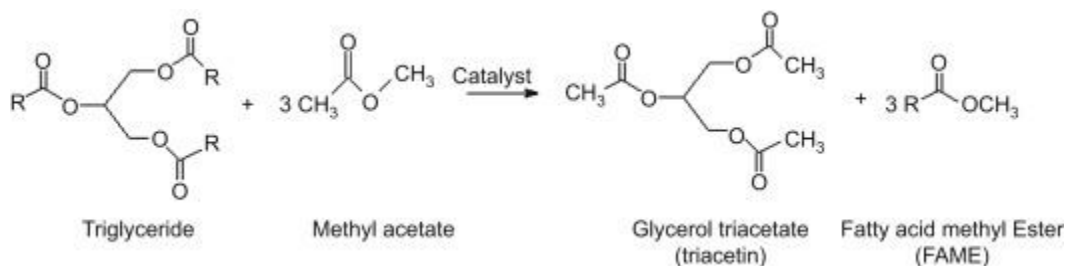
Παλμιτικό οξύ (Palmitic acid, FFA), 40 mg/ml.

Υπόλοιπες μπάντες που τυχόν παρουσιάστηκαν στα δείγματα κατά την ανάλυση της TLC αναγνωρίστηκαν σύμφωνα με την ανάλυση λιπιδίων στο Cyberlipid (<http://cyberlipid.gerli.com/>).

2.3.5.2 Μεθυλεστεροποίηση

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

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



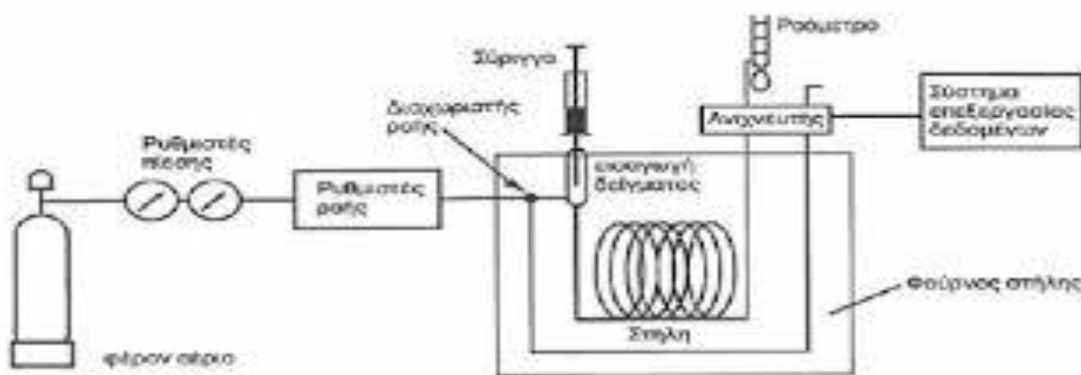
Εικόνα 2.3.5.3-1: Μηχανισμός μεθυλεστεροποίησης. (Basit Ali et al., 2019)

2.3.5.3 Ανάλυση με αέριο χρωματογράφο (GC)

Για τον ποιοτικό προσδιορισμό της σύστασης του μικροβιακού λίπους στα επιμέρους λιπαρά οξέα χρησιμοποιήθηκε αέριο χρωματογράφος Fisons GC8000 εξοπλισμένο με τριχοειδή στήλη CPWAX 52 CB μήκους 30 m και με ανιχνευτή FID (Flame Ionization Detector) (Εικόνα 2.2). Το φέρον αέριο ήταν το He, του οποίου η ροή ήταν 2 ml/min (25°C). Στον εισαγωγέα του αέριου χρωματογράφου με την βοήθεια σύριγγας εγχύεται 1 μL δείγματος.

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

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



Εικόνα 2.3.5.3-1: Πιθανή διάταξη αέριου χρωματογράφου (GC)

2.4 ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Η προβλεπόμενη αλματώδη αύξηση της παραγωγής βιοντίζελ στο προσεχώς μέλλον οδηγεί στην αναγκαιότητα της ανακάλυψης διαφόρων ολοκληρωμένων διεργασιών βιο-επεξεργασίας για την αξιοποίηση της ακατέργαστης γλυκερόλης, καθώς είναι το κύριο υπόλειμμα που προκύπτει από την σύνθεση των βιοκαυσίμων. Για κάθε 10kg βιοντίζελ παράγεται 1kg γλυκερόλης καθαρότητας 90% κ.β. ως υπολείμματος της διεργασίας. Το 2007 υπήρχαν 600.000 t ακάθαρτης γλυκερόλης σε Ευρωπαϊκό επίπεδο μόνο, η οποία προερχόταν από τη διεργασία παραγωγής βιοντίζελ. Η ακάθαρτη γλυκερόλη εκείνη την περίοδο θεωρήθηκε ως τυπικό βιομηχανικό απόβλητο (0 \$ ανά kg). Για πρώτη φορά στα πλαίσια της Ε.Ε. υπήρξε ενότητα με αποκλειστικό θέμα την αξιοποίηση της γλυκερόλης μέσω βιομηχανικών διεργασιών. Τα χρόνια που ακολούθησαν από το 2007 και έπειτα η κατάσταση έγινε λίγο καλύτερη καθώς βελτιώθηκαν οι διεργασίες καθαρισμού και ανάκτησης με απόρροια η τιμή της γλυκερόλης να ανέβει. Σήμερα η τιμή της καθαρής γλυκερόλης (καθαρότητας 98% κ.β.) είναι της τάξεως 0,50-0,70\$ ανά kg ενώ εκείνη της ακάθαρτης (καθαρότητας 65-85% κ.β.) είναι μικρότερη.

Στην παρούσα μελέτη διερευνήθηκε η ικανότητα ανάπτυξης στελεχών των ζυμών (πίνακας 2.1-1) χρησιμοποιώντας ακάθαρτη βιομηχανική γλυκερόλη. Ειδικότερα μελετήθηκε η ικανότητα των ζυμών να μεταβολίζουν αυτό το υπόστρωμα προς μεταβολικά προϊόντα προστιθέμενης αξίας όπως πολυόλες (μαννιτόλη, αραβιτόλη, ερυθριτόλη), μικροβιακό λίπος κ.α.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Το κόστος και η απόδοση των παραγόμενων προϊόντων σε μικροβιακές καλλιέργειες επηρεάζονται σε σημαντικό βαθμό από το κόστος της πηγής άνθρακα που χρησιμοποιείται. Συνεπώς απαιτείται να εντοπιστούν πηγές άνθρακα μηδενικής ή και ελάχιστης αξίας, όπως η γλυκερόλη που προέρχεται από την παραγωγή βιοντήζελ ως υποπροϊόν αυτής της διαδικασίας.

Γενικά, η σύνθεση της γλυκερόλης που προέρχεται από την παραγωγή βιοντήζελ, εξαρτάται από την προέλευση των πρώτων υλών, την μέθοδο της μετεστεροποίησης και τις συνθήκες διαχωρισμού κατά τη διάρκεια παραγωγής βιοντήζελ. Επομένως η σύνθεση της γλυκερόλης σε ακαθαρσίες και προσμίξεις μπορεί να διαφέρει αρκετά και αυτές να έχουν είτε θετικές είτε αρνητικές συνέπειες στην μικροβιακή αύξηση και στον σχηματισμό προϊόντων. (Chatzifragkou et al., 2010)

Σε αυτή την ενότητα παρατίθενται αναλυτικά όλα τα πειραματικά αποτελέσματα από τις ζυμώσεις των δέκα στελεχών καθώς και τα διαγράμματα κινητικής των παραμέτρων που αναλύθηκαν. Πιο συγκεκριμένα, από καθεμία ζύμωση και για κάθε στέλεχος ποσοτικοποιήθηκαν τα εξής δεδομένα: παραγωγή βιομάζας, παραγωγή ενδοπολυσακχαριτών, παραγωγή μεταβολικών προϊόντων (μαννιτόλη, αραβιτόλη, εριθρυτόλη), καταναλωθείσα γλυκερόλη και παραγωγή μικροβιακού λίπους.

Αρχικά πραγματοποιήθηκαν ζυμώσεις για το κάθε στέλεχος όπου επικράτησαν οι ίδιες συνθήκες ζύμωσης με περιεκτικότητα σε άνθρακα, δηλαδή γλυκερόλη, 60g/L και πάντα με περιοριστικό παράγοντα το άζωτο. Κάθε 24 h γινόταν έλεγχος pH και διόρθωση αν αυτό ήταν αναγκαίο. Επίσης ανά 24h πραγματοποιούνταν μέτρηση της καταναλωθείσας γλυκερόλης όπως και των παραγόμενων πολυολών κάθε μικροοργανισμού. Επίσης, πραγματοποιήθηκε ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός των λιπαρών οξέων του παραγόμενου λίπους με την βοήθεια της χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας και της αέριας χρωματογραφίας.

3.1 Αξιολόγηση (screening) των 10 στελεχών

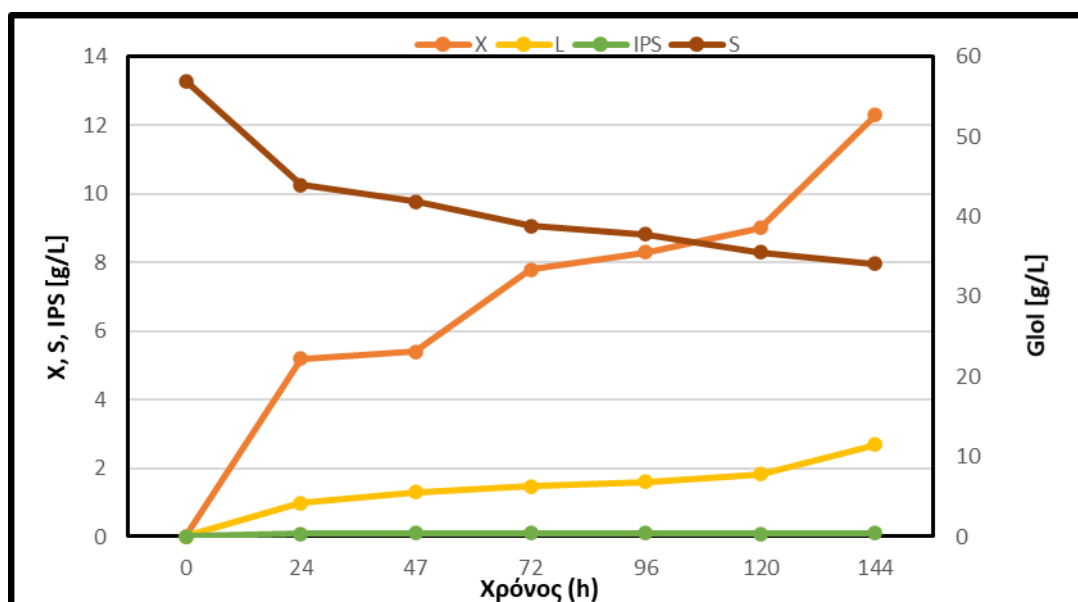
3.1.1 Ζύμωση του στελέχους *Pichia fermentans* 5257

Τα αποτελέσματα της ζύμωσης του στελέχους *P. fermentans* 5257 συγκεντρώνονται στον Πίνακα 3.1.1-1. Έπειτα από 144 ώρες επώασης καταναλώθηκε περίπου το 60% του υποστρώματος ενώ η βιομάζα συνέχιζε να αυξάνεται με μέγιστη τιμή 10,2 g/L. Ο μέγιστος συντελεστής απόδοσης βιομάζας παρατηρήθηκε στις 96 ώρες όπου το μισό υπόστρωμα είχε καταναλωθεί και η βιομάζα έλαβε τιμή 9,1 g/L.

Η παραγωγή του ενδοκυτταρικού λίπους επίσης παρουσίασε αύξηση φτάνοντας στο τέλος της ζύμωσης σε τιμή 2,2 g/L με μέγιστο συντελεστή απόδοσης 21,31 g/L, ενώ τα ποσά των παραγόμενων ενδοπολυσακχαριτών ήταν χαμηλά. Στο Διάγραμμα 3.1.1-1 παρουσιάζονται η κινητική κατανάλωσης της γλυκερόλης, παραγωγής βιομάζας, ενδοκυτταρικού λίπους και ενδοπολυσακχαριτών.

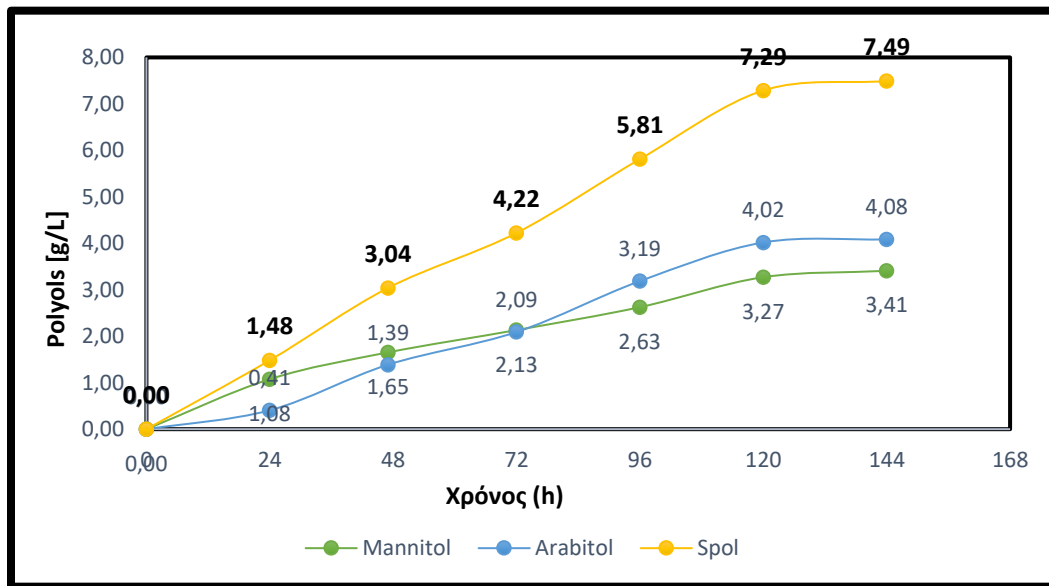
Πίνακας 3.1.1-1: Αποτελέσματα της υγρής καλλιέργειας του *P. fermentans* 5257 σε συγκέντρωση γλυκερόλης 60 g/L. Όπου S_{rem} : υπολειπόμενη συγκέντρωση γλυκερόλης [g/L], X : βιομάζα [g/L], L : ενδοκυτταρικό λίπος[g/L], IPS : ενδοπολυσακχαρίτες [g/L], $Y_{L/x}$: συντελεστής απόδοσης παραγόμενου λίπους προς την αντίστοιχη βιομάζα. (g/g).

Time(h)	S_{rem} (g/L)	X(g/L)	L (g/L)	IPS(g/L)	IPS (%)	$Y_{L/x}$ (%)
0	57,00	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
24	40,52	5,20	0,98	0,07	3,05	18,85
48	36,63	6,97	1,30	0,09	3,81	18,66
72	30,12	8,00	1,46	0,10	4,06	18,25
96	28,45	9,08	1,60	0,11	4,54	17,61
120	25,74	9,59	1,82	0,09	3,71	18,98
144	24,51	10,23	2,18	0,10	3,82	21,31

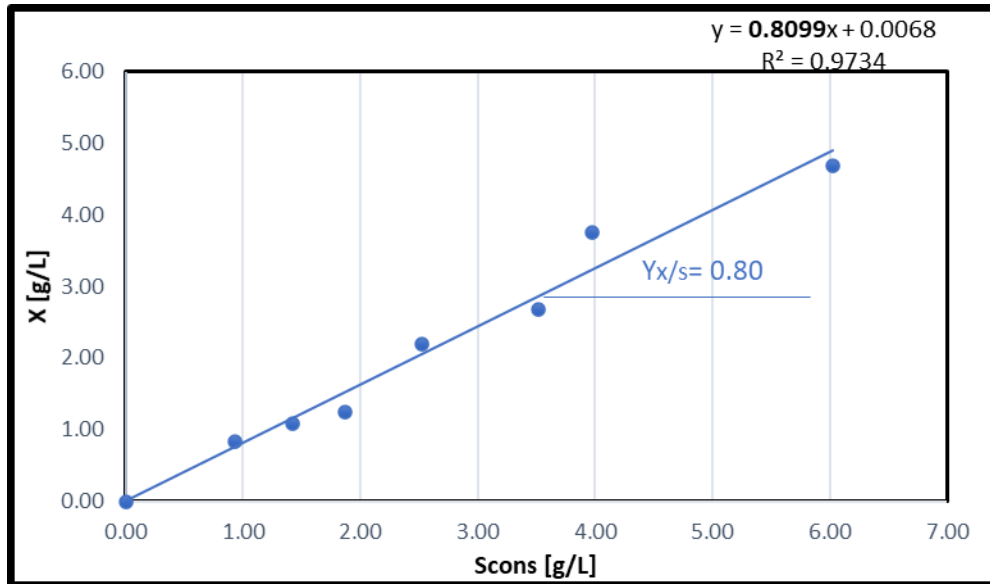


Διάγραμμα 3.1.1-1: Κινητικά δεδομένα για την μεταβολή βιομάζας X[g/L], του αρχικού υποστρώματος [g/L], της παραγωγής λίπους [SCO g/L] και των ενδοπολυσακχαριτών [IPS g/L] του στελέχους *P. fermentans* 5257.

Στο Διάγραμμα 3.1.1-2 φαίνεται η κινητική παραγωγής των πολυολών. Η πορεία παραγωγής των δύο πολυολών είναι ανοδική με την μαννιτόλη να υπερέχει τις πρώτες 72 ώρες επώασης, στο οποίο σημείο οι δύο πολυόλες παρουσίασαν την ίδια τιμή, 2,1 g/L (Πίνακας 3.1.1-2). Στη συνέχεια της ζύμωσης η αραβιτόλη έλαβε μεγαλύτερες τιμές φτάνοντας σε μέγιστη παραγωγή 4,1 g/L και η μαννιτόλη 3,4 g/L.



Διάγραμμα 3.1.1-2: Παραγωγή πολυολών του στελέχους *P. fermentans* 5257, σε αρχική συγκέντρωση υποστρώματος γλυκερόλης 60g/L.



Διάγραμμα 3.1.1-3 :Παραγωγή βιομάζας του στελέχους *P. fermentans* 5257 ως προς το καταναλωθέν υπόστρωμα όπου $Y_{x/s}$: συντελεστής απόδοσης παραγόμενης βιομάζας προς S_{cons} (g/g) και S_{cons} : καταναλωθέν υπόστρωμα γλυκερόλης [g/L].

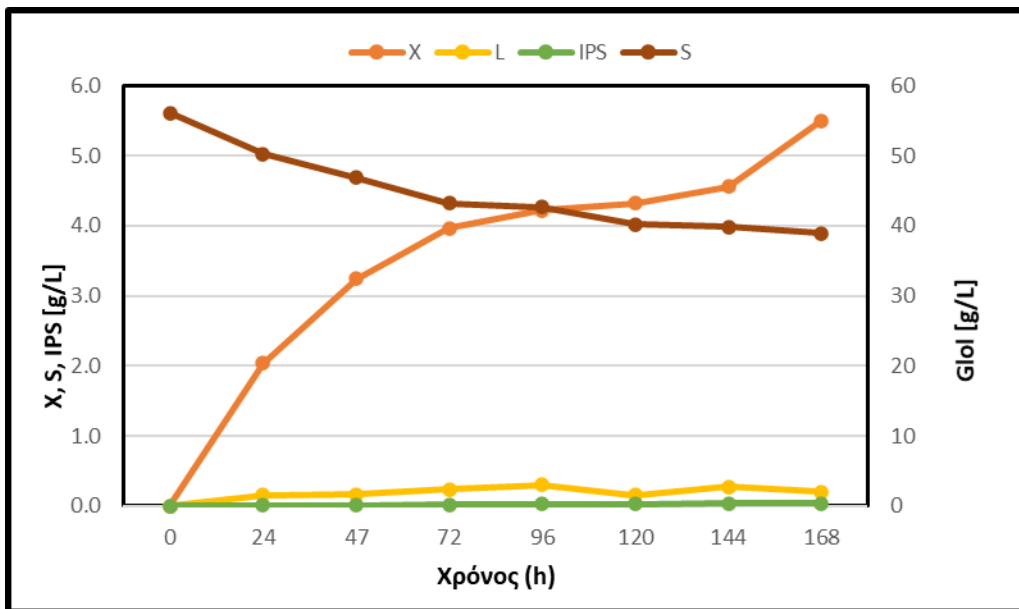
3.1.2 Ζύμωση του στελέχους *Pichia fermentans* 5265

Τα αποτελέσματα της ζύμωσης του στελέχους *P. fermentans* 5257 συγκεντρώνονται στον Πίνακα 3.1.2-1. Η ζύμη κατανάλωσε το 30% του υποστρώματος και έφτασε σε μέγιστη παραγωγή βιομάζας 5,50 g/L. Ο μικροοργανισμός μετά τις 72 ώρες μπήκε στην στατική φάση. Η μέγιστη απόδοση βιομάζας παρατηρήθηκε στις 48 ώρες επώασης με ποσοστό 35,03% (w/w). Η παραγωγή των μεταβολικών προϊόντων ήταν μικρή με επίσης μικρά ποσά λίπους, ενδοπολυσακχαριτών και πολυολών.

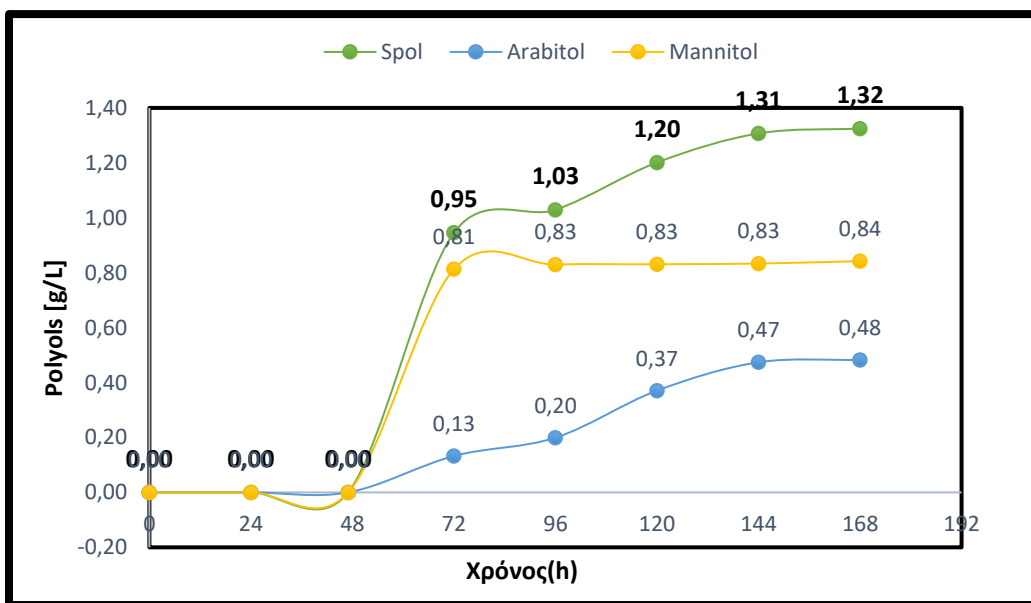
Στο Διάγραμμα 3.1.2-1 παρουσιάζονται οι κινητικές κατανάλωσης υποστρώματος, παραγωγής βιομάζας, ενδοκυτταρικού λίπους και ενδοπολυσακχαριτών, ενώ στο Διάγραμμα 3.1.2-2 παρουσιάζεται η παραγωγή των πολυολών.

Πίνακας 3.1.2-1: Αποτελέσματα της υγρής καλλιέργειας του *P. fermentans* 5265 σε συγκέντρωση γλυκερόλης 60g/L. Όπου S_{rem} : υπολειπόμενη συγκέντρωση γλυκερόλης[g/L], X : βιομάζα [g/L], L : ενδοκυτταρικό λίπος [g/L], IPS : ενδοπολυσακχαρίτες [g/L], $Y_{L/X}$: συντελεστής απόδοσης παραγόμενου λίπους προς την αντίστοιχη βιομάζα. (g/g).

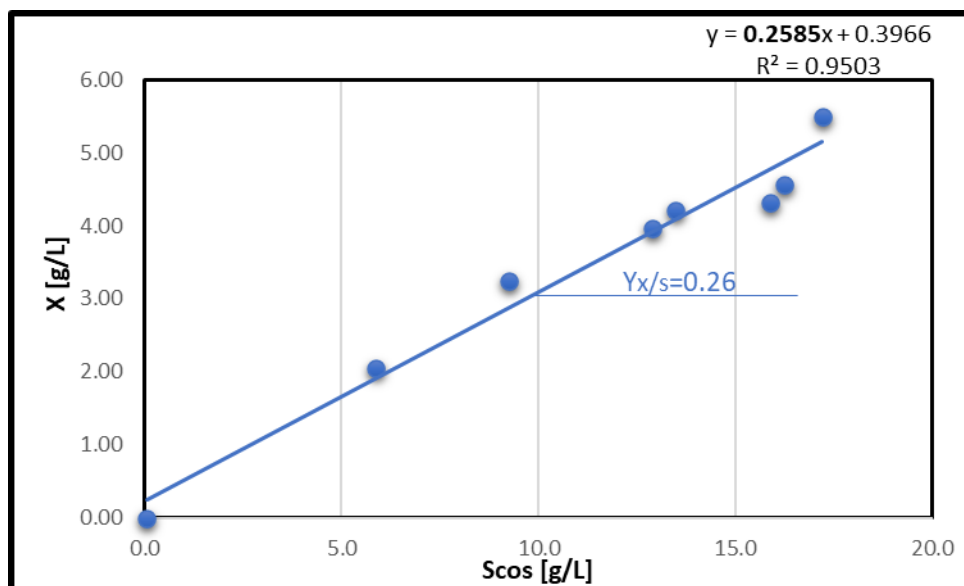
Time(h)	S_{rem} (g/L)	X (g/L)	L (g/L)	IPS(g/L)	IPS (%)	$Y_{L/X}$ (%)
0	56,05	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
24	50,23	2,04	0,16	0,01	0,56	7,84
48	46,85	3,24	0,17	0,02	0,80	5,25
72	43,21	3,96	0,24	0,04	1,56	6,06
96	42,63	4,22	0,30	0,07	2,99	7,11
120	40,21	4,32	0,16	0,07	2,94	3,70
144	39,87	4,56	0,28	0,09	3,55	6,14
168	38,90	5,50	0,20	0,10	3,98	3,64



Διάγραμμα 3.1.2-1 : Κινητικά δεδομένα για την μεταβολή βιομάζας Χ[g/L], του αρχικού υποστρώματος [g/L], της παραγωγής λίπους [SCO g/L] και των ενδοπολυσακχαριτών IPS g/L] του στελέχους *P. fermentans* 5265.



Διάγραμμα 3.1.2-2 : Παραγωγή αραβιτόλης και μαννιτόλης του στελέχους *P. fermentans* 5265, σε αρχική συγκέντρωση υποστρώματος γλυκερόλης 60g/L.



Διάγραμμα 3.1.2-3 : Παραγωγή βιομάζας του στελέχους *P. fermentans* 5265 ως προς το καταναλωθέν υπόστρωμα όπου $Y_{x/s}$: συντελεστής απόδοσης παραγόμενης βιομάζας προς S_{cons} (g/g) και S_{cons} : καταναλωθέν υπόστρωμα γλυκερόλης [g/L].

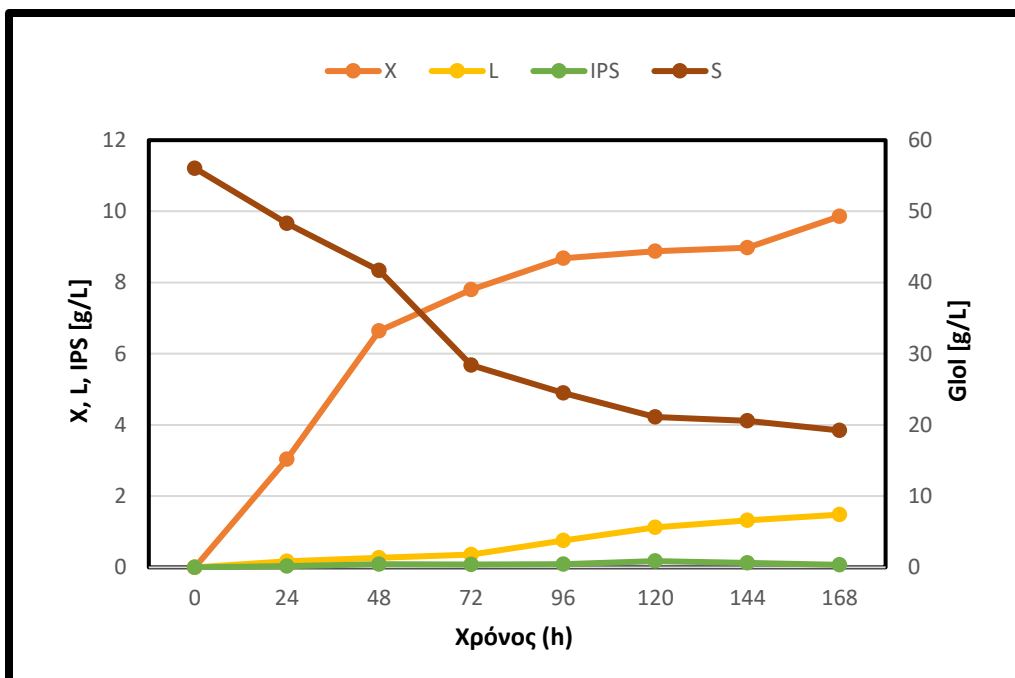
3.1.3 Ζύμωση του στελέχους *C. zeylanoides* 5266

Τα αποτελέσματα της ζύμωσης του στελέχους *C. zeylanoides* 5266 συγκεντρώνονται στον Πίνακα 3.3. Η ζύμη κατανάλωσε το 66% της γλυκερόλης μετά από 168 ώρες επώαση λαμβάνοντας μέγιστη παραγωγή βιομάζας 9,86 g/L και 26,72% (w/w) απόδοση βιομάζας στο ίδιο σημείο ανάλυσης, ενώ η μέγιστη απόδοση βιομάζας παρουσιάστηκε στις 48 ώρες με ποσοστό 46,11%, όπου υπήρχε 26% κατανάλωση υποστρώματος και βιομάζα 6,64 g/L. Στο Διάγραμμα 3.1.3-1 στην κινητική παραγωγής βιομάζας φαίνεται καθαρά η είσοδος του μικροοργανισμού στην στατική φάση μετά από 72 ώρες επώασης με ελάχιστη αύξηση και παράλληλη σταδιακή μείωση της γλυκερόλης.

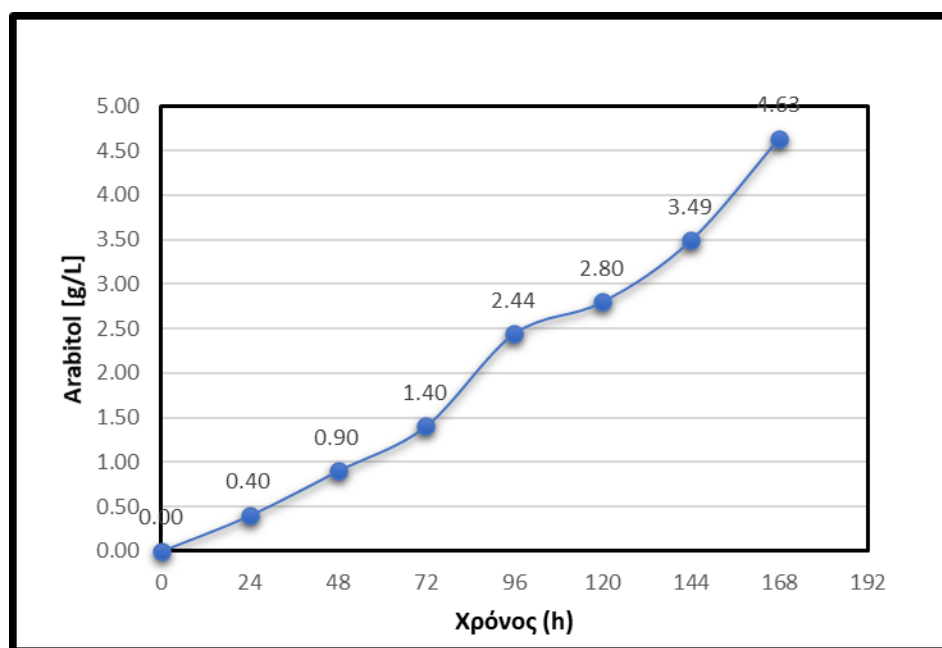
Πίνακας 3.1.3-1: Αποτελέσματα της υγρής καλλιέργειας *C. zeylanoides* 5266 σε συγκέντρωση γλυκερόλης 60g/L. Όπου S_{rem} : υπολειπόμενη συγκέντρωση γλυκερόλης [g/L], X : βιομάζα [g/L], L : ενδοκυτταρικό λίπος [g/L], IPS : ενδοπολυσακχαρίτες [g/L], $Y_{L/x}$: συντελεστής απόδοσης παραγόμενου λίπους προς την αντίστοιχη βιομάζα. (g/g).

Time (h)	S_{rem} (g/L)	X(g/L)	L (g/L)	IPS (g/L)	IPS (%)	$Y_{L/x}$ (%)
0	56,06	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
24	48,30	3,04	0,17	0,04	9,47	5,59
48	41,70	6,64	0,27	0,09	3,55	4,04
72	28,40	7,80	0,36	0,08	3,28	4,62
96	24,50	8,68	0,75	0,08	3,26	8,64
120	21,10	8,88	1,12	0,18	6,87	12,61
144	20,60	8,98	1,32	0,13	4,97	14,70
168	19,23	9,86	1,48	0,07	2,78	19,51

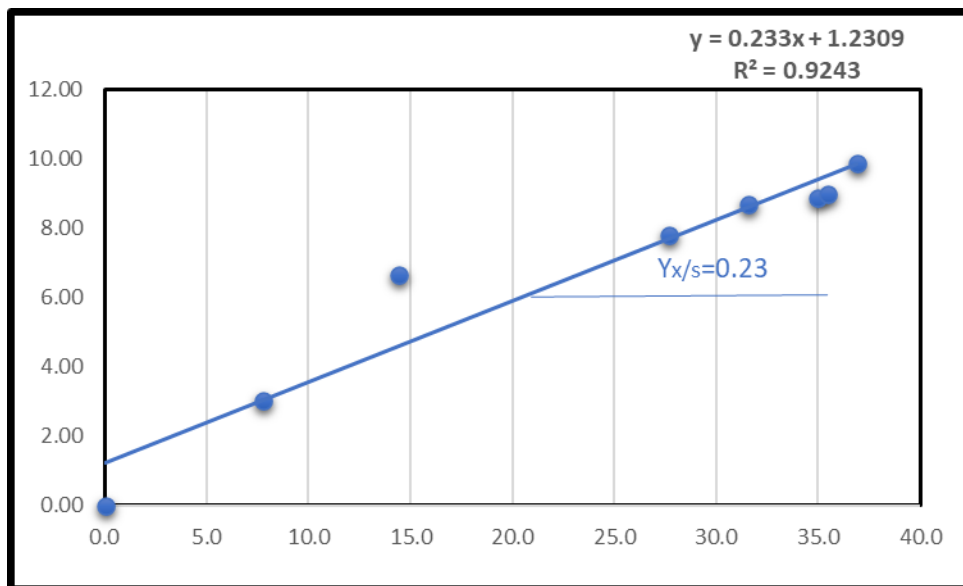
Η παραγωγή του λίπους, όπως φαίνεται και στο Διάγραμμα 3.1.3-1, σταδιακά αυξανόταν λαμβάνοντας 1,48 g/L μέγιστη τιμή στο τέλος της ζύμωσης (168 ώρες) και μέγιστη απόδοση παραγωγής λίπους επί ξηράς ουσίας 15,01% (Πίνακας 3.1.3-1). Χαμηλές τιμές ενδοπολυσακχαριτών παρατηρήθηκαν λαμβάνοντας μέγιστη τιμή 0,18 g/L (6.87% w/w) έπειτα από 120 ώρες επώασης. Τέλος, παρατηρήθηκε μόνο παραγωγή αραβιτόλης λαμβάνοντας μέγιστη τιμή 4,6 g/L στο τέλος της ζύμωσης έχοντας αυξητική πορεία (Διάγραμμα 3.1.3-2).



Διάγραμμα 3.1.3-1: Κινητικά δεδομένα για την μεταβολή βιομάζας X [g/L], του αρχικού υποστρώματος [g/L], της παραγωγής λίπους [SCO g/L] και των ενδοπολυσακχαριτών [IPS g/L] του στελέχους *C. zeylanoides* 5266.



Διάγραμμα 3.1.3-2: Παραγωγή αραβιτόλης του στελέχους *C. zeylanoides* 5266, σε αρχική συγκέντρωση υποστρώματος γλυκερόλης 60g/L.



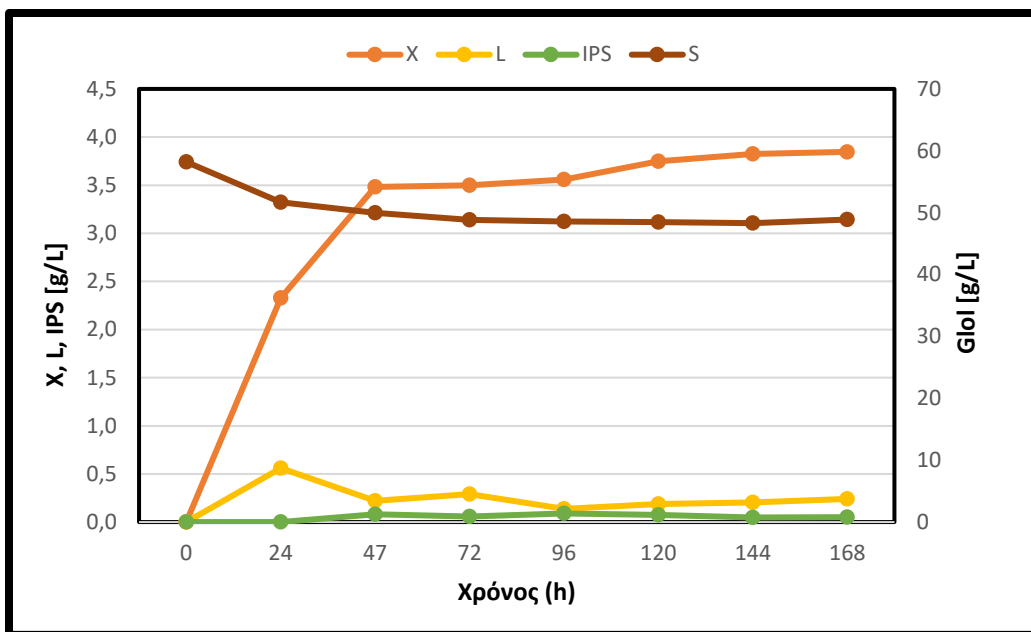
Διάγραμμα 3.1.3-3: Παραγωγή βιομάζας του στελέχους *C. zeylanoides* 5266 ως προς το καταναλωθέν υπόστρωμα όπου $Y_{x/s}$: συντελεστής απόδοσης παραγόμενης βιομάζας προς S_{cons} (g/g) και S_{cons} : καταναλωθέν υπόστρωμα γλυκερόλης [g/L].

3.1.4 Ζύμωση του στελέχους *C. incospicua* 5292

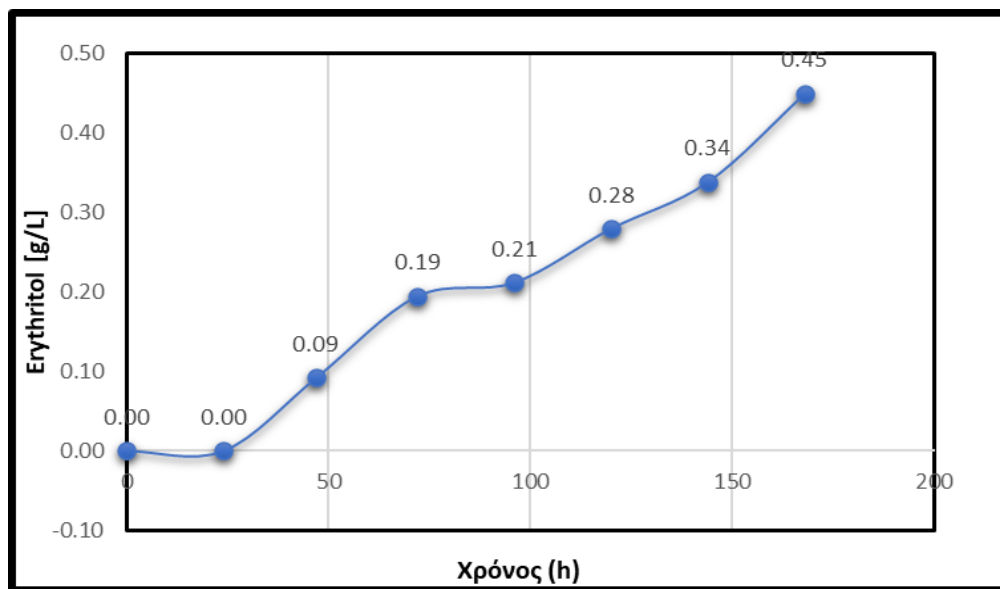
Στον Πίνακα 3.1.4-1 συγκεντρώνονται τα αποτελέσματα της ζύμωσης του στελέχους *C. incospicua* 5292. Το στέλεχος αυτό δεν μπόρεσε να καταναλώσει την γλυκερόλη στο χρονικό περιθώριο των 168 ωρών επώασης, στο οποίο κατανάλωσε μόλις το 16% της γλυκερόλης φτάνοντας σε μέγιστη παραγωγή βιομάζας 3,85 g/L. Όπως φαίνεται και στο Διάγραμμα 3.1.4-1 η βιομάζα αυξήθηκε στο 3,5 g/L μετά από 24 ώρες και έμεινε σχεδόν στάσιμη με ελάχιστη αύξηση μέχρι το τέλος της επώασης. Ασήμαντες ποσότητες ενδοκυτταρικού λίπους και ενδοπολυσακχαριτών παρατηρήθηκαν, ενώ μόνο η ερυθριτόλη εντοπίστηκε σε πολύ χαμηλές τιμές (Διάγραμμα 3.1.4-2).

Πίνακας 3.1.4-1: Αποτελέσματα της υγρής καλλιέργειας *C. incospicua* 5292 σε συγκέντρωση γλυκερόλης 60g/L. Όπου S_{rem} : υπολειπόμενη συγκέντρωση γλυκερόλης [g/L], X : βιομάζα [g/L], L : ενδοκυτταρικό λίπος [g/L], IPS : ενδοπολυσακχαρίτες [g/L], $Y_{L/x}$: συντελεστής απόδοσης παραγόμενου λίπους προς την αντίστοιχη βιομάζα. (g/g).

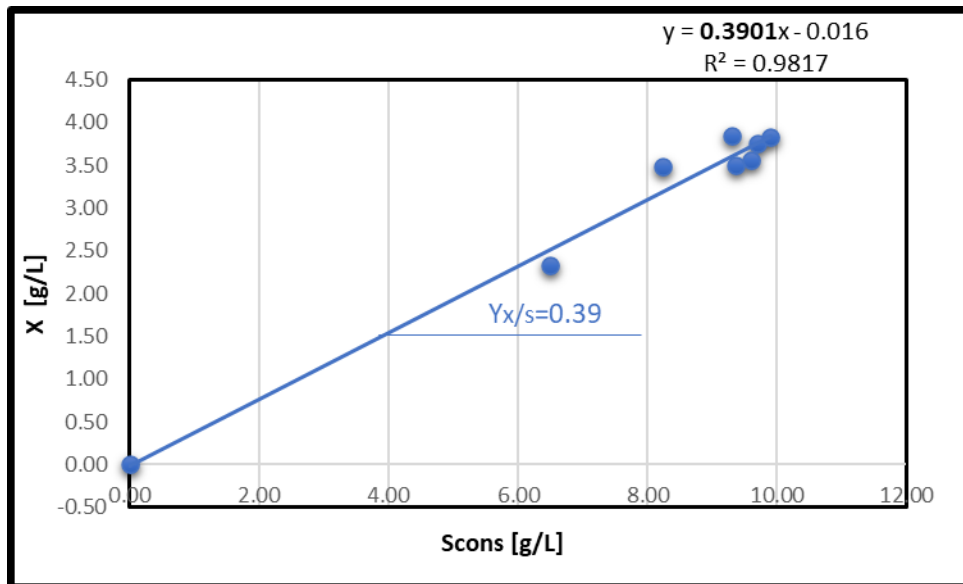
Time(h)	S_{rem} (g/L)	X (g/L)	L (g/L)	IPS(g/L)	IPS (%)	$Y_{L/x}$ (%)
0,0	58,20	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
24	51,70	2,33	0,56	0,0	0,0	16,83
48	49,97	3,48	0,22	0,08	3,22	6,32
72	48,84	3,50	0,29	0,06	2,55	8,34
96	48,60	3,56	0,14	0,09	3,50	3,82
120	48,50	3,75	0,19	0,07	2,85	4,96
144	48,31	3,82	0,20	0,05	1,83	5,33
168	48,90	3,85	0,24	0,05	1,95	6,29



Διάγραμμα 3.1.4-1 :Κινητικά δεδομένα για την μεταβολή βιομάζας X[g/L], του αρχικού υποστρώματος [g/L], της παραγωγής λίπους [SCO g/L] και των ενδοπολυσακχαριτών [IPS g/L] του στελέχους *C. incosprica* 5292.



Διάγραμμα 3.1.4-2 : Παραγωγή ερυθριτόλης του στελέχους, *C. incosprica* 5292 σε αρχική συγκέντρωση υποστρώματος γλυκερόλης 60g/L.



Διάγραμμα 3.1.4-3: Παραγωγή βιομάζας του στελέχους *C. Incospicua* 5292 ως προς το καταναλωθέν υπόστρωμα όπου $Y_{x/s}$: συντελεστής απόδοσης παραγόμενης βιομάζας προς S_{cons} (g/g) και S_{cons} : καταναλωθέν υπόστρωμα γλυκερόλης [g/L].

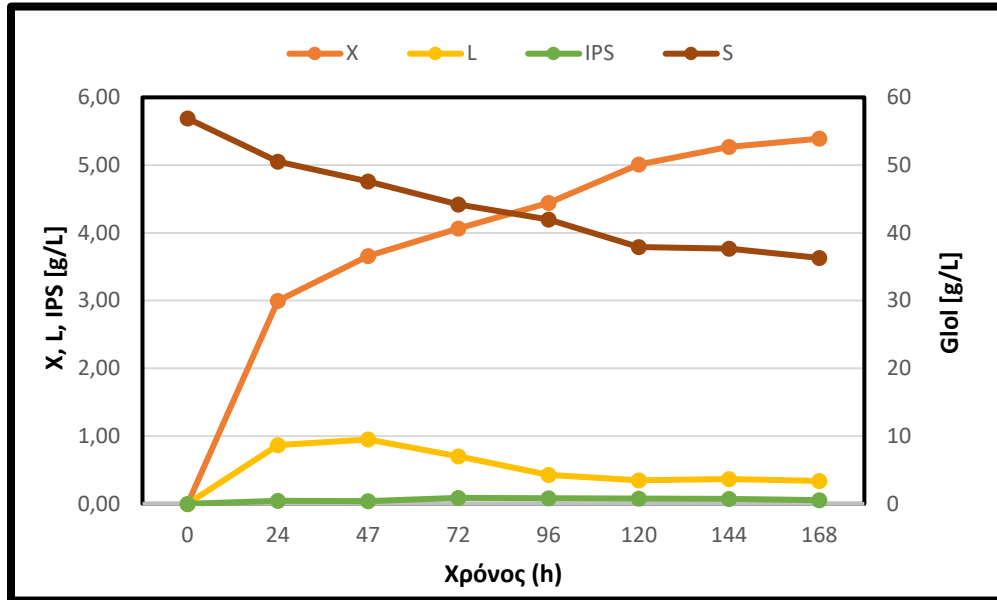
3.1.5 Ζύμωση του στελέχους *C. incospicua* 5293

Στον Πίνακα 3.1.5-1 συγκεντρώνονται τα αποτελέσματα της ζύμωσης του στελέχους *C. incospicua* 5293. Το στέλεχος έφτασε σε μέγιστη τιμή βιομάζας 5,39 g/L μετά από 168 ώρες, όπου κατανάλωσε το 26% του υποστρώματος. Ωστόσο, στις 48 ώρες παρατηρήθηκε η μέγιστη απόδοση βιομάζας (50,3%) σε σχέση με το καταναλωθέν υπόστρωμα. Όπως φαίνεται και στο Διάγραμμα 3.1.5-1, η βιομάζα μετά τις 120 ώρες αυξανόταν ελάχιστα, ενώ παράλληλα ελάχιστα αυξανόταν και η κατανάλωση του υποστρώματος, δηλώνοντας πως ο μικροοργανισμός αυτός δεν έχει παραπάνω δυνατότητα κατανάλωσης της γλυκερόλης ακόμα και σε επέκταση του χρόνου επώασης.

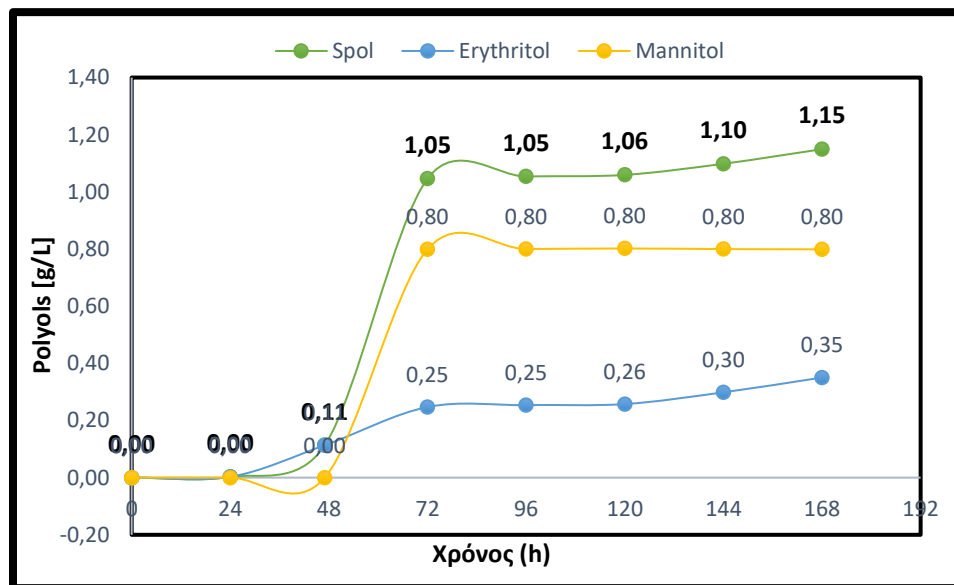
Πίνακας 3.1.5-1: Αποτελέσματα της υγρής καλλιέργειας *C. incospicua* 5293 σε συγκέντρωση γλυκερόλης 60g/L. Όπου S_{rem} : υπολειπόμενη συγκέντρωση γλυκερόλης[g/L], X : βιομάζα [g/L], L : ενδοκυτταρικό λίπος [g/L], IPS : ενδοπολυσακχαρίτες [g/L], $Y_{L/x}$: συντελεστής απόδοσης παραγόμενου λίπους προς την αντίστοιχη βιομάζα. (g/g).

Time(h)	S_{rem} (g/L)	X (g/L)	L (g/L)	IPS(g/L)	IPS (%)	$Y_{L/x}$ (%)
0	56,88	0,0	0,0	0,0	0,0	0
24	50,50	3,00	0,87	0,05	1,82	19,09
48	47,61	3,66	0,95	0,04	1,59	18,93
72	44,20	4,06	0,70	0,09	3,53	17,22
96	41,99	4,44	0,43	0,08	3,16	9,68
120	37,91	5,01	0,35	0,08	2,98	7,91
144	37,66	5,27	0,36	0,07	2,85	8,60
168	36,30	5,39	0,34	0,05	2,01	8,11

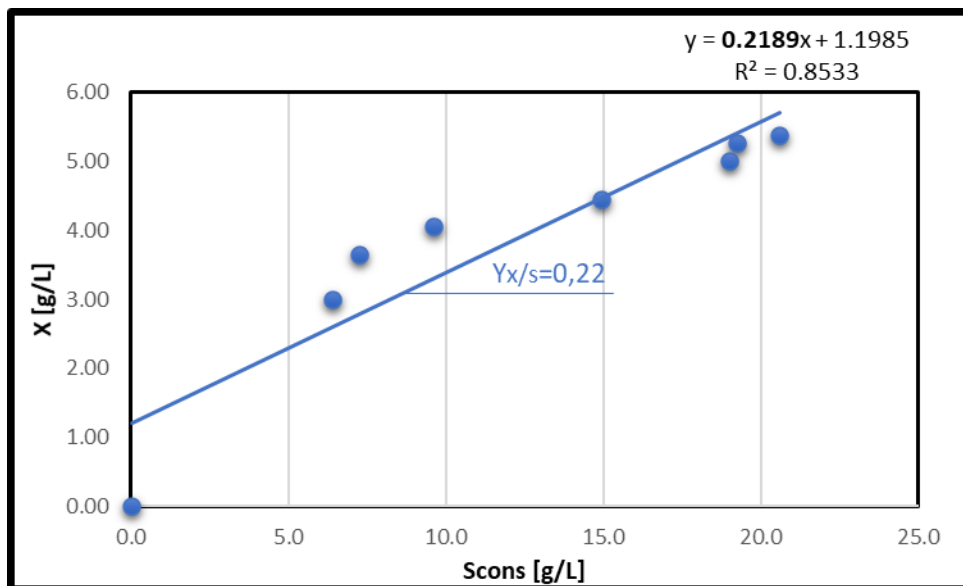
Η μέγιστη παραγωγή λίπους παρατηρήθηκε μετά τις 48 ώρες με τιμή μόλις 0,95 g/L και συντελεστή απόδοσης λίπους ανά ξηράς ουσίας βιομάζα ήταν 25,97% (w/w), ενώ η μέγιστη απόδοση παραγωγής ενδοκυτταρικού λίπους ήταν στις 24 ώρες με τιμή 28,95% και μετά μειώνονταν. Το γεγονός αυτό οδηγεί στο συμπέρασμα ότι το λίπος που παράχθηκε ανακαταναλώθηκε από τον μικροοργανισμό. Η παραγωγή ενδοπολυσακχαριτών ήταν στα ίδια χαμηλά επίπεδα με το προηγούμενο στέλεχος. Μικρή παραγωγή των πολυολών παρατηρήθηκε με την μαννιτόλη (0,8 g/L) να υπερέχει της ερυθριτόλης (0,35 g/L). Στο Διάγραμμα 3.1.5-2 παρουσιάζεται η κινητική παραγωγής των συνολικών πολυολών, όπου φτάνουν σε ένα μέγιστο στις 72 ώρες και μετά η συνολική τιμή των παραγόμενων πολυολών μένει στάσιμη.



Διάγραμμα 3.5-1: Κινητικά δεδομένα για την μεταβολή βιομάζας X [g/L], του αρχικού υποστρώματος [g/L], της παραγωγής λίπους [SCO g/L] και των ενδοπολυσακχαριτών [IPS g/L] του στελέχους *C.incosprica* 5293.



Διάγραμμα 3.5-2 : Παραγωγή ερυθριτόλης και μαννιτόλης του στελέχους, *C.incosprica* 5293 σε αρχική συγκέντρωση υποστρώματος γλυκερόλης 60g/L.



Διάγραμμα 3.1.5-3: Παραγωγή βιομάζας του στελέχους *C. Incospricua* 5293 ως προς το καταναλωθέν υπόστρωμα όπου $Y_{x/s}$: συντελεστής απόδοσης παραγόμενης βιομάζας προς S_{cons} (g/g) και S_{cons} : καταναλωθέν υπόστρωμα γλυκερόλης [g/L].

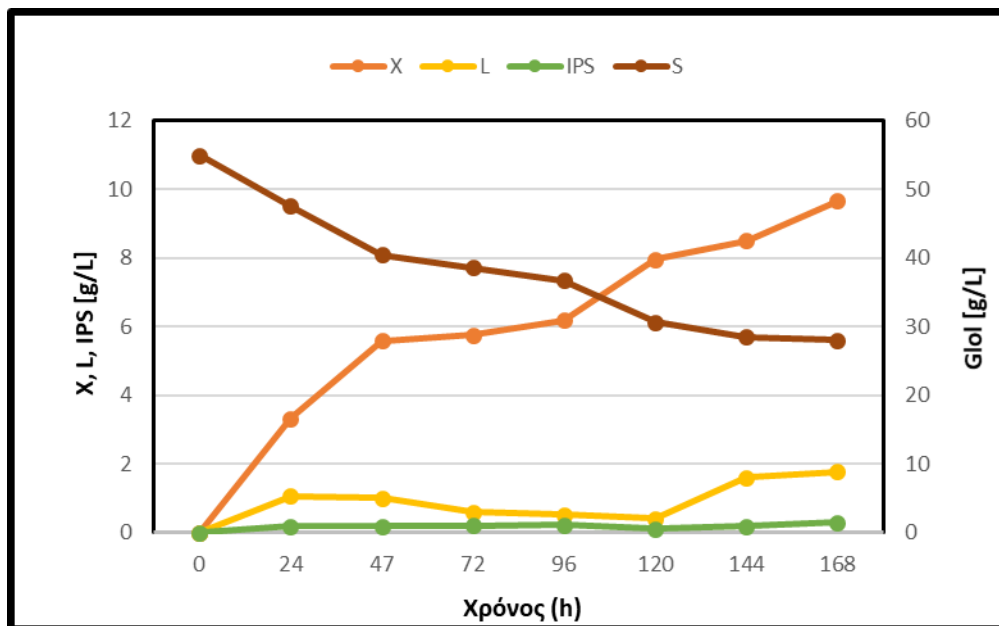
3.1.6 Ζύμωση του στελέχους *G. Candidum* 5274

Στον Πίνακα 3.1.6-1 συγκεντρώνονται τα αποτελέσματα από τη ζύμωση του στελέχους *G. candidum* 5274. Ο μικροοργανισμός αυτός έδειξε σημαντική και συνεχόμενη αύξηση βιομάζας φτάνοντας σε μέγιστη τιμή 9,68 g/L στο τέλος της επώασης (168 ώρες) καταναλώνοντας το 50% του υποστρώματος. Στο Διάγραμμα 3.1.6-1 παρατηρούμε μια πιο γρήγορη κατανάλωση υποστρώματος (14%) μετά από 48 ώρες με σημαντική παραγωγή βιομάζας και μεγάλη απόδοση και ταυτόχρονη μετατροπή του υποστρώματος σε ενδοκυτταρικό λίπος. Στη συνέχεια η κατανάλωση του υποστρώματος και η παραγωγή βιομάζας είχαν ανάλογη πορεία η οποία αντικατοπτρίζεται σε μια σχεδόν σταθερή απόδοση βιομάζας. Μέγιστα ποσοστά απόδοσης ενδοκυτταρικού λίπους παρατηρήθηκαν στις αρχικές ώρες επώασης 31,93% και παραγωγή λίπους 1,06 g/L, αντίστοιχα. Σημαντικά ποσά παραγόμενων πολυολών παρατηρήθηκαν με την ερυθριτόλη να υπερέχει της αραβιτόλης (Διάγραμμα 3.1.6-2) λαμβάνοντας μέγιστες τιμές στο

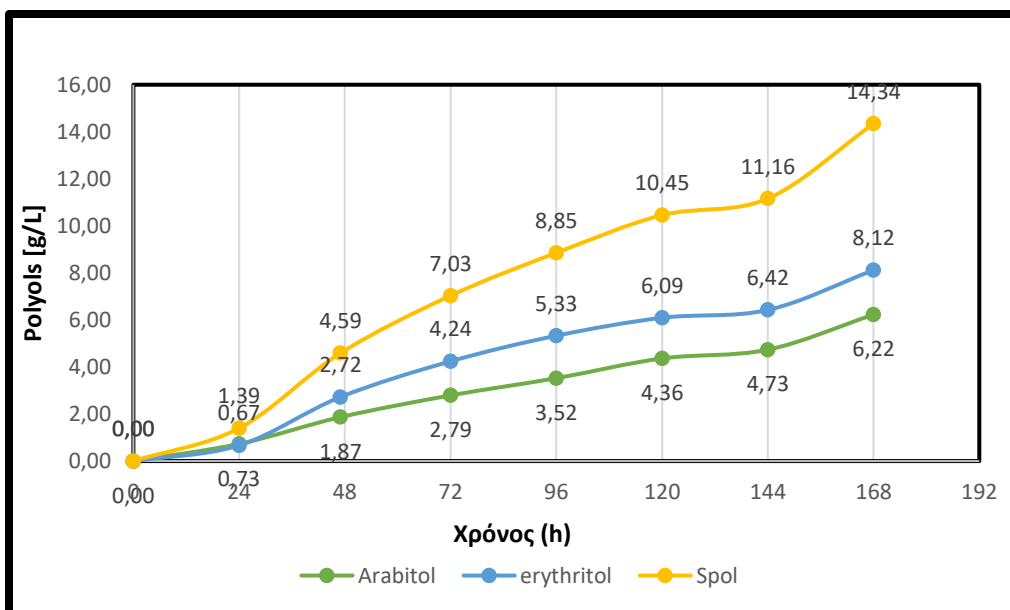
τέλος της επώασης, 8,1 και 6,2 g/L, αντίστοιχα. Το στέλεχος *G. candidum* 5274 εμφάνισε τις υψηλές τιμές πολυολών σε σχέση με τα λοιπά στελέχη της παρούσας μελέτης.

Πίνακας 3.1.6-1: Αποτελέσματα της υγρής καλλιέργειας *G. candidum* 5274 σε συγκέντρωση γλυκερόλης 60g/L. Όπου S_{rem} : υπολειπόμενη συγκέντρωση γλυκερόλης [g/L], X : βιομάζα [g/L], L : ενδοκυτταρικό λίπος [g/L], IPS : ενδοπολυσακχαρίτες [g/L], $Y_{L/x}$: συντελεστής απόδοσης παραγόμενου λίπους προς την αντίστοιχη βιομάζα. (g/g).

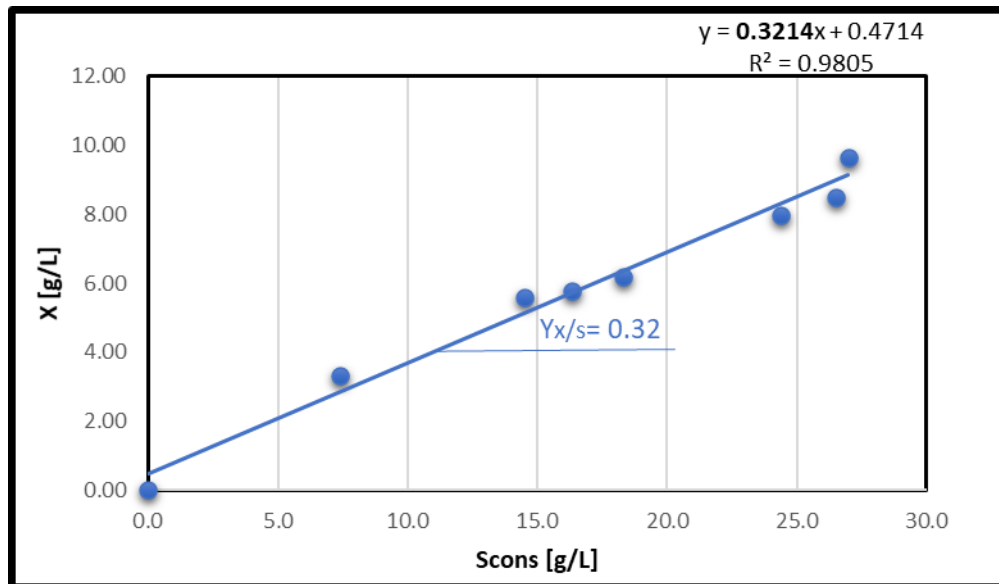
Time(h)	S_{rem} (g/L)	X(g/L)	L(g/L)	IPS (g/L)	IPS (%)	$Y_{L/x}$ (%)
0	55,00	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
24	47,63	3,32	1,06	0,17	6,60	18,93
48	40,50	5,58	1,00	0,19	7,67	19,40
72	38,65	5,76	0,60	0,20	7,98	10,42
96	36,71	6,18	0,52	0,21	7,97	8,41
120	30,63	7,96	0,40	0,11	4,28	5,03
144	28,51	8,50	1,60	0,19	7,31	18,82
168	28,01	9,66	1,78	0,30	11,86	18,43



Διάγραμμα 3.6-1: Κινητικά δεδομένα για την μεταβολή βιομάζας Χ[g/L], του αρχικού υποστρώματος [g/L], της παραγωγής λίπους [SCO g/L] και των ενδοπολυσακχαριτών [IPS g/L] του στελέχους *G.candidum* 5274.



Διάγραμμα 3.6-2: Παραγωγή αραβιτόλης και ερυθριτόλης του στελέχους *G. candidum* 5274, σε αρχική συγκέντρωση υποστρώματος γλυκερόλης 60g/L.



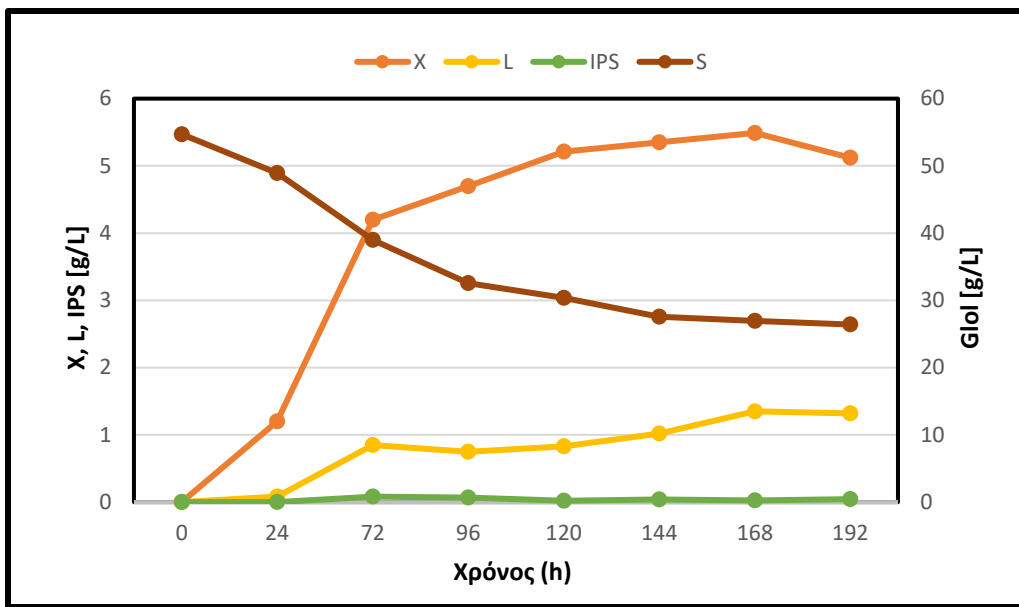
Διάγραμμα 3.1.5-3: Παραγωγή βιομάζας του στελέχους *G. candidum* 5274 ως προς το καταναλωθέν υπόστρωμα όπου $Y_{x/s}$: συντελεστής απόδοσης παραγόμενης βιομάζας προς S_{cons} (g/g) και S_{cons} : καταναλωθέν υπόστρωμα γλυκερόλης [g/L].

3.1.7 Ζύμωση του στελέχους *G. tartarivorans* 5222

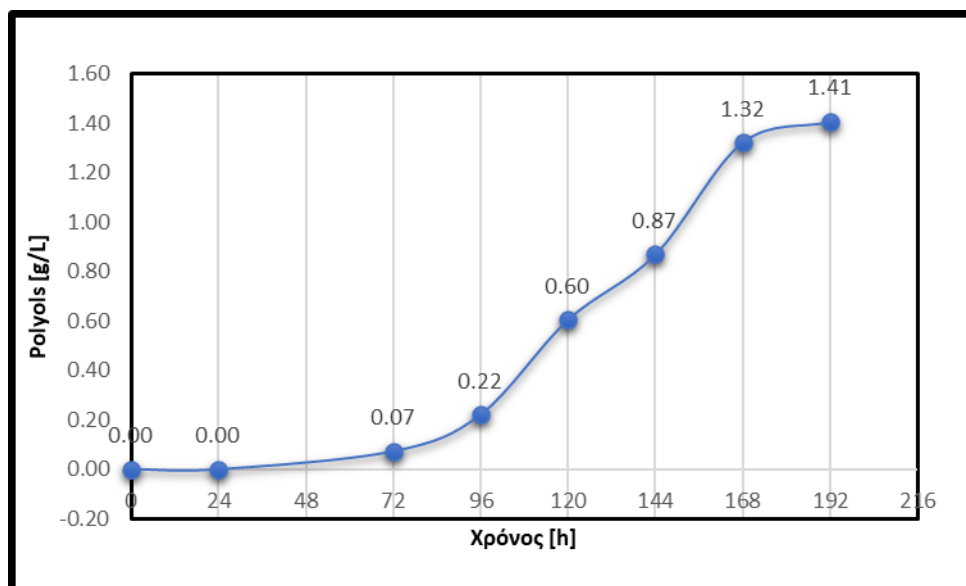
Το στέλεχος *C. tartarivorans* 5222 κατανάλωσε 48% του υποστρώματος παράγοντας μέγιστη τιμή βιομάζας 5,49 g/L και μέγιστη απόδοση 36,61% μετά από 144 ώρες επώαση (Πίνακας 3.1.7-1). Όπως φαίνεται και στο Διάγραμμα 3.1.7-1, αυτή είναι η δυναμική του μικροοργανισμού και η ικανότητα του για αξιοποίηση της γλυκερόλης, αφού μετά τις 120 ώρες επώασης τόσο η παραγωγή της βιομάζας όσο και η κατανάλωση του υποστρώματος μειώνονται. Σημαντική παραγωγή λίπους παρατηρήθηκε στις 144 ώρες επώασης με τιμή 2 g/L και μέγιστη απόδοση 36,61%. Ωστόσο, τα ποσά παραγωγής ενδοπολυσακχαριτών παρέμειναν χαμηλά, το ίδιο μικρή ήταν και η παραγωγή των πολυολών με μέγιστη τιμή της αραβιτόλης 1,38 g/L (Διάγραμμα 3.1.7-2).

Πίνακας 3.1.7-1: Αποτελέσματα της υγρής καλλιέργειας *C. tartarivorans* 5222 σε συγκέντρωση γλυκερόλης 60g/L. Όπου S_{rem} : υπολειπόμενη συγκέντρωση γλυκερόλης [g/L], X : βιομάζα [g/L], L : ενδοκυτταρικό λίπος [g/L], IPS : ενδοπολυσακχαρίτες [g/L], $Y_{L/x}$: συντελεστής απόδοσης παραγόμενου λίπους προς την αντίστοιχη βιομάζα. (g/g).

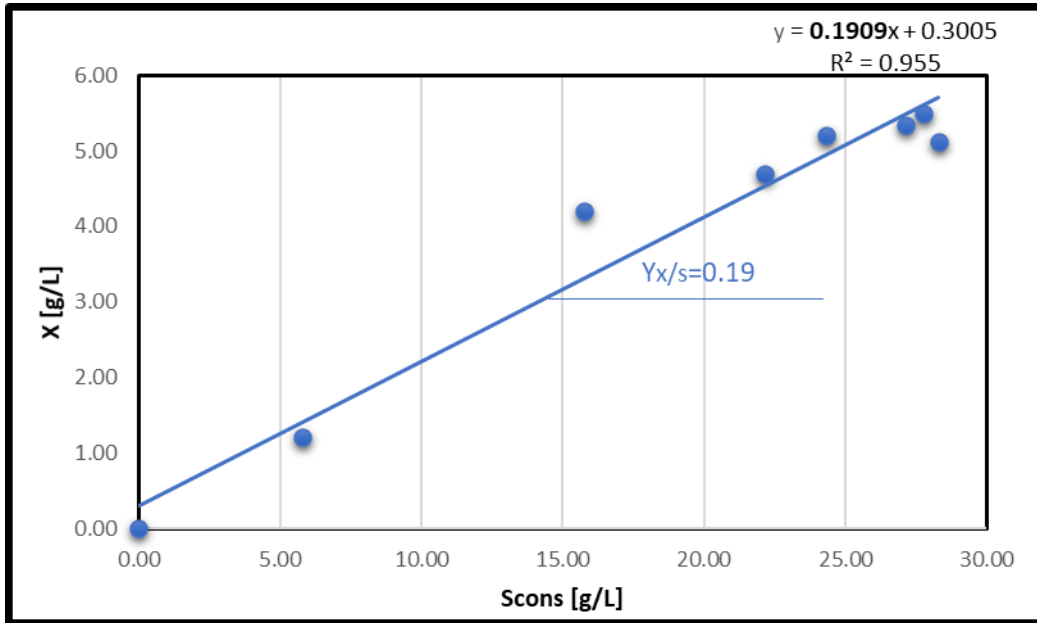
Time(h)	S_{rem} (g/L)	X (g/L)	L (g/L)	IPS (g/L)	IPS (%)	$Y_{L/x}$ (%)
0	54,71	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
24	48,93	1,20	0,08	0,0	0,0	20,76
48	38,97	4,20	1,43	0,08	3,12	26,08
72	32,57	4,70	0,75	0,07	2,65	21,23
96	30,37	5,21	0,83	0,02	0,83	21,40
120	27,57	5,35	1,02	0,04	1,62	19,71
144	26,96	5,49	1,35	0,03	0,99	19,78
168	26,41	5,12	1,32	0,05	1,64	25,78



Διάγραμμα 3.1.7-1: Κινητικά δεδομένα για την μεταβολή βιομάζας X [g/L], του αρχικού υποστρώματος [g/L], της παραγωγής λίπους [SCO g/L] και των ενδοπολυσακχαριτών [IPS g/L] του στελέχους *C.tartarivorans* 5222.



Διάγραμμα 3.1.7-2: Παραγωγή αραβιτόλης και ερυθριτόλης του στελέχους *C.tartarivorans* 5222, σε αρχική συγκέντρωση υποστρώματος γλυκερόλης 60g/L.



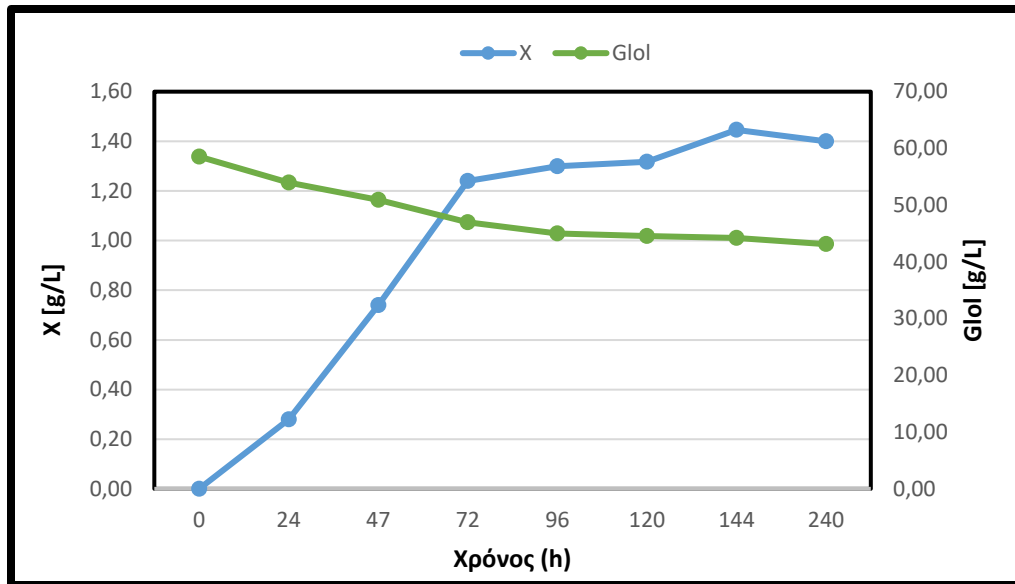
Διάγραμμα 3.1.7-3: Παραγωγή βιομάζας του στελέχους *C.tartarivorans* 5222 ως προς το καταναλωθέν υπόστρωμα όπου $Y_{x/s}$: συντελεστής απόδοσης παραγόμενης βιομάζας προς S_{cons} (g/g) και S_{cons} : καταναλωθέν υπόστρωμα γλυκερόλης [g/L].

3.1.8 Ζύμωση του στελέχους *G. tartarivorans* 5224

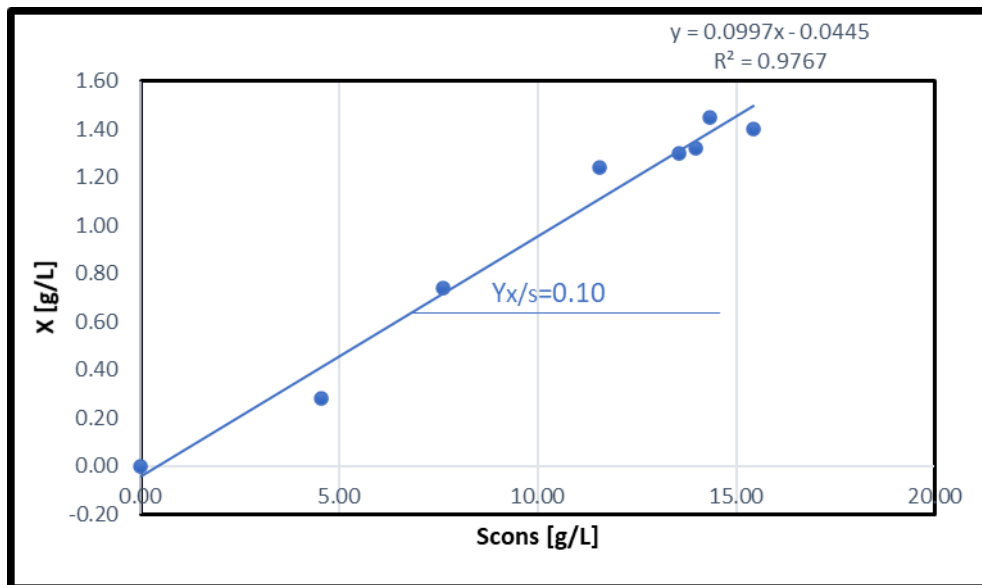
Το στέλεχος *C. tartarivorans* 5224 κατανάλωσε το 26% του υποστρώματος παράγοντας μέγιστη τιμή βιομάζας 1,40 g/L και μέγιστη απόδοση 10,8% μετά από 72 ώρες επώαση (Πίνακας 3.1.8-1). Όπως φαίνεται και στο Διάγραμμα 3.1.8-1, η δυναμική του μικροοργανισμού και η ικανότητα του για αξιοποίηση της γλυκερόλης ήταν πολύ μικρή, αφού μετά τις 120 ώρες επώασης τόσο η παραγωγή της βιομάζας όσο και η κατανάλωση του υποστρώματος που σημείωσε ήταν σχεδόν αμελητέα. Για το λόγο αυτόν δεν κατέστη δυνατή η πραγματοποίηση των περεταίρω αναλύσεων καθώς η βιομάζα δεν ήταν αρκετή.

Πίνακας 3.1.8-1: Αποτελέσματα της υγρής καλλιέργειας *G. tartarivorans* 5222 σε συγκέντρωση γλυκερόλης 60g/L. Όπου S_{rem} : υπολειπόμενη συγκέντρωση γλυκερόλης [g/L], S_{cons} : καταναλωθείσα γλυκερόλη [g/L], X : βιομάζα [g/L], L : ενδοκυτταρικό λίπος [g/L], IPS : ενδοπολυσακχαρίτες [g/L], $Y_{x/s}$: συντελεστής απόδοσης παραγόμενης βιομάζας προς S_{cons} (g/g), $Y_{L/x}$: συντελεστής απόδοσης παραγόμενου λίπους προς την αντίστοιχη βιομάζα. (g/g).

Time(h)	S_{rem} (g/L)	X (g/L)
0	58,6	0,0
24	54,0	0,28
48	51,0	0,74
72	47,0	1,24
96	45,0	1,30
120	44,6	1,32
144	44,2	1,45
168	43,1	1,40



Διάγραμμα 3.1.8-1: Κινητικά δεδομένα για την μεταβολή βιομάζας X [g/L] και του αρχικού υποστρώματος G_{lol} [g/L], του στελέχους *C.tartarivorans* 5224.



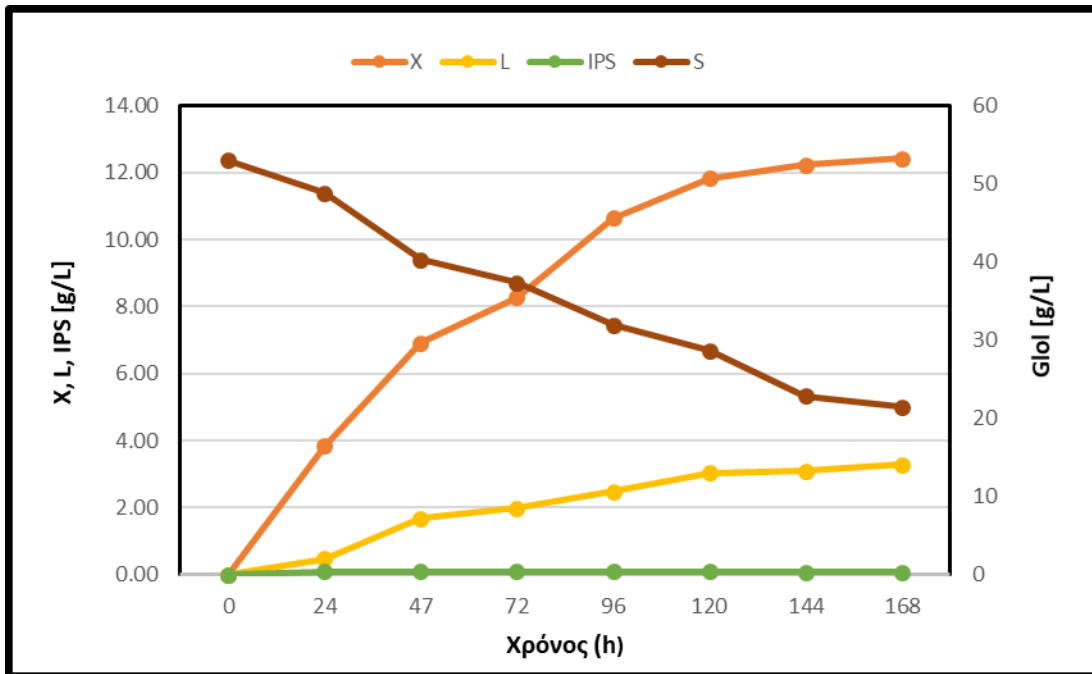
Διάγραμμα 3.1.8-2: Παραγωγή βιομάζας του στελέχους *C.tartarivorans* 5224 ως προς το καταναλωθέν υπόστρωμα όπου $Y_{x/s}$: συντελεστής απόδοσης παραγόμενης βιομάζας προς S_{cons} (g/g) και S_{cons} : καταναλωθέν υπόστρωμα γλυκερόλης [g/L].

3.1.9 Ζύμωση του στελέχους *Rh. toruloides* Y-6985

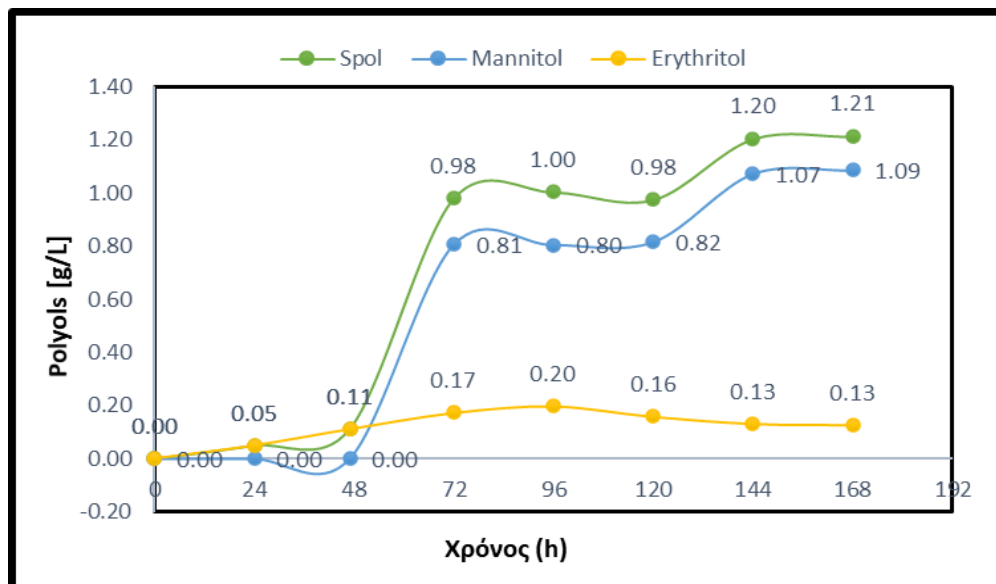
Το στέλεχος *Rh. toruloides* Y-6985 παρουσίασε σημαντική παραγωγή βιομάζας (12,41 g/L) με μέγιστη απόδοση 39,41%, επιτυγχάνοντας 60% κατανάλωση γλυκερόλης (Πίνακας 3.1.9-1). Όπως φαίνεται και στο Διάγραμμα 3.1.9-1, επέκταση του χρόνου επώασης μπορεί να οδηγήσει σε ενδεχόμενη επιπλέον μείωση του υποστρώματος, ενώ η μεγάλη αύξηση της βιομάζας οφείλεται και στη συσσώρευση παραγόμενου ενδοκυτταρικού λίπους. Η μέγιστη τιμή παραγωγής ενδοκυτταρικού λίπους ήταν 3,28 g/L με μέγιστη απόδοση 54,97% στο τέλος της επώασης. Τα ποσά παραγωγής ενδοπολυσακχαριτών παρέμειναν χαμηλά όπως στους περισσότερους μικροοργανισμούς (0,3-0,4 g/L), ενώ παρατηρήθηκε ελάχιστη παραγωγή μαννιτόλης (1,09 g/L στις 168 ώρες) και ερυθριτόλης (0,2 g/L στις 96 ώρες). Στο Διάγραμμα 3.1.9-2 παρουσιάζεται η κινητική παραγωγής του συνολικού αριθμού πολυολών.

Πίνακας 3.8: Αποτελέσματα της υγρής καλλιέργειας *Rh. toruloides* Y-6985 σε συγκέντρωση γλυκερόλης 60g/L. Όπου S_{rem} : υπολειπόμενη συγκέντρωση γλυκερόλης [g/L], X : βιομάζα [g/L], L : ενδοκυτταρικό λίπος [g/L], IPS : ενδοπολυσακχαρίτες [g/L], $Y_{L/x}$: συντελεστής απόδοσης παραγόμενου λίπους προς την αντίστοιχη βιομάζα. (g/g).

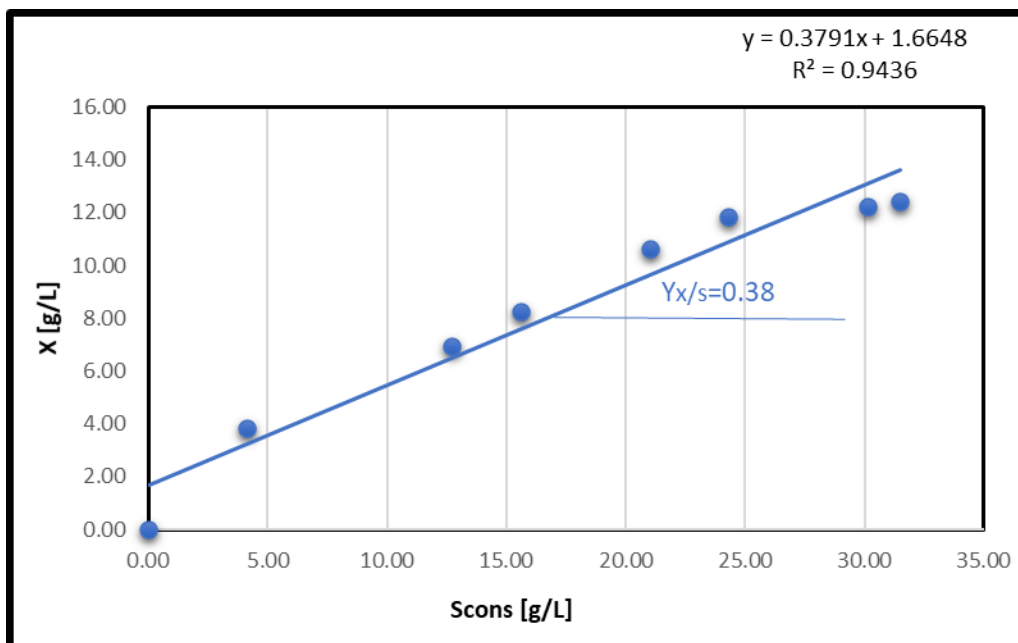
Time(h)	S_{rem} (g/L)	X (g/L)	L (g/L)	IPS(g/L)	IPS (%)	$Y_{L/x}$ (%)
0	52,94	0,0	0,0	0,0	0	0
24	48,82	3,83	0,48	0,09	3,34	12,47
48	40,24	6,92	1,67	0,10	3,75	24,16
72	37,34	8,27	1,98	0,10	3,73	23,95
96	31,94	10,64	2,47	0,09	3,34	23,22
120	28,66	11,83	3,04	0,09	3,48	25,70
144	22,81	12,22	3,10	0,08	3,00	8,75
168	21,45	12,41	3,28	0,07	2,77	19,94



Διάγραμμα 3.1.9-1: Κινητικά δεδομένα για την μεταβολή βιομάζας X [g/L], του αρχικού υποστρώματος [g/L], της παραγωγής λίπους [SCO g/L] και των ενδοπολυσακχαριτών [IPS g/L] του στελέχους *Rh. Toruloides Y-6985*.



Διάγραμμα 3.1.9-2: Παραγωγή μαννιτόλης και ερυθριτόλης του στελέχους *Rh. Toruloides Y-6985*, σε αρχική συγκέντρωση υποστρώματος γλυκερόλης 60g/L



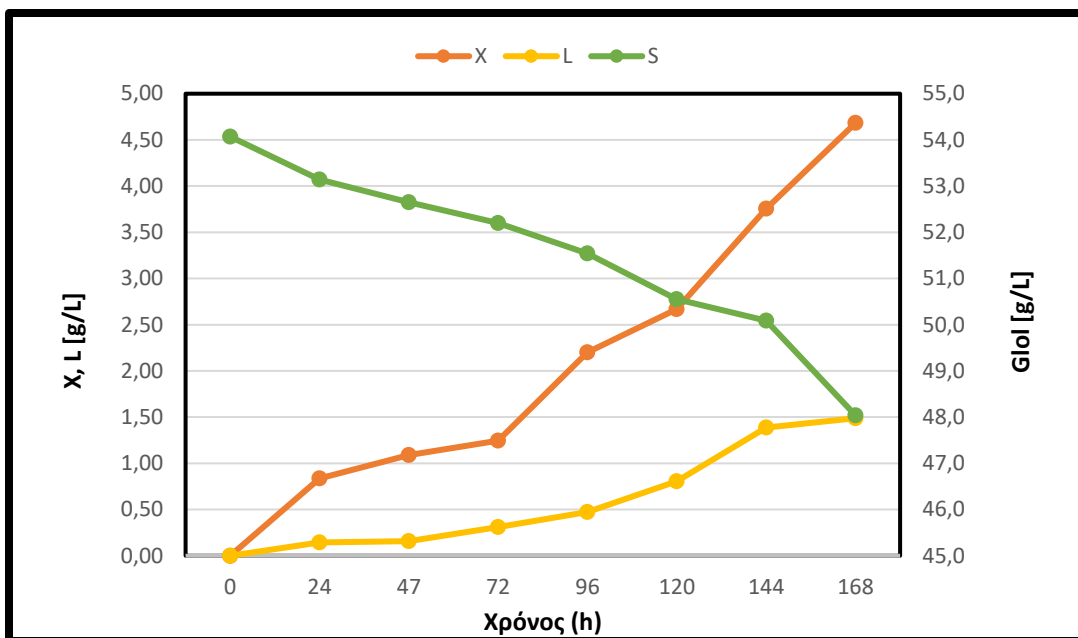
Διάγραμμα 3.1.9-3: Παραγωγή βιομάζας του στελέχους *Rh. toruloides* Y-6985 ως προς το καταναλωθέν υπόστρωμα όπου $Y_{x/s}$: συντελεστής απόδοσης παραγόμενης βιομάζας προς S_{cons} (g/g) και S_{cons} : καταναλωθέν υπόστρωμα γλυκερόλης [g/L].

3.1.10 Ζύμωση του στελέχους *Rh. toruloides* Y-1588

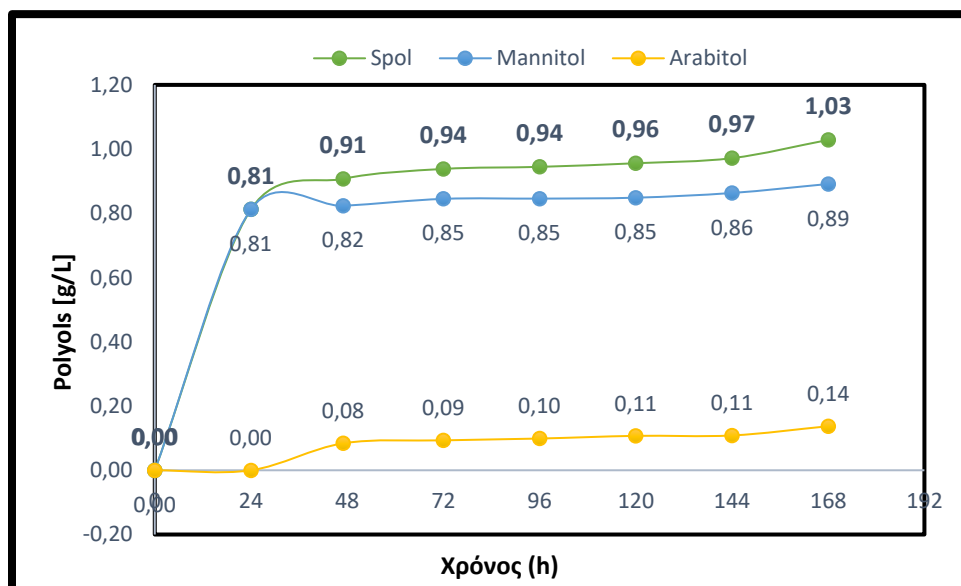
Το στέλεχος *Rh. toruloides* Y-1588 δεν απέδωσε σημαντικά στην παραγωγή βιομάζας και μόνο 11% του υποστρώματος καταναλώθηκε (Πίνακας 3.1.10-1). Σύμφωνα με το Διάγραμμα 3.1.10-1, όπου παρατηρούμε μια συνεχόμενη αυξητική πορεία της βιομάζας και συνεχόμενη κατανάλωσης του υποστρώματος, ενδεχομένως το συγκεκριμένο στέλεχος να χρειαζόταν μεγαλύτερο χρόνο επώασης προκειμένου να προσαρμοστεί στο υπόστρωμα γλυκερόλης. Παρατηρήθηκε επίσης παραγωγή ενδοκυτταρικού λίπους με τιμή 1,4-1,5 g/L και μέγιστη απόδοση 36,95%. Καθόλου παραγωγή ενδοπολυσακχαριτών δεν σημειώθηκε, ενώ από τις πολυόλες που αναλύθηκαν εντοπίστηκαν μικρά ποσά αραβιτόλης και 0,89 g/L μέγιστη τιμή μαννιτόλης. Στο Διάγραμμα 3.1.10-2 παρουσιάζεται η κινητική παραγωγής του συνολικού αριθμού πολυολών ο οποίος μετά τις 24 ώρες επώασης μένει στάσιμος.

Πίνακας 3.1.10-1: Αποτελέσματα της υγρής καλλιέργειας *R. toruloides* Y-1588 σε συγκέντρωση γλυκερόλης 60g/L. Όπου S_{rem} : υπολειπόμενη συγκέντρωση γλυκερόλης[g/L], S_{cons} : καταναλωθείσα γλυκερόλη[g/L], X : βιομάζα [g/L], L : ενδοκυτταρικό λίπος [g/L], IPS : ενδοπολυσακχαρίτες [g/L], $Y_{x/s}$: συντελεστής απόδοσης παραγόμενης βιομάζας προς S_{cons} (g/g), $Y_{L/x}$: συντελεστής απόδοσης παραγόμενου λίπους προς την αντίστοιχη βιομάζα. (g/g).

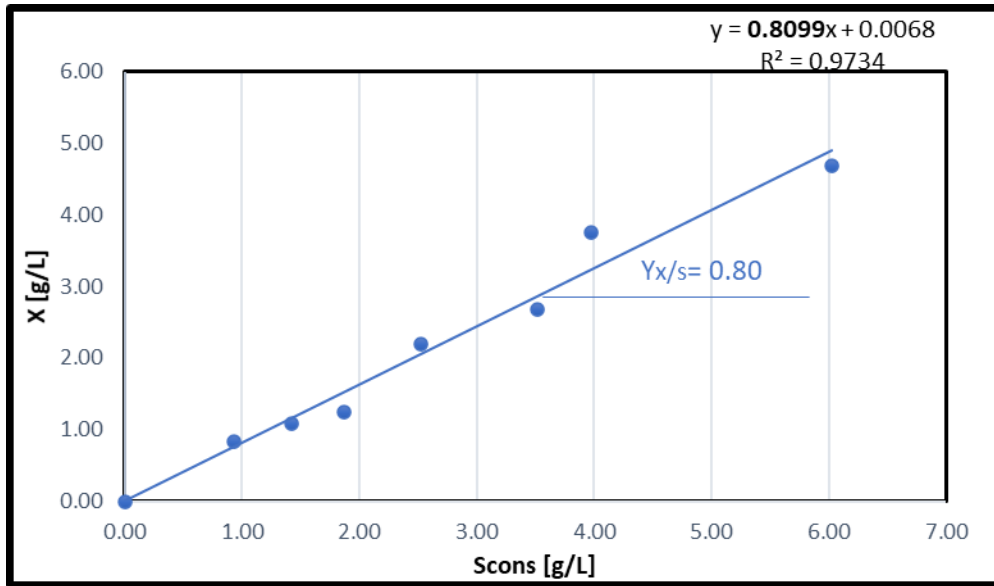
Time(h)	S_{rem} (g/L)	X (g/L)	L (g/L)	$Y_{L/x}$ (%)
0	54,07	0,0	0,0	0
24	53,14	0,84	0,14	17,22
48	52,65	1,09	0,16	14,42
72	52,20	1,24	0,31	24,92
96	51,54	2,20	0,47	18,24
120	50,	2,67	0,81	30,19
144	50,09	3,76	1,39	36,95
168	48,04	4,68	1,49	31,78



Διάγραμμα 3.1.10-1 : Κινητικά δεδομένα για την μεταβολή βιομάζας X[g/L], του αρχικού υποστρώματος [g/L], της παραγωγής λίπους [SCO g/L] και των ενδοπολυσακχαριτών [IPS g/L] του στελέχους Rh.Toruloides Y-1588.



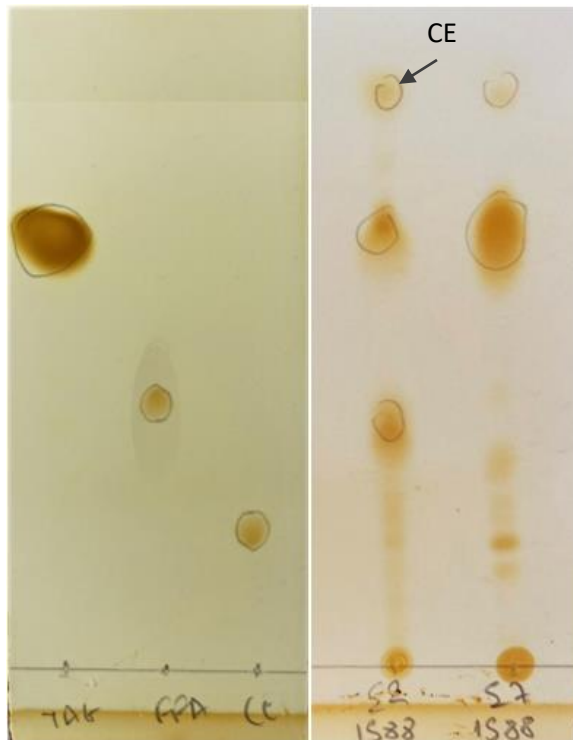
Διάγραμμα 3.1.10-2 : Παραγωγή μαννιτόλης και αραβιτόλης του στελέχους Rh.Toruloides Y-6985, σε αρχική συγκέντρωση υποστρώματος γλυκερόλης 60g/L



Διάγραμμα 3.1.9-3: Παραγωγή βιομάζας του στελέχους *Rh. toruloides* Y-1588 ως προς το καταναλωθέν υπόστρωμα όπου $Y_{x/s}$: συντελεστής απόδοσης παραγόμενης βιομάζας προς S_{cons} (g/g) και S_{cons} : καταναλωθέν υπόστρωμα γλυκερόλης [g/L].

3.2 Ανάλυση ενδοκυτταρικού λίπους με TLC

3.2.1 Μικροοργανισμός *Rh. toruloides* 1588

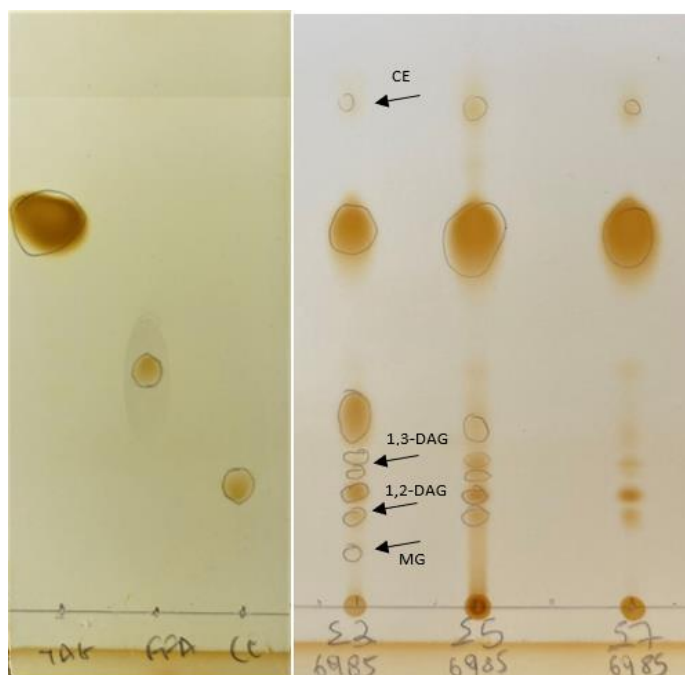


Εικόνα 3.2.1-1: Ανάλυση μικροβιακού λίπους με TLC του μικροοργανισμού *Rh. toruloides* 1588. Όπου: TAG – Τριγλυκερίδια, FFA – ελεύθερα λιπαρά οξέα, CL – χοληστερόλη, CE – εστέρες χοληστερόλης. Σημεία ανάλυσης: S2 – 48 ώρες, S7 – 168 ώρες.

Η ανάλυση του παραγόμενου ενδοκυτταρικού λίπους του μικροοργανισμού *Rh. toruloides* Y-1588 με TLC πραγματοποιήθηκε στις 48 και στις 168 ώρες επώασης, όπου είχε συνολικό ενδοκυτταρικό λίπος 0,16 g/L και 1,49 g/L, αντίστοιχα. Η ανάλυση των κλασμάτων του παραγόμενου κυτταρικού λίπους έδειξε την παρουσία τριγλυκεριδίων έπειτα από 48 ώρες επώαση, των οποίων η συγκέντρωση δείχνει να αυξάνεται στις 168 ώρες (Εικόνα 3.2.1-1). Επίσης, στο δείγμα ταυτοποιήθηκε η παρουσία ελεύθερων λιπαρών οξέων στις 48 ώρες, τα οποία φαίνεται να έχουν καταναλωθεί από τον μικροοργανισμό έπειτα από 168 ώρες. Στα δείγματα επιβεβαιώθηκε και η παρουσία χοληστερόλης η οποία φαίνεται πιο έντονη μετά από 168 ώρες ανάπτυξης του μικροοργανισμού. Οι μπάντες που αχνοφαίνονται πάνω και κάτω από την μπάντα της χοληστερόλης ενδεχομένως αφορούν 1,3-διακυλογλυκερόλες (1,3-DAG) και 1,2-

διακυλογλυκερόλες (1,2-DAG), αντίστοιχα, ενώ οι τέρμα πάνω μπάντες αφορούν εστέρες χοληστερόλης, σύμφωνα με την ανάλυση λιπιδίων στο Cyberlipid (<http://cyberlipid.gerli.com/>).

3.2.2 Μικροοργανισμός *Rh. toruloides* 6985

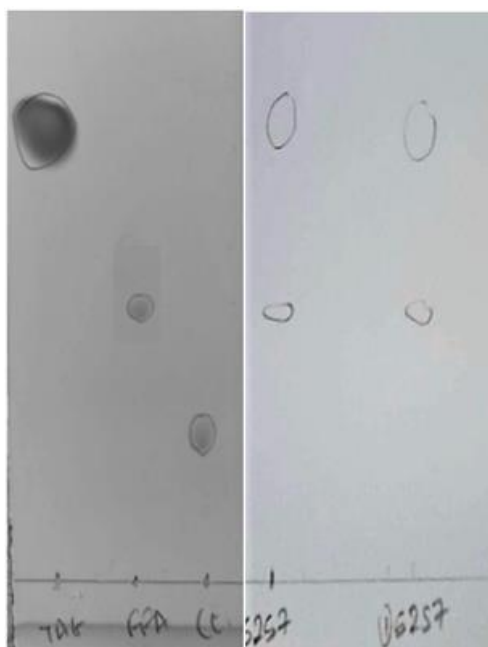


Εικόνα 3.2.2-1: Ανάλυση μικροβιακού λίπους με TLC του μικροοργανισμού *Rh. toruloides* 6985. Όπου TAG – Τριγλυκερίδια, FFA – ελεύθερα λιπαρά οξέα, CL – χοληστερόλη. Επιπλέον σημεία: CE – εστέρες χοληστερόλης, 1,3-DAG – 1,3-διακυλογλυκερόλη, 1,2-DAG – 1,2-διακυλογλυκερόλη, MG – μονοακυλογλυκερόλη. Ώρες ανάλυσης: S2 – 48, S5 – 120, S7 – 168.

Η ανάλυση του παραγόμενου ενδοκυτταρικού λίπους του μικροοργανισμού *R. toruloides* 6985 με TLC πραγματοποιήθηκε στις 48 ώρες, στις 120 ώρες και στις 168 ώρες επώασης, όπου είχε συνολικό ενδοκυτταρικό λίπος 1,67 g/L, 3,04 g/L και 3,28 g/L, αντίστοιχα. Η ανάλυση των κλασμάτων του παραγόμενου κυτταρικού λίπους έδειξε σε όλα τα σημεία που αναλύθηκαν την παρουσία τριγλυκεριδίων, καθώς και χοληστερόλης (Εικόνα 3.2.2-1). Επίσης, στο δείγμα

ταυτοποιήθηκε η παρουσία ελεύθερων λιπαρών οξέων στις 48 ώρες, τα οποία φαίνεται να καταναλώνονται από τον μικροοργανισμό έπειτα από 120 και 168 ώρες. Οι μπάντες που φαίνονται πάνω και κάτω από την μάντα της χοληστερίνης ενδεχομένως αφορούν 1,3-διακυλγλυκερόλες (1,3-DAG) και 1,2-διακυλγλυκερόλες (1,2-DAG), αντίστοιχα, ενώ οι τέρμα πάνω μπάντες αφορούν εστέρες χοληστερόλης, σύμφωνα με την ανάλυση λιπιδίων στο Cyberlipid (<http://cyberlipid.gerli.com/>). Επιπλέον, στις 48 ώρες φαίνεται η παρουσία μονοακυλγλυκερόλης (MAG) στο παραχθέν κυτταρικό λίπος, ενώ δεν υπάρχει στο παραχθέν κυτταρικό λίπος στις επόμενες ώρες ανάπτυξης του μικροοργανισμού.

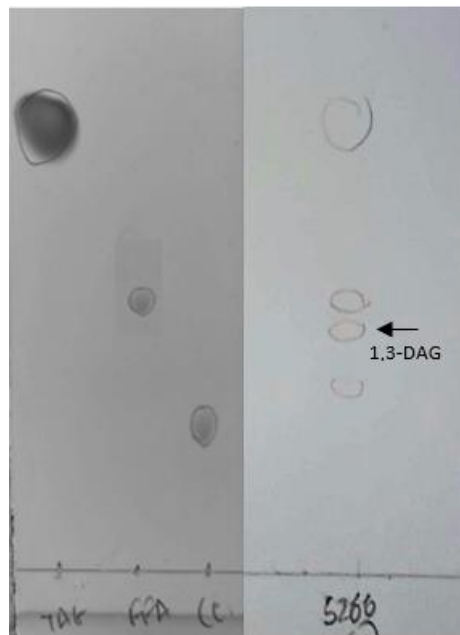
3.2.3 Μικροοργανισμός *Pichia fermentans* 5257



Εικόνα 3.2.3-1: Ανάλυση μικροβιακού λίπους με TLC του μικροοργανισμού *Pichia fermentans* 5257 μετά από 24 ώρες επώαση. Όπου TAG – Τριγλυκερίδια, FFA – ελεύθερα λιπαρά οξέα, CL – χοληστερόλη.

Η ανάλυση των κλασμάτων του παραγόμενου ενδοκυτταρικού λίπους του μικροοργανισμού *Pichia fermentans* 5257 μετά από 24 ώρες επώαση (συνολικό ενδοκυτταρικό λίπος 0,98 g/L) έδειξε την παρουσία τριγλυκεριδίων και ελεύθερων λιπαρών οξέων (Εικόνα 3.2.3-1).

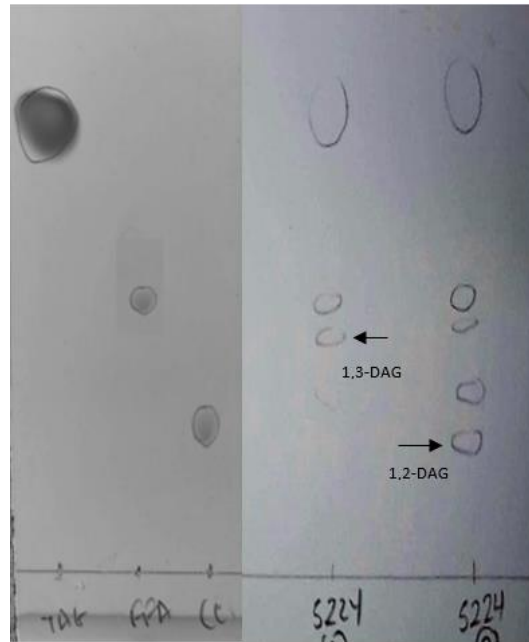
3.2.4 Μικροοργανισμός *Candida zeylanoides* 5266



Εικόνα 3.2.4-1. Ανάλυση μικροβιακού λίπους με TLC του μικροοργανισμού *Candida zeylanoides* 5266 μετά από 168 ώρες επώαση. Όπου TAG – Τριγλυκερίδια, FFA – ελεύθερα λιπαρά οξέα, CL – χοληστερόλη, 1,3-DAG – 1,3-διακυλογλυκερόλη.

Η ανάλυση των κλασμάτων του παραγόμενου ενδοκυτταρικού λίπους του μικροοργανισμού *Candida zeylanoides* 5266 μετά από 96 ώρες επώαση (συνολικό ενδοκυτταρικό λίπος 1,60 g/L) έδειξε την παρουσία τριγλυκεριδίων, ελεύθερων λιπαρών οξέων, καθώς και παρουσία χοληστερίνης και 1,3-διακυλογλυκερόλης (Εικόνα 3.2.4-1).

3.2.5 Μικροοργανισμός *Candida tartarivorans* 5222



Εικόνα 3.2.5-1: Ανάλυση μικροβιακού λίπους με TLC του μικροοργανισμού *Candida tartarivorans* 5222 μετά από 48 και 168 ώρες επώαση. TAG – Τριγλυκερίδια, FFA – ελεύθερα λιπαρά οξέα, CL – χοληστερόλη, 1,3-DAG – 1,3-διακυλογλυκερόλη, 1,2-DAG – 1,2-διακυλογλυκερόλη.

Η ανάλυση του παραγόμενου ενδοκυτταρικού λίπους του μικροοργανισμού *Candida tartarivorans* 5222 με TLC πραγματοποιήθηκε στις 144 και στις 168 ώρες επώασης, όπου είχε συνολικό ενδοκυτταρικό λίπος 0,91 g/L και 2,01 g/L, αντίστοιχα. Η ανάλυση των κλασμάτων του παραγόμενου κυτταρικού λίπους έδειξε την παρουσία τριγλυκεριδίων, ελεύθερων λιπαρών οξέων, καθώς και παρουσία 1,3-διακυλογλυκερόλης μετά από 144 ώρες ανάπτυξης του μικροοργανισμού. Ανάλυση του κυτταρικού λίπους μετά από 168 ώρες επώασης έδειξε επίσης και παρουσία χοληστερόλης και 1,2-διακυλογλυκερόλης (Εικόνα 3.2.5-1).

3.3 Ανάλυση ενδοκυτταρικού λίπους με GC

Με την βοήθεια της αέριας χρωματογραφίας βρέθηκε ότι το μικροβιακό λίπος, που παράχθηκε από τα παρακάτω στελέχη, αποτελείται από τα ακόλουθα λιπαρά οξέα :

Πίνακας 3.3-1: Σύσταση των λιπιδίων σε λιπαρά οξέα των στελεχών με απόδοση $Y_{l/x} \geq 20\%$ και αρχικής συγκέντρωσης γλυκερόλης 60 g/L.

Λιπαρά οξέα%						
Στέλεχος	Time(h)	C 16:0	C 18:0	C 18:1	C 18:2	C 20:0
<i>P. fermentans</i> 5257	168	24,73	6,35	35,82	12,89	20,21
<i>C. zeylanoides</i> 5266	168	35,12	8,372	44,26	10,56	-
<i>C. tartarivorans</i> 5222	168	30,50	9,32	47,90	10,21	-
<i>Rh. Toruloides</i> Y-6985	168	24,48	12,29	59,32	2,13	-
<i>Rh. Toruloides</i> Y-1588	168	26,32	10,56	56,71	2,01	-

Συνθήκες καλλιέργειας: Ασυνεχής ζύμωση σε ανακινούμενες κωνικές φιάλες (180±5 gpm), T=28±1 °C, αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης $S_{Glc}=60$ g/L, pH=6,0±0,2 υπό αερόβιες και περιοριστικές σε άζωτο συνθήκες.

T (h): χρόνος ζύμωσης.
C 16:0: Παλμιτικό οξύ
C 18:0: Στεατικό οξύ
C 18:1: Ελαϊκό οξύ
C 18:2: Λινελαϊκό οξύ
C 20:0 : Αραχιδικό οξύ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η πηγή άνθρακα η οποία χρησιμοποιείται για την καλλιέργεια μικροοργανισμών προς την παραγωγή προϊόντων προστιθέμενης αξίας επηρεάζει σε σημαντικό βαθμό το κόστος αλλά και την απόδοση των προϊόντων αυτών. Η ακάθαρτη γλυκερόλη η οποία προέρχεται από την παραγωγή βιοντίζελ ως παραπροϊόν της διαδικασίας αυτής, είναι μια σημαντική πηγή άνθρακα καθώς το κόστος της είναι σχεδόν μηδενικό. Ως αναφέρθηκε και στα προηγούμενα εδάφια, το ανωτέρω υλικό είναι μια ανανεώσιμη πηγή άνθρακα η οποία παράγεται σε διεθνές και Ελληνικό επίπεδο με διαρκώς αυξανόμενους ρυθμούς ως το κύριο υποπροϊόν των βιομηχανιών παραγωγής σαπώνων και λοιπών ελαιοχημικών υλικών, καθώς και των βιομηχανιών παραγωγής οιονοπνευματωδών ποτών και βιοαιθανόλης. Επίσης, η συνεχής και αλματώδης αύξηση της χρήσης του βιοντίζελ (αλκυλεστέρες λιπαρών οξέων προερχόμενοι από μετεστεροποίηση διαφόρων τύπων λιπών και ελαίων) αναμένεται τα επόμενα χρόνια να έχει ως απόρροια ακόμη περισσότερο σημαντική αύξηση της παρουσίας της γλυκερόλης ως ενός χαμηλού κόστους προϊόντος στην αγορά, δεδομένου ότι η γλυκερόλη είναι το κυριότερο παράπλευρο προϊόν το οποίο παράγεται από τη διεργασία αυτή (Paranikolaou & Aggelis 2009; Koutinas et al., 2014a). Από 10 kg ελαίου που υφίσταται μεθυλίωση, παράγεται 1 kg γλυκερόλης (καθαρότητας ~90% κ.β.) ως παραπροϊόντος της διεργασίας, ενώ από εικοσαετίας για την Ευρώπη και περίπου από δεκαετίας για την Ελλάδα, το εναλλακτικό αυτό καύσιμο χρησιμοποιείται ως συμπληρωματικό καύσιμο στους κινητήρες εσωτερικής καύσης διαφόρων τύπων αυτοκινήτων και λεωφορείων, με την τάση παραγωγής αυτού, και συνεπώς της γλυκερόλης, να είναι αυξητική (Koutinas et al., 2014a). Καθίσταται προφανές και επιτακτικό συνεπώς, να υπάρχει η δυνατότητα εξεύρεσης (πολλών και ποικίλων) λύσεων αναφορικά με την οικολογική και φιλική προς το περιβάλλον διαχείριση της γλυκερόλης.

Η γλυκερόλη που διατίθεται στην αγορά μπορεί να χωριστεί σε ακατέργαστη, καθαρή και εμπορική γλυκερόλη με σημαντικές διαφορές και μεγάλη διάκριση μεταξύ ακατέργαστης και καθαρής. Η τελευταία παράγεται κατά τον καθαρισμό της ακατέργαστης γλυκερόλης. Η περιεκτικότητα σε τέφρα και άλλων προσμίξεων στην ακατέργαστη γλυκερόλη είναι η υψηλότερη και αυτή εμφανίζει υψηλή τιμή pH λόγω αυτών. Γενικά, η σύνθεση της γλυκερόλης μπορεί να διαφέρει αρκετά αναλόγως την προέλευση των πρώτων υλών και άλλων παραμέτρων και ο συνδυασμός αυτών μπορεί να επιφέρει είτε θετικές, είτε αρνητικές συνέπειες στην μικροβιακή αύξηση και στον σχηματισμό προϊόντων. (Chong, C., Aqsha, A., Ayoub, M., Sajid, M., Abdullah, A. Z., Yusup, S., & Abdullah, B., 2020)

Σε αυτό το κεφάλαιο εξετάζονται οι παραγόμενες ποσότητες σε βιομάζα, μεταβολικά προϊόντα, ενδοκυτταρικά λιπίδια και ενδοπολυσακχαρίτες, καθώς και οι αποδόσεις είτε προς το καταναλωθέν υπόστρωμα είτε ως προς την παραγόμενη βιομάζα.

4.1 Σύγκριση και αξιολόγηση (screening) των 10 στελεχών σε κωνικές φιάλες (S0 60 g/L)

Τα ευρήματα του πρώτου σταδίου της πειραματικής διαδικασίας που προκύπτουν από τους υπολογισμούς των παραμέτρων της μικροβιακής αύξησης και αποτέλεσαν τα κριτήρια για την επιλογή των στελεχών που χρησιμοποιήθηκαν στο δεύτερο πείραμα είναι η μέγιστη παραγόμενη βιομάζα, η μέγιστη συγκέντρωση μικροβιακού λίπους, η μέγιστη συγκέντρωση ενδοπολυσακχαριτών και η μέγιστη απόδοση λιπιδίων προς την μέγιστη παραγόμενη βιομάζα όπως παρατίθενται παρακάτω.

Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας αναφορικά με την παραγωγή ξηράς μικροβιακής μάζας συγκεφαλαιώνονται στον Πίνακα 4.1-1.

Πίνακας 4.1-1: Μέγιστη παραγωγή βιομάζας σε υπόστρωμα βιομηχανικής γλυκερόλης, συγκέντρωσης 60 g/L, ανά στέλεχος. S_{cons} : καταναλωθέν υπόστρωμα (g/L), X: βιομάζα (g/L), $Y_{x/s}$: συντελεστής απόδοσης βιομάζας προς καταναλωθέν υπόστρωμα (g/g , %).

Στέλεχος μικροοργανισμού	Time(h)	S_{cons} [g/L]	X [g/L]	$Y_{x/s}$ %
<i>Pichia fermentans</i> 5257	144	32,5	10,2	31,49
<i>Pichia fermentans</i> 5265	168	16,2	5,5	28,10
<i>Candida zeylanoides</i> 5266	168	36,9	9,9	26,72
<i>Candida inconspicua</i> 5293	168	14,9	5,5	29,78
<i>Candida inconspicua</i> 5292	168	9,3	3,9	41,35
<i>Geotrichum candidum</i> 5274	168	27,0	9,7	35,79
<i>Candida tartarivorans</i> 5222	144	27,8	5,5	36,61
<i>Rhodosporidium toruloides</i> Y-6985	168	31,5	12,4	54,97
<i>Rhodosporidium toruloides</i> Y-1588	168	6,0	4,7	77,64

Η μέγιστη συγκέντρωση βιομάζας στις υγρές καλλιέργειες με αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης 60 g/L παρατηρήθηκε από το στέλεχος *Rh. toruloides* Y-6985 στις 168 ώρες καλλιέργειας. Σχεδόν σε όλα τα στελέχη ο συντελεστής απόδοσης βιομάζας στο σημείο της μέγιστης παραγωγής τους, είχε τιμές $Y_{x/s} > 30\%$. Η ερμηνεία που μπορεί να δοθεί στο γεγονός αυτό είναι ότι ο λόγος C/N ευνόησε την παραγωγή της βιομάζας.

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

Πίνακας 4.1-2: Παραγωγή ξηράς κυτταρικής μάζας (X, g/L) από ποικίλα στελέχη ζυμών καλλιεργούμενα στη γλυκερόλη υπό διάφορες συνθήκες καλλιέργειας (YX/S, g/g, είναι ο αντίστοιχος συντελεστής απόδοσης της παραγόμενης βιομάζας (δεδομένα από *Paranikolaou et al., 2017*).

Strain	Culture mode	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 ^a	≈0.45*
<i>Yarrowia phangngensis</i> CBS 10407	Shake flasks	≈40-44 ^a	≈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
<i>Rhodospiridium toruloides</i> Y-6985*	Shake flasks	12.4	0.39
<i>Candida zeylanoides</i> 5266*	Shake flasks	9.9	0.27
<i>Pichia fermentans</i> 5257*	Shake flasks	10.2	0.31

*Παρούσα μελέτη

Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας αναφορικά με την παραγωγή μικροβιακών ελαίων συγκεφαλαιώνονται στον Πίνακα 4.1-3.

Πίνακας 4.1-3: Μέγιστη παραγωγή μικροβιακών λιπιδίων σε υπόστρωμα βιομηχανικής γλυκερόλης, συγκέντρωσης 60 g/L, ανά στέλεχος. L : παραγόμενο μικροβιακό λίπος g/L, $Y_{L/X}$: το ποσοστό του παραγόμενου μικροβιακού λίπους προς την παραγόμενη βιομάζα (g/g , %).

Στέλεχος μικροοργανισμού	Χρόνος(h)	L [g/L]	$Y_{L/X}$ (%)
<i>Pichia fermentants</i> 5257	144	2.2	21.31
<i>Pichia fermentants</i> 5265	96	0.3	7.11
<i>Candida zeylanoides</i> 5266	168	1.5	15.01
<i>Candida inconspicua</i> 5293	47	1.0	25.97
<i>Candida inconspicua</i> 5292	24	0.6	16.83
<i>Geotrichum candidum</i> 5274	168	1.8	18.43
<i>Candida tartarivorans</i> 5222	144	2.0	19.78
<i>Rhodospiridium toruloides</i> Y-6985	168	3.3	18.94
<i>Rhodospiridium toruloides</i> Y-1588	168	1.5	31.78

Η μέγιστη συγκέντρωση μικροβιακού λίπους, στις υγρές καλλιέργειες και με αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης 60 g/L, παρατηρήθηκε από το στέλεχος *Rh. toruloides* Y-6985 στις 168 ώρες καλλιέργειας. Στην περίπτωση που αφορά το ενδοκυτταρικό λίπος, ο λόγος C/N δείχνει να μην ευνοεί σε όλους τους μικροοργανισμούς την παραγωγή λιπιδίων, για το λόγο ότι δεν επιτεύχθηκαν υψηλές συγκεντρώσεις λιπιδίων και το ποσοστό του παραγόμενου

μικροβιακού λίπους προς την παραγόμενη βιομάζα δεν ξεπέρασε σε πολλά σημεία το 20% ενώ όποτε έγινε αυτό δεν συνδυάστηκε με υψηλές συγκεντρώσεις.

Ενδεικτικά αποτελέσματα παραγωγής μικροβιακών ελαίων κατά την καλλιέργεια στελεχών ζυμών στη γλυκερόλη, παρατίθενται στον πιο κάτω πίνακα (δεδομένα από *Papanikolaou et al., 2017*).

Πίνακας 4.1-4: Παραγωγή λιπιδίων (L, g/L) από ποικίλα στελέχη ζυμών καλλιεργούμενα στη γλυκερόλη υπό διάφορες συνθήκες καλλιέργειας ($Y_{L/x}$, g/g, είναι ο αντίστοιχος συντελεστής απόδοσης του παραγόμενου λίπους (δεδομένα από *Papanikolaou et al., 2017*).

Strain	Culture mode	L (g/L)	Lipid in DCW (% w/w)
<i>Yarrowia lipolytica</i> LGAM S(7)1	Repeated-batch bioreactor	5.8	23.5
<i>Yarrowia lipolytica</i> NCYC 3825	Fed-batch bioreactor	13.0	30.9
<i>Yarrowia lipolytica</i> LGAM S(7)1	Single stage continuous	3.5	43.0
<i>Yarrowia lipolytica</i> JMY 4086	Fed-batch bioreactor	22.6	46.0
<i>Rhodospiridium toruloides</i> Y4	Shake flasks	12.2	48.9
<i>Rhodospiridium toruloides</i> DSM 4444	Batch bioreactor	≈8.6	≈57.0
<i>Rhodospiridium toruloides</i> DSM 4444	Shake flasks	8.1	29.0
<i>Lipomyces starkeyi</i> DSM 70296	Shake flasks	12.3	35.9
<i>Rhodospiridium toruloides</i> NRRL Y-27012	Shake flasks	12.0	40.0
<i>Rhodospiridium toruloides</i> AS2.1389	Shake flasks	9.2	47.7
<i>Rhodospiridium toruloides</i> AS2.1389	Batch bioreactor	18.5	69.5
<i>Rhodospiridium toruloides</i> AS 2.1389	Shake flasks	10.0	37.7
<i>Cryptococcus curvatus</i> ATCC 20509	Fed-batch bioreactor	29.5	25.0
<i>Yarrowia lipolytica</i> MUCL 28849	Fed-batch bioreactor	16.1	38.2
<i>Rhodotorula glutinis</i> BCRC 21418	Fed-batch bioreactor	27.8	62.1
<i>Rhodospiridium fluviale</i> DMKU-RK253	Batch bioreactor	9.0	63.8

<i>Rhodospiridium fluviale</i> DMKU-RK253	Shake flasks	16.0	69.5
<i>Rhodotorula glutinis</i> CICC 31596	Fed-batch bioreactor	16.3	53.0
<i>Yarrowia lipolytica</i> Wratislavia K1	Repeated-batch bioreactor	6.3	26.4
<i>Cryptococcus curvatus</i> ATCC 20509	Fed-batch bioreactor	10.8	49.0
<i>Cryptococcus curvatus</i> ATCC 20509	Fed-batch bioreactor	17.4	52.9
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	Shake flasks	3.0	40.0
<i>Rhodotorula glutinis</i> CICC 31596	Fed-batch bioreactor	5.8	34.6
<i>Kodamea ohmeri</i> BY4-523	Shake flasks	3.2	30.4
<i>Trichosporanoides spathulata</i> JU4-57	Fed Batch bioreactor	7.8	56.4
<i>Rhodospiridium toruloides</i> CBS 14	Shake flasks	2.0	34.6
<i>Rhodospiridium toruloides</i> Y4 ¶	Batch bioreactor	16.2	46.0
<i>Rhodotorula glutinis</i> TISTR 5159	Shake flasks	1.9	35.2
<i>Cryptococcus curvatus</i> ATCC 20509	Shake flasks	19.0	37.7
<i>Cryptococcus freyschussii</i> ATCC 18737	Fed-batch bioreactor	9.1	29.8
<i>Yarrowia lipolytica</i> ATCC 20460	Shake flasks	3.6	31.0
<i>Rhodospiridium toruloides</i> DSM 4444	Shake flasks	13.7	37.0
<i>Rhodospiridium toruloides</i> Y-6985*	Shake flasks	3.3	19.9
<i>Candida zeylanoides</i> 5266*	Shake flasks	1.5	19.5
<i>Pichia fermentans</i> 5257*	Shake flasks	2.2	21.3

*Παρούσα μελέτη

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

Πίνακας 4.1-5: Παραγωγή αραβιτόλης (g/L) από ποικίλα στελέχη ζυμών καλλιεργούμενα υπό διάφορες συνθήκες ζύμωσης.

Strain	Carbon source	Culture type	(g/L)	Reference
<i>Hansenula polymorpha</i> DSM 70277	Glucose	Batch-bioreactor	18.8	<i>Escalante et al., (1990)</i>
<i>Candida succiphila</i> Y-11998	Arabinose	Shake flasks	≈81	<i>Dien et al., (1996)</i>
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i> NRRL B-27,624	Glucose	Shake flasks	83.4	<i>Saha et al., (2007)</i>
<i>Debaryomyces hansenii</i> NRRL Y-7483	Glycerol	Shake flasks	14.5	<i>Koganti et al., (2011)</i>
<i>Debaryomyces hansenii</i> NRRL Y-7483	Glycerol	Batch bioreactor	40-43	<i>Koganti and Ju (2013)</i>
<i>Candida quercitrusa</i> NBRC 1022	Glycerol	Batch bioreactor	85.1	<i>Yoshikawa et al., (2014)</i>
<i>Debaryomyces hansenii</i> NRRL Y-7483	Soybean flour	Shake flasks	11.8	<i>Loman et al., (2017)</i>
<i>Debaryomyces</i> sp. FMCC Y ₆₉	Glycerol	Shake flasks	47.5	<i>Filippousi et al., (2019)</i>
<i>Debaryomyces</i> sp. FMCC Y ₆₉	Glycerol	Batch-bioreactor	29.4	<i>Filippousi et al., (2019)</i>

Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας αναφορικά με την παραγωγή ενδοπολυσακχαριτών συγκεφαλαιώνονται στον Πίνακα 4.1-6.

Πίνακας 4.1-6: Μέγιστη παραγωγή ενδοπολυσακχαριτών σε υπόστρωμα βιομηχανικής γλυκερόλης, συγκέντρωσης 60 g/L, ανά στέλεχος. IPS : παραγόμενοι ενδοπολυσακχαρίτες (g/L), X : παραγόμενη βιομάζα (g/L), IPS(%) : Το ποσοστό των παραγόμενων ενδοπολυσακχαριτών προς την παραγόμενη βιομάζα (g/g , %).

Στέλεχος μικροοργανισμού	Χρόνος(h)	IPS[g/L]	IPS(%)	X(g/L)
<i>Pichia fermentants</i> 5257	96	0.11	4.54	9.1
<i>Pichia fermentants</i> 5265	96	0.10	3.98	4.2
<i>Candida zeylanoides</i> 5266	120	0.18	3.22	8.9
<i>Candida inconspicua</i> 5293	72	0.08	3.22	4.1
<i>Candida inconspicua</i> 5292	96	0.09	3.53	3.6
<i>Geotrichum candidum</i> 5274	168	0.21	7.97	9.7
<i>Candida tartarivorans</i> 5222	48	0.08	3.12	4.2
<i>Rhodospiridium toruloides</i> Y-6985	48	0.10	3.75	7.0

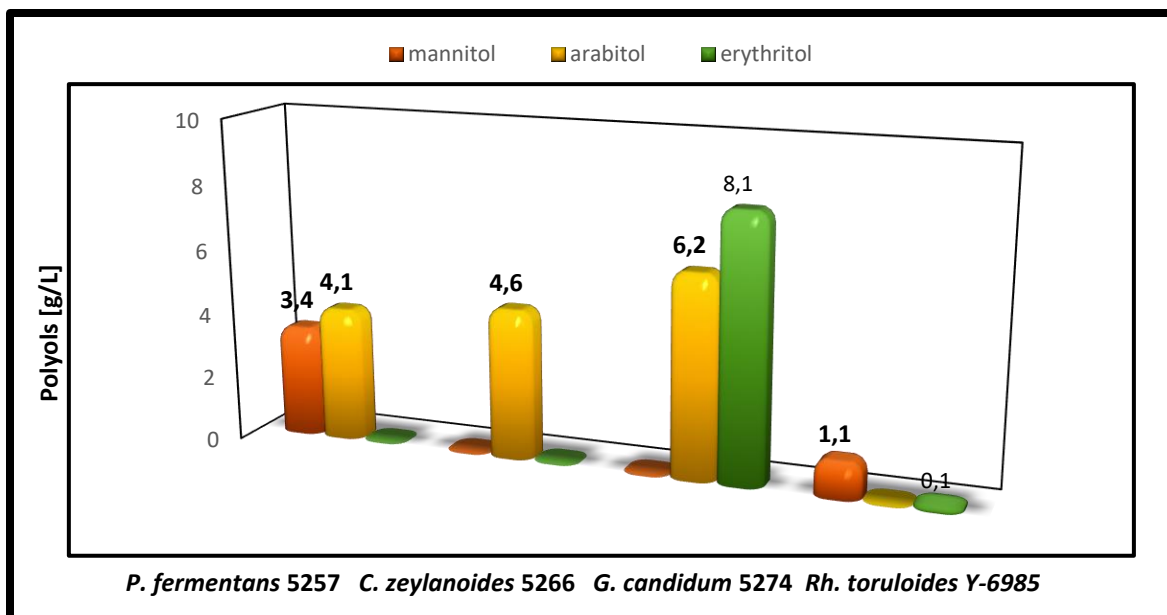
Η μέγιστη συγκέντρωση ενδοπολυσακχαριτών στις υγρές καλλιέργειες, με αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης 60 g/L, παρατηρήθηκε από τον μικροοργανισμό *Geotrichum candidum* 5274 στις 168 ώρες καλλιέργειας. Στην περίπτωση των παραγόμενων ενδοπολυσακχαριτών δεν εμφανίστηκαν υψηλές συγκεντρώσεις σχεδόν σε κανένα στέλεχος.

Τα συμπεράσματα των πειραμάτων είναι τα εξής :

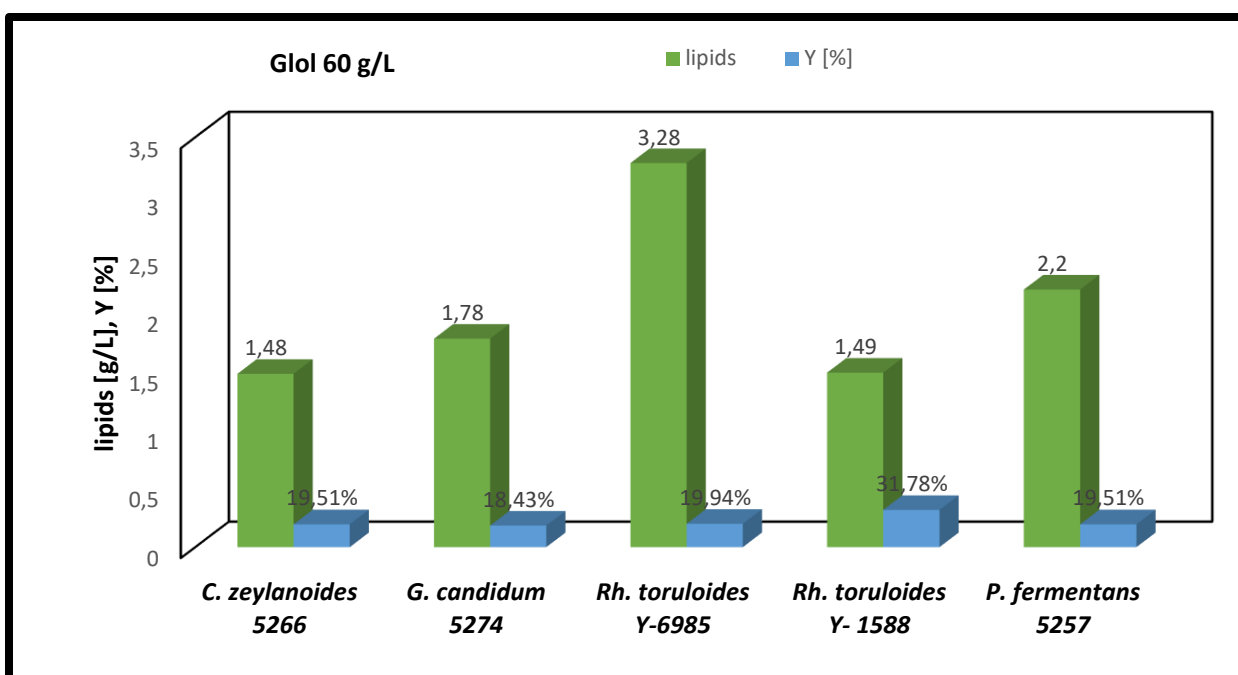
- Τα δύο στελέχη *Pichia fermentans* 5257 και *Rhodospiridium toruloides* Y-6985 παρουσίασαν ικανότητα στην κατανάλωση της βιομηχανικής γλυκερόλης και παράγαγαν σημαντική ποσότητα βιομάζας (10,2-12,4 g/L) καθώς και σημείωσαν την μεγαλύτερη παραγωγή λιπιδίων (2,2-3,3 g/L). Η ποσότητα των ενδοπολυσακχαριτών όμως δεν ξεπέρασε τα 0.1 g/L για κανέναν από τους δυο μικροοργανισμούς. Η παραγωγή των πολυολών αραβιτόλης και μαννιτόλης για το στέλεχος *P.fermentans* 5257 έφτασε τα 4,1 και 3,4 g/L αντίστοιχα.
- Τα στελέχη του γένους *Candida*, *C. inconspicua* 5293 και *C. inconspicua* 5292, παρουσίασαν μικρή ικανότητα κατανάλωσης της γλυκερόλης με μέγιστη ποσότητα βιομάζας 5,4 και 3,9 g/L. Η παραγωγή των ενδοκυτταρικών λιπιδίων μόλις που άγγιξε το 1 g/L και οι ενδοπολυσακχαρίτες ήταν επίσης σε χαμηλά επίπεδα (~ 0,1 g/L).
- Το στέλεχος *Rhodospiridium toruloides* Y-1588 δεν αναπτύχθηκε πλήρως στις 168 ώρες καλλιέργειας καθώς είχε καταναλώσει 6 g/L γλυκερόλης για αυτό και δεν ήταν εφικτός ο προσδιορισμός των ενδοπολυσακχαριτών. Παρόλα αυτά όμως από 4,7 g/L βιομάζας επιτεύχθηκε η παραγωγή 1,5 g/L ενδοκυτταρικού λίπους. Ο μικροοργανισμός αυτός παρουσίασε ένα άριστο συντελεστή απόδοσης παραγόμενης βιομάζας προς αναλωθείσα γλυκερόλη ($\approx 0,80$ g/g).
- Τα στελέχη *Candida zeylanoides* 5266 και *Geotrichum candidum* 5274 παρουσίασαν ικανοποιητική κατανάλωση υποστρώματος με την βιομάζα να κυμαίνεται σε ποσότητες 9.9-9.7g/L αντίστοιχα. Ο μικροοργανισμός *G. candidum* 5274 σημείωσε την μεγαλύτερη παραγωγή ενδοπολυσακχαριτών (0,30 g/L) καθώς και των πολυολών αραβιτόλη και ερυθριτόλη (6,2-8,1 g/L) ενώ το στέλεχος *C. zeylanoides* 5266 είχε παραγωγή αραβιτόλης με μέγιστη ποσότητα τα 4.6g/L.
- Τα στελέχη *Pichia fermentans* 5265 και *Candida tartarivorans* 5222 κατανάλωσαν μερικώς την γλυκερόλη χωρίς όμως σημαντικές αποδόσεις σε βιομάζα (5,5 g/L) ή ενδοπολυσακχαριτών (0,10-0,08 g/L). Αξιοσημείωτη ήταν η παραγωγή ενδοκυτταρικού λίπους (2,0 g/L, $\approx 20\%$ κ.β. λίπος επί ξηράς μικροβιακής μάζας) για τον μικροοργανισμό *C. tartarivorans* 5222 ο οποίος παρουσίασε και κάποια παραγωγή αραβιτόλης.

- Το στέλεχος *Candida tartarivorans* 5224 δεν εμφάνισε ικανοποιητική ανάπτυξη μετά από 168 ώρες καλλιέργειες σε γλυκερόλη (1.4g/L βιομάζα) και έτσι δεν ήταν εφικτό να προχωρήσει η ζύμωση και οι αναλύσεις.
- Σύμφωνα με τις κινητικές, τα στελέχη *Pichia fermentans* 5257, *G. candidum* 5274, *Rhodospiridium toruloides* Y-6985 και Y-1588 έδειξαν αυξητική πορεία της βιομάζας τους και μια συνεχόμενη κατανάλωση του υποστρώματος. Επέκταση του χρόνου επώασης ενδεχομένως να οδηγήσει σε μεγαλύτερη κατανάλωση του υποστρώματος.
- Η ποιοτική ανάλυση του ενδοκυτταρικού λίπους στα στελέχη που εμφάνισαν αρκετή παραγωγή (*P. fermentans* 5257, *C. zeylanoides* 5266, *G. tartarivorans* 5222, *Rh. toruloides* Y-6985 και Y-1588) έδειξε κυρίως την παρουσία τριγλυκεριδίων και ελεύθερων λιπαρών οξέων. Σε ορισμένα στελέχη, όπως στο *G. tartarivorans* 5222 και τα *Rh. toruloides* Y-6985 και Y-1588, αναλύθηκαν και 1,3-διακυλογλυκερόλες (1,3-DAG) και 1,2-διακυλογλυκερόλες (1,2-DAG).

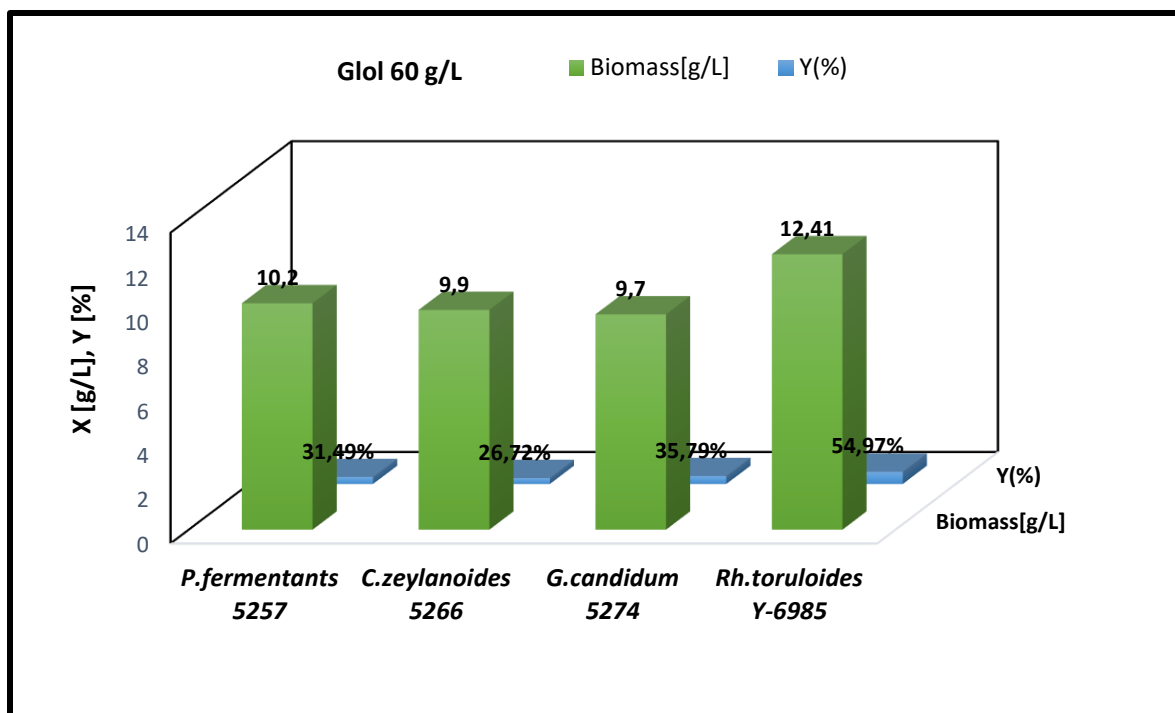
Από τα στελέχη του γένους *Geotrichum* και *Pichia*, τα *P. fermentans* 5257 και *G. candidum* 5274 παρουσίασαν αξιοσημείωτη παραγωγή μαννιτόλης, αραβιτόλης και ερυθριτόλης, η οποία παρουσιάζεται στο διάγραμμα 4.1-1. Τα στελέχη που παρουσίασαν την μεγαλύτερη παραγωγή ενδοκυτταρικών λιπιδίων εμφανίζονται στο διάγραμμα 4.1-2 μαζί με την αντίστοιχη απόδοση λίπους. Στο διάγραμμα 4.1-3 συγκεντρώνονται τα στελέχη με την μεγαλύτερη παραγωγή βιομάζας και την αντίστοιχη απόδοση. Επίσης, τα στελέχη με την μεγαλύτερη παραγωγή ενδοπολυσακχαριτών συγκρίνονται στο διάγραμμα 4.1-4. Τέλος στο διάγραμμα 4.1-5 παρουσιάζεται η ποσοστιαία κατανομή των ελεύθερων λιπαρών οξέων των στελεχών.



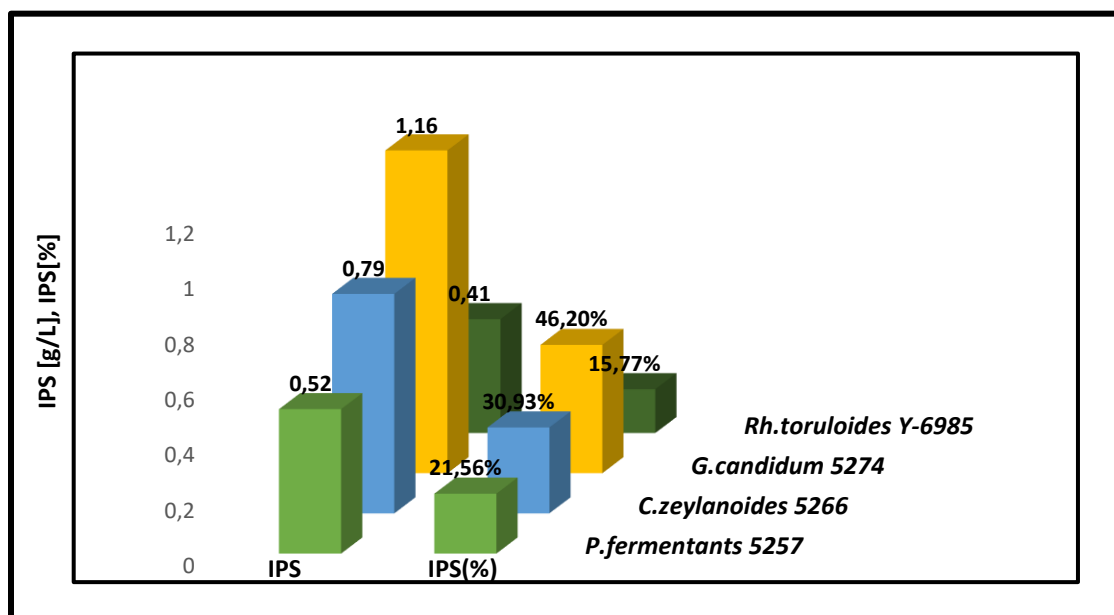
Διάγραμμα 4.1-1 : Μέγιστες συγκεντρώσεις των παραγόμενων πολυολών (μαννιτόλη, αραβιτόλη, ερυθριτόλη) στις 168 ώρες καλλιέργειας για τα στελέχη *P.fermentans* 5257, *G.candidum* 5274, *C.zeylanoides* 5266 και *Rh.toruloides* Y-6985, σε υγρή καλλιέργεια αρχικής συγκέντρωσης γλυκερόλης 60g/L.



Διάγραμμα 4.1-2 : Σύγκριση παραγόμενων λιπιδίων στις 168 ώρες καλλιέργειας μεταξύ των διαφορετικών στελεχών ζυμών με την μεγαλύτερη συγκέντρωση λιπιδίων σε αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης 60 g/L , όπου Y η ποσοστιαία απόδοση του παραγόμενου λίπους προς την αντίστοιχη βιομάζα [W/W].



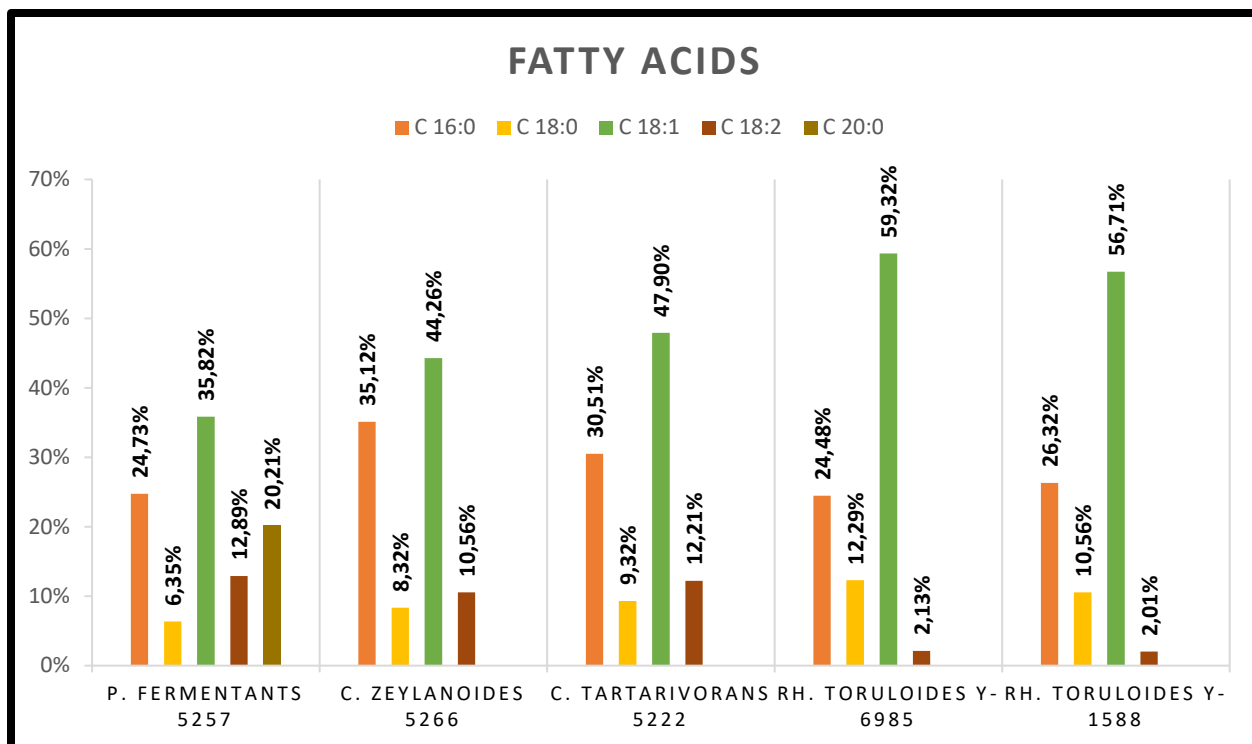
Διάγραμμα 4.1-3 : Σύγκριση παραγόμενης βιομάζας στις 168 ώρες καλλιέργειας μεταξύ των διαφορετικών στελεχών ζυμών με την μεγαλύτερη συγκέντρωση βιομάζας σε αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης 60 g/L, όπου Y η ποσοστιαία απόδοση της παραγόμενης βιομάζας προς το καταναλωθέν υπόστρωμα [W/W].



Διάγραμμα 4.1-4 : Σύγκριση των μέγιστων παραγόμενων ενδοπολυσακχαριτών μεταξύ των διαφορετικών στελεχών των ζυμών με την μεγαλύτερη συγκέντρωση ενδοπολυσακχαριτών σε αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης 60g/L, όπου IPS(%) η ποσοστιαία απόδοση των παραγόμενων ενδοπολυσακχαριτών προς την αντίστοιχη παραγόμενη βιομάζα [W/W].

Σύμφωνα και με τα παραπάνω διαγράμματα τα συμπεράσματα που προκύπτουν είναι τα εξής:

- Το στέλεχος *Rhodospiridium toruloides* Y-6985 παρουσίασε την μέγιστη παραγωγή βιομάζας 12,4 g/L με συγκέντρωση λιπιδίων 3,3 g/L, ενδοπολυσακχαριτών 0,10 g/L και παραγωγή μαννιτόλης 1,09 g/L έπειτα από 168 ώρες καλλιέργειας.
- Το στέλεχος *Geotrichum candidum* 5274 παρουσίασε τη μέγιστη παραγωγή πολυολών. Πιο συγκεκριμένα παράγαγε 8,1 g/L ερυθριτόλη και 6,2 g/L αραβιτόλη με συγκέντρωση βιομάζας 9,7 g/L, ενδοπολυσακχαριτών 0,2 g/L και λιπιδίων 1,9 g/L στις 168 ώρες καλλιέργειας.
- Η μεγαλύτερη παραγωγή ενδοκυτταρικού λίπους πραγματοποιήθηκε το στέλεχος *Rhodospiridium toruloides* Y-6985 με συγκέντρωση 3,3 g/L και στη συνέχεια από το στέλεχος *Pichia fermentants* 5257 με συγκέντρωση 2,2 g/L.
- Η μέγιστη συγκέντρωση ενδοπολυσακχαριτών παράχθηκε από το στέλεχος *Geotrichum candidum* 5274 με τιμή 0,21 g/L και έπειτα από το στέλεχος *Candidum zeylanoides* 5266 με συγκέντρωση 0,2 g/L.



Διάγραμμα 4.1-5: Ποσοστιαία κατανομή των λιπαρών οξέων των στελεχών που εμφανίζονται σε υπόστρωμα γλυκερόλης 60g/L.

Από το Διάγραμμα 4.1-5 προκύπτουν τα εξής συμπεράσματα:

- Κυρίαρχο λιπαρό οξύ σε όλες τις ζυμώσεις ήταν είναι το ελαιικό οξύ (C18:1) σε ποσοστό που κυμαίνεται από 35,8-59,3%.
- Τα αμέσως επόμενα μεγαλύτερα ποσοστά σε όλα τα στελέχη, κατέλαβε το παλμιτικό οξύ (16:0) με ποσοστά από 24,4 έως 35,1%
- Ακολούθησε το λινελαϊκό οξύ (18:2) με ποσοστά μεταξύ 2,0 έως 12,8%
- Τέλος εμφανίστηκε το λιπαρό οξύ αραχιδικό (20:0) σε ποσοστό 20,2% στο στέλεχος *P. fermentans* 5257.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Adhikari, S., Fernando, S.D., and Haryanto, A. (2009). *Hydrogen production from glycerol: An update. Energy Conversion and Management* 50, 2600-2604.

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

André, A., Diamantopoulou, P., Philippoussis, A., Sarris, D., Komaitis, M., & Papanikolaou, S. (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), 407–416. doi:10.1016/j.indcrop.2009.12.011

Barbirato F, Himmi EH, Conte T, & Bories, A. 1998: *1,3-Propanediol production by fermentation: an interesting way to valorize glycerin from the ester and ethanol industries. Industrial Crops and Products* 7:281–289.

Barnett, J. A. (1976). ‘*The Utilization of Sugars by Yeasts. Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*’.

BeMiller, J. N. (1996). *Food Polysaccharides and Their Applications. Trends in Food Science & Technology*, 7(6), 207–208. doi:10.1016/0924-2244(96)81250-7 .

Bhutada, G., Kavšček, M., Ledesma-Amaro, R., Thomas, S., Rechberger, G. N., Nicaud, J.-M., & Natter, K. (2017). *Sugar versus fat: elimination of glycogen storage improves lipid accumulation in Yarrowia lipolytica. FEMS Yeast Research*, 17(3). doi:10.1093/femsyr/fox020.

Carly, F., Vandermies, M., Telek, S., Steels, S., Thomas, S., Nicaud, J.-M., & Fickers, P. (2017). *Enhancing erythritol productivity in Yarrowia lipolytica using metabolic engineering. Metabolic Engineering*, 42, 19–24.

Chatzifragkou, A., & Papanikolaou, S. (2012). *Effect of impurities in biodiesel-derived waste glycerol on the performance and feasibility of biotechnological.*

Chatzifragkou, A., Makri, A., Belka, A., Bellou, S., Mavrou, M., Mastoridou, M., ... Papanikolaou, S. (2011). *Biotechnological conversions of biodiesel derived waste glycerol by yeast and fungal species. Energy, 36(2), 1097–1108.*

Chong, C. C., Aqsha, A., Ayoub, M., Sajid, M., Abdullah, A. Z., Yusup, S., & Abdullah, B. (2020). *A review over the role of catalysts for selective short-chain polyglycerol production from biodiesel derived waste glycerol.*

Cintolesi, A., Clomburg, J.M., Rigou, V., Zygourakis, K., and Gonzalez, R. (2012). *Quantitative analysis of the fermentative metabolism of glycerol in Escherichia coli. Biotechnology and Bioengineering, 109 (1): 187-198.*

Čipinytė, V., Grigiškis, S., and Baškys, E. (2009). *Selection of fat-degrading microorganisms for the treatment of lipid-contaminated environment. Biologija, 55(3), 84-92.*

Copetti, M. V. (2019). *Fungi as industrial producers of food ingredients. Current Opinion in Food Science. doi:10.1016/j.cofs.2019.02.006.*

Courtright, JB. 1975a: *Intracellular localization and properties of glycerokinase and glycerophosphate dehydrogenase in Neurospora crassa. Archives of Biochemistry and Biophysics 167:21–33.*

Courtright, JB. 1975b: *Differential rates of synthesis of glycerokinase and glycerophosphate dehydrogenase in Neurospora crassa during induction. Archives of Biochemistry and Biophysics 167:34–44.*

Daskalaki, A., Perdikouli, N., Aggeli D., Aggelis G., (2019). *Laboratory evolution strategies for improving lipid accumulation in Yarrowia lipolytica.*

Demain, A. L., Phaff, H. J., & Kurtzman, C. P. (1998). *The industrial and agricultural significance of yeasts.*

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 Microbiology Letters.*

Dourou, M., Kancelista, A., Juszczak, P., Sarris, D., Bellou, S., Triantaphyllidou, I.-E., ... Aggelis, G. (2016). Bioconversion of olive mill wastewater into high-added value products. *Journal of Cleaner Production*, 139, 957–969.

Dourou, M., Mizerakis, P., Papanikolaou, S., & Aggelis, G. (2017). Storage lipid and polysaccharide metabolism in *Yarrowia lipolytica* and *Umbelopsis isabellina*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101(19), 7213–7226. doi:10.1007/s00253-017-8455-6.

Duarte, S. H., Ghiselli, G., & Maugeri, F. (2013). Influence of culture conditions on lipid production by *Candida* sp. LEB-M3 using glycerol from biodiesel synthesis.

Fakas S, Bellou S, Makri A, & Aggelis, G. 2009a: “Single cell oil and gamma–linolenic acid production by *Thamnidium elegans* grown on raw glycerol” in Aggelis, G. (Ed), *Microbial conversions of raw glycerol* Nova Science Publishers, Inc., NT.

Fakas S, Makri A, Bellou S, & Aggelis, G. 2009b: “Pathways to aerobic glycerol catabolism and their regulation” in Aggelis, G. (Ed), *Microbial conversions of raw glycerol* Nova Science Publishers, Inc., NT.

Fakas S, Makri A, Mavromati M, Tselepi M, & Aggelis G. 2009e: Fatty acid composition in lipid fractions lengthwise the mycelium of *Mortierella isabellina* and lipid production by solid state fermentation. *Bioresource Technology* 100:6118–6120.

Fakas S, Papanikolaou S, Galiotou–Panayotou M, Komaitis M, & Aggelis, G. 2009c: “Biochemistry and Biotechnology of Single Cell Oil” in Pandey A, Larroche C, Soccol CR, & Dussard, CG. (Eds.), *New Horizons in Biotechnology*, Asiatech Publishers, Inc., New Delhi, India.

Fakas S., Papanikolaou S, Batsos A, Galiotou–Panayotou M, Mallouchos A, & Aggelis, G. 2009d: Evaluating renewable carbon sources as substrates for single cell oil production by *Cunninghamella echinulata* and *Mortierella isabellina*. *Biomass Bioenergy* 33:573–580.

Fakas S., Papanikolaou S., Galioutou-Panayotou M., Komaitis M., Aggelis G., 2006. Lipids of *Cunninghamella echinulate* with emphasis to γ -linoleic acid distribution among lipid classes. *Applied Microbiology and Biotechnology* 73, 676-683.

Filippousi, R., Antoniou, D., Tryfinopoulou, P., Nisiotou, A. A., Nychas, G., 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. Journal of Applied Microbiology.

Folch J., Lees M., Sloane –Stanley G. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. Journal of Biological Chemistry 199, 833-841.

*Gao, Z., Ma, Y., Wang, Q., Zhang, M., Wang, J., & Liu, Y. (2016). Effect of crude glycerol impurities on lipid preparation by *Rhodospiridium toruloides* yeast 32489.*

*Guerfali, M., Ayadi, I., Sassi, H.-E., Belhassen, A., Gargouri, A., & Belghith, H. (2020). Biodiesel-derived crude glycerol as alternative feedstock for single cell oil production by the oleaginous yeast *Candida viswanathii* Y-E4.*

*Guo, Q., Zayed, H., Zhang, H., Wang, X., Yun, J., Zhang, G., ... Qi, X. (2018). Optimization of fermentation medium for a newly isolated yeast strain (*Zygosaccharomyces rouxii* JM-C46) and evaluation of factors affecting biosynthesis of D-arabitol. LWT.*

Hubert Schiweck, Albert Bär, Roland Vogel, Eugen Schwarz, Markwart Kunz, Cécile Dusautois, Alexandre Clement, Caterine Lefranc, Bernd Lüssem, Matthias Moser, Siegfried Peters, 2012, 'Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry'.

Hüsing B, Angerer G, Gaisser S, & Marscheider–Weidemann, F. 2003: Biotechnologische Herstellung von Werkstoffen unter besonderer Berücksichtigung von Energieträgern und Biopolymeren. Study for the German Federal Environment Agency (UBA), project number: UFOPLAN 200 66 301.

Johnson DT, & Taconi, KA. 2007: The glycerin glut: options for the value-added conversion of crude glycerol resulting from biodiesel production. Environmental Progress 26:338–348.

*Koganti, S., & Ju, L.-K. (2013). *Debaryomyces hansenii* fermentation for arabitol production. Biochemical Engineering Journal, 79, 112–119.*

Koutinas, A. A., Chatzifragkou, A., Kopsahelis, N., Papanikolaou, S., & Kookos, I. K. (2014). Design and techno-economic evaluation of microbial oil production as a renewable resource for biodiesel and oleochemical production. Fuel, 116, 566–577.

Kowalczyk, D., Kordowska-Wiater, M., Nowak, J., & Baraniak, B. (2015). Characterization of films based on chitosan lactate and its blends with oxidized starch and gelatin. *International Journal of Biological Macromolecules*, 77, 350–359.

Li, J., Yuan, X., Dong, Z., Mugabe, W., & Shao, T. (2018). The effects of fibrolytic enzymes, cellulolytic fungi and bacteria on the fermentation characteristics, structural carbohydrates degradation, and enzymatic conversion yields of *Pennisetum sinense* silage. *Bioresource Technology*, 264, 123–130. doi:10.1016/j.biortech.2018.05.059.

Loman, A. A., & Ju, L.-K. (2015). Inhibitory effects of arabitol on caries-associated microbiologic parameters of oral *Streptococci* and *Lactobacilli*. *Archives of Oral Biology*, 60(12), 1721–1728.

Loman, A. A., Callow, N. V., Islam, S. M. M., & Ju, L.-K. (2018). Single-step enzyme processing of soybeans into intact oil bodies, protein bodies and hydrolyzed carbohydrates. *Process Biochemistry*, 68, 153–164.

McAuliffe, O., Kilcawley, K., & Stefanovic, E. (2018). Symposium review: Genomic investigations of flavor formation by dairy microbiota. *Journal of Dairy Science*. doi:10.3168/jds.2018-15385.

Meesters PAEP, Huijberts GNM, & Eggink, G. 1996: High-cell-density cultivation of the lipid accumulating yeast *Cryptococcus curvatus* using glycerol as a carbon source. *Applied Microbiology and Biotechnology* 45:575–579.

Miller G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* 31 (3), 426-428.

Mirończuk, A. M., Dobrowolski, A., Rakicka, M., Rywińska, A., & Rymowicz, W. (2015). Newly isolated mutant of *Yarrowia lipolytica* MK1 as a proper host for efficient erythritol biosynthesis from glycerol. *Process Biochemistry*, 50(1), 61–68.

Mukesh Meena, Vishal Prasad, Andleeb Zehra, Vijai K. Gupta and Ram S. Upadhyay, (2015) 'Mannitol metabolism during pathogenic fungal–host interactions under stressed conditions'.

Munch, G., Sestric, R., Sparling, R., Levin, D. B., & Cicek, N. (2015). Lipid production in the under-characterized oleaginous yeasts, *Rhodospiridium babjevae* and *Rhodospiridium diobovatum*, from biodiesel-derived waste glycerol.

Pagliario M, Ciriminna R, Kimura H, Rossi M, & Pina, CD. 2007: *From glycerol to Value-Added Products*. *Angewandte Chemie International Edition* 46:4434–4440.

Pagliario, M., & Rossi, M. (2010). *Glycerol: properties and production. The future of glycerol*, 20-21.

Papanikolaou S., Agelis G., (2011a). *Lipids of oleaginous yeasts. Part I: biochemistry of cell oil production*. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 113, 1031-1051.

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

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

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

Papanikolaou, S. (2000). *High production of 1,3-propanediol from industrial glycerol by a newly isolated Clostridium butyricum*.

Polburee, P., Yongmanitchai, W., Lertwattanasakul, N., Ohashi, T., Fujiyama, K., & Limtong, S. (2015). *Characterization of oleaginous yeasts accumulating high levels of lipid when cultivated in glycerol and their potential for lipid production from biodiesel-derived crude glycerol*.

Rakicka, M., Biegalska, A., Rymowicz, W., Dobrowolski, A., & Mirończuk, A. M. (2017). *Polyol production from waste materials by genetically modified Yarrowia lipolytica*. *Bioresource Technology*, 243, 393–399.

Ratledge C., 2002. *Regulation of lipid accumulation in oleaginous microorganisms*. *Biochemical Society*, 1047-1050.

Ratledge C., Hopkins S., 2006. *Lipids from microbial sources*. In: Gunstone FD, Ed. *Modifying lipids for use in food*. England, Woodhead Publishing Limited, 80-113.

Ratledge C., Wynn J.P., 2006. *Microbial production of oils and fats*. In: *Food Biotechnology . Second Edition*. Taylor & Fancis, 460-481.

Ratledge, C. (2004). *Fatty acid biosynthesis in microorganisms being used for Single Cell Oil production*. *Biochimie*, 86(11), 807–815.

Ratledge, C., & Wynn, J. P. (2002). *The Biochemistry and Molecular Biology of Lipid Accumulation in Oleaginous Microorganisms*. *Advances in Applied Microbiology*, 1–52.

Runnel, R., Mäkinen, K. K., Honkala, S., Olak, J., Mäkinen, P.-L., Nömmela, R., ... Saag, M. (2013). *Effect of three-year consumption of erythritol, xylitol and sorbitol candies on various plaque and salivary caries-related variables*. *Journal of Dentistry*, 41(12), 1236–1244.

Rush D, Karibian D, Karnovsky ML, & Magasanik, B. 1957: *Pathways of glycerol dissimilation in two strains of Aerobacter aerogenes: enzymatic and tracer studies*. *Journal of Biological Chemistry* 226:891–899.

Rymowicz, W., Rywińska, A., & Marcinkiewicz, M. (2008). *High-yield production of erythritol from raw glycerol in fed-batch cultures of Yarrowia lipolytica*. *Biotechnology Letters*, 31(3), 377–380.

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

Sarris, D., Rapti, A., Papafotis, N., Koutinas, A., & Papanikolaou, S. (2019). *Production of Added-Value Chemical Compounds through Bioconversions of Olive-Mill Wastewaters Blended with Crude Glycerol by a Yarrowia lipolytica Strain*. *Molecules*, 24(2), 222.

Sarris, D., Sampani, Z., Rapti, A., Papanikolaou, S. (2019). *Valorization of Crude Glycerol, Residue Deriving from Biodiesel-Production Process, with the Use of Wild-type New Isolated Yarrowia lipolytica Strains: Production of Metabolites with Pharmaceutical and Biotechnological Interest*.

Tchakouteu, S. S., Chatzifragkou, A., Kalantzi, O., Koutinas, A. A., Aggelis, G., & Papanikolaou, S. (2014). *Oleaginous yeast Cryptococcus curvatus exhibits interplay between biosynthesis of*

intracellular sugars and lipids. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 117(5), 657–672.

Tom GD, Viswanath–Reddy M, & Howe, HB. 1978: Effect of carbon source on enzymes involved in glycerol metabolism in *Neurospora crassa*. *Archives of Microbiology* 117:259–263.

Tomaszewska, L., Rywińska, A., & Gładkowski, W. (2012). Production of erythritol and mannitol by *Yarrowia lipolytica* yeast in media containing glycerol. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 39(9), 1333–1343.

Tsakona S., Kopsahelis N., Chatzifragkou A., Papanikolaou S., Koukos I.K., Koutinas A.A., 2014. Formulation of fermentation media from flour-rich waste streams for microbial lipid production by *Lipomyces starkeyi*. *Journal of Biotechnology* 189. 36-45.

Tzirita, M., Kremmyda, M., Sarris, D., Koutinas, A. A., & Papanikolaou, S. (2019). Effect of Salt Addition upon the Production of Metabolic Compounds by *Yarrowia lipolytica* Cultivated on Biodiesel-Derived Glycerol Diluted with Olive-Mill Wastewaters. *Energies*, 12(19), 3649.

Uprety, B. K., Samavi, M., & Rakshit, S. K. (2018). Contribution of specific impurities in crude glycerol towards improved lipid production by *Rhodosporidium toruloides*.

W. Wang, C. Xue and X. Mao, Radioprotective effects and mechanisms of animal, plant and microbial polysaccharides, *International Journal of Biological Macromolecules*(2020).

Wang ZX, Zhuge J, Fang H, & Prior, BA. 2001: Glycerol production by microbial fermentation: a review. *Biotechnology Advances* 19:201–223.

Willke TH, & Vorlop, KD. 2004: Industrial bioconversion of renewable resources as an alternative to conventional chemistry. *Applied Microbiology and Biotechnology* 66:131–142.

Yoshikawa, J., Habe, H., Morita, T., Fukuoka, T., Imura, T., Iwabuchi, H., ... Kitamoto, D. (2014). Production of mannitol from raw glycerol by *Candida azyma*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 117(6), 725–729.

Yuste AJ, & Dorado, MP. 2006: A neural network approach to simulate biodiesel production from waste olive oil. *Energy & Fuels* 20:399–402.

Παπανικολάου Σ., 2013. Ενζυμικές και Μικροβιακές διεργασίες τροφίμων. Πανεπιστημιακές παραδόσεις, Γ.Π.Α, Αθήνα.