



ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ, ΣΥΝΤΗΡΗΣΗ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΕΣ ΔΙΕΡΓΑΣΙΕΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΒΙΟ-ΟΙΚΟΝΟΜΙΑΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

«Παραγωγή μικροβιακών ελαίων κατά την καλλιέργεια στελεχών του
μικροοργανισμού *Cryptococcus curvatus* και *Rhodospiridium*
toruloides σε υποστρώματα με βάση την ακάθαρτη γλυκερόλη»

ΒΑΤΙΣΤΑΣ Β. ΧΡΗΣΤΟΣ

Επιβλέπων καθηγητής:
Παπανικολάου Σεραφείμ, Καθηγητής ΓΠΑ

ΑΘΗΝΑ, 2020

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

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Παραγωγή μικροβιακών ελαίων κατά την καλλιέργεια στελεχών του μικροοργανισμού *Cryptococcus curvatus* και *Rhodospiridium toruloides* σε υποστρώματα με βάση την ακάθαρτη γλυκερόλη

“Production of microbial oils in the culture of *Cryptococcus curvatus* and *Rhodospiridium toruloides* strains on crude glycerol-based substrates”

ΒΑΤΙΣΤΑΣ Β. ΧΡΗΣΤΟΣ

Εξεταστική Επιτροπή

Επιβλέπων:

Παπανικολάου Σεραφείμ, Καθηγητής,
Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών
Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου

Μέλη:

Κουτίνης Απόστολος, Αναπληρωτής Καθηγητής
Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών
Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου

Στοφόρος Νικόλαος, Καθηγητής
Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών
Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου

Παραγωγή μικροβιακών ελαίων κατά την καλλιέργεια στελεχών του μικροοργανισμού *Cryptococcus curvatus* και *Rhodospiridium toruloides* σε υποστρώματα με βάση την ακάθαρτη γλυκερόλη

Τμήμα επιστήμης και διατροφής του ανθρώπου
Εργαστήριο μικροβιολογίας και βιοτεχνολογίας

Περίληψη

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η διερεύνηση της ικανότητας της ελαιογόνου ζύμης *Cryptococcus curvatus* να μεταβολίζει την ακάθαρτη βιομηχανική γλυκερόλη ως πηγή άνθρακα, η οποία αποτελεί παραπροϊόν της βιομηχανίας παραγωγής βιοκαυσίμου (biodiesel). Ειδικότερα, μελετήθηκε ο μεταβολισμός της ακάθαρτης γλυκερόλης προς παραγωγή βιομάζας και δευτερογενών μεταβολιτών (μικροβιακού λίπους και ενδοπολυσακχαριτών) για διαφορετικές πηγές αζώτου στο υπόστρωμα ανάπτυξής της. Τα στελέχη της ζύμης *Cryptococcus curvatus* που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα ATCC 20509 και NRRL Y-1511 ενώ ως πηγές αζώτου ήταν το εκχύλισμα ζύμης (yeast extract) σε όλες τις ζυμώσεις σε ποσότητα 1g/L και σαν επιπλέον η πειπτόνη, η ουρία, το νιτρικό κάλιο, το θειικό αμμώνιο, το εκχύλισμα ζύμης και μια ζύμωση χωρίς επιπλέον πηγή αζώτου. Όλες οι ζυμώσεις έγιναν υπό περιοριστικές σε άζωτο συνθήκες, και ο λόγος άνθρακα προς άζωτο (C/N) ήταν σταθερός και ίσος με 70. Τέλος, πραγματοποιήθηκαν οι δύο ζυμώσεις που έδωσαν την μεγαλύτερη τιμή βιομάζας και ενδοκυτταρικού λίπους (2 g/L πειπτόνη και 2,038 g/L νιτρικό κάλιο αντίστοιχα) με το στέλεχος *Rhodospiridium toruloides* NRRL Y-6984 προκειμένου να διαπιστωθεί αν θα είχε την ίδια επίπτωση στον μεταβολισμό της ζύμης.

Για το στέλεχος NRRL Y-1511 πραγματοποιήθηκαν μόνο οι ζυμώσεις με πειπτόνη και χωρίς κάποια επιπλέον πηγή αζώτου, καθώς τα δευτερογενή μεταβολικά προϊόντα που παρήγαγε ήταν σε πολύ μικρό ποσοστό σε σχέση με την ξηρή βιομάζα, όποτε δεν έχριζε περαιτέρω ανάλυση.

Σαν δεύτερο ερευνητικό αντικείμενο της παρούσας μελέτης ήταν η πραγματοποίηση δυο επιπλέον ζυμώσεων με σκοπό τον προσδιορισμό της βέλτιστης διαδικασίας για την εκχύλιση του ενδοκυτταρικού μικροβιακού λίπους. Οι εκχυλίσεις έγιναν με τοποθέτηση της βιομάζας στο αντιδραστήριο «Folch» (χλωροφόρμιο / μεθανόλη 2/1) για πέντε ημέρες, με πέψη με HCl και κατόπιν εκχύλιση με «Folch» και με βρασμό της βιομάζας εντός του αντιδραστηρίου «Folch» σε σύστημα μανδύα βρασμού - συμπυκνωτή.

Οι ζυμώσεις έλαβαν χώρα σε κωνικές φιάλες των 250 mL και με αρχική συγκέντρωση της ακάθαρτης γλυκερόλης 50 g/L. Οι συνθήκες των ζυμώσεων ήταν ίδιες, με τιμή pH = 6,0±0,2, ανάδευση 180±5 rpm και θερμοκρασία T = 28±1 °C. Κατά το πέρας των ζυμώσεων πραγματοποιήθηκε ποσοτικός προσδιορισμός της ξηρής βιομάζας, του ενδοκυτταρικού λίπους και των ενδοπολυσακχαριτών. Για το παραγόμενο λίπος έγινε και ποιοτικός προσδιορισμός έπειτα από μεθυλεστεροποίηση και ανάλυση σε αέριο χρωματογράφο.

Πιο συγκεκριμένα, για το στέλεχος ATCC 20509 η μεγαλύτερη παραγωγή βιομάζας παρατηρήθηκε στην ζύμωση με πηγή αζώτου την πειπτόνη, η οποία ανήλθε στα 23,68 g/L, ενώ το μεγαλύτερο ποσοστό ενδοπολυσακχαριτών είχε τιμή 0,44 g/g και παρατηρήθηκε στη ζύμωση με 0,605 g/L ουρία. Η μεγαλύτερη παραγωγή ενδοκυτταρικού λίπους ήταν στη ζύμωση με πηγή αζώτου το

νιτρικό κάλιο, η οποία έφτασε τα 4,52 g/L. Για το στελέχος NRRL Y-1511 η μεγαλύτερη παραγωγή βιομάζας παρατηρήθηκε στη ζύμωση με πειπτόνη ως πρόσθετη πηγή αζώτου, η οποία ανήλθε στα 16,58 g/L ενώ στην ζύμωση χωρίς πρόσθετη πηγή αζώτου παρατηρήθηκε η μέγιστη παραγωγή λίπους με τιμή 0,74 g/L και ενδοπολυσακχαριτών με τιμή 0,16 g/g. Τέλος, για το στελέχος *Rhodospiridium toruloides* NRRL Y-6984, όπως και στην περίπτωση του στελέχους ATCC 20509, η μεγαλύτερη παραγωγή βιομάζας παρατηρήθηκε στην ζύμωση με πηγή αζώτου την πειπτόνη, η οποία έφτασε στα 16,4 g/L, η μεγαλύτερη παραγωγή ενδοκυτταρικού λίπους ήταν στην ζύμωση με πηγή αζώτου το νιτρικό κάλιο, η οποία έφτασε στα 3,32 g/L, ενώ και στις δύο ζυμώσεις το μεγαλύτερο ποσοστό ενδοπολυσακχαριτών είχε την τιμή 0,31 g/g. Τα λιπαρά οξέα τα οποία παρήγαγαν τα στελέχη και προσδιορίστηκαν με την χρήση της αέριας χρωματογραφίας ήταν τα εξής: παλμιτικό οξύ (C16:0), παλμιτελαϊκό οξύ (Δ^9 C16:1), στεατικό οξύ (C18:0), ελαϊκό οξύ (Δ^9 C18:1), λινελαϊκό οξύ ($\Delta^{9,12}$ C18:2) και α -λινολενικό οξύ ($\Delta^{9,12,15}$ C18:3).

Στις ζυμώσεις που πραγματοποιήθηκαν για την βέλτιστη μέθοδο εκχύλισης λίπους, η μέθοδος με «Folch» και βρασμό και η μέθοδος μόνο με τοποθέτηση της ξηράς βιομάζας εντός πενθημέρου στους διαλύτες «Folch» είχαν τα καλύτερα αποτελέσματα, όμως επιλέχθηκε η απλή μέθοδος χωρίς βρασμό για την εκχύλιση του λίπους στα πειράματα, διότι ήταν πιο σταθερή στα αποτελέσματά της.

Επιστημονική περιοχή: Διατροφή του ανθρώπου

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

Production of microbial oils in the culture of *Cryptococcus curvatus* and *Rhodospiridium toruloides* strains on crude glycerol-based substrates

Department of Human Science and Nutrition

Laboratory of Microbiology and Biotechnology

Abstract

The aim of this research was to investigate the ability of *Cryptococcus curvatus* and *Rhodospiridium toruloides* to metabolize crude glycerol as a carbon source, which is the main byproduct of biodiesel industry. In particular, the metabolism of crude glycerol upon the production of total biomass and secondary metabolites (microbial lipid and endopolysaccharides) was assessed for different sources of nitrogen employed into the growth substrate. The strains of *Cryptococcus curvatus* used were the ATCC 20509 and NRRL Y-1511. In all trials, yeast extract at an initial concentration adjusted to 1.0 g/L was used. Additional nitrogen source at equal nitrogen concentrations, were used the following nitrogenous compounds: peptone, urea, potassium nitrate and ammonium sulfate. In one of the trials performed, yeast extract (at 1.0 g/L) alone (without additional source of nitrogen) was used. All fermentations were performed under nitrogen-limited conditions and the carbon to nitrogen ratio (C/N) was constant and equal to 70. Finally, the two fermentations that gave the highest value of biomass and intracellular lipid (2 g/L peptone and 2,038 g/L potassium nitrate respectively) were performed with the strain *Rhodospiridium toruloides* NRRL Y-6984 to determine if it would have the same effect on the yeast physiological behavior.

For the NRRL Y-1511 strain only the fermentations with peptone and without any additional nitrogen source were performed, as this strain did not produce noticeable quantities of total biomass and storage lipids.

The second research object of the present study was to perform two additional fermentations in order to determine the optimal process for the extraction of intra-cellular microbial oil. The extractions were performed with "Folch" solvent blend (chloroform / methanol 2/1), with implication of HCl and digestion of the dry cell biomass followed by "Folch" extraction, and finally by adding "Folch" solvent blend into the dry biomass followed by boiling the mixture of solvents into a boiling-condenser system.

The fermentations took place in 250 mL conical flasks with an initial concentration of crude glycerol of 50 g/L. The fermentation conditions were the same, with pH = 6 ± 2 , agitation 180 ± 5 rpm and temperature $T = 28 \pm 1$ °C. During the trials, dry biomass, intracellular oil and endopolysaccharides were quantified. For the produced oil, a total fatty acid composition analysis was made after methyl esterification and analysis on a gas chromatograph.

For the ATCC 20509 strain the highest biomass production was observed in the fermentation with nitrogen source peptone, which amounted to 23.68 g/L, while the highest percentage of endopolysaccharides was 0.44 g/g and was observed in the fermentation with 0.605 g/L urea. The highest production of intracellular lipid was in the fermentation with nitrogen source potassium nitrate, which reached 4.52 g/L. For the strain NRRL Y-1511 the highest biomass production was observed in the fermentation with peptone as additional nitrogen source, which amounted to 16.58 g/L while in the fermentation without additional nitrogen source the maximum lipid production was

observed at 0.74 g/L and endopolysaccharides at a value of 0.16 g/g. Finally, for the strain *Rhodospiridium toruloides* NRRL Y-6984, as in the case of strain ATCC 20509, the highest biomass production was observed in the fermentation with nitrogen source peptone, which reached 16.4 g/L, the highest production of single cell oil was in the fermentation with nitrogen source potassium nitrate, which reached 3.32 g/L, while in both fermentations the highest percentage of endopolysaccharides was 0.31 g/g. The fatty acids produced by the strains and determined using gas chromatography were: palmitic acid (C16:0), palmitoleic acid (Δ^9 C16:1), stearic acid (C18:0), oleic acid (Δ^9 C18:1), linoleic acid ($\Delta^{9,12}$ C18:2) and α -linolenic acid ($\Delta^{9,12,15}$ C18:3). Single cell oil was mostly composed of the fatty acids oleic and palmitic. Due to this fatty acid composition, storage lipid of all yeasts tested seems to be quite suitable for the synthesis of "2nd generation" biodiesel.

In the fermentations performed for the optimal method of intra-cellular oil extraction, the method with "Folch" and boiling and the method with simple "Folch" extraction seemed to present the best results.

Scientific area: Human nutrition

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

Ευχαριστίες

Με την ολοκλήρωση και συγγραφή της παρούσας πτυχιακής μελέτης, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στους ανθρώπους που βρέθηκαν δίπλα μου κατά τη διάρκεια της, συντελώντας καθοριστικά στην ολοκλήρωση της.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον καθηγητή του τμήματος Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών κ. Σεραφείμ Παπανικολάου, επιβλέποντα της πτυχιακής μου μελέτης, για την ευκαιρία που μου έδωσε να ασχοληθώ με τον κλάδο της μικροβιολογίας και βιοτεχνολογίας τροφίμων, για την εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπό μου και για την πολύτιμη καθοδήγηση του κατά τη διάρκεια της εκπόνησης της πτυχιακής μου μελέτης.

Στη συνέχεια, ευχαριστώ πολύ τους κ. Νικόλαο Στοφόρο, καθηγητή του τμήματος Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, και κ. Απόστολο Κουτίνα, αναπληρωτή καθηγητή του τμήματος Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, για τη συμβολή τους στην εξέταση της παρούσας μελέτης.

Τις βαθύτατες ευχαριστίες μου εκφράζω στην υποψήφια διδάκτωρ Σέβη Μίχου για την τεράστια συμβολή της σε όλη τη διάρκεια πραγματοποίησης της πτυχιακής μου μελέτης και την ανεξάντλητη προθυμία της για βοήθεια. Ακόμη, ευχαριστώ ιδιαίτερος την κα. Ουρανία Καλαντζή (ΕΔΠ) η οποία, με την παροχή των γνώσεών της βοήθησε σημαντικά στην λύση πολλών προβλημάτων κατά τη διάρκεια της παρούσας μελέτης.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω την υποψήφια διδάκτωρ Ελένη Βασταρούχα για τη βοήθειά της σε πολλά τεχνικά θέματα καθώς και όλο το προσωπικό του εργαστηρίου Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων, για τη δημιουργία ενός εξαιρετικά φιλικού περιβάλλοντος εργασίας κατά την παραμονή μου στο εργαστήριο.

Επιπλέον, οφείλω να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες στους συμφοιτητές μου, και κυρίως στους Σωκράτη Παπαθανασίου και Ξένια Φέτση για τις συμβουλές και τη βοήθεια που μου παρείχαν καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την οικογένειά μου για την ηθική στήριξη και την κατανόηση, που έδειξαν όλο αυτόν τον καιρό, καθώς επίσης και όλους τους κοντινούς μου ανθρώπους, που με βοήθησαν και εξακολουθούν να με βοηθούν στην προσπάθεια πραγματοποίησης των στόχων μου.

Πίνακας Περιεχομένων

1	ΕΙΣΑΓΩΓΗ	2
1.1	Γλυκερόλη	2
1.1.1	Φυσικοχημικές ιδιότητες της γλυκερόλης	2
1.1.2	Βιομηχανική Γλυκερόλη	3
1.1.3	Βιομηχανική χρήση της γλυκερόλης	5
1.2	Ζύμες - Ελαιογόνοι μικροοργανισμοί	6
1.2.1	Ζύμες	6
1.2.2	Ελαιογόνοι μικροοργανισμοί	7
1.2.2.1	Η ελαιογόνος ζύμη <i>Cryptococcus curvatus</i>	9
1.2.2.2	Η ζύμη <i>Rhodosporidium toruloides</i>	10
1.3	Λιπίδια	10
1.3.1	Βιοχημεία συσσώρευσης μικροβιακού λίπους	10
1.3.2	Εφαρμογές μικροβιακού λίπους	16
1.4	Ενδοπολυσακχαρίτες	18
1.5	Βιο-ντιζελ	20
1.5.1	Παραγωγή βιο-ντιζελ	22
2	ΣΚΟΠΟΣ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ	26
2.1	Σκοπός πειραματικής μελέτης	26
3	ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	28
3.1	Βιολογικό υλικό	28
3.2	Θρεπτικά Υποστρώματα	28
3.2.1	Παρασκευή προκαλλιέργειας	28
3.2.2	Παρασκευή κυρίως καλλιέργειας	28
3.3	Μέθοδοι ανάλυσης	29
3.3.1	Προσδιορισμός pH	29
3.3.2	Προσδιορισμός βιομάζας	29
3.3.3	Προσδιορισμός ενδοπολυσακχαριτών (IPS)	30
3.3.4	Προσδιορισμός καταναλωθείσας γλυκερόλης	30

3.3.5	Μέθοδοι εκχύλισης μικροβιακού λίπους	31
3.3.6	Ποσοτικός προσδιορισμός ενδοκυτταρικού λίπους	31
3.3.7	Προσδιορισμός της σύστασης των λιπαρών οξέων του μικροβιακού λίπους	32
3.3.7.1	Μεθυλεστεροποίηση λιπιδίων (Fatty Acid Methyl Esters, FAMES)	32
3.3.7.2	Προσδιορισμός της σύστασης των λιπαρών οξέων.	32
4	ΜΕΤΡΗΣΕΙΣ - ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	35
4.1	Αποτελέσματα για <i>C. curvatus</i> ATCC 20509	36
4.1.1	Κινητικά δεδομένα μικροοργανισμού	36
4.1.2	Παραγόμενα λιπαρά οξέα	41
4.1.3	Παραγόμενοι ενδοπολυσακχαρίτες	42
4.2	Αποτελέσματα για <i>C. curvatus</i> NRRL Y-1511	43
4.2.1	Κινητικά δεδομένα μικροοργανισμού	43
4.2.2	Παραγόμενα λιπαρά οξέα	45
4.2.3	Παραγόμενοι ενδοπολυσακχαρίτες	46
4.3	Αποτελέσματα για <i>R. toruloides</i> NRRL Y-6984	47
4.3.1	Κινητικά δεδομένα μικροοργανισμού	47
4.3.2	Παραγόμενα λιπαρά οξέα	49
4.3.3	Παραγόμενοι ενδοπολυσακχαρίτες	50
4.4	Αποτελέσματα από εκχύλιση λίπους	51
5	ΣΥΖΗΤΗΣΗ - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	54
5.1	Συζήτηση	54
5.2	Συμπεράσματα	67
	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ	68

Κατάλογος Εικόνων

- Εικόνα 1-1:** Χημικός τύπος γλυκερόλης. 4
- Εικόνα 1-2:** Η παραγωγή βιο-ντίζελ εντός της Ευρωπαϊκής Ένωσης από το έτος 1998 έως το έτος 2016. 5
- Εικόνα 1-3:** Το σχέδιο δείχνει πως ο κύκλος του κιτρικού/μηλικού και ο κύκλος της τρανσυδρογενάσης στο κυτταρόπλασμα συνεισφέρουν στην παροχή πρόδρομων του ακετυλο-CoA και NADPH για λιπογένεση στους ελαιογόνους μικροοργανισμούς. Ένζυμα: 1. αποκαρβοξυλάση του πυροσταφυλικού οξέος, 2. αφυδρογονάση του μηλικού οξέος, 3. μυλικό ένζυμο, 4. αφυδρογονάση του πυροσταφυλικού οξέος, 5. κιτρική συνθάση, 6. ATP-κιτρική λύαση, 7. τρανσλοκάση κιτρικού/μηλικού, ένζυμο υπεύθυνο για την λειτουργία του συστήματος μεταφοράς κιτρικού/μηλικού οξέος μεταξύ μιτοχονδρίου – κυτταροπλάσματος. Ο κύκλος της τρανσυδρογενάσης μπορεί να λειτουργήσει ανεξάρτητα από την ροή του άνθρακα (μιτοχονδριακού κιτρικού οξέος σε κυτοπλασματικό ακέτυλο-CoA) και παρέχοντας NADPH σε διαδικασίες βιοσύνθεσης, επιμόκυνσης αλειφατικών αλυσίδων και αποκορεσμού λιπαρών οξέων. 11
- Εικόνα 1-4:** Διάσπαση του κιτρικού οξέος σε ακετυλο-CoA και οξαλοξικό οξύ μέσω του ενζύμου ATP- κιτρική λύαση (ATP - CL). 12
- Εικόνα 1-5:** Σχηματισμός ενδοκυτταρικών τρι-ακυλο-γλυκερολών μέσω ακυλίωσης της α-φωσφορο-γλυκερόλης. 14
- Εικόνα 1-6:** Ενδιάμεσος μεταβολισμός ελαιογόνων μικροοργανισμών. (a-c) Σύστημα μεταφοράς του πυροσταφυλικού οξέος από το κυτταρόπλασμα στο μιτοχόνδριο και αντιθέτως για το μηλικό, (d) σύστημα μεταφοράς κιτρικού/μηλικού ανάμεσα στο κυτταρόπλασμα και το μιτοχόνδριο. Ένζυμα: Ac (ακοτινάση), ACC (καρβοξυλάση του ακετυλο-CoA), ACL(ATP-κιτρική λύαση), FAS (συνθετάση λιπαρών οξέων), ICDH (ισοκιτρική αφυδρογονάση), MDc (κυτοπλασματική μηλική αφυδρογονάση), MDm (μιτοχονδριακή μηλική αφυδρογονάση), PD (πυροσταφυλική αφυδρογονάση), PFK (φωσφορική φρουκτοκινάση), PK (πυροσταφυλική κινάση). 16
- Εικόνα 1-7:** Σύνοψη διαφόρων οδών μέσω των οποίων τα λιπαρά οξέα μικροβιακού λίπους μετατρέπονται σε ανανεώσιμα ελαιοχημικά προϊόντα και οι τελικές τους χρήσεις. 18
- Εικόνα 1-8:** Η αντίδραση σχηματισμού του γλυκοζιτικού δεσμού, τυπική αντίδραση συμπύκνωσης στην οποία απελευθερώνεται ένα μόριο νερού. 20
- Εικόνα 1-9:** Μετεστεροποίηση. 22
- Εικόνα 1-10:** Σχηματική ροή διεργασίας για παραγωγή βιο-ντίζελ. 22
- Εικόνα 5-1:** Απόδοση ξηρής βιομάζας στο λίτρο (μαύρες ράβδοι) και περιεκτικότητα λιπιδίων στην ξηρή βιομάζα (λευκές ράβδοι) για τα 7 στελέχη ζυμών που καλλιεργήθηκαν σε 4 διαφορετικές πηγές αζώτου. 61

Κατάλογος Πινάκων

Πίνακας 1-1: Φυσικοχημικές ιδιότητες της γλυκερόλης.	3
Πίνακας 1-2: Χρήση ζυμών στις βιομηχανίες τροφίμων και ποτών (Demain et al 1998).	7
Πίνακας 1-3: Σύνθεση λιπαρών οξέων που παράγονται από διάφορα στελέχη ζυμών που αναπτύσσονται σε σακχαρούχα (ή παρόμοια υποστρώματα όπως γλυκερόλη, μελάσα κλπ.) υποστρώματα σε συνθήκες καλλιέργειας που ευνοούν τη συσσώρευση μικροβιακού λίπους.	9
Πίνακας 3-1: Πηγές αζώτου που χρησιμοποιήθηκαν για κάθε ζύμωση.	29
Πίνακας 4-1: Πηγές αζώτου που χρησιμοποιήθηκαν σε κάθε ζύμωση.	36
Πίνακας 4-2: Κινητικά δεδομένα από τις ζυμώσεις βυθού του στελέχους <i>C. curvatus</i> ATCC 20509 σε γλυκερόλη αρχικής συγκέντρωσης 50 g/L, για διαφορετικές πηγές αζώτου.	37
Πίνακας 4-3: Σύσταση ενδοκυτταρικού λίπους σε λιπαρά οξέα για το στέλεχος <i>C. curvatus</i> ATCC 20509 σε γλυκερόλη αρχικής συγκέντρωσης 50 g/L, για διαφορετικές πηγές αζώτου.	41
Πίνακας 4-4: Κινητικά δεδομένα από τις ζυμώσεις βυθού του στελέχους <i>C. curvatus</i> NRRL Y-1511 σε γλυκερόλη αρχικής συγκέντρωσης 50 g/L, για διαφορετικές πηγές αζώτου.	43
Πίνακας 4-5: Σύσταση ενδοκυτταρικού λίπους σε λιπαρά οξέα για το στέλεχος <i>C. curvatus</i> NRRL-Y 1511 σε γλυκερόλη αρχικής συγκέντρωσης 50 g/L, για πηγή αζώτου την πεπτόνη και χωρίς επιπλέον πηγή αζώτου.	45
Πίνακας 4-6: Κινητικά δεδομένα από τις ζυμώσεις βυθού του στελέχους <i>R. toruloides</i> NRRL Y-6984 σε γλυκερόλη αρχικής συγκέντρωσης 50 g/L, για διαφορετικές πηγές αζώτου.	47
Πίνακας 4-7: Σύσταση ενδοκυτταρικού λίπους σε λιπαρά οξέα για το στέλεχος <i>R. toruloides</i> NRRL Y-6984 σε γλυκερόλη αρχικής συγκέντρωσης 50 g/L, για πηγή αζώτου την πεπτόνη και το νιτρικό κάλιο.	49
Πίνακας 4-8: Σύγκριση των τριών μεθόδων εξαγωγής λίπους για το στέλεχος <i>C. curvatus</i> ATCC 20509 σε υπόστρωμα την γλυκερόλη, αρχικής συγκέντρωσης 50 g/L.	51
Πίνακας 4-9: Σύγκριση της 1ης και 3ης μεθόδου εξαγωγής λίπους για το στέλεχος <i>C. curvatus</i> ATCC 20509 σε υπόστρωμα την γλυκερόλη, αρχικής συγκέντρωσης 50 g/L.	52
Πίνακας 5-1: Σύγκριση αποτελεσμάτων με άλλες μελέτες για το στέλεχος <i>C. curvatus</i> ATCC 20509.	57
Πίνακας 5-2: Σύγκριση αποτελεσμάτων με άλλες μελέτες για το στέλεχος <i>C. curvatus</i> NRRL Y-1511.	58
Πίνακας 5-3: Σύγκριση αποτελεσμάτων με άλλες μελέτες για τη ζύμη <i>R. toruloides</i> .	60

Κατάλογος Διαγραμμάτων

- Διάγραμμα 4-1:** Κινητικά δεδομένα για την μεταβολή της βιομάζας, του αρχικού υποστρώματος και την παραγωγή λίπους ως προς το χρόνο, για το στέλεχος *C. curvatus* ATCC 20509 και πηγή αζώτου την πειπτόνη. **38**
- Διάγραμμα 4-2:** Κινητικά δεδομένα για την μεταβολή της βιομάζας, του αρχικού υποστρώματος και την παραγωγή λίπους ως προς το χρόνο, για το στέλεχος *C. curvatus* ATCC 20509 και πηγή αζώτου το θειικό αμμώνιο. **38**
- Διάγραμμα 4-3:** Κινητικά δεδομένα για την μεταβολή της βιομάζας, του αρχικού υποστρώματος και την παραγωγή λίπους ως προς το χρόνο, για το στέλεχος *C. curvatus* ATCC 20509 και πηγή αζώτου το νιτρικό κάλιο. **39**
- Διάγραμμα 4-4:** Κινητικά δεδομένα για την μεταβολή της βιομάζας, του αρχικού υποστρώματος και την παραγωγή λίπους ως προς το χρόνο, για το στέλεχος *C. curvatus* ATCC 20509 και πηγή αζώτου την ουρία. **39**
- Διάγραμμα 4-5:** Κινητικά δεδομένα για την μεταβολή της βιομάζας, του αρχικού υποστρώματος και την παραγωγή λίπους ως προς το χρόνο, για το στέλεχος *C. curvatus* ATCC 20509 και πηγή αζώτου το εκχύλισμα ζύμης. **40**
- Διάγραμμα 4-6:** Κινητικά δεδομένα για την μεταβολή της βιομάζας, του αρχικού υποστρώματος και την παραγωγή λίπους ως προς το χρόνο, για το στέλεχος *C. curvatus* ATCC 20509 και χωρίς επιπλέον πηγή αζώτου. **40**
- Διάγραμμα 4-7:** Καμπύλες συντελεστών των παραγόμενων ενδοπολυσακχαριτών ως προς τη παραχθείσα βιομάζα σε συνάρτηση με τον χρόνο, για το στέλεχος *C. curvatus* ATCC 20509. **42**
- Διάγραμμα 4-8:** Κινητικά δεδομένα για την μεταβολή της βιομάζας, του αρχικού υποστρώματος και την παραγωγή λίπους ως προς το χρόνο, για το στέλεχος *C. curvatus* NRRL Y-1511 και πηγή αζώτου την πειπτόνη. **44**
- Διάγραμμα 4-9:** Κινητικά δεδομένα για την μεταβολή της βιομάζας, του αρχικού υποστρώματος και την παραγωγή λίπους ως προς το χρόνο, για το στέλεχος *C. curvatus* NRRL Y-1511 χωρίς επιπλέον πηγή αζώτου. **44**
- Διάγραμμα 4-10:** Καμπύλες συντελεστών των παραγόμενων ενδοπολυσακχαριτών ως προς τη παραχθείσα βιομάζα σε συνάρτηση με τον χρόνο, για το στέλεχος *C. curvatus* NRRL-Y 1511. **46**
- Διάγραμμα 4-11:** Κινητικά δεδομένα για την μεταβολή της βιομάζας, του αρχικού υποστρώματος και την παραγωγή λίπους ως προς το χρόνο, για το στέλεχος *R. toruloides* NRRL Y-6984 και πηγή αζώτου την πειπτόνη. **48**
- Διάγραμμα 4-12:** Κινητικά δεδομένα για την μεταβολή της βιομάζας, του αρχικού υποστρώματος και την παραγωγή λίπους ως προς το χρόνο, για το στέλεχος *R. toruloides* NRRL Y-6984 και πηγή αζώτου το νιτρικό κάλιο. **48**
- Διάγραμμα 4-13:** Καμπύλες συντελεστών των παραγόμενων ενδοπολυσακχαριτών ως προς τη παραχθείσα βιομάζα σε συνάρτηση με τον χρόνο, για το στέλεχος *R. toruloides* NRRL Y-6984. **50**

Κατάλογος Γραφημάτων

- Γράφημα 5-1:** Μέγιστη παραγωγή βιομάζας και ενδοκυτταρικού λίπους για τις ζυμώσεις του στελέχους *C. curvatus* ATCC 20509 σε γλυκερόλη αρχικής συγκέντρωσης 50 g/L. **54**
- Γράφημα 5- 2:** Μέγιστη παραγωγή βιομάζας και ενδοκυτταρικού λίπους για τις ζυμώσεις του στελέχους *C. curvatus* NRRL Y-1511 σε γλυκερόλη αρχικής συγκέντρωσης 50 g/L. **55**
- Γράφημα 5- 3:** Μέγιστη παραγωγή βιομάζας και ενδοκυτταρικού λίπους για τις ζυμώσεις του στελέχους *R. toruloides* NRRL Y-6984 σε γλυκερόλη αρχικής συγκέντρωσης 50 g/L. **59**
- Γράφημα 5- 4:** Ποσοστιαία κατανομή των λιπαρών οξέων του στελέχους *C. curvatus* ATCC 20509. **62**
- Γράφημα 5- 5:** Ποσοστιαία κατανομή των λιπαρών οξέων του στελέχους *C. curvatus* NRRL Y-1511. **63**
- Γράφημα 5- 6:** Ποσοστιαία κατανομή των λιπαρών οξέων του στελέχους *R. toruloides* NRRL Y-6984. **64**
- Γράφημα 5- 7:** Σύγκριση μεθόδων εκχύλισης ενδοκυτταρικού λίπους. **66**

1^ο Κεφάλαιο

Εισαγωγή

1 Εισαγωγή

1.1 Γλυκερόλη

Η γλυκερόλη, γνωστή στη βιβλιογραφία και ως 1,2,3- προπανοτριόλη ή γλυκερίνη, είναι μια οργανική πολυολική ένωση που ανήκει στην ομάδα των αλκοολών. Η ονομασία γλυκερόλη προέρχεται από την ελληνική λέξη “γλυκός” που αναφέρεται σε κάτι γλυκό (Pagliaro et al., 2010). Είναι μια ουσία με μεγάλο εύρος εφαρμογών στη φαρμακευτική βιομηχανία, στα καλλυντικά και στη βιομηχανία τροφίμων. Μπορεί να παραχθεί ως υποπροϊόν από αντιδράσεις σαπωνοποίησης και υδρόλυσης σε ελαιοχημικά εργοστάσια καθώς επίσης και από αντίδραση μετεστεροποίησης σε εργοστάσια παραγωγής βιο-ντίζελ. Η γλυκερόλη που παράγεται από τα εργοστάσια αυτά είναι σε ακατέργαστη μορφή και μπορεί να περιέχει διάφορες ακαθαρσίες όπως λιπαρά, αλκαλικές ενώσεις, διόλες, συστατικά σαπουνιού, άλατα κ.λπ. ανάλογα με τον τύπο των υλικών που υποβάλλονται σε επεξεργασία καθώς και την διαδικασία που ακολουθήθηκε. Για τον λόγο αυτό, η γλυκερόλη αυτή αναφέρεται ως ακάθαρτη γλυκερόλη (Tan et al., 2013).

Η ακάθαρτη γλυκερόλη αποτελεί ένα προϊόν χαμηλής αξίας μιας και οι ακαθαρσίες που περιέχει την περιορίζουν στο να χρησιμοποιηθεί σαν πρώτη ύλη στις βιομηχανίες. Για τον λόγο αυτό, γίνονται διάφορες μελέτες προκειμένου να αναπτυχθούν διαδικασίες τέτοιες ώστε να μετατρέπεται η ακάθαρτη γλυκερόλη σε άλλα προϊόντα προστιθέμενης αξίας. Στον αντίποδα, η καθαρή γλυκερόλη μπορεί να πουληθεί με αυξημένη τιμή καθώς αποτελεί μια πολύ σημαντική βιομηχανική πρώτη ύλη, ιδιαίτερα στις χημικές βιομηχανίες. Συνεπώς, η ανάπτυξη μεθόδων καθαρισμού της ακάθαρτης γλυκερόλης είναι πολύ σημαντική προκειμένου να μπορέσει να χρησιμοποιηθεί σαν πρώτη ύλη στις βιομηχανίες αλλά και για να αξιοποιηθεί ως υποπροϊόν με τον βέλτιστο και οικονομικότερο τρόπο.

Επί του παρόντος, έχουν αναπτυχθεί διάφορες τεχνικές καθαρισμού της ακάθαρτης γλυκερόλης, όπως η συμβατική διήθηση, μικροδιήθηση, η υπερδιήθηση η οποία χρησιμοποιεί μεμβράνες οργανικού πολυμερούς, απλές αποστάξεις, αποστάξεις κενού, χημικές και φυσικές επεξεργασίες, τεχνικές ανταλλαγής ιόντων και προσρόφηση. Ο συνδυασμός δυο ή περισσότερων τεχνικών οδηγεί στην παραλαβή γλυκερόλης με υψηλότερη καθαρότητα (Tan et al., 2013).

1.1.1 Φυσικοχημικές ιδιότητες της γλυκερόλης

Η γλυκερόλη είναι μια οργανική ένωση με χημικό τύπο $C_3H_8O_3$. Είναι μια αλκοόλη χαμηλής τοξικότητας που αποτελείται από μια αλυσίδα τριών ατόμων άνθρακα με μια ομάδα υδροξυλίου προσκολλημένη σε κάθε άτομο άνθρακα.

Προέρχεται από φυσικές ή πετροχημικές πρώτες ύλες. Πρακτικά είναι μη τοξική τόσο για τον άνθρωπο όσο και για το περιβάλλον. Αποτελεί ένα άοσμο, άχρωμο και κολλώδες υγρό με γλυκιά γεύση (Farsalinos 2017). Το σημείο τήξης της είναι στους 18 °C και το σημείο βρασμού στους 290 °C. Υπό κανονική ατμοσφαιρική πίεση, έχει μοριακό βάρος 92,09 g/mol, πυκνότητα 1,226 g/cm³ και ιξώδες 1,5 Pa s. Η εκτενής διαμοριακή σύνδεση με το υδρογόνο είναι αυτή που οφείλεται για το υψηλό ιξώδες και το υψηλό σημείο βρασμού της γλυκερόλης. Η γλυκερόλη έχει την δυνατότητα να προσελκύει και να συγκρατεί την υγρασία του αέρα από το περιβάλλον χωρίς να μεταβάλλεται η ίδια. Οι τρεις υδροξυλομάδες είναι υπεύθυνες για την πολύ καλή διαλυτότητα της στο νερό και σε αλκοόλες. Στον αιθέρα είναι ελαφρώς διαλυτή ενώ είναι αδιάλυτη στους υδρογονάνθρακες. Αποτελεί πολύ καλό διαλύτη για πολλές ουσίες όπως το βρώμιο, το ιώδιο και τη φαινόλη λόγω της παρουσίας της υδροξυλομάδας στο μόριο της. Κάτω από φυσιολογικές συνθήκες αποθήκευσης και χειρισμού, η γλυκερόλη είναι χημικά σταθερή, ωστόσο, μπορεί να γίνει έκρηξη όταν έρθει σε επαφή με ισχυρά οξειδωτικά όπως το χλωρικό κάλιο. Η γλυκερόλη είναι ένα μόριο το οποίο μπορεί να συμμετέχει σε ένα μεγάλο αριθμό αντιδράσεων εξαιτίας της παρουσίας των πρωτογενών και δευτερογενών αλκοολικών ομάδων, οι οποίες μπορούν να αντικατασταθούν με άλλες χημικές ομάδες. Επιπλέον, υφίσταται διάφορες αντιδράσεις με τις οποίες σχηματίζει παράγωγα όπως ο αιθέρας, οι εστέρες, η αμίνη και η αλδεΐδη (Tan et al., 2013).

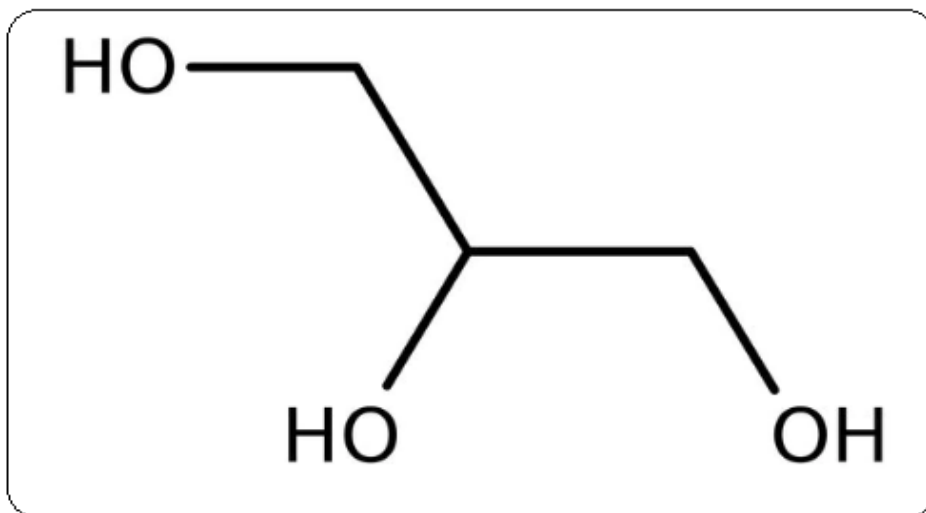
Πίνακας 1-1: Φυσικοχημικές ιδιότητες της γλυκερόλης.

Μοριακός τύπος:	C ₃ H ₈ O ₃
Μοριακή μάζα:	92,09 g/mol
Πυκνότητα:	1,226 g/cm ³
Ιξώδες:	1,5 Pa s
Σημείο βρασμού:	290 °C
Σημείο τήξης:	18 °C
Σημείο ανάφλεξης:	160 °C
Δείκτης διάθλασης:	1,4746
Επιφανειακή τάση:	64,00 mN/m
Διατροφική ενέργεια:	4,32 kcal/g

1.1.2 Βιομηχανική Γλυκερόλη

Η γλυκερόλη δημιουργείται έπειτα από την μετεστεροποίηση φυτικών ελαίων ή ζωικών λιπών στα εργοστάσια παραγωγής βιο-καυσίμου και αποτελεί το κύριο

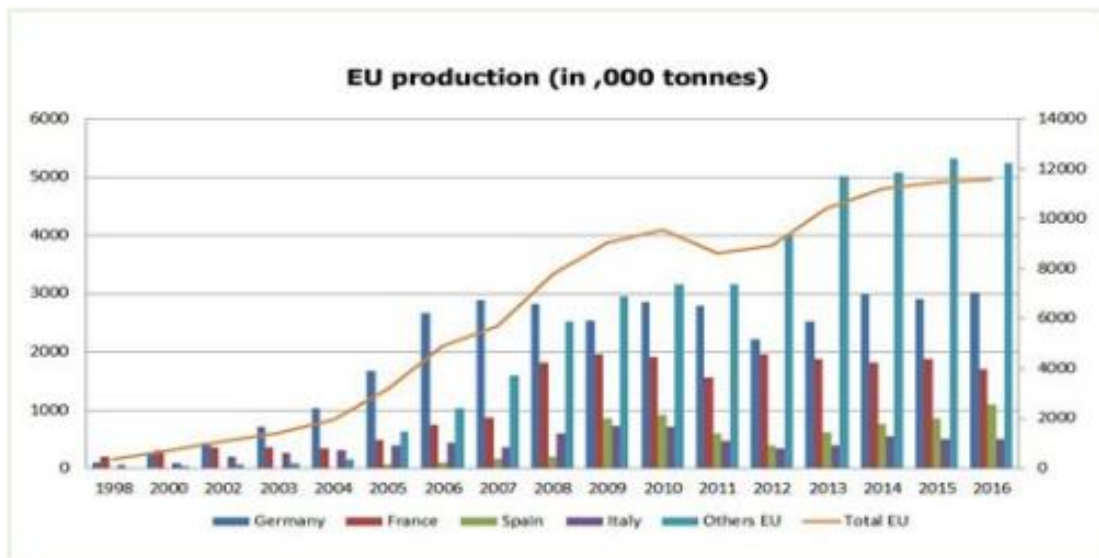
υποπροϊόν τους. Η μετεστεροποίηση είναι μια χημική αντίδραση κατά την οποία το λίπος και τα φυτικά έλαια (τριγλυκερίδια) αντιδρούν με μια αλκοόλη, όπως η μεθανόλη, με την παρουσία καταλύτη και παράγονται μεθυλεστέρες λιπαρών οξέων και γλυκερόλη. Κατά την διάρκεια της αντίδρασης της μετεστεροποίησης σχηματίζονται δύο φάσεις, όπου η ανώτερη φάση είναι πλούσια σε βιο-ντίζελ και η κατώτερη φάση πλούσια σε γλυκερόλη. Ο διαχωρισμός αυτός οφείλεται στην διαφορετική πυκνότητα και πολικότητα που έχουν (Tan et al., 2013). Η παραγωγή 100 kg βιο-ντίζελ αποδίδει περίπου 10 kg γλυκερόλης με καθαρότητα 50-55% (OOI et al., 2001). Η γλυκερόλη που παράγεται από την μετεστεροποίηση, στην ουσία αποτελεί ένα μείγμα διάφορων ουσιών με υψηλή περιεκτικότητα σε άλατα και με περίσσεια αλκοολών (Lopez et al., 2009).



Εικόνα 1-1: Χημικός τύπος γλυκερόλης.

Σήμερα, τα εργοστάσια παραγωγής βιο-ντίζελ έχουν γίνει μια πολύ σημαντική πηγή παραγωγής ακάθαρτης γλυκερόλης. Ωστόσο, η εκθετική ανάπτυξη παραγωγής βιο-ντίζελ από τις βιομηχανίες αυτές έχουν δημιουργήσει ένα πλεόνασμα ακάθαρτης γλυκερόλης στην αγορά (Ayoub et al., 2012). Όπως φαίνεται και στην Εικόνα 1-2, η παραγωγή βιο-ντίζελ στην Ευρωπαϊκή Ένωση έχει ανοδική πορεία με το χρόνο. Για το έτος 2017 παρήχθησαν περίπου 21 εκατομμύρια τόνοι βιο-ντίζελ εντός της Ευρωπαϊκής Ένωσης (European Biodiesel Board). Λόγω των ακαθαρσιών όμως που περιέχονται στην γλυκερόλη αυτή, δεν είναι οικονομικώς αποδοτικό να καθαριστεί αυτό το ρεύμα αποβλήτων και να χρησιμοποιηθεί από βιομηχανίες όπως αυτές των τροφίμων, των φαρμάκων και των καλλυντικών. Έχουν χρησιμοποιηθεί διάφορες εναλλακτικές μέθοδοι για την διάθεση και αξιοποίησή της, όπως η καύση, η κομποστοποίηση, η αναερόβια χώνευση, χρήση σε ζωοτροφές, θερμοχημικές και βιολογικές μετατροπές προς προϊόντα προστιθέμενης αξίας κ.α. Αν λοιπόν αναπτυχθούν μέθοδοι όπου θα μπορέσουν να αξιοποιήσουν την ακάθαρτη

γλυκερόλη με τρόπο που να συμφέρει οικονομικά τις βιομηχανίες, τότε η παραγωγή βιο-ντιζελ θα γίνει πιο επικερδής και επικρατούσα στην αγορά. (Wen et al., 2009).



Εικόνα 1-2: Η παραγωγή βιο-ντιζελ εντός της Ευρωπαϊκής Ένωσης από το έτος 1998 έως το έτος 2016 (πηγή: European Biodiesel Board).

1.1.3 Βιομηχανική χρήση της γλυκερόλης

Η γλυκερόλη είναι ένα πολύτιμο υπο-προϊόν καθώς έχει ένα εύρη φάσμα βιομηχανικών εφαρμογών όπως φαρμακευτικά σκευάσματα, προϊόντα προσωπικής φροντίδας, στα τρόφιμα και στα καλλυντικά. Κάποιες από τις χρήσεις της γλυκερόλης στη φαρμακευτική βιομηχανία είναι: για την καλύτερη διαλυτότητα ορισμένων φαρμάκων, για την αύξηση της υγρασίας στα χάπια, την αύξηση στο ιζώδες στα υγρά φάρμακα, σε σιρόπια για τον βήχα, στα αντιβιοτικά και αντισηπτικά ενώ χρησιμοποιείται και ως πλαστικοποιητής για φάρμακα τύπου κάψουλας. Η γλυκερόλη είναι ένας εξαιρετικός διαλύτης διαφόρων συστατικών τύπου ιωδίου, βρωμίου, φαινόλης, τανινών, αλκαλοειδών καθώς και του χλωριούχου υδράργυρου. Άλλη χρήση της είναι σε προϊόντα προσωπικής φροντίδας, κυρίως ως λιπαντικό, υγραντικό και ενυδατικό μέσο σε πολλά προϊόντα περιποίησης δέρματος και μαλλιών όπου η ενυδάτωση είναι μια σημαντική ιδιότητα των προϊόντων που χρησιμοποιούνται. Αποτελεί επίσης ένα κύριο συστατικό στις οδοντόκρεμες προκειμένου να αποφευχθεί η σκλήρυνση και η ξήρανση των διαφόρων υλικών καθαρισμού εντός του σωλήνα. Στη βιομηχανία τροφίμων και ποτών η γλυκερόλη δρα ως διαλύτης, γλυκαντικό και συντηρητικό. Η κατανάλωση της από τον άνθρωπο γίνεται συνήθως από προϊόντα εκχύλισης τσαγιού, καφέ, τζίντζερ και άλλων φυτικών προϊόντων. Επίσης χρησιμοποιείται ως συστατικό για το μαλάκωμα στο ψωμί, στα κέικ, στα κρέατα, στα τυριά και στις καραμέλες. Η χρήση της στα τρόφιμα δεν

αποτελεί κίνδυνο για τον άνθρωπο, αλλά είναι απαραίτητη προϋπόθεση να έχει υψηλή καθαρότητα. Άλλη μια χρήση της είναι στην καπνοβιομηχανία προκειμένου να ρυθμίζει την υγρασία του καπνού, να παρέχει φρεσκάδα ενώ δύναται να χρησιμοποιηθεί και ως μέσω εξάλειψης των δυσάρεστων ερεθιστικών γεύσεων. Στην βιομηχανία κλωστοϋφαντουργίας χρησιμοποιείται για την λίπανση και στο μαλάκωμα των νημάτων και των υφασμάτων (Yang et al., 2012, Tan et al., 2013).

1.2 Ζύμες - Ελαιογόνοι μικροοργανισμοί

1.2.1 Ζύμες

Οι ζύμες είναι ευκαρυστικοί μονοκύτταροι μικροοργανισμοί οι οποίοι κατανέμονται ευρέως στα διάφορα φυσικά περιβάλλοντα. Παρόλο που οι ζύμες δεν βρίσκονται παντού στο φυσικό περιβάλλον, όπως τα βακτήρια, έχουν απομονωθεί τόσο από το χερσαίο και υδάτινο όσο και από το ατμοσφαιρικό περιβάλλον. Έχει διαπιστωθεί ότι υπάρχει αλληλεπίδραση μεταξύ των κοινοτήτων των ζυμών με τα ζώα, φυτά και έντομα. Αρκετά είδη ζυμών έχουν απομονωθεί από εξειδικευμένα ή ακραία περιβάλλοντα, όπως αυτά με χαμηλό υδατικό δυναμικό (π.χ. υψηλή συγκέντρωση σακχάρου ή άλατος), χαμηλών θερμοκρασιών (π.χ. ζύμες που απομονώθηκαν από το περιβάλλον της Ανταρκτικής), χαμηλής διαθεσιμότητας οξυγόνου (π.χ. εντερική οδό των ζώων) κ.α.. Μέχρι σήμερα περίπου 1500 είδη ζυμών τα οποία ανήκουν σε περισσότερα από 100 γένη έχουν περιγραφεί. Εκτιμάται ότι μόνο το 1% από τα υπάρχοντα είδη έχουν περιγραφεί (Satyanarayana et al., 2009).

Οι ζύμες παίζουν σημαντικό ρόλο στις τροφικές αλυσίδες αλλά και στον κύκλο του άνθρακα, του αζώτου και του θείου (Satyanarayana et al., 2009). Χρησιμοποιούνται σε πολλές βιομηχανικές διεργασίες, όπως στην παραγωγή αλκοολούχων ποτών, αρτοποιευσμάτων, τροφίμων, ζωοτροφών καθώς και στη βιοσύνθεση διαφόρων άλλων μεταβολικών προϊόντων. Στην τελευταία κατηγορία περιλαμβάνονται ένζυμα, βιταμίνες, πολυσακχαρίτες, καροτενοειδή, πολυόλες, λιπίδια, γλυκολιπίδια, κιτρικό οξύ, αιθανόλη, διοξείδιο του άνθρακα και ενώσεις που συντίθενται με την εισαγωγή του ανασυνδυασμένου DNA σε ζυμομύκητες. Μερικά από αυτά τα προϊόντα παράγονται εμπορικά ενώ άλλα είναι δυνητικά πολύτιμα στον τομέα της βιοτεχνολογίας (Demain et al., 1998).

Από τα αρχαία ακόμη χρόνια, ο άνθρωπος χωρίς να γνωρίζει τη χρήση και χρησιμότητα / σημασία των μικροοργανισμών, χρησιμοποιούσε κατά τρόπο εμπειρικό / παραδοσιακό τις ζύμες προς παραγωγή τροφίμων και ποτών. Εκτιμάται ότι πριν από 9000 χρόνια, στη Σουμερία παράγονταν μύρα, στην Ασσυρία παράγονταν κρασί από το 3500 π.Χ., ενώ στην αρχαία Ρώμη υπήρχαν πάνω από 250 αρτοποιεία όπου έφτιαχναν ψωμί με προζύμι από το 100 π.Χ.. Πολλά προϊόντα τα οποία βρίσκονται στην καθημερινή διατροφή του ανθρώπου, παράγονται από την

διαδικασία της ζύμωσης με την χρήση ζυμών. Κάποια από αυτά είναι η μπύρα ($60 \cdot 10^6$ tn/yr), το κρασί ($30 \cdot 10^6$ tn/yr), η μονοκυτταρική πρωτεΐνη και οι ζωοτροφές ($8 \cdot 10^5$ tn/yr), η ζύμη αρτοποιίας ($6 \cdot 10^5$ tn/yr) και το κιτρικό οξύ ($5 \cdot 10^5$ tn/yr) το οποίο παράγεται από ζύμες και μύκητες (Demain et al 1998).

Στον Πίνακα 1-2 παρουσιάζονται ορισμένες ζυμώσεις που χρησιμοποιούνται από βιομηχανίες ποτών, τροφίμων και άλλων βιομηχανιών και τα αντίστοιχα στελέχη ζυμών που χρησιμοποιούνται.

Πίνακας 1-2: Χρήση ζυμών στις βιομηχανίες τροφίμων και ποτών (Demain et al 1998).

Εφαρμογή	Ζύμη
Ζύμωση μπύρας τύπου "ale"	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Διόγκωση ψωμιού και προζύμης	<i>S. cerevisiae</i> , <i>Saccharomyces exiguus</i> , " <i>Saccharomyces rosei</i> "
D- Αραβιτόλη (γλυκαντική ουσία)	<i>Candida diddensiae</i>
Γαλακτοματοποιητές	<i>Candida lipolytica</i>
Ζύμωση αιθανόλης	<i>S. cerevisiae</i>
Ιχθυοτροφές και πιτηνοτροφές (ασταξανθίνη)	<i>Phaffia rhodozyma</i>
Ζωοτροφές και μονοκυτταρική πρωτεΐνη	<i>Candida utilis</i>
Ζύμωση λακτόζης και γάλακτος	<i>Candida pseudotropicalis</i> , " <i>Kluyveromyces fragilis</i> ", <i>Kluyveromyces lactis</i>
Ζύμωση μπύρας τύπου "lager"	" <i>Saccharomyces carlsbergensis</i> " (= <i>S. pastorianus</i>)
Μαννιτόλη (ενυδατική ουσία)	" <i>Torulopsis mannifaciens</i> "
Σάλτσα (Shoyu) και πάστα (Miso) σόγιας	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>
Ζύμωση κρασιού	<i>S. cerevisiae</i>
Ευλιτόλη (γλυκαντική ουσία)	" <i>Torulopsis Candida</i> "
Ζύμωση D- Ξυλόζης	<i>Candida shehatae</i> , <i>Pachysolen tannophilus</i> , <i>Pichia stipitidis</i> , <i>Pichia segobiensis</i>

1.2.2 Ελαιογόνοι μικροοργανισμοί

Ως ελαιογόνοι μικροοργανισμοί έχουν οριστεί οι μικροοργανισμοί αυτοί που μπορούν να συσσωρεύσουν έως το 20% της βιομάζας του σε λίπος όταν οι συνθήκες καλλιέργειας ευνοούν τη συσσώρευση λιπιδίων από αυτόν (π.χ. αύξηση σε υποστρώματα τύπου γλυκόζης με υψηλό περιορισμό αζώτου). Κάθε ελαιογόνος μικροοργανισμός έχει διαφορετική μέγιστη ποσότητα λίπους που μπορεί να συσσωρεύσει. Ορισμένοι μικροοργανισμοί μπορούν να συσσωρεύσουν λίπος μόνο σε ποσοστό 25% του ξηρού τους βάρους, άλλοι έχουν την ικανότητα να παράγουν λιπίδια μέχρι 50%, ενώ ορισμένοι μπορούν να συσσωρεύσουν μέχρι και 70-80% (Ratledge, 1991).

Η παραγωγή και συσσώρευση λίπους από τους ελαιογόνους μικροοργανισμούς γίνεται κάτω από ειδικές συνθήκες. Η εξάντληση ενός βασικού συστατικού, συνήθως η πηγή αζώτου στο περιβάλλον ανάπτυξης, είναι υπεύθυνη για την συσσώρευση ενδοκυτταρικού λίπους. Κατά τη φάση ανάπτυξης, όλα τα απαραίτητα θρεπτικά συστατικά είναι διαθέσιμα για ανάπτυξη και πολλαπλασιασμό των κυττάρων και λίγα λιπίδια συσσωρεύονται. Όταν το άζωτο αρχίζει να περιορίζεται από το περιβάλλον ανάπτυξης, αλλά οι πηγές άνθρακα εξακολουθούν να είναι σε αφθονία, ο μικροοργανισμός βιώνει μη ισορροπημένες καταστάσεις και η φάση αυτή καλείται ιδιόφαση. Κατά τη διάρκεια της φάσης αυτής ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων σταματά λόγω της έλλειψης αζώτου (κρίσιμη για

νουκλειϊκά οξέα και πρωτεϊνική σύνθεση), αλλά τα κύτταρα συνεχίζουν να καταναλώνουν τον διαθέσιμο άνθρακα και να συνθέτουν και συσσωρεύουν λιπίδια ως αποθεματικό υλικό αποθήκευσης (Ratledge, 2004). Τα λιπίδια αυτά είναι γνωστά ως ενδοκυτταρικά έλαια (SCO – Single Cell Oil) και ο χαρακτηρισμός αυτός απευθύνεται στα έλαια τα οποία προέρχονται από μικροοργανισμούς. Αποθηκεύονται ενδοκυτταρικά με την μορφή τριακυλογλυκερόλης ή τριγλυκερίδια (TAGs) (Paranikolaou et al., 2001, Paranikolaou et al., 2004) και σε μικρότερο βαθμό ως ελεύθερα λιπαρά οξέα, ουδέτερα λιπίδια όπως μονοακυλογλυκερίνες, διακυλογλυκερίνες, στερόλες και πολικά κλάσματα όπως φωσφολιπίδια, σφιγγολιπίδια και γλυκολιπίδια (Paranikolaou & Aggelis, 2011). Τα μικροβιακά κύτταρα μπορούν να χρησιμοποιήσουν αυτό το αποθεματικό λιπιδίων ως πηγή άνθρακα και ενέργειας όταν οι περιβαλλοντικές συνθήκες δεν είναι ευνοϊκές και άλλες πηγές άνθρακα δεν είναι διαθέσιμες (Dyal et al., 2005).

Μια σύνοψη σχετικά με τις καλύτερα ελεγμένες ελαιογόνες ζύμες, σε ποσοστό λιπιδίων και προφίλ λιπαρών οξέων παρουσιάζεται στον Πίνακα 1-3. Τα κυριότερα λιπαρά οξέα που συναντώνται στα μικροβιακά λιπίδια είναι το παλμιτικό οξύ (16:0), το παλμιτελαϊκό οξύ (16:1), το στεατικό οξύ (18:0), το ελαϊκό οξύ (18:1), το λινελαϊκό οξύ (18:2) και το λινολενικό οξύ (18:3).

Ανάλογα με τον επιλεγμένο μικροοργανισμό απαιτούνται διαφορετικές πηγές άνθρακα και ενέργειας. Τα μικροβιακά λιπίδια περιέχουν μια τεράστια ποικιλία διαφορετικών λιπαρών οξέων κατάλληλων ως εναλλακτικό βασικό υλικό για διάφορες βιομηχανικές εφαρμογές (Paranikolaou & Aggelis, 2011).

Πίνακας 1-3: Σύνθεση λιπαρών οξέων που παράγονται από διάφορα στελέχη ζυμών που αναπτύσσονται σε σακχαρούχα (ή παρόμοια υποστρώματα όπως γλυκερόλη, μελάσα κλπ.) υποστρώματα σε συνθήκες καλλιέργειας που ευνοούν τη συσσώρευση μικροβιακού λίπους (Papanikolaou & Aggelis, 2011).

Γένος	Λίπος (% w/w)	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3
<i>Candida sp. 107^{a)}</i>	37,1	37	1	14	36	7	T.
<i>Candida sp. 107</i>	n.r	28	n.r	8	41	17	17
<i>Candida sp.</i>	40,3	23	13	3	54	5	2
<i>Rhodotorula gracilis</i>	41,0	21	T.	13	51	11	3
<i>Candida curvata^{b)}</i>	29,1	36	T.	14	40	7	T.
<i>Candida curvata^{b)}</i>	28,0	37	T.	10	44	6	T.
<i>Apiotrichum curvarum^{b)}</i>	31,0	34	T.	10	43	7	2
<i>Cryptococcus curvatus^{b)}</i>	38,0	24	T.	10	46	9	6
<i>Cryptococcus curvatus^{b)}</i>	25,0	18	T.	16	50	16	T.
<i>Cryptococcus curvatus^{b)}</i>	50,0	31	-	22	42	1	n.r.
<i>Cryptococcus albidus</i>	46,3	14	T.	9	53	18	2
<i>Cryptococcus albidus</i>	n.r.	20	n.r.	11	59	6	6
<i>Yarrowia lipolytica</i>	43,2	15	2	11	47	21	3
<i>Yarrowia lipolytica</i>	30,7	12	11	9	57	11	T.
<i>Yarrowia lipolytica^{a)}</i>	22,3	13	17	6	55	7	n.r.
<i>Rhodospiridium toruloides</i>	67,5	20	1	15	47	13	3
<i>Rhodospiridium toruloides</i>	65,2	34	T.	13	48	1	T.
<i>Rhodospiridium toruloides</i>	62,1	26	2	5	62	3	T.
<i>Rhodospiridium toruloides</i>	55,6	43	T.	16	35	2	T.
<i>Lipomyces starkeyi</i>	68,0	56	2	14	26	T.	T.
<i>Lipomyces starkeyi</i>	61,5	37	4	6	49	1	T.
<i>Rhodotorula mucilaginoso</i>	48,6	22	2	9	55	11	T.
<i>Trichosporon capitatum</i>	37,6	12	1	2	74	9	n.r.
<i>Rhodotorula sp.</i>	22,0	22	1	7	56	12	n.r.
<i>Candida oleophila</i>	15,3	13	3	7	66	11	n.r.

T. <0,5% w/w; n.r. : δεν αναφέρεται.

a) αναπαράσταση του ουδέτερου κλάσματος των μικροβιακών λιπιδίων που παράγονται.

b) ο *Cryptococcus curvatus* ονομαζόταν στο παρελθόν *Candida curvata* και μετά *Apiotrichum curvatum*; Αυτοί οι μικροοργανισμοί είναι στην πραγματικότητα τα ίδια είδη.

1.2.2.1 Η ελαιογόνος ζύμη *Cryptococcus curvatus*

Η ελαιογόνος ζύμη *Cryptococcus curvatus* γνωστή παλιότερα και ως *Apiotrichum curvatum* και *Candida curvata*, ανακαλύφθηκε στο πολιτειακό πανεπιστήμιο της Αϊόβα (Moon & Hammond, 1978). Τέσσερα στελέχη ζύμης απομονώθηκαν έπειτα από αποστράγγιση γαλακτοκομικών προϊόντων, τα οποία είχαν την ικανότητα ζύμωσης της λακτόζης η οποία προερχόταν από τυρί ορού γάλακτος. Τα στελέχη αυτά είχαν την ικανότητα συσσώρευσης μιας σημαντικής ποσότητας ενδοκυτταρικών λιπιδίων (Hammond et al., 1981).

Ένα σημαντικό χαρακτηριστικό της ζύμης *Cryptococcus curvatus* είναι η ικανότητα ανάπτυξης της σε ένα ευρύ φάσμα υποστρωμάτων. Η ανάπτυξη της έχει αξιολογηθεί σε διάφορες πηγές άνθρακα όπως η γλυκόζη, η λακτόζη, η γαλακτόζη, η

σακχαρόζη αλλά και σε γεωργικά απόβλητα ή απόβλητα επεξεργασίας τροφίμων (Ratledge & Cohen, 2005). Ο *C. curvatus* έχει την ικανότητα να μετατρέπει τις διάφορες πηγές άνθρακα σε λιπαρά οξέα. Τα λιπίδια στο εσωτερικό του κυττάρου βρίσκονται κυρίως με την μορφή τριακυλογλυκεριδίων και έχει την ικανότητα να συσσωρεύσει λίπος έως και 60% του ξηρού βάρους του κυττάρου του. Η σύνθεση των ενδοκυτταρικών λιπιδίων του είναι παρόμοια με εκείνη του φοινικέλαιου, με υψηλή ποσότητα ελαϊκού οξέος, το οποίο είναι κατάλληλο για παραγωγή βιο-ντίζελ (Hassan et al., 1994).

1.2.2.2 Η ζύμη *Rhodosporidium toruloides*

Η ζύμη *Rhodosporidium toruloides* είναι μια κόκκινη ελαιογόνος, μη παθογόνος ζύμη που ανήκει στην οικογένεια των βασιδιομυκήτων (Zhu et al., 2012). Η εν λόγω ζύμη έχει πολλές βιοτεχνολογικές εφαρμογές, καθώς μπορεί να παράξει ουδέτερα λιπίδια, καρτενοειδή ουσίες αλλά και πολλά σημαντικά ένζυμα (Passoth et al., 2017). Μελέτες έχουν δείξει την ικανότητα της να αναπτύσσεται σε ένα ευρύ φάσμα πηγών άνθρακα και αζώτου με αποτέλεσμα την παραγωγή προϊόντων υψηλής αξίας από υποστρώματα χαμηλού κόστους. Ο μικροοργανισμός *R. toruloides* είναι ικανός να συσσωρεύσει λιπίδια σε ποσοστό πάνω από 70% (w/w) επί της ξηράς ουσίας (Xu et al., 2015).

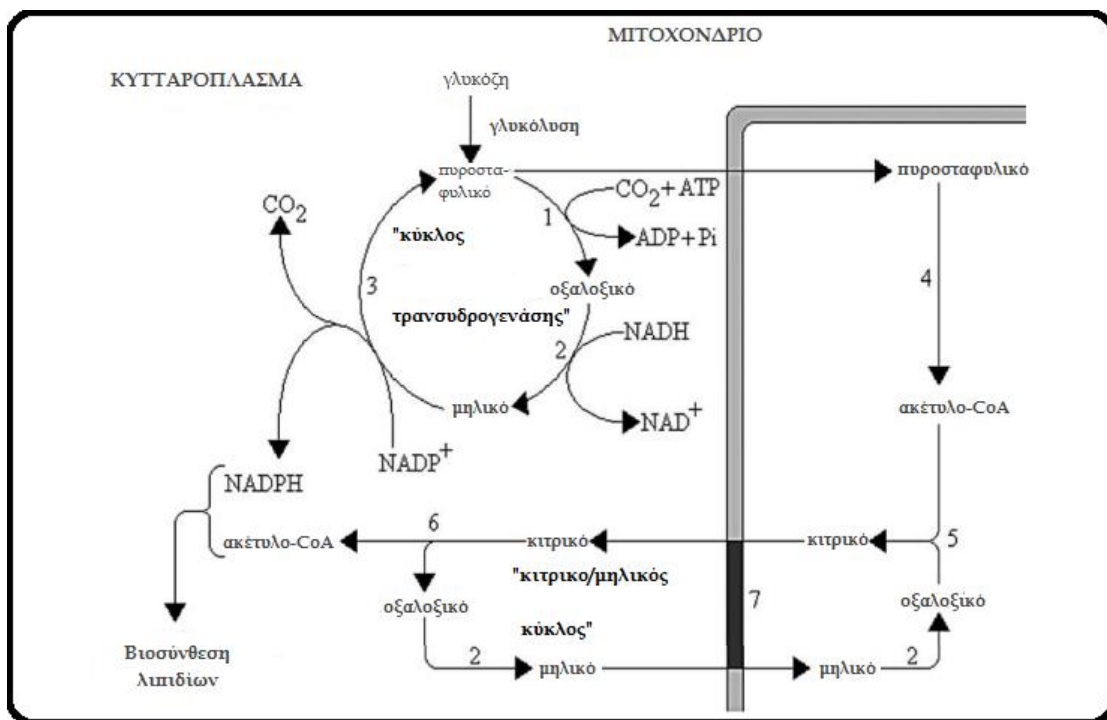
1.3 Λιπίδια

1.3.1 Βιοχημεία συσσώρευσης μικροβιακού λίπους

Απαραίτητη προϋπόθεση για να μπορέσουν οι εκάστοτε ελαιογόνοι μικροοργανισμοί να συσσωρεύσουν ενδοκυτταρικό λίπος, είναι να καλλιεργούνται σε περιβάλλον όπου υπάρχει περίσσεια πηγής άνθρακα και το άζωτο είναι περιορισμένο. Όταν το άζωτο που βρίσκεται στο περιβάλλον ανάπτυξης του μικροοργανισμού καταναλωθεί, τότε ο μικροοργανισμός συνεχίζει να αφομοιώνει την πηγή άνθρακα και την μετατρέπει σε τριγλυκερίδια, τα οποία συσσωρεύονται εντός του κυττάρου του (Ratledge, 2004).

Οι κύριοι παράμετροι με τους οποίους ένας μικροοργανισμός μπορεί να χαρακτηριστεί ελαιογόνος είναι δύο: η πρώτη αφορά την δυνατότητα να παράγεται συνεχόμενα το Ακέτυλο συνένζυμο Α (Ακέτυλο-CoA - Acetyl-CoA) απευθείας στο κυτταρόπλασμα του κυττάρου, το οποίο είναι προαπαιτούμενο για την σύνθεση των λιπαρών οξέων. Η δεύτερη είναι η ικανότητα του μικροοργανισμού να παράγει επαρκείς ποσότητες NADPH, το οποίο είναι ένα βασικό αναγωγικό μέσο που συμμετέχει στο μηχανισμό βιοσύνθεσης των λιπαρών οξέων (Ratledge, 2004).

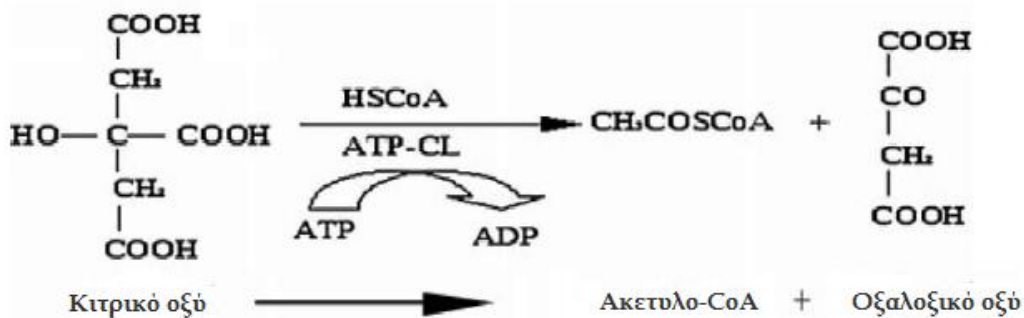
Κατά την διάρκεια αφομοίωσης της πηγής άνθρακα, το τελικό προϊόν της γλυκόλυσης είναι το πυροσταφυλικό οξύ, το οποίο εισέρχεται εντός του μιτοχονδρίου μέσω της μιτοχονδριακής μεμβράνης (Εικόνα 1-3). Εκεί το ένζυμο αποκαρβοξυλάση του πυροσταφυλικού οξέος καταλύει το σχηματισμό του ακέτυλου-CoA. Αφού σχηματιστεί το ακέτυλο συνένζυμο A, εισέρχεται στο κύκλο του Krebs. Όταν εξαντληθεί η πηγή αζώτου στο περιβάλλον ανάπτυξης, παρατηρείται διακοπή του κύκλου του Krebs. Η διακοπή αυτή οφείλεται στην ενεργοποίηση του ενζύμου AMP – απαμινάση, η οποία καταλύει την διάσπαση του AMP (μονοφωσφορική αδενοσίνη) σε IMP (μονοφωσφορική ινοσίνη) και ιόντα NH_4^+ . Με τον τρόπο αυτό επιτυγχάνεται ταχύτατη πτώση της συγκέντρωσης AMP και μείωση της ενεργότητας του ενζύμου ισοκιτρική αφυδρογονάση, διότι ενεργοποιείται αλλοστερικά από την ενδοκυτταρική AMP. Το ένζυμο ισοκιτρική αφυδρογονάση είναι υπεύθυνο για την μετατροπή του ισοκιτρικού οξέος σε α-κετογλουταρικό οξύ, το οποίο έχει ως συνέπεια την συσσώρευση του ισοκιτρικού οξέος εντός του μιτοχονδρίου. Το ισοκιτρικό οξύ βρίσκεται σε ισορροπία με το κιτρικό οξύ (αντίδραση η οποία καταλύεται από την ισοκιτρική ακοτινάση (Papanikolaou & Angelis, 2011)).



Εικόνα 1-3: Το σχέδιο δείχνει πως ο κύκλος του κιτρικού/μηλικού και ο κύκλος της τρανσυδρογέναςης στο κυτταρόπλασμα συνεισφέρουν στην παροχή πρόδρομων του ακετυλο-CoA και NADPH για λιπογένεση στους ελαιογόνους μικροοργανισμούς. Ένζυμα: 1. αποκαρβοξυλάση του πυροσταφυλικού οξέος, 2. αφυδρογονάση του μηλικού οξέος, 3. μηλικό ένζυμο, 4. αφυδρογονάση του πυροσταφυλικού οξέος, 5. κιτρική συνθάση, 6. ATP-κιτρική λύαση, 7. τρανσλοκάση κιτρικού/μηλικού, ένζυμο υπεύθυνο για την λειτουργία του συστήματος μεταφοράς κιτρικού/μηλικού οξέος μεταξύ μιτοχονδρίου - κυτταροπλάσματος. Ο κύκλος της τρανσυδρογέναςης μπορεί να λειτουργήσει ανεξάρτητα από την ροή του άνθρακα (μιτοχονδριακού κιτρικού οξέος σε κυτοπλασματικό ακέτυλο-CoA) και παρέχοντας NADPH σε διαδικασίες βιοσύνθεσης, επιμήκυνσης αλειφατικών αλυσίδων και αποκορεσμού λιπαρών οξέων (Ratledge, 2004).

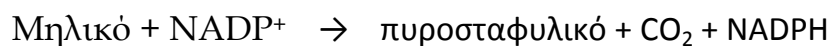
Όταν η συγκέντρωση του κιτρικού οξέος που βρίσκεται στο εσωτερικό του μιτοχονδρίου υπερβεί μια κρίσιμη συγκέντρωση ανοχής, τότε εξέρχεται από το μιτοχόνδριο στο κυτταρόπλασμα μέσω του συστήματος μεταφοράς κιτρικού/μηλικού οξέος, σε ισορροπία με το μηλικό. Ο σχηματισμός του ακετυλο-CoA στους ελαιογόνους μικροοργανισμούς αποδίδεται από αρκετούς ερευνητές στην παρουσία του ενζύμου ATP- κιτρική λυάση (ATP - CL), η οποία κατά κανόνα δεν εντοπίζεται στους μη ελαιογόνους μικροοργανισμούς (Papanikolaou & Aggelis, 2011).

Έτσι το κιτρικό οξύ μέσω του ενζύμου ATP- κιτρική λυάση (ATP - CL) διασπάτε σε ακετυλο-CoA και οξαλοξικό οξύ, όπως φαίνεται στην παρακάτω αντίδραση της Εικόνας 1-4 (Papanikolaou & Aggelis, 2011).



Εικόνα 1-4: Διάσπαση του κιτρικού οξέος σε ακετυλο-CoA και οξαλοξικό οξύ μέσω του ενζύμου ATP- κιτρική λυάση (ATP - CL).

Όπως έχει αναφερθεί, το NADPH είναι απαραίτητο για την βιοσύνθεση των λιπαρών οξέων και παρέχεται από τον ενδιάμεσο κυτταρικό μεταβολισμό (κύκλος της τρανσυδρογενάσης), όπως φαίνεται στην Εικόνα 1-3. Εξίσου σημαντική όμως είναι και η συνεισφορά του μηλικού ενζύμου στη βιοσύνθεση του λίπους, καθώς λειτουργεί ως προμηθευτής NADPH:



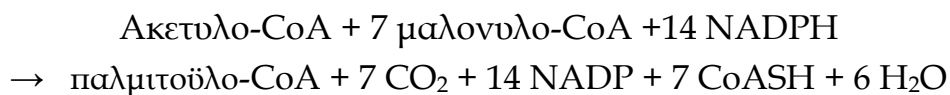
Πιθανότατα το μηλικό ενζυμο σχηματίζει ένα σταδιακό μεταβολικό σύμπλοκο το οποίο συνδυάζεται με την ATP- κιτρική λυάση και τη συνθάση των λιπαρών οξέων, με σκοπό την εξασφάλιση μιας άμεσης διόδου επικοινωνίας κατά τη μετατροπή του ακετυλο-CoA σε λιπαρά οξέα. Τα λιπαρά οξέα που παράγονται από την μετατροπή αυτή, εστεροποιούνται με γλυκερόλη σε σταγονίδια λιπαρών οξέων (Ratledge, 2004). Εάν το ενζυμο ATP- κιτρική λυάση απουσιάζει από έναν μικροοργανισμό ή είναι ανενεργό, τότε όταν εξαντληθούν τα αποθέματα αζώτου από το θρεπτικό μέσο της καλλιέργειας, το παραγόμενο ενδοκυτταρικό κιτρικό οξύ απεκκρίνεται εντός του κυτταροπλάσματος. Σε αυτή τη περίπτωση το κιτρικό οξύ ή

θα εκκριθεί στο θρεπτικό μέσο της καλλιέργειας ή θα προκαλέσει την παρεμπόδιση του ενζύμου 6-φώσφορο-φρουκτοκινάση, με αποτέλεσμα την συσσώρευση ενδοκυτταρικών πολυσακχαριτών με βάση την 6-φώσφορο-γλυκόζη. Συνεπώς, οι διεργασίες συσσώρευσης ενδοκυτταρικού λίπους και συσσώρευσης κιτρικού οξέος, κατά τα πρώτα στάδια τους είναι βιοχημικά ταυτόσημες (Paranikolaou & Aggelis, 2011).

Η πρώτη αντίδραση για την βιοσύνθεση των λιπαρών οξέων αμέσως μετά τη δημιουργία του ακετυλο-CoA, καταλύεται από το ένζυμο καρβοξυλάση του ακετυλο-CoA. Το ένζυμο είναι εξαρτώμενο από την βιοτινή και η συνολική αντίδραση δίδεται στην παρακάτω αντίδραση (Paranikolaou & Aggelis, 2011).

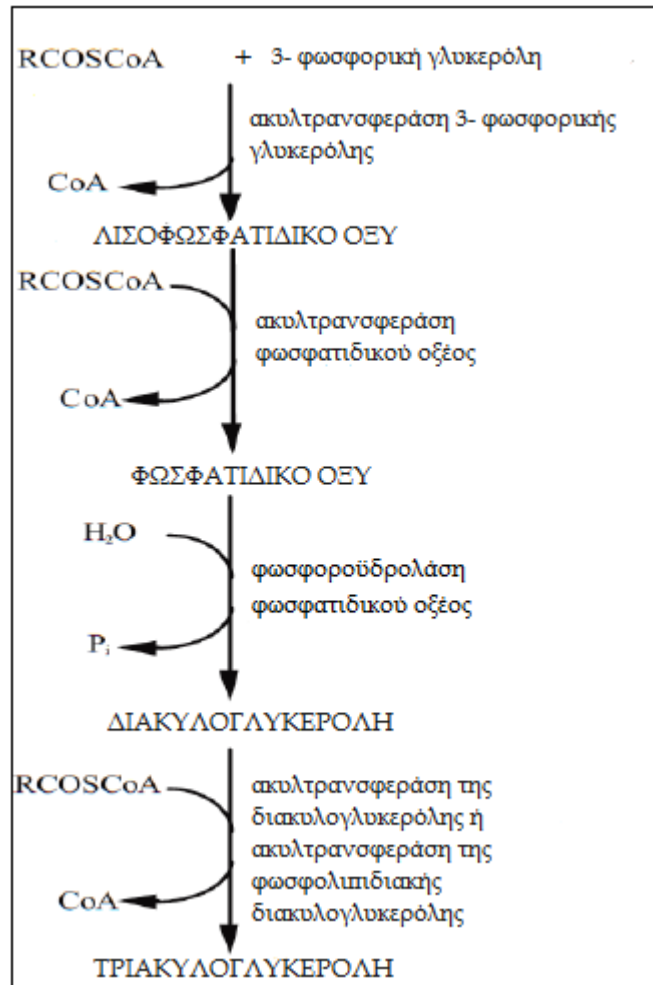


Η αντίδραση αυτή θεωρείται ως το περιοριστικό στάδιο για την βιοσύνθεση των λιπαρών οξέων και ενεργοποιείται από την παρουσία του κιτρικού οξέος στο κυτταρόπλασμα των ελαιογόνων μικροοργανισμών. Όταν επιτευχθεί η παραγωγή του μαλονύλο-συνενζύμου-A (μαλονυλο-CoA), η βιοσύνθεση των λιπαρών οξέων συνεχίζεται με τη συμβολή ενός πολλαπλού ενζυμικού συμπλέγματος. Το σύμπλεγμα αυτό ονομάζεται συνθετάση των λιπαρών οξέων (Fatty Acid Synthetase, FAS) και η συνολική αντίδραση δίδεται παρακάτω (Paranikolaou & Aggelis, 2011).



Γενικότερα, τα πολύ-ενζυμικά συμπλέγματα της συνθετάσης των λιπαρών οξέων (FAS) και του ενζύμου ATP- κιτρική λυάση (ATP - CL) παρεμποδίζονται από την παρουσία εξωγενών μεγάλων αλειφατικών αλυσίδων, όπως λιπαρών οξέων και n-αλκανίων, τα οποία εντοπίζονται στο θρεπτικό μέσο της καλλιέργειας (Paranikolaou & Aggelis, 2011).

Αφότου γίνει η βιοσύνθεση των εστέρων λιπαρού συνενζύμου A (παλμιτοϋλο-CoA εστέρες), πραγματοποιείται εστεροποίηση με γλυκερόλη με σκοπό την αποθήκευση λιπιδίων με τη μορφή τριγλυκεριδίων (TAGs). Η σύνθεση διεξάγεται κυρίως από ένα μεταβολικό μονοπάτι το οποίο ονομάζεται ακυλίωση της α-φωσφορικής γλυκερόλης (Εικόνα 1-5).



Εικόνα 1-5: Σχηματισμός ενδοκυτταρικών τρι-ακυλο-γλυκερών μέσω ακυλίωσης της α-φωσφορο-γλυκερόλης (Paranikolaou & Aggelis, 2011).

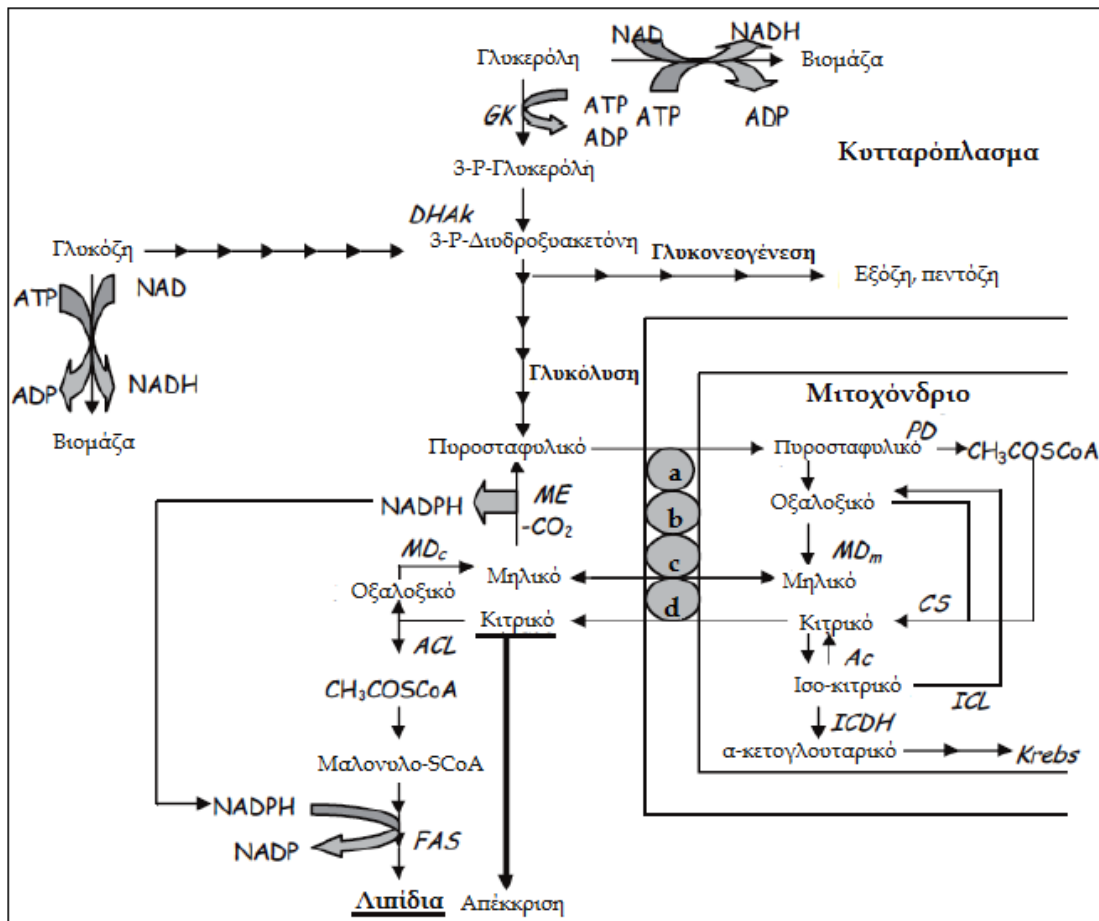
Αρχικά η 3-φωσφορική γλυκερόλη (G-3-P) ακυλιώνεται με το ένζυμο ακυλτρανσφεράση (GAT) στην θέση sn-1 προς σχηματισμό της 1-ακυλο-3-φωσφορικής γλυκερόλης (λυσοφωσφατιδικό οξύ, LPA). Έπειτα, το λυσοφωσφατιδικό οξύ, με τη συμβολή του ενζύμου ακυλτρανσφεράση του λυσοφωσφατιδικού οξέος (AGAT) ακυλιώνεται στην θέση sn-2 προς παραγωγή φωσφατιδικού οξέος (PA). Στη συνέχεια ακολουθεί η αποφωσφορυλίωση του φωσφατιδικού οξέος με το ένζυμο φωσφοροϋδρολάση φωσφατιδικού οξέος (PAP) προς απελευθέρωση της δι-ακυλο-γλυκερόλης (DAG). Τέλος η δι-ακυλο-γλυκερόλη ακυλιώνεται είτε μέσω του ενζύμου ακυλτρανσφεράση της διακυλογλυκερόλης ή μέσω του ενζύμου ακυλτρανσφεράση της φωσφολιπιδιακής διακυλογλυκερόλης προς παραγωγή τρι-ακυλο-γλυκερόλης (TAG) (Paranikolaou & Aggelis, 2011).

Επίσης, το φωσφατιδικό οξύ μπορεί να παραχθεί μέσω της δι-υδροξυ-φωσφορο-ακετόνης (DHAP). Η δι-υδροξυ-φωσφορο-ακετόνη ακυλιώνεται στη θέση sn-1 μέσω του ενζύμου ακυλτρανσφεράση της δι-υδροξυ-φωσφορο-ακετόνης (DHAPAT) προς παραγωγή της 1-ακυλο-δι-υδροξυ-φωσφορο-ακετόνης (1-ακυλο-DHAP). Το προϊόν 1-ακυλο-DHAP ανάγεται μέσω του ενζύμου ρεδοκτάση της δι-

υδροξυ-φωσφορο-ακετόνης (ADR) ώστε να αποδώσει την 1-ακυλο-φωσφορο-γλυκερόλη, η οποία με περαιτέρω ακυλίωση παράγει φωσφατιδικό οξύ (PA). Η συγκεκριμένη αντίδραση καταλύεται από το ένζυμο ακυλτρανσφεράση του λυσοφωσφατιδικού οξέος (AGAT).

Στην περίπτωση των ελαιογόνων μικροοργανισμών, έχοντας υπόψη το βιοχημικό μονοπάτι της ακυλίωσης της α-φωσφορο-γλυκερόλης, η θέση sn-2 της γλυκερόλης καταλαμβάνεται από ακόρεστα λιπαρά οξέα. Αυτό έχει ως συνέπεια τα μικροβιακά λιπίδια να παράγουν τριγλυκερίδια (TAGs) παρόμοιας δομής με τα τριγλυκερίδια φυτικής προέλευσης.

Τα κυριότερα στάδια συσσώρευσης ενδοκυτταρικού λίπους των ελαιογόνων μικροοργανισμών σε θρεπτικό μέσο με υψηλό λόγο C/N παρουσιάζονται στο σχήμα της Εικόνας 1-6 (Papanikolaou & Aggelis, 2011).



Εικόνα 1-6: Ενδιάμεσος μεταβολισμός ελαιογόνων μικροοργανισμών. (a-c) Σύστημα μεταφοράς του πυροσταφυλικού οξέος από το κυτταρόπλασμα στο μιτοχόνδριο και αντιθέτως για το μηλικό, (d) σύστημα μεταφοράς κιτρικού/μηλικού ανάμεσα στο κυτταρόπλασμα και το μιτοχόνδριο. Ένζυμα: Ac (ακοτινάση), ACC (καρβοξυλάση του ακετυλο-CoA), ACL(ATP-κιτρική λυάση), FAS (συνθετάση λιπαρών οξέων), ICDH (ισοκιτρική αυδρογονάση), MD_c (κυτοπλασματική μηλική αφυδρογονάση), MD_m (μιτοχονδριακή μηλική αφυδρογονάση), PD (πυροσταφυλική αφυδρογονάση), PFK (φωσφορική φρουκτοκινάση), PK (πυροσταφυλική κινάση) (Papanikolaou & Aggelis, 2011).

Σύμφωνα με τα παραπάνω βιοχημικά μονοπάτια που αναφέρθηκαν, (η ενεργοποίηση των οποίων προκαλείται από τον υψηλό λόγο C/N στο θρεπτικό μέσο) οι μικροοργανισμοί κατηγοριοποιούνται σε αυτούς που δύναται να συνθέσουν λίπος και σε αυτούς που συνθέτουν κιτρικό οξύ (Papanikolaou & Aggelis, 2011).

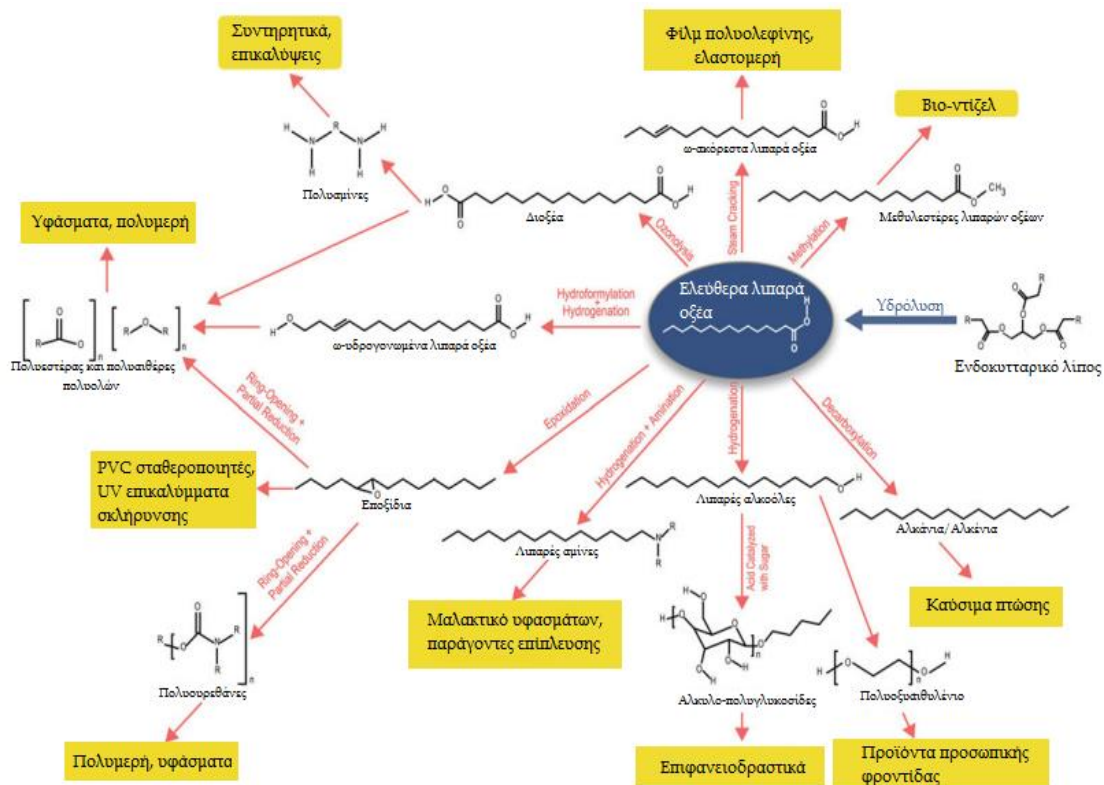
1.3.2 Εφαρμογές μικροβιακού λίπους

Οι ελαιογόνες ζύμες έχουν μια μοναδική φυσιολογία η οποία τις καθιστά τους πιο κατάλληλους ξενιστές για την παραγωγή λίπους, ελαιοχημικών και καυσίμων όμοιων με αυτά που παράγονται από το πετρέλαιο. Η υψηλή τους λιπογένεση, η ικανότητα τους να αναπτύσσονται σε μια πληθώρα διαφορετικών πηγών άνθρακα

(συμπεριλαμβανομένων των λιγνοκυτταρινούχων σακχάρων), η ευκολία καλλιέργειας σε μεγάλη κλίμακα και ο αυξανόμενος αριθμός γενετικών εργαλείων, είναι κάποια από τα πλεονεκτήματα που έχουν ενισχύσει τη χρήση τους για την ανάπτυξη βιώσιμων διαδικασιών (Adrio, 2017). Το μικροβιακό λίπος που παράγουν, δύναται να υποκαταστήσει διάφορα φυτικά και ζωικά λίπη, όπως έλαια πλούσια σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα, τα οποία απαντώνται σπανίως στη φύση ή λίπη εξεζητημένης δομής όπως είναι το λίπος του κακάο (Papanikolaou & Aggelis, 2011).

Η ανάγκη για προστασία του περιβάλλοντος από τους ρύπους αλλά και η εξάντληση των υποθεμάτων πετρελαίου, έχουν οδηγήσει τις βιοτεχνολογικές εταιρίες να επενδύουν όλο και περισσότερο στην ανάπτυξη πρώτης και δεύτερης γενιάς βιοκαυσίμων, προερχόμενων από φυτά και υπολείμματα καλλιεργειών (Βεορουλος et al., 2011). Το βιο-ντίζελ είναι ένα ανανεώσιμο, ασφαλές και μη τοξικό βιοκαύσιμο το οποίο μπορεί να παραχθεί από μια μεγάλη ποικιλία εδώδιμων και μη εδώδιμων πρώτων υλών. Οι ελαιογόνες πρώτες ύλες μετατρέπονται σε βιο-ντίζελ μέσω ομοιογενώς ή ετερογενώς καταλυόμενης μετεστεροποίησης των τριγλυκεριδίων με μεγάλη αλυσίδα σε μικρότερους εστέρες με ευθείες αλυσίδες. Το μεγαλύτερο εμπόδιο για την εμπορευματοποίηση του βιο-ντίζελ είναι το υψηλό κόστος των πρώτων υλών που χρησιμοποιούνται. Επιπλέον, εάν οι πρώτες ύλες προέρχονται από γεωργικές καλλιέργειες, συχνά υποστηρίζεται ότι αυτός ο τύπος βιο-ντίζελ μπορεί να συμβάλει στην αύξηση των τιμών των τροφίμων. Για το λόγο αυτό η επιστημονική κοινότητα επικεντρώνεται στην επιλογή ανανεώσιμων πρώτων υλών που δεν συναγωνίζονται την τροφική αλυσίδα (Muniraj et al., 2015).

Μια άλλη μεγάλη κατηγορία στην οποία το μικροβιακό λίπος μπορεί να αποτελέσει πρώτη ύλη είναι τα ελαιοχημικά, τα οποία αυτή τη στιγμή παράγονται κατά κανόνα μέσω της βιομηχανίας του πετρελαίου. Μέσω της χρήσης ποικίλων χημικών, φυσικών ή βιοχημικών τεχνικών, εκτός από τους μεθυλεστέρες λιπαρών οξέων, δύναται να παραχθούν και άλλα παράγωγα του μικροβιακού λίπους, όπως λιπαρά οξέα, γλυκερόλη και υδρογονωμένα προϊόντα μεθυλεστέρων λιπαρών οξέων και λιπαρών αλκοολών, εποξειδία κ.α., τα οποία αποτελούν υλικό βάσης για ένα ευρύ φάσμα ελαιοχημικών προϊόντων, όπως είναι οι επιφανειοδραστικές ουσίες, οι διαλύτες, τα χρώματα, οι κηροί, τα λιπαντικά, τα πολυμερή τα πλαστικά κ.α (Εικόνα 1-7) (Probst et al., 2016).



Εικόνα 1-7: Σύνοψη διαφόρων οδών μέσω των οποίων τα λιπαρά οξέα μικροβιακού λίπους μετατρέπονται σε ανανεώσιμα ελαιοχημικά προϊόντα και οι τελικές τους χρήσεις (Probst et al., 2016).

Η χρήση του μικροβιακού λίπους θα μπορούσε να στοχεύει στην παραγωγή συγκεκριμένων ελαιοχημικών, καθώς ορισμένες ελαιογόνες ζύμες είναι σε θέση να συσσωρεύουν κατά φυσικό τρόπο υψηλότερες ποσότητες συγκεκριμένων λιπαρών οξέων. Σύμφωνα με αποτελέσματα ερευνών, διάφορα είδη *Candida* παράγουν υψηλότερα ποσοστά παλμιτικού οξέος, τα οποία μπορεί να ανέλθουν ως και το 40% επί του συνόλου των λιπαρών οξέων. Η ζύμη *Yarrowia lipolytica* δύναται να παράγει ποσοστά μεγαλύτερα του 50% σε λινελαϊκό οξύ, ενώ ζύμες όπως ο *Cryptococcus albidus* και *Lipomyces starkeyi* είναι ικανές να παράγουν ελαϊκό οξύ σε ποσοστά έως και 75% (Probst et al., 2016). Ωστόσο, είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι μόνο τα υψηλής αξίας λίπη έχουν πιθανότητες να παραχθούν με βιοτεχνολογικά μέσα, καθώς επί του παρόντος οι μικροοργανισμοί δεν δύναται να παράγουν τα κοινά έλαια και λίπη τόσο φθηνά όσο οι φυτικές και ζωικές πηγές (Beoroulos et al., 2011).

1.4 Ενδοπολυσακχαρίτες

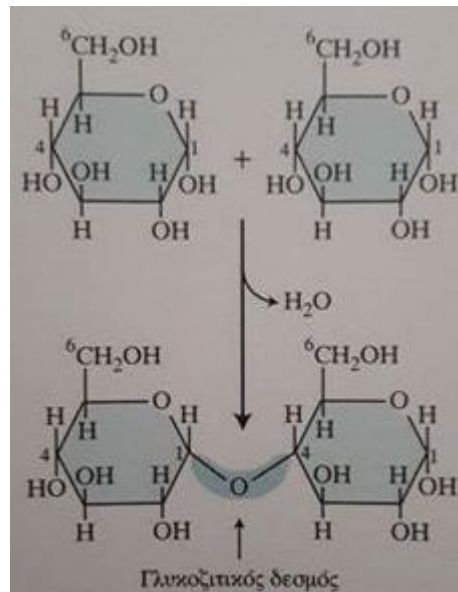
Οι υδατάνθρακες, γνωστοί και ως σάκχαρα, είναι οργανικές ενώσεις που περιέχουν άνθρακα, υδρογόνο και οξυγόνο σε αναλογία 1:2:1. Η γλυκόζη είναι το πιο κοινό από όλα τα σάκχαρα και έχει χημικό τύπο $C_6H_{12}O_6$. Το μεγαλύτερο βιολογικό ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι υδατάνθρακες με 4,5,6 και 7 άτομα άνθρακα

(δηλαδή C₄, C₅, C₆ και C₇). Από αυτούς, τα σάκχαρα C₅ (πεντόζες) έχουν ιδιαίτερη σημασία ως μονομερή των νουκλεϊκών οξέων, ενώ τα σάκχαρα C₆ (εξόζες) είναι μονομερή των πολυσακχαριτών του κυτταρικού τοιχώματος και αυτών που χρησιμεύουν ως αποθέματα ενέργειας (Brock et al., 2003).

Παράγωγα των απλών υδατανθράκων μπορούν να σχηματιστούν με αντικατάσταση μιας ή περισσότερων υδροξυλομάδων από άλλες χημικές ομάδες. Η πεπτιδογλυκάνη, για παράδειγμα, αποτελεί ένα σημαντικό πολυμερές του βακτηριακού τοιχώματος, η οποία περιέχει το μονομερές *N*-ακετυλογλυκοζαμίνη, που είναι παράγωγο της γλυκόζης. Εκτός από την ύπαρξη παραγώγων, σάκχαρα με τον ίδιο συντακτικό τύπο μπορεί να διαφέρουν ως προς τις στερεοχημικές τους ιδιότητες. Κατά συνέπεια, αυξάνεται σημαντικά ο αριθμός διαφορετικών σακχάρων που είναι δυνητικά διαθέσιμος στο κύτταρο για τον σχηματισμό πολυσακχαριτών (Brock et al., 2003).

Οι πολυσακχαρίτες είναι υδατάνθρακες που περιέχουν πολλές (συντά εκατοντάδες ή και χιλιάδες) μονομερείς μονάδες συνδεδεμένες με ομοιοπολικούς δεσμούς, οι οποίοι καλούνται γλυκοζιτικοί δεσμοί (Brock et al 2003). Ο άνθρακας ενός μονοσακχαρίτη αντιδράει με ένα υδροξύλιο ενός άλλου μονοσακχαρίτη και σχηματίζεται ο γλυκοζιτικός δεσμός. Το μόριο που προκύπτει ονομάζεται δισακχαρίτης (Διαμαντίδης, 2007). Η προσθήκη ενός ακόμη μονοσακχαρίτη δίνει ένα μόριο τρισακχαρίτη, η προσθήκη μερικών ακόμα μονομερών δίνει ολιγοσακχαρίτη, ενώ με την προσθήκη μιας εκτεταμένης σειράς μονομερών έχουμε έναν πολυσακχαρίτη (Brock et al., 2003).

Η αντίδραση σχηματισμού του γλυκοζιτικού δεσμού είναι μια τυπική αντίδραση συμπύκνωσης, καθώς στην αντίδραση απελευθερώνεται ένα μόριο νερού (Εικόνα 1-8)(Διαμαντίδης, 2007).



Εικόνα 1-8: Η αντίδραση σχηματισμού του γλυκοζιτικού δεσμού, τυπική αντίδραση συμπόκνωσης στην οποία απελευθερώνεται ένα μόριο νερού (Διαμαντίδης, 2007).

Οι πολυσακχαρίτες μπορεί επίσης να συνδυαστούν με άλλες τάξεις μακρομορίων, όπως π.χ. πρωτεΐνες ή λιπίδια, και να σχηματίζουν σύνθετους πολυσακχαρίτες, όπως γλυκοπρωτεΐνες ή γλυκολιπίδια. Αυτές οι ενώσεις παίζουν σπουδαίο ρόλο στις κυτταρικές μεμβράνες ως μόρια-υποδοχείς της κυτταρικής επιφάνειας, που έρχονται σε επαφή με το εξωτερικό περιβάλλον. Τα γλυκολιπίδια, έξωθεν, συνιστούν μεγάλο τμήμα του κυτταρικού τοιχώματος των αρνητικών κατά Gram βακτηρίων και προσδίδουν σε αυτά πολλές από τις χαρακτηριστικές τους ιδιότητες (Brock et al., 2003).

1.5 Βιο-ντίζελ

Το βιο-ντίζελ είναι ένα εναλλακτικό καύσιμο για κινητήρες ντίζελ, το οποίο παράγεται από τη χημική αντίδραση φυτικών ελαίων ή ζωικού λίπους, με μια αλκοόλη όπως η μεθανόλη. Η αντίδραση απαιτεί την χρήση ενός καταλύτη. Ως καταλύτης συνήθως χρησιμοποιείται μια ισχυρή βάση, όπως το υδροξείδιο του νατρίου ή υδροξείδιο του καλίου, και παράγονται νέες χημικές ενώσεις οι οποίες ονομάζονται μεθυλεστέρες. Οι μεθυλεστέρες αυτοί είναι γνωστοί ως βιο-ντίζελ (Gerpen, 2005).

Επειδή το κύριο συστατικό του βιο-ντίζελ είναι φυτικό έλαιο ή ζωικό λίπος, θεωρείται ως ανανεώσιμο. Δεδομένου ότι ο άνθρακας στο έλαιο ή στο λίπος προέρχεται κυρίως από το διοξείδιο του άνθρακα που υπάρχει στην επιφάνεια της γης, η κατανάλωση βιο-ντίζελ συμβάλει πολύ λιγότερο στην υπερθέρμανση του πλανήτη απ' ό,τι η κατανάλωση ορυκτών καυσίμων. Οι κινητήρες που λειτουργούν με

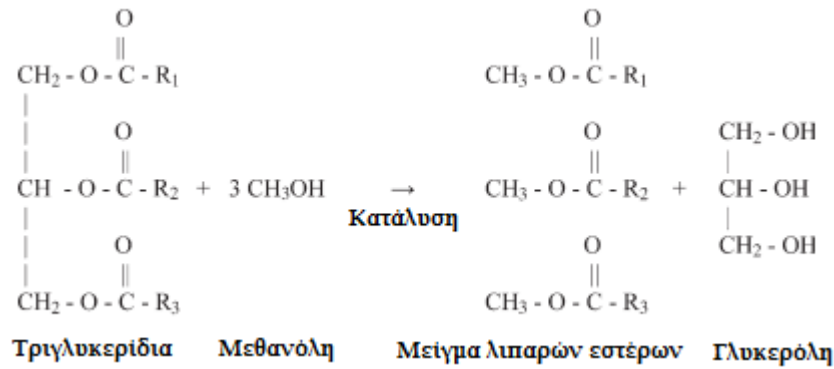
βιο-ντίζελ, έχουν χαμηλότερες εκπομπές μονοξειδίου του άνθρακα, άκαυστων υδρογονανθράκων, αιωρούμενων σωματιδίων και τοξικών αερίων σε σχέση με τους συμβατικούς κινητήρες ντίζελ (Gerpen, 2005).

Στις Ηνωμένες Πολιτείες η παραγωγή φυτικού ελαίου και ζωικού λίπους ανέρχεται περίπου στα 35,3 δισεκατομμύρια λίμπρες ετησίως (Gerpen, 2005). Η παραγωγή αυτή εκτιμάται ότι θα μπορούσε να παρέχει 4,6 δισεκατομμύρια γαλόνια βιο-ντίζελ. Ωστόσο, η ετήσια κατανάλωση ντίζελ που προέρχεται από πετρέλαιο, στις Ηνωμένες Πολιτείες, ανέρχεται στα 33 δισεκατομμύρια γαλόνια. Από τα παραπάνω προκύπτει ότι αν όλα τα φυτικά έλαια και το ζωικά λίπη που παράγονται στις ΗΠΑ ήταν διαθέσιμα για την παραγωγή βιο-ντίζελ, θα αντικαταστάσουν μόνο το 14% της ζήτησης σε ντίζελ (Gerpen, 2005).

Αν και το βιο-ντίζελ δεν μπορεί ακόμη να αντικαταστήσει εντελώς το συμβατικό ντίζελ με βάση το πετρέλαιο, οι παρακάτω πέντε λόγοι δικαιολογούν το ενδιαφέρον για την ανάπτυξη του:

- 1) Παρέχει την δυνατότητα αξιοποίησης της περίσσειας παραγωγής φυτικών ελαίων και των ζωικών λιπών.
- 2) Μειώνει την εξάρτηση της εκάστοτε χώρας για εισαγωγή πετρελαίου.
- 3) Το βιο-ντίζελ είναι ανανεώσιμο και δεν συμβάλλει στην υπερθέρμανση του πλανήτη λόγω του κλειστού κύκλου του άνθρακα. Μια ανάλυση που πραγματοποιήθηκε για το κύκλο ζωής του βιο-ντίζελ, έδειξε ότι συνολικά οι εκπομπές CO₂ μειώθηκαν κατά 78% συγκριτικά με το ντίζελ που παράγεται από το πετρέλαιο (Sheehan et al., 1998).
- 4) Οι εκπομπές καυσαερίων όπως το μονοξείδιο του άνθρακα, άκαυστοι υδρογονάνθρακες και οι εκπομπές σωματιδίων είναι χαμηλότερες από ότι με το κανονικό καύσιμο ντίζελ. Το μειονέκτημα είναι ότι οι περισσότερες δοκιμές έχουν δείξει μια μικρή αύξηση στα οξείδια του αζώτου NO_x.
- 5) Όταν προστεθεί στο κανονικό καύσιμο ντίζελ σε ποσότητα ίση με 1-2%, μπορεί να μετατρέψει καύσιμα με κακές λιπαντικές ιδιότητες, όπως το σύγχρονο καύσιμο ντίζελ εξαιρετικά χαμηλής περιεκτικότητας σε θείο, σε ένα αποδεκτό καύσιμο (Gerpen, 2005).

Το βιο-ντίζελ παράγεται μέσω της διαδικασίας της μετεστεροποίησης, όπως φαίνεται στο παρακάτω σχήμα:

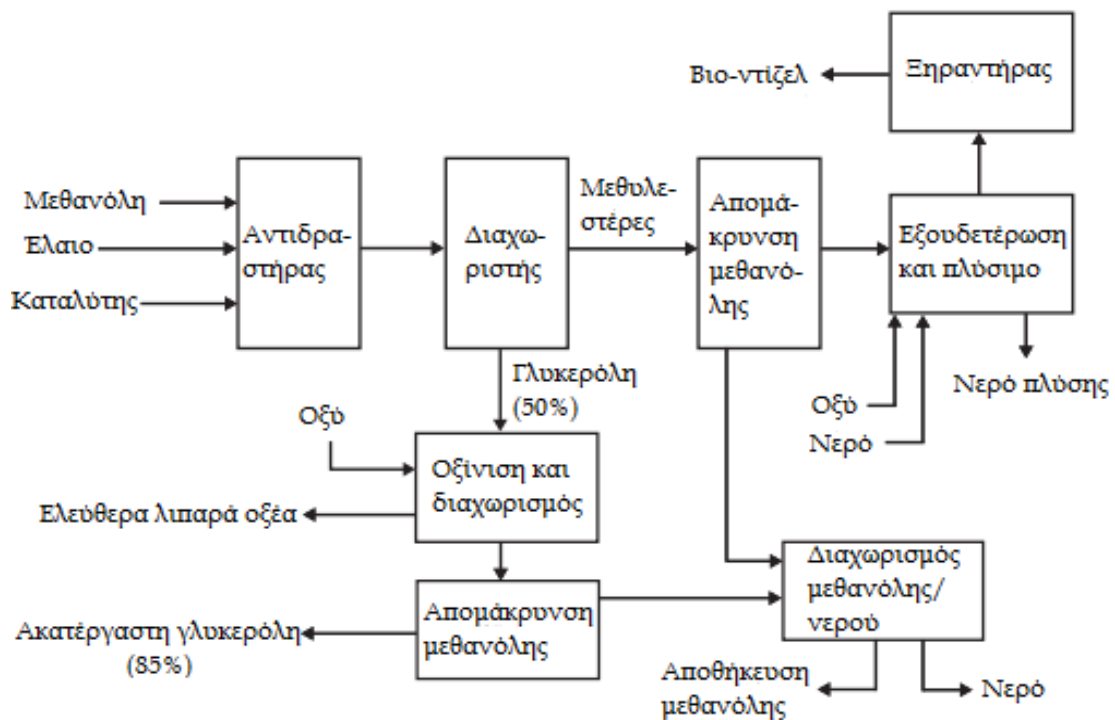


Εικόνα 1-9: Μετεστεροποίηση (Gerpen, 2005).

Όπου, τα R₁, R₂ και R₃ είναι μακριές αλυσίδες υδρογονανθράκων οι οποίες ονομάζονται και αλυσίδες λιπαρών οξέων. Με τη χημική μετατροπή των φυτικών ελαίων και των ζωικών λιπών σε μεθυλεστέρες, η γλυκερόλη είναι εύκολο να διαχωριστεί καθώς είναι αδιάλυτη στους εστέρες. Λόγω της υψηλής της πυκνότητας, είναι εύκολο να διαχωριστεί με φυγοκέντρηση ή καθίζηση (Ma & Hanna, 1999).

1.5.1 Παραγωγή βιο-ντίζελ

Στο σχήμα που ακολουθεί φαίνονται οι διεργασίες που πραγματοποιούνται προς το σχηματισμό και την παραλαβή του βιο-ντίζελ (Gerpen, 2005).



Εικόνα 1-10: Σχηματική ροή διεργασίας για παραγωγή βιο-ντίζελ.

Όπως φαίνεται και στο σχήμα της Εικόνας 1-10, η αλκοόλη, ο καταλύτης και το έλαιο αναμιγνύονται σε έναν αντιδραστήρα και αναδεύονται για περίπου 1 ώρα στους 60 °C. Τα εργοστάσια μικρότερης παραγωγής συνήθως χρησιμοποιούν το σύστημα με αντιδραστήρες παρτίδας (Stidham et al., 2000). Τα μεγαλύτερα εργοστάσια (παραγωγή 4 εκατομμυρίων λίτρων/έτος) χρησιμοποιούν την μέθοδο συνεχόμενης ροής που περιλαμβάνει αντιδραστήρες συνεχούς αναδευόμενης ροής (Α.Σ.Α.Ρ.). Η αντίδραση γίνεται συνήθως σε δυο στάδια.

Σε αυτό το σύστημα, περίπου το 80% της αλκοόλης και του καταλύτη προστίθενται στο έλαιο σε ένα πρώτο στάδιο Α.Σ.Α.Ρ.. Στη συνέχεια το ρεύμα των αντιδρώντων από αυτόν τον αντιδραστήρα περνά πρώτα από ένα βήμα όπου απομακρύνεται η παραχθείσα γλυκερόλη, και στη συνέχεια το υπόλοιπο υγρό εισέρχεται σε έναν δεύτερο αντιδραστήρα Α.Σ.Α.Ρ.. Το υπόλοιπο 20% της αλκοόλης και του καταλύτη προστίθενται σε αυτόν τον αντιδραστήρα. Το σύστημα αυτό παρέχει μια πλήρη αντίδραση και απαιτεί λιγότερη χρήση αλκοόλης σε σχέση με το σύστημα ενός βήματος (Gerpen, 2005).

Μετά την αντίδραση, η παραχθείσα γλυκερόλη απομακρύνεται από τους μεθυλεστέρες είτε μέσω μιας δεξαμενής καθίζησης ή με φυγοκέντριση. Η περίσσεια μεθανόλης στο υγρό μπορεί να δράσει ως διαλυτοποιητής, με συνέπεια να επιβραδύνεται ο διαχωρισμός. Ωστόσο, η περίσσεια αυτή μεθανόλης δεν απομακρύνεται από το υγρό μείγμα προτού χωριστεί η γλυκερόλη από τους μεθυλεστέρες, διότι υπάρχει φόβος αναστροφής της αντίδρασης της μετεστεροποίησης. Μετά το πέρας της αντίδρασης της μετεστεροποίησης, μπορεί να προστεθεί νερό στο μείγμα για να διευκολυνθεί η διαδικασία του διαχωρισμού της γλυκερόλης (Gerpen, 2005).

Μετά το διαχωρισμό από την γλυκερόλη, οι μεθυλεστέρες περνούν από ένα σύστημα απομάκρυνσης της μεθανόλης. Αυτό γίνεται είτε με σύστημα κενού, όπου εξατμίζεται η μεθανόλη ή με χρήση εξατμιστήρων μεμβράνης. Στη συνέχεια προστίθεται οξύ στο υγρό, προκειμένου να εξουδετερωθεί οποιοδήποτε υπόλειμμα καταλύτη έχει μείνει ή να διασπαστούν τυχόν σάπωνες που μπορεί να έχουν σχηματιστεί κατά τη διάρκεια της αντίδρασης. Οι σάπωνες αντιδρούν με το οξύ και σχηματίζουν υδατοδιαλυτά άλατα και ελεύθερα λιπαρά οξέα. Τα άλατα θα απομακρυνθούν στο στάδιο πλύσης με νερό, ενώ τα ελεύθερα λιπαρά οξέα θα παραμείνουν στο βιο-ντίζελ. Το βήμα πλύσης με νερό γίνεται προκειμένου να απομακρυνθούν οποιαδήποτε υπολείμματα καταλύτη, σάπωνος, αλάτων, μεθανόλης ή γλυκερόλης από το βιο-ντίζελ. Η εξουδετέρωση πριν από το πλύσιμο μειώνει το απαιτούμενο νερό και ελαχιστοποιεί το δυναμικό για σχηματισμό γαλακτωμάτων, όταν το νερό πλύσης προστίθεται στο βιο-ντίζελ. Τέλος, ότι ποσότητα νερού πλύσης έχει απομείνει στο βιο-ντίζελ, απομακρύνεται με ένα σύστημα εξάτμισης υπό κενό και παραλαμβάνεται το βιο-ντίζελ καθαρό (Gerpen, 2005).

Όσο αναφορά το ρεύμα της γλυκερόλης, το υγρό που διαχωρίστηκε περιέχει μόνο 50% γλυκερόλη. Το υπόλοιπο ποσοστό αποτελείται από μεθανόλη, μεγάλο

μέρος του καταλύτη και σάπωνες που έχουν δημιουργηθεί κατά την αντίδραση. Σε αυτή τη μορφή η γλυκερόλη έχει μικρή εμπορική αξία και η μεταχείριση αυτού του ρεύματος δεν είναι εύκολη καθώς θεωρούνται επικίνδυνα απόβλητα. Για το λόγο αυτό ο καθαρισμός της γλυκερόλης είναι αναγκαίος. Αρχικά προστίθεται στο υγρό ένα οξύ, το οποίο διαχωρίζει τους σάπωνες σε ελεύθερα λιπαρά οξέα και άλατα. Τα ελεύθερα λιπαρά οξέα δεν είναι διαλυτά στο μείγμα της γλυκερόλης και ανεβαίνουν στην επιφάνεια του υγρού, όπου και είναι εύκολο να αφαιρεθούν και να ανακυκλωθούν. Κάποια από τα άλατα παραμένουν στο μείγμα της γλυκερόλης ενώ αλλά κατακρημνίζονται. Μια σύνηθες επιλογή είναι να χρησιμοποιείται υδροξείδιο του καλίου ως καταλύτης της αντίδρασης και φωσφορικό οξύ για εξουδετέρωση, ώστε το σχηματιζόμενο άλας να είναι φωσφορικό κάλιο, το οποίο μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως λίπασμα. Μετά την οξίνιση και των διαχωρισμό των ελεύθερων λιπαρών οξέων, η μεθανόλη απομακρύνεται από το ρεύμα της γλυκερόλης μέσω εξατμιστήρα κενού. Σε αυτό το σημείο, η γλυκερόλη πρέπει να έχει ποσοστό καθαρότητας περίπου 85%. Η γλυκερόλη μπορεί να εξυγενιστεί περαιτέρω σε τιμές καθαρότητας 99,5% έως 99,7%, μέσω συστημάτων απόσταξης κενού ή ανταλλαγής ιόντων (Gerpen, 2005).

Η μεθανόλη που απομακρύνεται από τα ρεύματα της γλυκερόλης και των μεθυλεστέρων, τείνει να συλλέξει οποιοδήποτε νερό μπορεί να έχει εισέλθει κατά τη διαδικασία. Το νερό αυτό πρέπει να αφαιρεθεί με τη χρήση μιας στήλης απόσταξης, προτού η μεθανόλη είναι αίτημα να ξαναχρησιμοποιηθεί στη διαδικασία. Αυτό το βήμα είναι πιο δύσκολο αν η αλκοόλη που χρησιμοποιήθηκε είναι αιθανόλη ή ισοπροπανόλη, καθώς σχηματίζουν αζεοτροπικό μείγμα με το νερό. Σε αυτή τη περίπτωση χρησιμοποιείται ένα μοριακό κόσκινο προκειμένου να απομακρυνθεί το νερό (Gerpen, 2005).

2^ο Κεφάλαιο

Σκοπός πειραματικής μελέτης

2 Σκοπός πειραματικής μελέτης

2.1 Σκοπός πειραματικής μελέτης

Η παρούσα ερευνητική εργασία είχε σαν στόχο την μελέτη της φυσιολογικής και κινητικής συμπεριφοράς στελεχών της ζύμης *C. curvatus* και της ζύμης *R. toruloides*, με υπόστρωμα την ακάθαρτη βιομηχανική γλυκερόλη, η οποία αποτελεί παραπροϊόν της βιομηχανίας παραγωγής βιοκαυσίμου (biodiesel). Ειδικότερα, μελετήθηκε ο μεταβολισμός της ακάθαρτης γλυκερόλης προς παραγωγή βιομάζας και δευτερογενών μεταβολιτών (μικροβιακού λίπους και ενδοπολυσακχαριτών) για διαφορετικές πηγές αζώτου στο υπόστρωμα ανάπτυξής της. Σκοπός ήταν να διερευνηθεί αν κάποιες πηγές αζώτου είναι πιο εύκολο να διασπαστούν και να αφομοιωθούν από τον μικροοργανισμό, ώστε να έχει μεγαλύτερη κυτταρική ανάπτυξη.

Σαν δεύτερο ερευνητικό αντικείμενο της παρούσας μελέτης ήταν η πραγματοποίηση δυο επιπλέον ζυμώνσεων με σκοπό τον προσδιορισμό της βέλτιστης διαδικασίας για την εκχύλιση του ενδοκυτταρικού μικροβιακού λίπους. Οι εκχυλίσεις έγιναν με αντιδραστήριο Folch, με HCL/Folch και Folch με βρασμό σε σύστημα μανδύα βρασμού - συμπυκνωτή. Για την μέγιστη επιτυχία μιας ζύμωσης που μελετάει τον ενδοκυτταρικό λίπος, είναι πολύ σημαντικό η τεχνική που θα χρησιμοποιηθεί προκειμένου να διασπαστούν τα κύτταρα και να εκχυλιστεί το λίπος να έχει την μεγαλύτερη δυνατή απόδοση, καθώς μπορεί να δώσει λανθασμένα συμπεράσματα για τον μεταβολισμό ενός μικροοργανισμού.

3^ο Κεφάλαιο

Υλικά και Μέθοδοι

3 Υλικά και Μέθοδοι

3.1 Βιολογικό υλικό

Στην παρούσα μελέτη, τα στελέχη των ζυμών που χρησιμοποιήθηκαν βρίσκονται στην τράπεζα του εργαστηρίου Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων, του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών. Πιο συγκεκριμένα, τα στελέχη ήταν: *C. curvatus* ATCC 20509, *C. curvatus* NRRL Υ-1511 και *R. toruloides* NRRL Υ-6984.

3.2 Θρεπτικά Υποστρώματα

3.2.1 Παρασκευή προκαλλιέργειας

Σαν πρώτο στάδιο για την έναρξη του πειράματος ήταν η παρασκευή προκαλλιέργειας, στην οποία ο μικροοργανισμός αναπτυσσόταν μέχρι το στάδιο της εκθετικής φάσης ανάπτυξης του. Η υγρή προκαλλιέργεια αποτελείται από θρεπτικό υπόστρωμα YPD (10 g/L γλυκόζη, 10 g/L πειπτόνη και 10 g/L εκχύλισμα ζύμης), το οποίο προστίθεται σε κωνικές φιάλες 250 ml πληρωμένες κατά το 1/5 του όγκου τους (50±1 ml) με ογκομετρικό κύλινδρο. Μετά την πλήρωση της φιάλης με το υγρό υπόστρωμα, προστίθεται ειδικό υδρόφοβο βαμβάκι και αλουμινόχαρτο στο στόμιο της φιάλης και ακολουθεί αποστείρωση σε θερμοκρασία 121 °C για 20 λεπτά. Μετά το πέρας της αποστείρωσης, οι κωνικές φιάλες εμβολιάζονται υπό ασηπτικές συνθήκες με τα κύτταρα της ζύμης. Τέλος, η προκαλλιέργεια τοποθετείται σε ανακινούμενο επωαστικό θάλαμο για επώαση σε σταθερές συνθήκες ανάδευσης (180±5 rpm) και θερμοκρασίας (28±1 °C). Μετά από 48 ώρες ο μικροοργανισμός βρίσκεται σε στάδιο εκθετικής ανάπτυξης, το οποίο αποτελεί το καλύτερο χρονικό σημείο για παραλαβή κάποιας ποσότητας από την υγρή προκαλλιέργεια και εμβολιασμό της στην κυρίως καλλιέργεια.

3.2.2 Παρασκευή κυρίως καλλιέργειας

Η σύσταση της κυρίως καλλιέργειας ήταν τέτοια ώστε να ευνοεί την συσσώρευση ενδοκυτταρικού λίπους (υψηλός λόγος C/N). Το θρεπτικό μέσο είχε σύσταση: 50 g/L γλυκερόλη, 1 g/L εκχύλισμα ζύμης, 7 g/L φωσφορικό κάλιο (KH₂PO₄), 2,5 g/L φωσφορικό-δι-νάτριο (Na₂HPO₄), 1,5 g/L θειικό μαγνήσιο (MgSO₄ *7H₂O), 0,15 g/L χλωριούχο σίδηρο (FeCl₂ *6H₂O), 0,15 g/L χλωριούχο κάλιο (CaCl₂ *2H₂O), 0,02 g/L θειικό ψευδάργυρο (ZnSO₄ *7H₂O) και 0,06 g/L θειικό

μαγγάνιο ($\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$). Ως κύρια πηγή αζώτου χρησιμοποιήθηκαν τα αντιδραστήρια που φαίνονται στον Πίνακα 3-1, η ποσότητα των οποίων ήταν τέτοια ώστε να διατηρείται σταθερός ο λόγος άνθρακα προς άζωτο (C/N), ίσως με 70.

Πίνακας 3-1: Πηγές αζώτου που χρησιμοποιήθηκαν για κάθε ζύμωση.

Πηγή αζώτου	g/L
Πεπτόνη	2
Θεικό αμμώνιο	1,343
Νιτρικό κάλιο	2,038
Ουρία	0,605
Εκχύλισμα ζύμης	2,541
Καμία επιπλέον	0

Η διαδικασία αποστείρωσης για τις κωνικές φιάλες που περιείχαν τις κυρίως καλλιέργειες ήταν όμοια με αυτή για τις προκαλλιέργειες.

3.3 Μέθοδοι ανάλυσης

3.3.1 Προσδιορισμός pH

Η μέτρηση του pH γίνεται κάθε φορά που λαμβάνεται σημείο της καλλιέργειας. Αν η τιμή του pH δεν βρίσκεται κοντά στην τιμή 6, όπου είναι και η επιθυμητή, τότε πραγματοποιείται διόρθωσή του σε όλα τα σημεία της καλλιέργειας υπό ασηπτικές συνθήκες, με υδροχλωρίο 5 M (HCl) ή καυστικό νάτριο 5 M (NaOH), αντίστοιχα. Το όργανο μέτρησης που χρησιμοποιήθηκε είναι τύπου Hanna Instruments 2211 pH/ORP meter.

3.3.2 Προσδιορισμός βιομάζας

Το υγρό της ζύμωσης παραλαμβάνεται σε falcon tubes τα οποία ζυγοσταθμίζονται και φυγοκεντρούντε σε φυγόκεντρο τύπου Universal 320R Hettich Zentrifugen. Η φυγοκέντριση γίνεται για 10 λεπτά στους 4 °C και σε ταχύτητα περιστροφής 9000 rpm. Μετά από έκπλυση με απιονισμένο νερό, ακολουθεί και δεύτερη φυγοκέντριση στις ίδιες συνθήκες. Στη συνέχεια, η νωπή βιομάζα η οποία βρίσκεται διαλυμένη μέσα σε μικρή ποσότητα απιονισμένου νερού, μεταφέρεται σε

προζυγισμένα φιαλίδια McCartney, τα οποία τοποθετούνται σε φούρνο τύπου Gallenkamp oven BS OV-160 προς ξήρανση στους 80 °C για 48 ώρες. Τέλος, μετά την ξήρανση, το φιαλίδιο ζυγίζεται σε αναλυτικό ζυγό τύπου KERN EW 420-3NM και αφαιρείται από την τιμή, η τιμή της μάζας του σκέτου φιαλιδίου, ώστε να προσδιοριστή η βιομάζα.

3.3.3 Προσδιορισμός ενδοπολυσακχαριτών (IPS)

Οι παραγόμενοι ενδοπολυσακχαρίτες μετρήθηκαν ποσοτικά με μια τροποποιημένη διαδικασία που βασίζεται στο πρωτόκολλο μεθόδου που προτάθηκε από τους Liang et al το 2009.

Αρχικά, παραλαμβάνονται 0,05 g ξηρής βιομάζας και τοποθετούνται σε δοκιμαστικό σωλήνα. Προστίθενται 10 ml υδροχλωρικού οξέος συγκέντρωσης 2M (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 σκοπό να απομακρυνθεί η βιομάζα και το διήθημα να καταστεί διαυγές.

Ο ποσοτικός προσδιορισμός των ενδοπολυσακχαριτών έγινε με την φασματοφωτομετρική μέθοδο του 3,5-δινιτροσαλικυλικού οξέος (DNS) (Miller, 1959). Σε δοκιμαστικούς σωλήνες προστίθενται 0,5 ml από το διηθημένο δείγμα και 0,5 ml από το αντιδραστήριο DNS, ακολουθεί ανάδευση του διαλύματος σε κυκλοαναμικτήρα (vortex) και τοποθετείται σε υδατόλουτρο στους 100 °C για 5 λεπτά. Μετά το πέρας των 5 λεπτών, οι δοκιμαστικοί σωλήνες αφήνονται να κρυώσουν και προστίθεται 5 mL απιονισμένου νερού. Αφού το μείγμα αναδευτεί καλά και ομογενοποιηθεί, μικρή ποσότητα του δείγματος τοποθετείται σε ειδικές κυβέτες και ακλουθεί μέτρηση της απορρόφησης στα 540 nm με την βοήθεια του φασματοφωτομέτρου Hitachi U-2000 Spectrophotometer.

Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης των αναγόντων σακχάρων έγινε με την χρήση πρότυπων καμπύλων αναφοράς και τα αποτελέσματα εκφράστηκαν σε ισοδύναμα γλυκόζης (g/L).

3.3.4 Προσδιορισμός καταναλωθείσας γλυκερόλης

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης της γλυκερόλης στην καλλιέργεια έγινε μέσω Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) σε υγρό χρωματογράφο τύπου Shimadzu. Ο χρωματογράφος ήταν εξοπλισμένος με ανιχνευτή διαφορικού διαθλασίμετρου τύπου RID-10A, Shimadzu. Η χρησιμοποιούμενη στήλη για τον διαχωρισμό του μίγματος

ήταν τύπου ROA-Organic Acid H⁺ (Phenomenex). Υδατικό διάλυμα H₂SO₄ (10mM) με ροή στα 0,5 mL/min χρησιμοποιήθηκε ως κινητή φάση του χρωματογράφου. Τέλος, η ταυτοποίηση της γλυκερόλης που εμπεριέχονταν στα δείγματα, πραγματοποιήθηκε μέσω της σύγκρισης του χρόνου κατακράτησης της γλυκερόλης με αντίστοιχους χρόνους κατακράτησης γνωστών προτύπων.

3.3.5 Μέθοδοι εκχύλισης μικροβιακού λίπους

Η εκχύλιση του μικροβιακού λίπους έγινε με τρεις μεθόδους:

- a) **Εκχύλιση με αντιδραστήριο Folch:** Το αντιδραστήριο Folch αποτελείται από χλωροφόρμιο (CHCl₃) και μεθανόλη (CH₃OH) σε αναλογία 2:1. Η ξηρή βιομάζα που έχει ληφθεί έπειτα από φυγοκεντρήσεις και ξήρανση, τοποθετείται σε γυάλινα φιαλίδια McCartney. Μέσα στα γυάλινα φιαλίδια προστίθεται αντιδραστήριο Folch και αφήνεται σε ηρεμία για περίπου 120 ώρες, προκειμένου να διαρρήξει τα κύτταρα της βιομάζας και να ενσωματώσει το ενδοκυτταρικό λίπος.
- b) **Εκχύλιση με HCl και Folch:** Σε αυτή τη περίπτωση, ζυγίζονται 0,3 g ξηρής βιομάζας σε γυάλινα φιαλίδια και προστίθενται 4 mL HCl 2 M. Το μίγμα τοποθετείται σε υδατόλουτρο στους 80 °C για 1 ώρα. Στη συνέχεια, το μίγμα απομακρύνεται από το υδατόλουτρο και αφού έρθει σε θερμοκρασία δωματίου, προστίθεται σε αυτό αντιδραστήριο Folch μέχρι πλήρωσης του φιαλιδίου. Το μίγμα αφήνεται σε ηρεμία για 24 ώρες ώστε να διαχωριστεί στις 3 φάσεις (HCl,βιομάζα,Folch). Αφότου γίνει ο διαχωρισμός, λαμβάνεται η φάση του χλωροφορμίου και διηθείται προκειμένου να απομακρυνθεί η τυχόν βιομάζα που μπορεί να βρίσκεται εντός της φάσης αυτής. Στη συνέχεια είναι έτοιμη για εξάτμιση σε ειδικό περιστροφικό συμπυκνωτή κενού (evaporator).
- c) **Εκχύλιση με Folch και βρασμό:** σε φιάλη εξάτμισης προστίθεται η ξηρή βιομάζα μαζί με αντιδραστήριο Folch. Η φιάλη τοποθετείτε σε σύστημα μανδύα βρασμού-συμπυκνωτή και αφήνεται να βράσει στους 80 °C για 1 ώρα.

3.3.6 Ποσοτικός προσδιορισμός ενδοκυτταρικού λίπους

Προκειμένου να υπολογιστεί η ποσότητα του ενδοκυτταρικού λίπους που έχει παραχθεί, γίνεται αρχικά διήθηση του μίγματος που προκύπτει από την εκάστοτε μέθοδο εκχύλισης σε προζυγισμένες φιάλες εξάτμισης. Έπειτα ακολουθεί εξάτμιση του διηθήματος υπό κενό στους 40 °C με τη 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. Τέλος, ζυγίζεται η φιάλη με το μικροβιακό λίπος και από την διαφορά μάζας υπολογίζεται το παραγόμενο ενδοκυτταρικό λίπος.

3.3.7 Προσδιορισμός της σύστασης των λιπαρών οξέων του μικροβιακού λίπους

3.3.7.1 Μεθυλεστεροποίηση λιπιδίων (Fatty Acid Methyl Esters, FAMES)

Σκοπός της μεθόδου είναι η παραλαβή μεθυλεστέρων λιπαρών οξέων από τα δείγματα λιπιδίων, που είναι ενώσεις με μεγαλύτερη πτητικότητα και συνεπώς μπορούν να αναλυθούν μέσω αέριας χρωματογραφίας, ώστε να γίνει ο προσδιορισμός της σύστασης των λιπαρών οξέων του δείγματος.

Η μέθοδος βασίζεται στη διαφορετική πολικότητα των συστατικών του μίγματος, ώστε να μετατρέψει τα λιπίδια αρχικά σε σάπωνες, γλυκερόλη και ιόντα νατρίου (Na^+) (βασική κατάλυση) και εν συνεχεία σε αλάτι (NaCl) και μεθυλεστέρες (όξινη κατάλυση).

Αρχικά το δείγμα λίπους τοποθετείται σε σφαιρική φιάλη στην οποία προστίθενται 10 mL μεθοξείδιο του νατρίου (MeO-Na^+) και 1-2 πέτρες βρασμού. Το δείγμα τοποθετείται σε σύστημα μανδύα βρασμού-συμπυκνωτή και βράζει για 20 λεπτά. Μετά το πέρας των 20 λεπτών προστίθεται υδροχλωρική μεθανόλη (HCl/MeOH) μέχρις ότου αποχρωματιστεί τελείως το μίγμα, και αφήνεται να βράσει για άλλα 20 λεπτά. Στη συνέχεια, προστίθεται στο μίγμα απιονισμένο νερό για να σταματήσει η αντίδραση. Το μίγμα απομακρύνεται από το μανδύα και προστίθεται σε αυτό 6 mL εξάνιο (C_6H_{14}). Τέλος, το μίγμα μεταφέρεται σε διαχωριστική χοάνη ούτως ώστε να διαχωριστούν οι δύο φάσεις, από τις οποίες παραλαμβάνεται η άνω φάση (οργανική) η οποία εμπεριέχει τους εστέρες των λιπαρών οξέων και το εξάνιο, ενώ η κάτω (υδατική) απορρίπτεται. Η μεθυλεστέρες συλλέγονται σε φιαλίδιο στο οποίο έχει προστεθεί άνυδρο θειικό νάτριο (Na_2SO_4) για απορρόφηση της υγρασίας και συντηρούνται στην κατάψυξη ($-20\text{ }^\circ\text{C}$).

3.3.7.2 Προσδιορισμός της σύστασης των λιπαρών οξέων.

Για τον ποιοτικό προσδιορισμό της σύστασης των λιπαρών οξέων που εμπεριέχονται στο μικροβιακό λίπος χρησιμοποιήθηκε αέριος χρωματογράφος (GC) τύπου Fisons GC8000 εξοπλισμένος με τριχοειδή στήλη CP WAX 52 CB μήκους 30 m

και με ανιχνευτή FID (Flame Ionization Detector). Το φέρον αέριο ήταν το ήλιο (He), του οποίου η ροή ήταν 2 ml/min (25 °C).

Παραλαμβάνεται 1 μL δείγματος με μικροσύριγγα Hamilton (10 μL), αφού έχει προηγηθεί έκπλυσή της με εξάνιο, και γίνεται έγχυση αυτού στον εισαγωγέα του αέριου χρωματογράφου. Η ταυτοποίηση των λιπαρών οξέων γίνεται με την βοήθεια πρότυπων μεθυλεστέρων των βασικότερων λιπαρών οξέων, αντιστοιχίζοντας τους χρόνους κατακράτησής τους (t_R). Το % ποσοστό κάθε λιπαρού οξέος υπολογίστηκε με βάση το εμβαδό της κάθε κορυφής στα χρωματογραφήματα με τον παρακάτω τύπο:

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

4^ο Κεφάλαιο

Μετρήσεις - Αποτελέσματα

4 Μετρήσεις – Αποτελέσματα

Στην ενότητα αυτή, παρατίθενται όλα τα πειραματικά αποτελέσματα τα οποία συλλέχθηκαν έπειτα από την μελέτη της κινητικής όλων των ζυμώσεων που πραγματοποιήθηκαν, τα αποτελέσματα από την ανάλυση στον αέριο χρωματογράφο καθώς και τα αποτελέσματα από την σύγκριση των μεθόδων εκχύλισης του μικροβιακού λίπους.

Πιο συγκεκριμένα, για όλες τις ζυμώσεις μετρήθηκαν: η παραγόμενη βιομάζα, η καταναλωθείσα γλυκερόλη, η παραγωγή μικροβιακού λίπους και η παραγωγή ενδοπολυσακχαριτών. Τα δεδομένα από τις ζυμώσεις χρησιμοποιήθηκαν για τον υπολογισμό των παρακάτω παραμέτρων:

- $(Y_{x/s})$: συντελεστής απόδοσης βιομάζας ως προς το καταναλωθέν υπόστρωμα.
- $(Y_{L/x})$: συντελεστής απόδοσης του παραγόμενου λίπους ως προς την παραχθείσα βιομάζα.
- $(Y_{IPS/x})$: συντελεστής απόδοσης παραγόμενων ενδοπολυσακχαριτών ως προς την παραχθείσα βιομάζα.

Οι ζυμώσεις είχαν όλες ως πηγή άνθρακα την ακάθαρτη γλυκερόλη (συγκέντρωσης 50 g/L) και πραγματοποιήθηκαν σε ανακινούμενες κωνικές φιάλες των 250 mL, με συνθήκες: τιμή pH = $6 \pm 0,2$, ανάδευση 180 ± 5 rpm και θερμοκρασία $T = 28 \pm 1^\circ\text{C}$. Η διαφοροποίηση στο θρεπτικό υπόστρωμα κάθε ζύμωσης ήταν στην επιπλέον πηγή αζώτου (εκτός του εκχυλίσματος ζύμης σε ποσότητα 1 g/L) που χρησιμοποιήθηκε. Όλες οι πηγές αζώτου που χρησιμοποιήθηκαν, προστέθηκαν σε τέτοια αναλογία ώστε να διατηρείται σταθερός ο λόγος άνθρακα προς άζωτο (C/N), ίσως με 70. Οι ζυμώσεις που πραγματοποιήθηκαν για κάθε στέλεχος, με διαφορετική πηγή αζώτου, φαίνονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 4-1: Πηγές αζώτου που χρησιμοποιήθηκαν σε κάθε ζύμωση.

Στέλεχος	Επιπλέον πηγή αζώτου
<i>Cryptococcus curvatus</i> ATCC 20509	Πεπτόνη 2 g/L Θεικό αμμώνιο 1,343 g/L Νιτρικό κάλιο 2,038 g/L Ουρία 0,605 g/L Εκχύλισμα ζύμης 2,541 g/L Καμία επιπλέον
<i>Cryptococcus curvatus</i> NRRL Y-1511	Πεπτόνη 2 g/L Καμία επιπλέον
<i>Rhodospiridium toruloides</i> NRRL Y-6984	Πεπτόνη 2 g/L Νιτρικό κάλιο 2,038 g/L

Μετά το πέρας των ζυμώσεων, πραγματοποιήθηκε ποιοτικός προσδιορισμός των λιπαρών οξέων που περιείχε το ενδοκυτταρικό λίπος, με τη χρήση του αέριου χρωματογράφου, καθώς και ο υπολογισμός του ποσοστού τους.

Τέλος, έγιναν δύο ζυμώσεις με το στέλεχος *C. curvatus* ATCC 20509 και επιπλέον πηγή αζώτου την πεπτόνη (2 g/L), προκειμένου να συγκριθούν τρεις διαφορετικές μέθοδοι εκχύλισης του ενδοκυτταρικού λίπους (Folch, HCL/Folch και Folch με βρασμό σε σύστημα μανδύα βρασμού - συμπυκνωτή).

4.1 Αποτελέσματα για *C. curvatus* ATCC 20509

4.1.1 Κινητικά δεδομένα μικροοργανισμού

Στον πίνακα που ακολουθεί, παρουσιάζονται τα πειραματικά αποτελέσματα των ζυμώσεων βυθού για το στέλεχος *C. curvatus* ATCC 20509 και αρχικής συγκέντρωσης γλυκερόλης 50 g/L.

Πίνακας 4-2: Κινητικά δεδομένα από τις ζυμώσεις βουθού του στελέχους *C. curvatus* ATCC 20509 σε γλυκερόλη αρχικής συγκέντρωσης 50 g/L, για διαφορετικές πηγές αζώτου.

Πηγή Αζώτου	Σημείο	T(h)	X(g/L)	Glycons (g/L)	L(g/L)	Y _{x/s} (g/g)	Y _{L/x} (g/g)	Y _{IPS/x} (g/g)
Πεπτόνη	δ	47	7,88	14,77	0,9	0,53	0,11	0,4
	γ	119	15,9	30,52	3,78	0,52	0,24	0,32
	α,β	191	23,68	44,77	4,46	0,53	0,19	0,23
Θ. Αμμώνιο	δ	71	13,6	24,2	1,69	0,56	0,12	0,27
	β,γ	144	18,5	36,55	3,35	0,51	0,18	0,21
	α	192	20	43,92	2,9	0,46	0,15	0,11
Ν.Κάλιο	δ	47	6	8,33	0,79	0,72	0,13	0,4
	β,γ	192	11,6	29,05	4,52	0,4	0,39	0,09
	α	216	12	29,61	3,92	0,41	0,33	0,08
Ουρία	γ	46	6,8	8,81	1,07	0,77	0,16	0,26
	δ	96	11,4	18,26	1,01	0,62	0,09	0,44
	α,β	170	14,8	24,7	1,9	0,6	0,12	0,36
Εκχύλισμα ζύμης	δ	72	14	23,23	1,3	0,6	0,09	0,43
	β,γ	170	21,2	44,74	2,97	0,47	0,14	0,37
	α	216	21,4	44,74	2,17	0,48	0,1	0,18
Καμία επιπλέον πηγή αζώτου	γ,δ	72	6,18	12,59	2,17	0,49	0,35	0,36
	β	195	12,4	29,42	3,16	0,42	0,25	0,2
	α	217	13,04	31,11	3,08	0,42	0,24	0,18

T(h): χρόνος ζύμωσης.

X(g/L): βιομάζα

Glycons(g/L): καταναλωθείσα γλυκερόλη.

L(g/L): ενδοκυτταρικό λίπος.

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

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

Y_{IPS/x} (g/g): συντελεστής απόδοσης παραγόμενων ενδοπολυσακχαριτών ως προς την βιομάζα.

α: το σημείο με την μέγιστη παραγωγή βιομάζας (g/L).

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

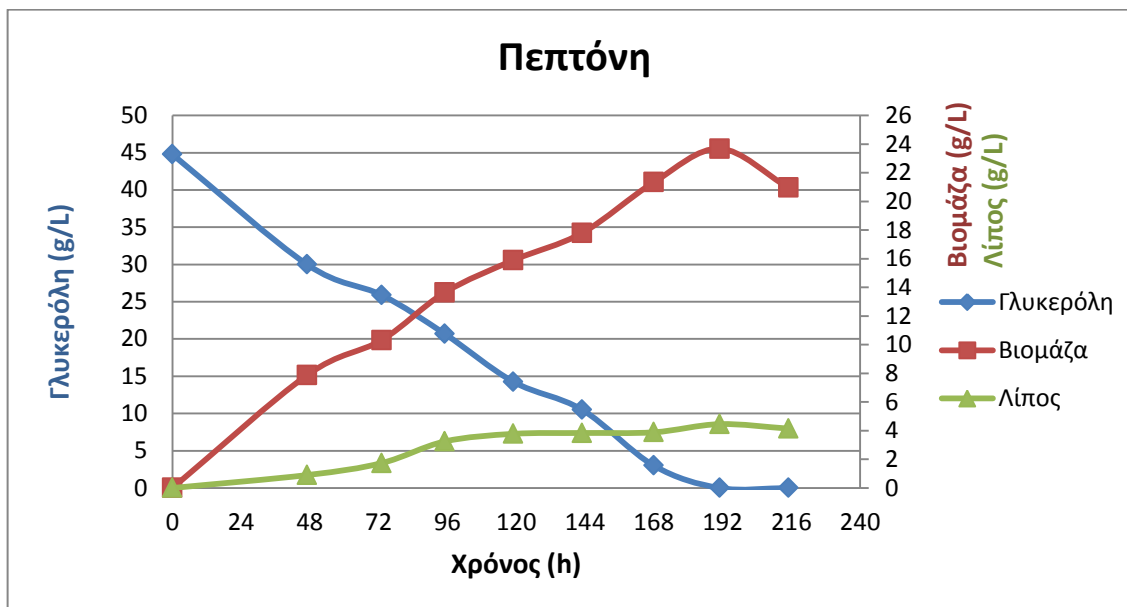
γ: το σημείο με την μέγιστη παραγωγή λίπους (g/L).

δ: το σημείο με το μέγιστο ποσοστό ενδοπολυσακχαριτών επί ξηράς ουσίας (g/g).

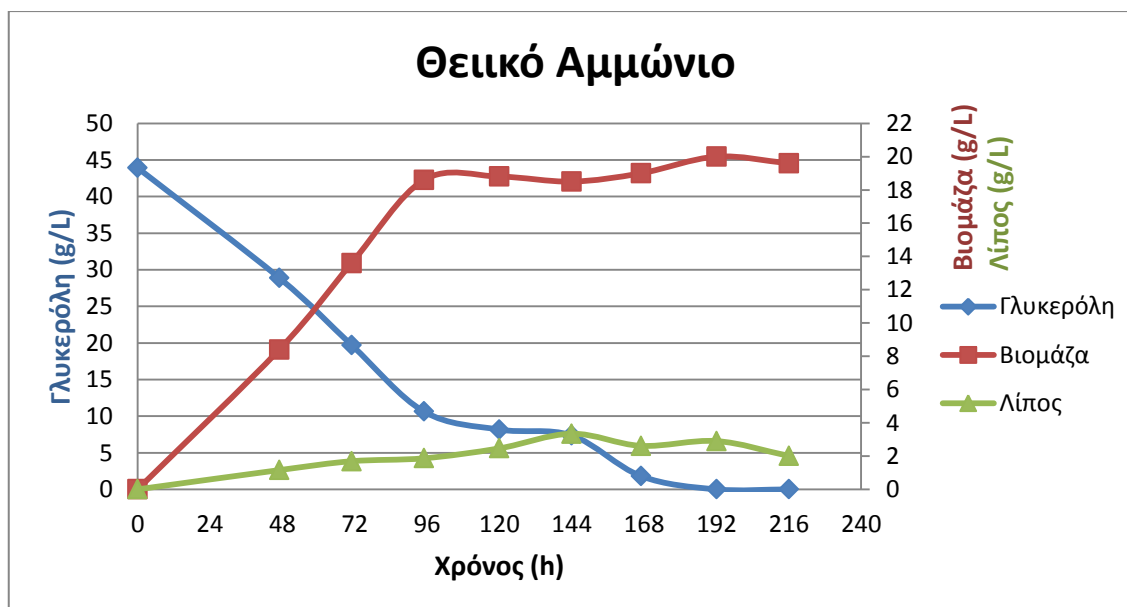
Από τον Πίνακα 4-2 προκύπτουν τα εξής συμπεράσματα:

- Η μέγιστη τιμή της βιομάζας παρατηρήθηκε στην ζύμωση με πηγή αζώτου την πεπτόνη, η οποία έφθασε τα 23,68 g/L.
- Η μεγαλύτερη παραγωγή λίπους παρατηρήθηκε στην ζύμωση με πηγή αζώτου το νιτρικό κάλιο, η οποία έφθασε τα 4,52 g/L.
- Το μέγιστο ποσοστό λίπους επί ξηράς ουσίας παρατηρήθηκε επίσης στην ζύμωση με πηγή αζώτου το νιτρικό κάλιο και είχε τιμή 0,39 g/g.
- Το μέγιστο ποσοστό ενδοπολυσακχαριτών επί ξηράς ουσίας παρατηρήθηκε στη ζύμωση με πηγή αζώτου την ουρία και είχε τιμή 0,44 g/g.

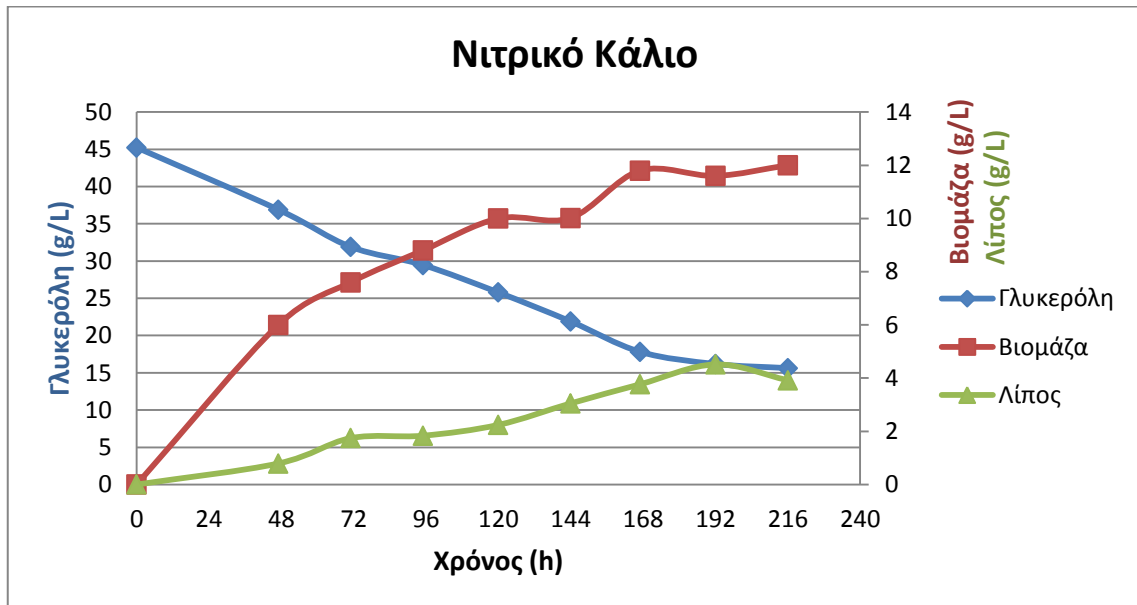
Παρακάτω, παρατίθενται τα διαγράμματα μεταβολής της βιομάζας, του αρχικού υποστρώματος και του μικροβιακού λίπους σε συνάρτηση με τον χρόνο, για τις ζυμώσεις βυθού που πραγματοποιήθηκαν.



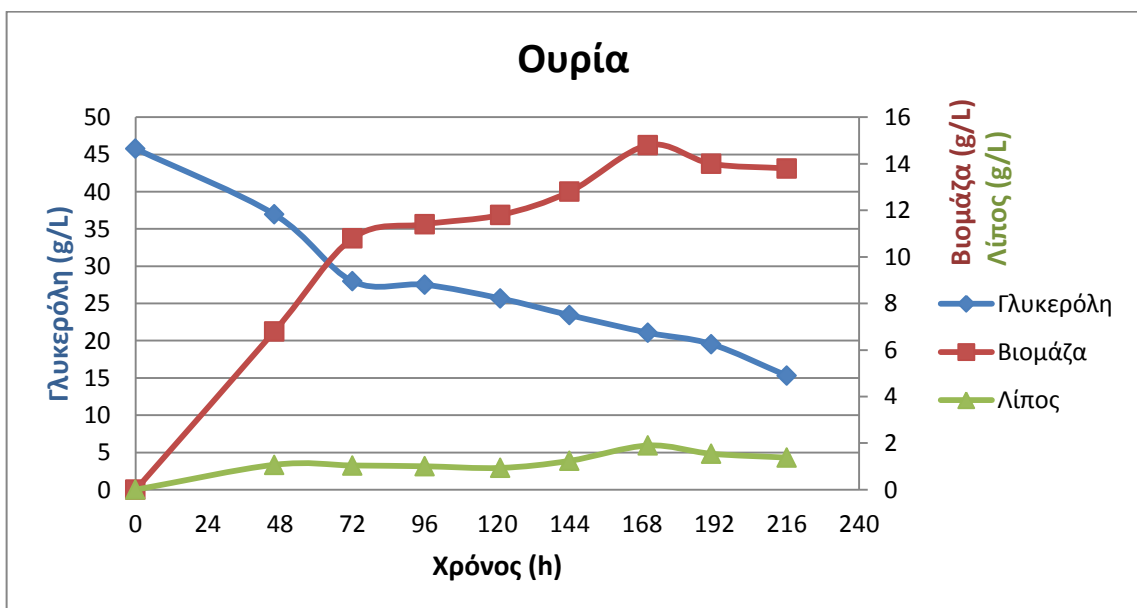
Διάγραμμα 4-1: Κινητικά δεδομένα για την μεταβολή της βιομάζας, του αρχικού υποστρώματος και την παραγωγή λίπους ως προς το χρόνο, για το στέλεχος *C. curvatus* ATCC 20509 και πηγή αζώτου την πεπτόνη.



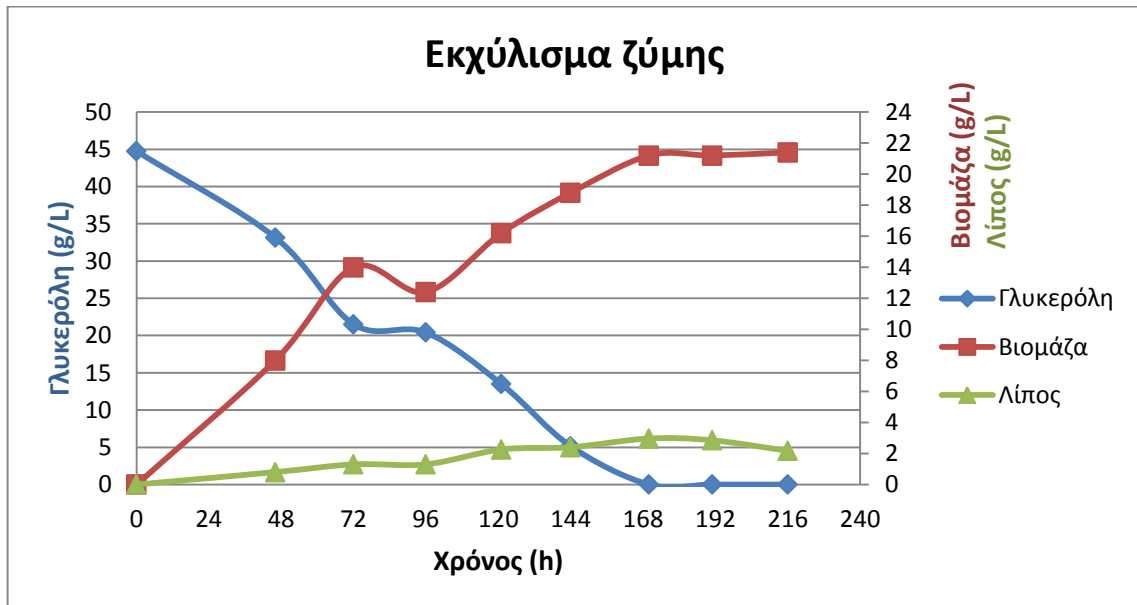
Διάγραμμα 4-2: Κινητικά δεδομένα για την μεταβολή της βιομάζας, του αρχικού υποστρώματος και την παραγωγή λίπους ως προς το χρόνο, για το στέλεχος *C. curvatus* ATCC 20509 και πηγή αζώτου το θεικό αμμώνιο.



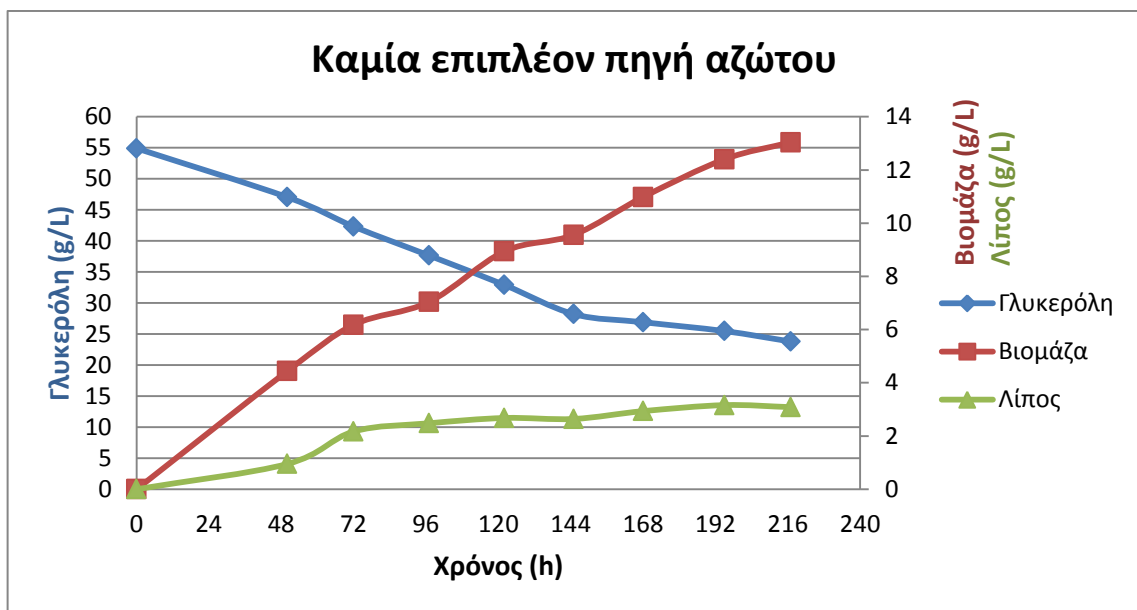
Διάγραμμα 4-3: Κινητικά δεδομένα για την μεταβολή της βιομάζας, του αρχικού υποστρώματος και την παραγωγή λίπους ως προς το χρόνο, για το στέλεχος *C. curvatus* ATCC 20509 και πηγή αζώτου το νιτρικό κάλιο.



Διάγραμμα 4-4: Κινητικά δεδομένα για την μεταβολή της βιομάζας, του αρχικού υποστρώματος και την παραγωγή λίπους ως προς το χρόνο, για το στέλεχος *C. curvatus* ATCC 20509 και πηγή αζώτου την ουρία.



Διάγραμμα 4-5: Κινητικά δεδομένα για την μεταβολή της βιομάζας, του αρχικού υποστρώματος και την παραγωγή λιπών ως προς το χρόνο, για το στέλεχος *C. curvatus* ATCC 20509 και πηγή αζώτου το εκχύλιμα ζύμης.



Διάγραμμα 4-6: Κινητικά δεδομένα για την μεταβολή της βιομάζας, του αρχικού υποστρώματος και την παραγωγή λιπών ως προς το χρόνο, για το στέλεχος *C. curvatus* ATCC 20509 και χωρίς επιπλέον πηγή αζώτου.

4.1.2 Παραγόμενα λιπαρά οξέα

Έπειτα από την εισαγωγή και επεξεργασία των μεθυλεστέρων των λιπαρών οξέων στον αέριο χρωματογράφο, πρόεκυψε ότι το μικροβιακό λίπος του στελέχους *C. curvatus* ATCC 20509 αποτελείται από τα ακόλουθα λιπαρά οξέα: : παλμιτικό οξύ (C16:0), παλμιτελαϊκό οξύ (Δ^9 C16:1), στεατικό οξύ (C18:0), ελαϊκό οξύ (Δ^9 C18:1), λινελαϊκό οξύ ($\Delta^{9,12}$ C18:2) και α-λινολενικό οξύ ($\Delta^{9,12,15}$ C18:3). Στον Πίνακα 4-3 παρουσιάζονται τα ποσοστά των λιπαρών οξέων για κάθε ζύμωση βυθού που πραγματοποιήθηκε.

Πίνακας 4-3: Σύσταση ενδοκυτταρικού λίπους σε λιπαρά οξέα για το στέλεχος *C. curvatus* ATCC 20509 σε γλυκερόλη αρχικής συγκέντρωσης 50 g/L, για διαφορετικές πηγές αζώτου.

Στέλεχος: <i>Cryptococcus curvatus</i> ATCC 20509						
Πηγή αζώτου	Λιπαρά οξέα (%)					
	C16:0	Δ^9 C16:1	C18:0	Δ^9 C18:1	$\Delta^{9,12}$ C18:2	$\Delta^{9,12,15}$ C18:3
Πεπτόνη	25,99	1,22	3,87	57,17	11,75	-
Θ. Αμμόνιο	37,19	-	-	49,39	13,42	-
N.Κάλιο	35,47	6,81	-	54,46	3,19	0,07
Ουρία	34,23	3,56	0,22	55,74	6,24	-
Εκχύλισμα ζύμης	39,18	4,15	0,06	47,42	8,73	0,45
Καμία επιπλέον πηγή αζώτου	38,3	-	0,37	54,86	6,47	-

Τα συμπεράσματα που προκύπτουν από τον Πίνακα 4-3 είναι τα εξής:

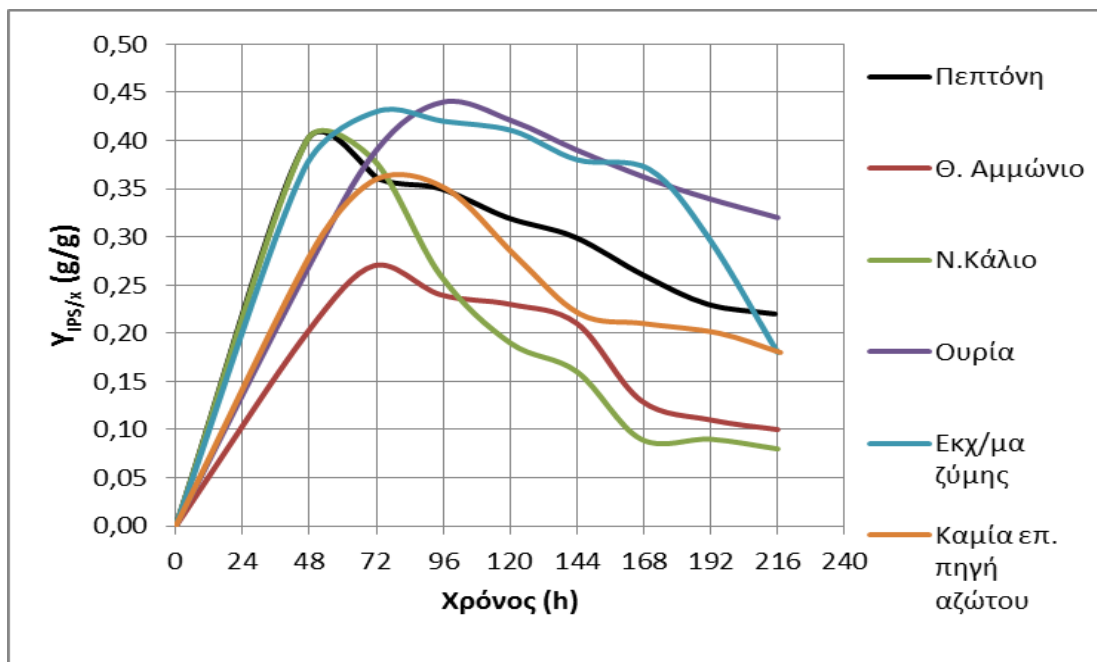
- Το κυρίαρχο λιπαρό οξύ σε όλες τις ζυμώσεις είναι το ελαϊκό οξύ (Δ^9 C18:1) και το ποσοστό του κυμαίνεται από 47,42 - 57,17%.
- Το δεύτερο σε ποσοστιαία σειρά είναι το παλμιτικό οξύ (C16:0) σε ποσοστό 25,99 - 39,18% και τρίτο το λινελαϊκό οξύ ($\Delta^{9,12}$ C18:2) σε ποσοστό 3,19 - 13,42%.
- Τα λιπαρά οξέα: παλμιτελαϊκό οξύ (Δ^9 C16:1), στεατικό οξύ (C18:0), και α-λινολενικό οξύ ($\Delta^{9,12,15}$ C18:3) δεν έχουν παραχθεί σε όλες τις ζυμώσεις και το

ποσοστό και των τριών λιπαρών οξέων δεν ξεπερνά το 7% σε καμία από τις ζυμώσεις.

- Η πηγή αζώτου δεν δείχνει να μεταβάλλει ιδιαίτερα την ποσοστιαία κατανομή των λιπαρών οξέων.
- Λίπος του οποίου η περιεκτικότητα σε ελαϊκό οξύ είναι μεγαλύτερη του 50%, είναι κατάλληλο για παραγωγή βιο-ντιζελ.

4.1.3 Παραγόμενοι ενδοπολυσακχαρίτες

Στο διάγραμμα που ακολουθεί παρουσιάζονται τα αποτελέσματα για τους παραγόμενους ενδοπολυσακχαρίτες κατά τη διάρκεια της ζύμωσης, εκφρασμένα σε γραμμάρια ενδοπολυσακχαριτών προς γραμμάρια ξηρής βιομάζας.



Διάγραμμα 4-7: Καμπύλες συντελεστών των παραγόμενων ενδοπολυσακχαριτών ως προς τη παραχθείσα βιομάζα σε συνάρτηση με τον χρόνο, για το στέλεχος *C. curvatus* ATCC 20509.

Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι για όλες τις ζυμώσεις, ο συντελεστής των παραγόμενων ενδοπολυσακχαριτών προς την παραχθείσα βιομάζα, φτάνει σε ένα μέγιστο τις πρώτες ώρες και κατά τη διάρκεια της ζύμωσης ελαττώνεται σταδιακά. Οι μέγιστες τιμές του συντελεστή επιτεύχθηκαν μεταξύ 47 και 96 ωρών και οι τιμές του κομάνθηκαν από 0,27 g/g για την περίπτωση με το θειικό αμμώνιο μέχρι 0,44 g/g για την περίπτωση με την ουρία, που είχε τον μεγαλύτερο συντελεστή από όλες τις ζυμώσεις. Οι χαμηλότερες τιμές του συντελεστή, ήταν για όλες τις ζυμώσεις στο τέλος

τους και οι τιμές του κυμάνθηκαν από 0,08 g/g για την περίπτωση με το νιτρικό κάλιο έως 0,32 g/g που ήταν η χαμηλότερη τιμή στην περίπτωση με την ουρία.

4.2 Αποτελέσματα για *C. curvatus* NRRL Y-1511

4.2.1 Κινητικά δεδομένα μικροοργανισμού

Στον πίνακα που ακολουθεί, παρουσιάζονται τα πειραματικά αποτελέσματα των ζυμώσεων βυθού για το στέλεχος *C. curvatus* NRRL Y-1511 και αρχικής συγκέντρωσης γλυκερόλης 50 g/L.

Πίνακας 4-4: Κινητικά δεδομένα από τις ζυμώσεις βυθού του στελέχους *C. curvatus* NRRL Y-1511 σε γλυκερόλη αρχικής συγκέντρωσης 50 g/L, για διαφορετικές πηγές αζώτου.

Πηγή Αζώτου	Σημείο	T(h)	X(g/L)	Glycons (g/L)	L(g/L)	Y _{x/s} (g/g)	Y _{L/x} (g/g)	Y _{IPS/x} (g/g)
Πεπτόνη	δ	162	15,5	36,17	0,26	0,43	0,02	0,14
	α	186	17,58	40,69	0,26	0,43	0,01	0,13
	β,γ	211	16,58	45,5	0,34	0,36	0,02	0,12
Καμία επιπλέον πηγή αζώτου	δ	168	6,5	19,36	0,7	0,34	0,11	0,16
	β,γ	195	6,68	21,75	0,74	0,31	0,11	0,15
	α	217	7,46	24,92	0,68	0,3	0,09	0,13

T(h): χρόνος ζύμωσης.

X(g/L): βιομάζα

Glycons(g/L): καταναλωθείσα γλυκερόλη.

L(g/L): ενδοκυτταρικό λίπος.

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

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

Y_{IPS/x} (g/g): συντελεστής απόδοσης παραγόμενων ενδοπολυσακχαριτών ως προς την βιομάζα.

α: το σημείο με την μέγιστη παραγωγή βιομάζας (g/L).

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

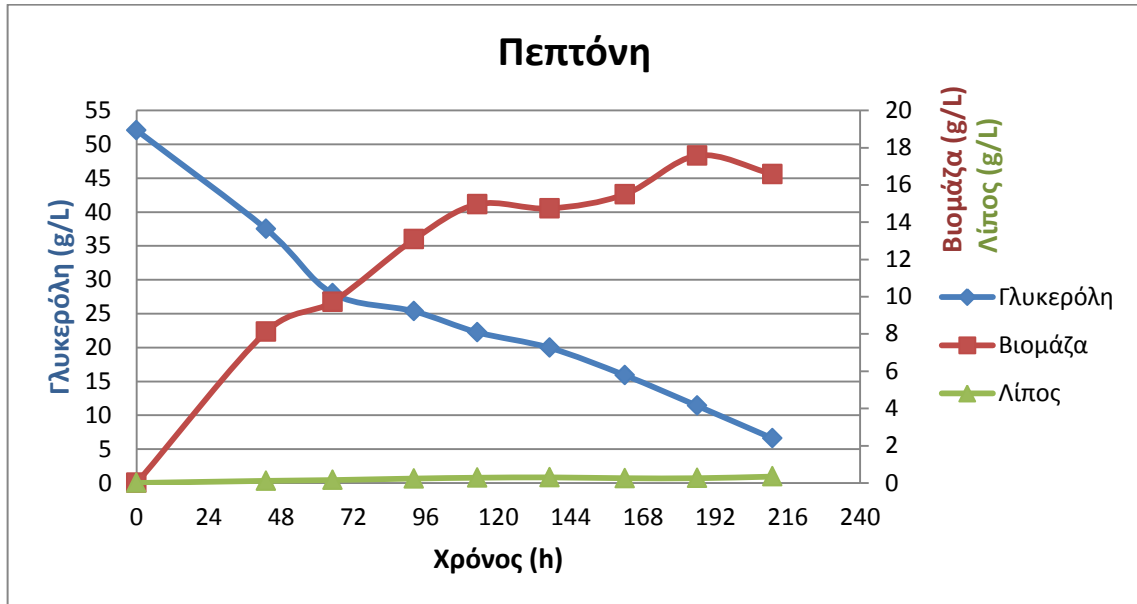
γ: το σημείο με την μέγιστη παραγωγή λίπους (g/L).

δ: το σημείο με το μέγιστο ποσοστό ενδοπολυσακχαριτών επί ξηράς ουσίας (g/g).

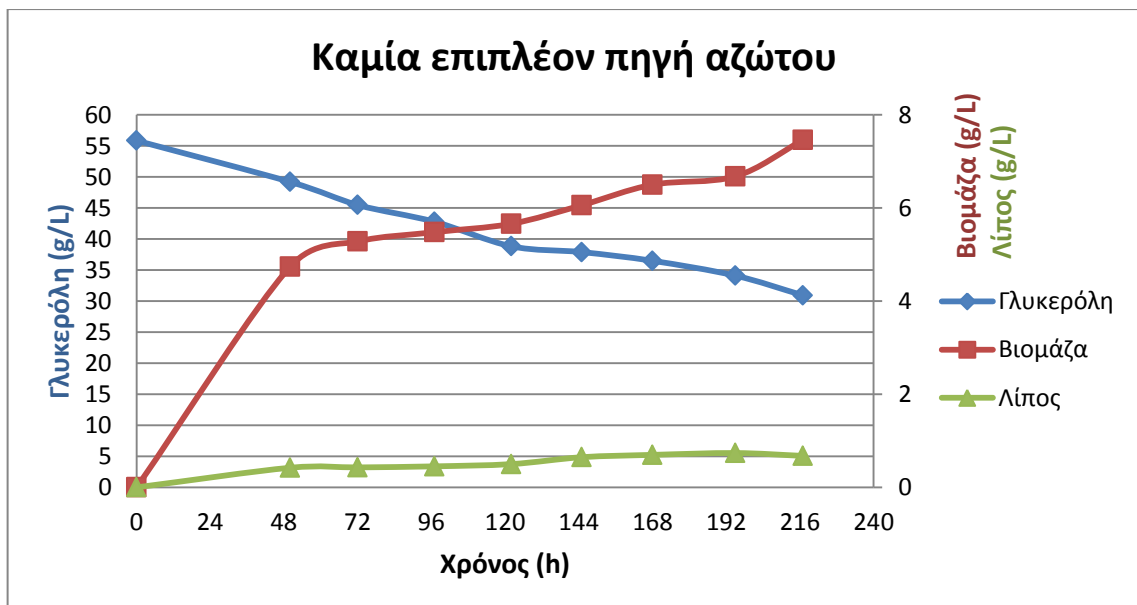
Από τον Πίνακα 4-4 προκύπτουν τα εξής συμπεράσματα:

- Η μέγιστη τιμή της βιομάζας παρατηρήθηκε στην ζύμωση με πηγή αζώτου την πεπτόνη, η οποία έφθασε τα 17,58 g/L.
- Η μεγαλύτερη παραγωγή λίπους παρατηρήθηκε στην ζύμωση χωρίς επιπλέον πηγή αζώτου, η οποία έφθασε τα 0,74 g/L.
- Το μέγιστο ποσοστό λίπους επί ξηράς ουσίας παρατηρήθηκε επίσης στην ζύμωση χωρίς επιπλέον πηγή αζώτου και είχε τιμή 0,11 g/g.
- Το μέγιστο ποσοστό ενδοπολυσακχαριτών επί ξηράς ουσίας παρατηρήθηκε στη ζύμωση χωρίς επιπλέον πηγή αζώτου και είχε τιμή 0,16 g/g.

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



Διάγραμμα 4-8: Κινητικά δεδομένα για την μεταβολή της βιομάζας, του αρχικού υποστρώματος και την παραγωγή λίπους ως προς το χρόνο, για το στέλεχος *C. curvatus* NRRL Y-1511 και πηγή αζώτου την πεπτόνη.



Διάγραμμα 4-9: Κινητικά δεδομένα για την μεταβολή της βιομάζας, του αρχικού υποστρώματος και την παραγωγή λίπους ως προς το χρόνο, για το στέλεχος *C. curvatus* NRRL Y-1511 χωρίς επιπλέον πηγή αζώτου.

4.2.2 Παραγόμενα λιπαρά οξέα

Έπειτα από την εισαγωγή και επεξεργασία των μεθυλεστέρων των λιπαρών οξέων στον αέριο χρωματογράφο, πρόεκυψε ότι το μικροβιακό λίπος του στελέχους *C. curvatus* NRRL Y-1511 αποτελείται από τα ακόλουθα λιπαρά οξέα: : παλμιτικό οξύ (C16:0), παλμιτελαϊκό οξύ (Δ^9 C16:1), στεατικό οξύ (C18:0), ελαϊκό οξύ (Δ^9 C18:1) , λινελαϊκό οξύ ($\Delta^{9,12}$ C18:2) και α-λινολενικό οξύ ($\Delta^{9,12,15}$ C18:3). Στον Πίνακα 4-5 παρουσιάζονται τα ποσοστά των λιπαρών οξέων για κάθε ζύμωση βυθού που πραγματοποιήθηκε.

Πίνακας 4-5: Σύσταση ενδοκυτταρικού λίπους σε λιπαρά οξέα για το στέλεχος *C. curvatus* NRRL-Y 1511 σε γλυκερόλη αρχικής συγκέντρωσης 50 g/L, για πηγή αζώτου την πεπτόνη και χωρίς επιπλέον πηγή αζώτου.

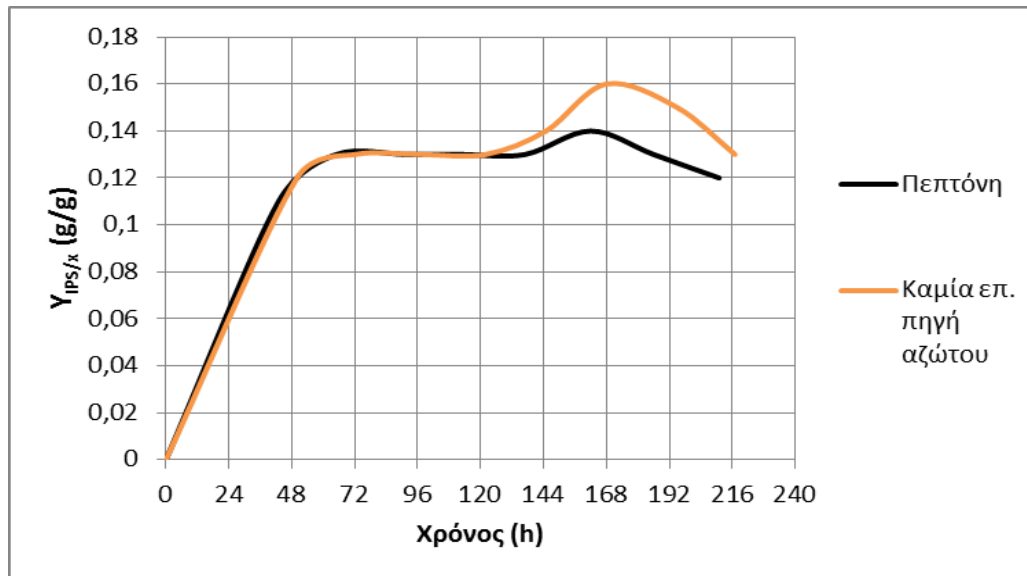
Στέλεχος: <i>Cryptococcus curvatus</i> NRRL Y-1511						
Πηγή αζώτου	Λιπαρά οξέα (%)					
	C16:0	Δ^9 C16:1	C18:0	Δ^9 C18:1	$\Delta^{9,12}$ C18:2	$\Delta^{9,12,15}$ C18:3
Πεπτόνη	33,81	5,59	0,69	45,2	11,73	2,99
Καμία επιπλέον πηγή αζώτου	29,81	2,43	4,5	48,46	14,81	-

Τα συμπεράσματα που προκύπτουν από τον Πίνακα 4-5 είναι τα εξής:

- Το κυρίαρχο λιπαρό οξύ και στις δύο ζυμώσεις είναι το ελαϊκό οξύ (Δ^9 C18:1) με ποσοστά 45,2 και 48,46% αντίστοιχα.
- Το δεύτερο σε ποσοστιαία σειρά είναι το παλμιτικό οξύ (C16:0) σε ποσοστά 33,81 και 29,81% και τρίτο το λινελαϊκό οξύ ($\Delta^{9,12}$ C18:2) σε ποσοστά 11,73 και 14,81% αντίστοιχα.
- Τα λιπαρά οξέα: παλμιτελαϊκό οξύ (Δ^9 C16:1), στεατικό οξύ (C18:0), και α-λινολενικό οξύ ($\Delta^{9,12,15}$ C18:3) έχουν παραχθεί, αλλά το ποσοστό τους είναι αρκετά μικρό και δεν ξεπερνά το 10% σε καμία από τις δυο ζυμώσεις.
- Η επιπλέον πηγή αζώτου δεν έδειξε να επηρεάζει την ποσοστιαία παραγωγή των λιπαρών οξέων σε αξιόλογο βαθμό.

4.2.3 Παραγόμενοι ενδοπολυσακχαρίτες

Στο διάγραμμα που ακολουθεί παρουσιάζονται τα αποτελέσματα για τους παραγόμενους ενδοπολυσακχαρίτες κατά τη διάρκεια της ζύμωσης, εκφρασμένα σε γραμμάρια ενδοπολυσακχαριτών προς γραμμάρια ξηρής βιομάζας.



Διάγραμμα 4-10: Καμπύλες συντελεστών των παραγόμενων ενδοπολυσακχαριτών ως προς τη παραχθείσα βιομάζα σε συνάρτηση με τον χρόνο, για το στέλεχος *C. curvatus* NRRL-Y 1511.

Όπως φαίνεται από το Διάγραμμα 4-10, ο συντελεστής των παραγόμενων ενδοπολυσακχαριτών προς την παραγόμενη βιομάζα και για τις δύο ζυμώσεις, αποκτά μία τιμή ίση με 0,13 g/g και την διατηρεί μέχρι τις ~162 ώρες της ζύμωσης. Στην συνέχεια αυξάνεται ελαφρώς μέχρι την τιμή 0,14 g/g για την περίπτωση με την πειπτόνη και 0,16 g/g για την περίπτωση χωρίς επιπλέον πηγή αζώτου, και στη συνέχεια μειώνεται σταδιακά μέχρι τη τιμή 0,12 g/g για την περίπτωση με την πειπτόνη και 0,13 g/g για την περίπτωση χωρίς επιπλέον πηγή αζώτου.

4.3 Αποτελέσματα για *R. toruloides* NRRL Y-6984

4.3.1 Κινητικά δεδομένα μικροοργανισμού

Στον πίνακα που ακολουθεί, παρουσιάζονται τα πειραματικά αποτελέσματα των ζυμώσεων βυθού για το στελέχος *R. toruloides* NRRL Y-6984 και αρχικής συγκέντρωσης γλυκερόλης 50 g/L.

Πίνακας 4-6: Κινητικά δεδομένα από τις ζυμώσεις βυθού του στελέχους *R. toruloides* NRRL Y-6984 σε γλυκερόλη αρχικής συγκέντρωσης 50 g/L, για διαφορετικές πηγές αζώτου.

Πηγή Αζώτου	Σημείο	T(h)	X(g/L)	Glycons (g/L)	L(g/L)	Y _{x/s} (g/g)	Y _{L/x} (g/g)	Y _{IPS/x} (g/g)
Πειπτόνη	δ	48	7,2	11,87	0,74	0,61	0,1	0,31
	α	191	16,4	43,17	3,18	0,38	0,19	0,17
	β,γ	215	16	43,17	3,23	0,37	0,2	0,16
N. Κάλιο	δ	48	5,6	13,97	0,4	0,4	0,07	0,31
	β,γ	168	16	44,21	3,32	0,36	0,21	0,15
	α	191	16,2	44,21	3,28	0,37	0,2	0,15

T(h): χρόνος ζύμωσης.

X (g/L): βιομάζα

Glycons (g/L): καταναλωθείσα γλυκερόλη.

L (g/L): ενδοκυτταρικό λίπος.

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

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

Y_{IPS/x} (g/g): συντελεστής απόδοσης παραγόμενων ενδοπολυσακχαριτών ως προς την βιομάζα.

α: το σημείο με την μέγιστη παραγωγή βιομάζας (g/L).

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

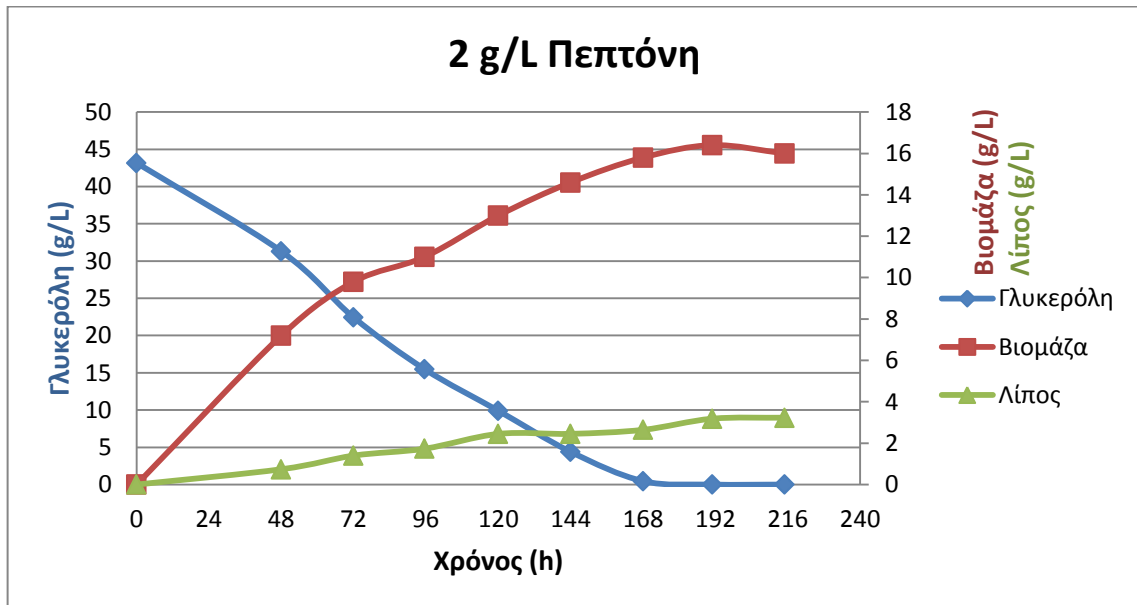
γ: το σημείο με την μέγιστη παραγωγή λίπους (g/L).

δ: το σημείο με το μέγιστο ποσοστό ενδοπολυσακχαριτών επί ξηράς ουσίας (g/g).

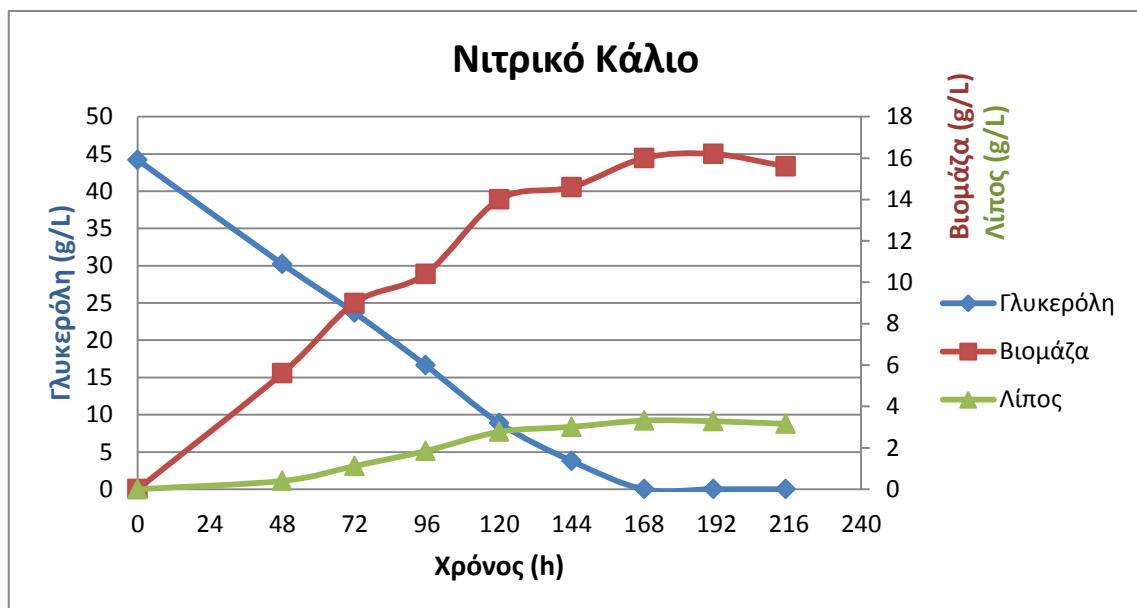
Από τον Πίνακα 4-6 προκύπτουν τα εξής συμπεράσματα:

- Η μέγιστη τιμή της βιομάζας παρατηρήθηκε στην ζύμωση με πηγή αζώτου την πειπτόνη, η οποία έφθασε τα 16,4 g/L.
- Η μεγαλύτερη παραγωγή λίπους παρατηρήθηκε στην ζύμωση με πηγή αζώτου το νιτρικό κάλιο, η οποία έφθασε τα 3,32 g/L.
- Το μέγιστο ποσοστό λίπους επί ξηράς ουσίας παρατηρήθηκε επίσης στην ζύμωση με πηγή αζώτου το νιτρικό κάλιο και είχε τιμή 0,21 g/g.
- Το μέγιστο ποσοστό ενδοπολυσακχαριτών επί ξηράς ουσίας που παρατηρήθηκε και στις δύο ζυμώσεις είχε τιμή 0,31 g/g.

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



Διάγραμμα 4-11: Κινητικά δεδομένα για την μεταβολή της βιομάζας, του αρχικού υποστρώματος και την παραγωγή λιπών ως προς το χρόνο, για το στέλεχος *R. toruloides* NRRL Y-6984 και πηγή αζώτου την πεπτόνη.



Διάγραμμα 4-12: Κινητικά δεδομένα για την μεταβολή της βιομάζας, του αρχικού υποστρώματος και την παραγωγή λιπών ως προς το χρόνο, για το στέλεχος *R. toruloides* NRRL Y-6984 και πηγή αζώτου το νιτρικό κάλιο.

4.3.2 Παραγόμενα λιπαρά οξέα

Έπειτα από την εισαγωγή και επεξεργασία των μεθυλεστέρων των λιπαρών οξέων στον αέριο χρωματογράφο, πρόεκυψε ότι το μικροβιακό λίπος του στελέχους *R. toruloides* NRRL Y-6984 αποτελείται από τα ακόλουθα λιπαρά οξέα: : παλμιτικό οξύ (C16:0), παλμιτελαϊκό οξύ (Δ^9 C16:1), στεατικό οξύ (C18:0), ελαϊκό οξύ (Δ^9 C18:1) , λινελαϊκό οξύ ($\Delta^{9,12}$ C18:2) και α-λινολενικό οξύ ($\Delta^{9,12,15}$ C18:3). Στον Πίνακα 4-7 παρουσιάζονται τα ποσοστά των λιπαρών οξέων για κάθε ζύμωση βυθού που πραγματοποιήθηκε.

Πίνακας 4-7: Σύσταση ενδοκυτταρικού λίπους σε λιπαρά οξέα για το στέλεχος *R. toruloides* NRRL Y-6984 σε γλυκερόλη αρχικής συγκέντρωσης 50 g/L, για πηγή αζώτου την πεπτόνη και το νιτρικό κάλιο.

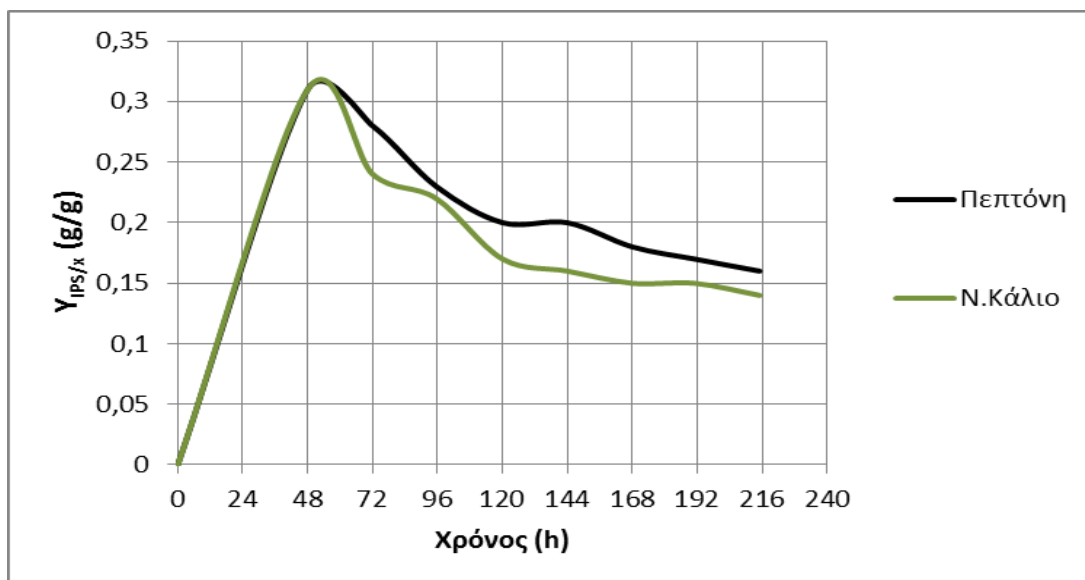
Στέλεχος: <i>Rhodospiridium toruloides</i> NRRL Y-6984						
Πηγή αζώτου	Λιπαρά οξέα (%)					
	C16:0	Δ^9 C16:1	C18:0	Δ^9 C18:1	$\Delta^{9,12}$ C18:2	$\Delta^{9,12,15}$ C18:3
Πεπτόνη	33,88	0,25	1,15	56,71	7,83	0,18
N.Κάλιο	26,95	-	6,27	59,98	3,42	3,39

Τα συμπεράσματα που προκύπτουν από τον Πίνακα 4-7 είναι τα εξής:

- Το κυρίαρχο λιπαρό οξύ και στις δύο ζυμώσεις είναι το ελαϊκό οξύ (Δ^9 C18:1) με ποσοστά 56,71 και 59,98% αντίστοιχα.
- Το δεύτερο σε ποσοστιαία σειρά είναι το παλμιτικό οξύ (C16:0) σε ποσοστά 33,88 και 26,95% αντίστοιχα.
- Στην περίπτωση με πηγή αζώτου την πεπτόνη (2 g/L), το λινελαϊκό οξύ ($\Delta^{9,12}$ C18:2) έρχεται τρίτο σε ποσοστιαία σειρά (7,83%), ενώ στην ζύμωση με πηγή αζώτου το νιτρικό κάλιο (2,038 g/L) έχει παραχθεί περισσότερο το στεατικό οξύ (C18:0), σε ποσοστό 6,27%.
- Τα λιπαρά οξέα: παλμιτελαϊκό οξύ (Δ^9 C16:1) και α-λινολενικό οξύ ($\Delta^{9,12,15}$ C18:3) έχουν παραχθεί σε αμελητέο βαθμό.
- Λίπος του οποίου η περιεκτικότητα σε ελαϊκό οξύ είναι μεγαλύτερη του 50%, είναι κατάλληλο για παραγωγή βιο-ντίζελ.

4.3.3 Παραγόμενοι ενδοπολυσακχαρίτες

Στο διάγραμμα που ακολουθεί παρουσιάζονται τα αποτελέσματα για τους παραγόμενους ενδοπολυσακχαρίτες κατά τη διάρκεια της ζύμωσης, εκφρασμένα σε γραμμάρια ενδοπολυσακχαριτών προς γραμμάρια ξηρής βιομάζας.



Διάγραμμα 4-13: Καμπύλες συντελεστών των παραγόμενων ενδοπολυσακχαριτών ως προς τη παραχθείσα βιομάζα σε συνάρτηση με τον χρόνο, για το στέλεχος *R. toruloides* NRRL Y-6984.

Από το Διάγραμμα 4-13, παρατηρείται ότι και για τις δύο ζυμώσεις, ο συντελεστής απόδοσης φτάνει την μέγιστη τιμή τους στις ~48 πρώτες ώρες, ίση με 0,31 g/g και στην συνέχεια μειώνεται σταδιακά μέχρι την τιμή 0,16 g/g για την περίπτωση με την πεπτόνη και 0,14 g/g για την περίπτωση με το νιτρικό κάλιο.

4.4 Αποτελέσματα από εκχύλιση λίπους

Η ζυμώσεις που έλαβαν χώρα προκειμένου να μελετηθεί ποια από τις τρεις μεθόδους εκχύλισης λίπους είναι πιο αποτελεσματική, έγιναν με το στέλεχος *C. curvatus* ATCC 20509 και αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης 50 g/L. Οι μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν παρουσιάζονται αναφορικά παρακάτω:

- 1) 1^η μέθοδος: σκέτο αντιδραστήριο Folch.
- 2) 2^η μέθοδος: HCl/Folch.
- 3) 3^η μέθοδος: αντιδραστήριο Folch και βρασμός σε μανδύα για 1 ώρα.

Στον Πίνακα 4-8 παρουσιάζονται οι συντελεστές απόδοσης των τριών μεθόδων για τρία διαφορετικά σημεία κατά την διάρκεια της πρώτης ζύμωσης.

Πίνακας 4-8: Σύγκριση των τριών μεθόδων εξαγωγής λίπους για το στέλεχος *C. curvatus* ATCC 20509 σε υπόστρωμα την γλυκερόλη, αρχικής συγκέντρωσης 50 g/L.

T(h)	1η Μέθοδος			2η Μέθοδος			3η Μέθοδος		
	X(g/L)	L(g/L)	YL/x(g/g)	X(g/L)	L(g/L)	YL/x(g/g)	X(g/L)	L(g/L)	YL/x(g/g)
119	15,82	3,044	0,19	15,96	0,59	0,04	15,7	3,077	0,20
191	21,4	3,94	0,18	19,836	3,253	0,16	20,687	6,694	0,32
215	20,97	4,298	0,20	21,2	3,392	0,16	18,746	4,373	0,23
		M.O.	0,19		M.O.	0,12		M.O.	0,25

T(h): χρόνος ζύμωσης.

X(g/L): βιομάζα

L(g/L): ενδοκυτταρικό λίπος.

YL/x(g/g): συντελεστής απόδοσης του παραγόμενου λίπους ως προς τη βιομάζα.

M.O.: ο μέσος όρος των συντελεστών απόδοσης του παραγόμενου λίπους ως προς τη βιομάζα, για τα τρία σημεία.

Από τον Πίνακα 4-8 προκύπτει ότι η 3^η μέθοδος είχε μεγαλύτερο μέσο όρο στον συντελεστή απόδοσης λίπους προς βιομάζα με τιμή 0,25 g/g και τον αμέσως μικρότερο είχε η πρώτη μέθοδος με τιμή 0,19 g/g. Για επαλήθευση των αποτελεσμάτων έγινε επιπλέον μια ζύμωση με τις ίδιες συνθήκες, συγκρίνοντας την 1^η και την 3^η μέθοδο. Τα αποτελέσματα από την δεύτερη σύγκριση παρουσιάζονται στον Πίνακα 4-9.

Πίνακας 4-9: Σύγκριση της 1ης και 3ης μεθόδου εξαγωγής λίπους για το στέλεχος *C. curvatus* ATCC 20509 σε υπόστρωμα την γλυκερόλη, αρχικής συγκέντρωσης 50 g/L.

T(h)	1η Μέθοδος			3η Μέθοδος		
	X(g/L)	L(g/L)	YL/x(g/g)	X(g/L)	L(g/L)	YL/x(g/g)
168	21,6	3,805	0,18	20,6	2,457	0,12
191	21,5	3,712	0,17	21,3	3,65	0,17
		M.O.	0,17		M.O.	0,15

T(h): χρόνος ζύμωσης.

X (g/L): βιομάζα

L (g/L): ενδοκυτταρικό λίπος.

YL/x (g/g): συντελεστής απόδοσης του παραγόμενου λίπους ως προς τη βιομάζα.

M.O.: ο μέσος όρος των συντελεστών απόδοσης του παραγόμενου λίπους ως προς τη βιομάζα, για τα τρία σημεία.

Από τα αποτελέσματα του Πίνακα 4-9 φαίνεται πως στην δεύτερη σύγκριση η 1^η μέθοδος έδωσε καλύτερα αποτελέσματα, με μέση τιμή για το συντελεστή απόδοσης ίση με 0,17 g/g, έναντι της 3^{ης} μεθόδου με τιμή ίση με 0,15 g/g.

Σύμφωνα με τους δύο παραπάνω πίνακες, προκύπτει ότι η 2^η μέθοδος είναι πιο σταθερή στα αποτελέσματά της (0,19 και 0,17g/g), ενώ οι μεγάλες διακυμάνσεις στα αποτελέσματα της 1^{ης} μεθόδου πιθανών να οφείλονται σε σφάλμα κατά την διάρκεια της διαδικασίας.

5^ο Κεφάλαιο

Συζήτηση - Συμπεράσματα

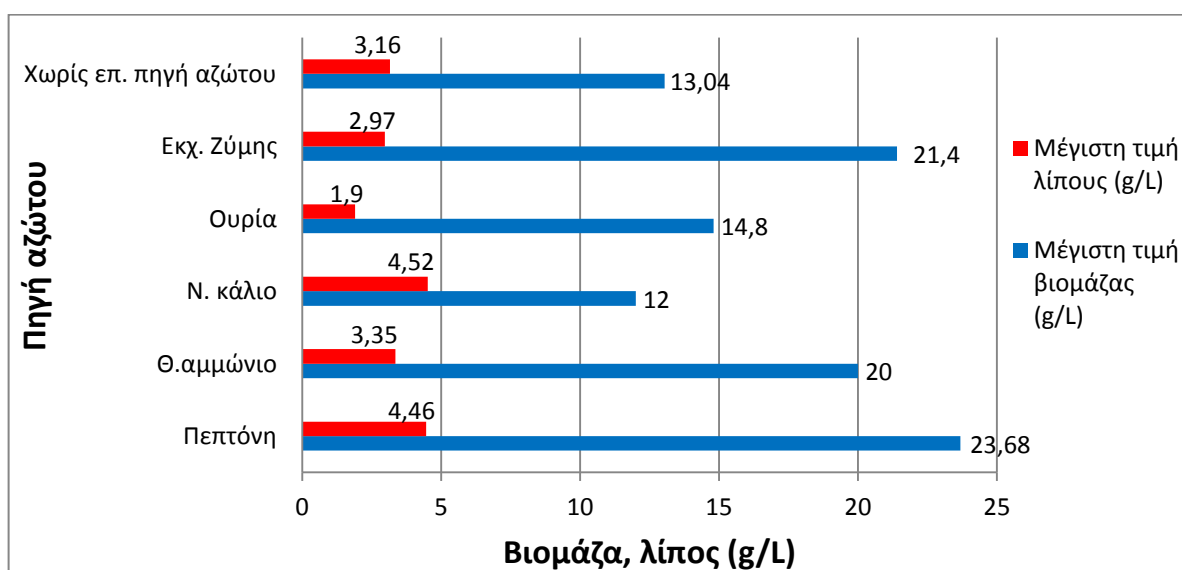
5 Συζήτηση – Συμπεράσματα

5.1 Συζήτηση

Από τις ασυνεχείς ζυμώσεις βυθού που πραγματοποιήθηκαν για τα τρία στελέχη, μπορούμε να εξάγουμε ορισμένα συμπεράσματα σχετικά με την παραγωγή βιομάζας, την παραγωγή ενδοκυτταρικού λίπους και ενδοπολυσακχαριτών.

Πιο συγκεκριμένα, για το στέλεχος *C. curvatus* ATCC 20509 η μέγιστη τιμή της βιομάζας έφτασε τα 23,68 g/L στην ζύμωση με πηγή αζώτου την πεπτόνη. Οι αμέσως μεγαλύτερες τιμές της ήταν 21,4 g/L στην ζύμωση με πηγή αζώτου το εκχύλισμα ζύμης και 20 g/L με το θειικό αμμώνιο. Στις άλλες τρεις ζυμώσεις η μέγιστη τιμή ήταν 14,8 g/L με πηγή αζώτου την ουρία, 13,08 g/L για την ζύμωση χωρίς επιπλέον πηγή αζώτου και 12 g/L για την ζύμωση με πηγή αζώτου το νιτρικό κάλλιο. Να σημειωθεί ότι στις ζυμώσεις με την λιγότερη παραγωγή βιομάζας η γλυκερόλη δεν είχε καταναλωθεί πλήρως, ενώ στις ζυμώσεις με παραγωγή βιομάζας >20 g/L η γλυκερόλη είχε καταναλωθεί τελείως από τις πρώτες ~168 ώρες.

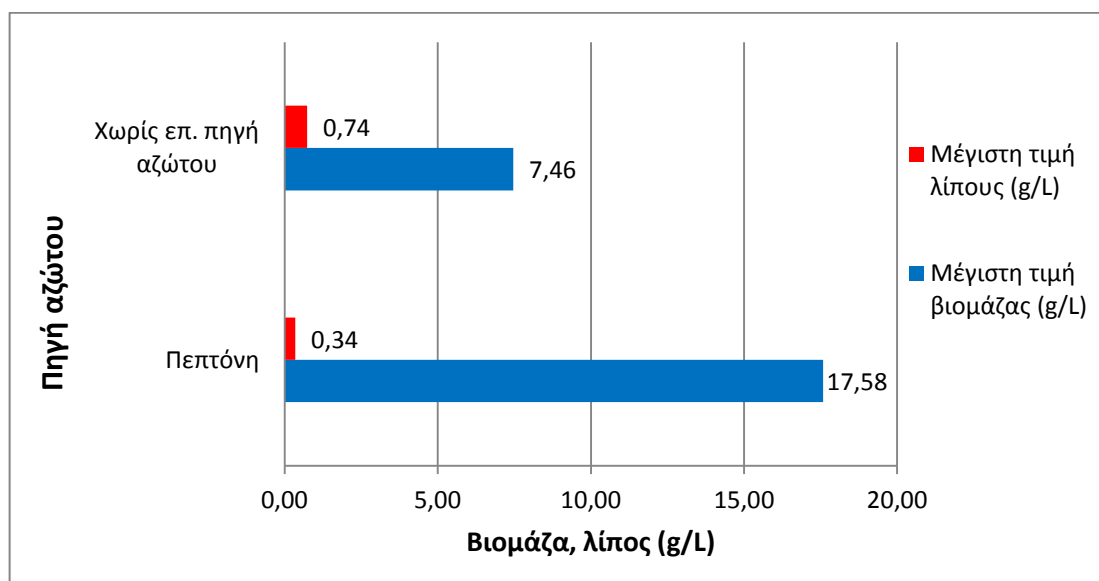
Όσο αναφορά την παραγωγή ενδοκυτταρικού λίπους, αυτό που έχει ενδιαφέρον είναι ότι στις ζυμώσεις με μικρή παραγωγή βιομάζας, ο συντελεστής απόδοσης του ενδοκυτταρικού λίπους προς την παραγόμενη βιομάζα ήταν συγκρίσιμος με αυτόν στις περιπτώσεις όπου είχε παραχθεί περισσότερη βιομάζα, με εξαίρεση την ουρία η οποία είχε την μικρότερη παραγωγή ενδοκυτταρικού λίπους (1,9 g/L). Στο γράφημα που ακολουθεί παρουσιάζονται η μέγιστη βιομάζα και το μέγιστο ενδοκυτταρικό λίπος για κάθε ζύμωση.



Γράφημα 5-1: Μέγιστη παραγωγή βιομάζας και ενδοκυτταρικού λίπους για τις ζυμώσεις του στελέχους *C. curvatus* ATCC 20509 σε γλυκερόλη αρχικής συγκέντρωσης 50 g/L.

Όπως φαίνεται και από το Γράφημα 5-1 η μέγιστη παραγωγή λίπους έγινε στην ζύμωση με πηγή αζώτου το νιτρικό κάλιο (4,52 g/L), όπου ήταν και η ζύμωση με την μικρότερη ανάπτυξη βιομάζας. Ακολουθεί η ζύμωση με πηγή αζώτου την πεπτόνη, όπου το λίπος έφτασε την τιμή 4,46 g/L και τρίτη σε σειρά παραγωγής λίπους είναι η ζύμωση με πηγή αζώτου το θειικό αμμώνιο, το οποίο έφτασε τα 3,5 g/L. Στην περίπτωση της ζύμωσης χωρίς επιπλέον πηγή αζώτου, μπορεί το παραγόμενο λίπος (3,16 g/L) να ήταν μικρότερο από αυτό στις ζυμώσεις με πεπτόνη και θειικό αμμώνιο, αλλά η βιομάζα που παράχθηκε ήταν αρκετά μικρότερη, δίνοντας έτσι μεγαλύτερο συντελεστή απόδοσης στη συγκεκριμένη ζύμωση (0,35 g/g).

Η παραγόμενη βιομάζα και το ενδοκυτταρικό λίπος για το στέλεχος *C. curvatus* NRRL Y-1511 δεν είχαν την ίδια απόδοση συγκριτικά με τα αποτελέσματα του στελέχους *C. curvatus* ATCC 20509. Πιο συγκεκριμένα, για τις δύο ζυμώσεις που πραγματοποιήθηκαν, η βιομάζα στην περίπτωση με πηγή αζώτου την πεπτόνη έφτασε την μέγιστη τιμή ίση με 17,58 g/L και στην περίπτωση χωρίς επιπλέον πηγή αζώτου, έφτασε μέγιστη τιμή ίση με 7,46 g/L, έναντι 23,68 g/L και 13,04 g/L για το στέλεχος *C. curvatus* ATCC 20509. Στην ζύμωση με πηγή αζώτου την πεπτόνη, η γλυκερόλη δεν είχε καταναλωθεί πλήρως από τον μικροοργανισμό. Στην ζύμωση χωρίς επιπλέον πηγή αζώτου η κατανάλωση του υποστρώματος ήταν ακόμη μικρότερη, πράγμα το οποίο φαίνεται και από την μικρότερη παραγωγή βιομάζας. Στο γράφημα που ακολουθεί παρουσιάζονται οι μέγιστες τιμές βιομάζας και λίπους που παράχθηκαν στις δύο ζυμώσεις.



Γράφημα 5- 2: Μέγιστη παραγωγή βιομάζας και ενδοκυτταρικού λίπους για τις ζυμώσεις του στελέχους *C. curvatus* NRRL Y-1511 σε γλυκερόλη αρχικής συγκέντρωσης 50 g/L.

Όπως φαίνεται από τα δεδομένα του Γραφήματος 5-2, το μέγιστο ενδοκυτταρικό λίπος ήταν στην ζύμωση χωρίς επιπλέον πηγή αζώτου ίσο με 0,74 g/L ενώ στην ζύμωση με πηγή αζώτου την πεπτόνη, το ενδοκυτταρικό λίπος έφτασε την τιμή 0,34 g/L. Και οι δύο τιμές για το λίπος είναι μικρές συγκριτικά με την βιβλιογραφία για την συγκεκριμένη ζύμη, όμως παρατηρείται πως και σε αυτή την περίπτωση ο συντελεστής απόδοσης λίπους προς βιομάζα είναι μεγαλύτερος για την περίπτωση της ζύμωσης χωρίς επιπλέον πηγή αζώτου (περισσότερο περιοριστικές σε άζωτο συνθήκες).

Στους παρακάτω πίνακες παρουσιάζονται αποτελέσματα βιβλιογραφικών μελετών που βασίζονται σε βιοδιεργασίες για τα δύο στελέχη της ζύμης *Cryptococcus curvatus*, σχετικά με την παραγόμενη βιομάζα και τον λόγο του ενδοκυτταρικού λίπους προς την ξηρή βιομάζα (g/g).

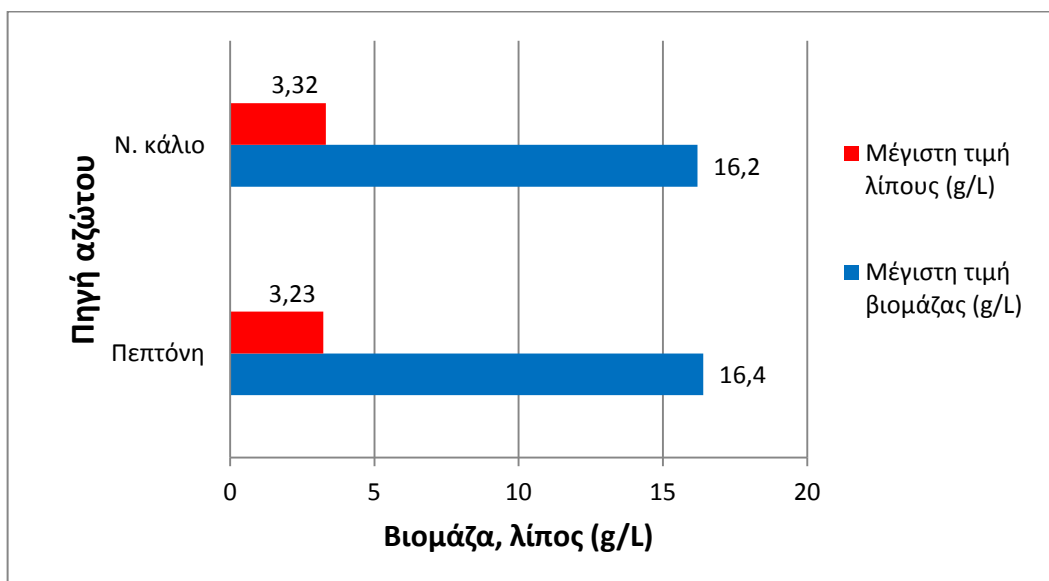
Πίνακας 5-1: Σύγκριση αποτελεσμάτων με άλλες μελέτες για το στέλεχος *C. curvatus* ATCC 20509.

Στέλεχος	Τύπος ζύμωσης	Υπόστρωμα	X (g/L)	Y _{1/x} (g/g)	Αναφορά
<i>C. curvatus</i> ATCC 20509	Αναδεδυόμενες φιάλες	Ακάθαρτη γλυκερόλη	4,2	0,18	Cui et al., 2012
<i>C. curvatus</i> ATCC 20509	Αναδεδυόμενες φιάλες	Λακτόζη	18,4	0,49	Awad et al., 2019
<i>C. curvatus</i> ATCC 20509	Αναδεδυόμενες φιάλες	Μικτά πηπτικά λιπαρά οξέα	8,1	0,52	Liu et al., 2017
<i>C. curvatus</i> ATCC 20509	Αναδεδυόμενες φιάλες	οξικό οξύ	7,2	0,57	Liu et al., 2017
<i>C. curvatus</i> ATCC 20509	ημι-συνεχής σε βιο- αντιδραστήρα	Καθαρή γλυκερόλη	118	0,25	Meesters et al., 1996
<i>C. curvatus</i> ATCC 20509	Αναδεδυόμενες φιάλες	Γλυκόζη	31,6	0,4	Yu et al., 2014
<i>C. curvatus</i> ATCC 20509	Αναδεδυόμενες φιάλες	Ακάθαρτη γλυκερόλη	22,96	0,18	Leiva et al., 2014
<i>C. curvatus</i> ATCC 20509	Αναδεδυόμενες φιάλες	Ακάθαρτη γλυκερόλη (Πειπόνη)	23,68	0,24	Παρούσα μελέτη
<i>C. curvatus</i> ATCC 20509	Αναδεδυόμενες φιάλες	Ακάθαρτη γλυκερόλη (Θ. αμμώνιο)	20	0,18	Παρούσα μελέτη
<i>C. curvatus</i> ATCC 20509	Αναδεδυόμενες φιάλες	Ακάθαρτη γλυκερόλη (N. κάλιο)	12	0,39	Παρούσα μελέτη
<i>C. curvatus</i> ATCC 20509	Αναδεδυόμενες φιάλες	Ακάθαρτη γλυκερόλη (Ουρία)	14,8	0,16	Παρούσα μελέτη
<i>C. curvatus</i> ATCC 20509	Αναδεδυόμενες φιάλες	Ακάθαρτη γλυκερόλη (Εκχ. ζύμης)	21,4	0,14	Παρούσα μελέτη
<i>C. curvatus</i> ATCC 20509	Αναδεδυόμενες φιάλες	Ακάθαρτη γλυκερόλη (Καμία επ. πηγή αζώτου)	13,04	0,35	Παρούσα μελέτη

Πίνακας 5-2: Σύγκριση αποτελεσμάτων με άλλες μελέτες για το στέλεχος *C. curvatus* NRRL Y-1511.

Στέλεχος	Τύπος ζύμωσης	Υπόστρωμα	X (g/L)	Y _{1/x} (g/g)	Αναφορά
<i>C. curvatus</i> NRRL Y-1511	Αναδεδυόμενες φιάλες	Ακάθαρτη γλυκερόλη	11,8	0,12	Tchakouteu et al., 2015
<i>C. curvatus</i> NRRL Y-1511	Αναδεδυόμενες φιάλες	Λακτόζη	13,7	0,18	Tchakouteu et al., 2015
<i>C. curvatus</i> NRRL Y-1511	Αναδεδυόμενες φιάλες	Ξυλόζη	19,42	0,17	Ψαριανός, 2015
<i>C. curvatus</i> NRRL Y-1511	Βιο-αντιδραστήρας	Ξυλόζη	21,64	0,14	Ψαριανός, 2015
<i>C. curvatus</i> NRRL Y-1511	Αναδεδυόμενες φιάλες	Ακάθαρτη γλυκερόλη	4,49	0,27	Spier et al., 2015
<i>C. curvatus</i> NRRL Y-1511	Αναδεδυόμενες φιάλες	Ricotta Cheese Whey	10,77	0,63	Eleonora et al., 2017
<i>C. curvatus</i> NRRL Y-1511	Αναδεδυόμενες φιάλες	Γλυκόζη	13,2	0,19	Harde et al., 2016
<i>C. curvatus</i> NRRL Y-1511	Αναδεδυόμενες φιάλες	Ακάθαρτη γλυκερόλη (Πειπτόνη)	17,58	0,02	Παρούσα μελέτη
<i>C. curvatus</i> NRRL Y-1511	Αναδεδυόμενες φιάλες	Ακάθαρτη γλυκερόλη (Καμία επ. πηγή αζώτου)	7,46	0,11	Παρούσα μελέτη

Τα αποτελέσματα των δύο ζυμώσεων που πραγματοποιήθηκαν για το στέλεχος *R. toruloides* NRRL Y-6984 δεν έχουν μεγάλες διαφορές μεταξύ τους. Συγκεκριμένα, στην περίπτωση με πηγή αζώτου την πειπτόνη, η μέγιστη τιμή της βιομάζας ήταν 16,4 g/L ενώ στην περίπτωση όπου πηγή αζώτου ήταν το νιτρικό κάλιο έφτασε τα 16,2 g/L. Και στις δύο περιπτώσεις η γλυκερόλη είχε καταναλωθεί από τις πρώτες ~168 ώρες. Στο γράφημα που ακολουθεί παρουσιάζονται η μέγιστη βιομάζα και το μέγιστο ενδοκυτταρικό λίπος για τις δύο ζυμώσεις.



Γράφημα 5- 3: Μέγιστη παραγωγή βιομάζας και ενδοκυτταρικού λίπους για τις ζυμώσεις του στελέχους *R. toruloides* NRRL Y-6984 σε γλυκερόλη αρχικής συγκέντρωσης 50 g/L.

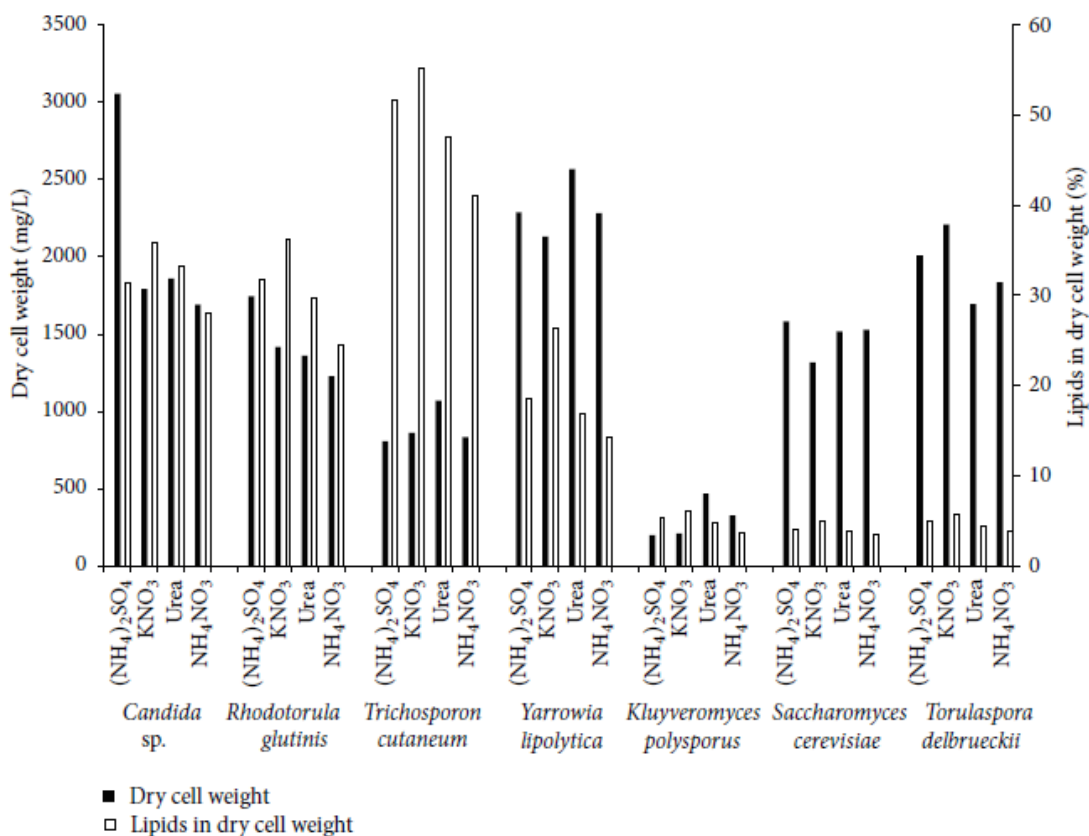
Από το Γράφημα 5-3 φαίνεται ότι το παραγόμενο ενδοκυτταρικό λίπος δεν έχει μεγάλη διαφορά για τις δύο ζυμώσεις. Στην περίπτωση όπου πηγή αζώτου ήταν το νιτρικό κάλιο το λίπος έφτασε τα 3,32 g/L ενώ στην περίπτωση της πειπτόνης ήταν λίγο λιγότερο, ίσο με 3,23 g/L. Παρόλο που δεν έχουν μεγάλη διαφορά μεταξύ τους, ο συντελεστής απόδοσης λίπους προς βιομάζα ήταν μεγαλύτερος για την περίπτωση με πηγή αζώτου το νιτρικό κάλιο (μέγιστη τιμή 0,21 g/g), όπως και για το στέλεχος *C. curvatus* ATCC 20509 (μέγιστη τιμή 0,39 g/g).

Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται αποτελέσματα βιβλιογραφικών μελετών που βασίζονται σε βιοδιεργασίες για τη ζύμη *R. toruloides* σχετικά με την παραγόμενη βιομάζα και τον λόγο του ενδοκυτταρικού λίπους προς την ξηρή βιομάζα (g/g).

Πίνακας 5-3: Σύγκριση αποτελεσμάτων με άλλες μελέτες για τη ζύμη *R. toruloides*.

Στέλεχος	Τύπος ζύμωσης	Υπόστρωμα	X (g/L)	Y _{1/x} (g/g)	Αναφορά
<i>R. toruloides</i> NRRL Y-27012	Αναδευόμενες φιάλες	Ακάθαρτη γλυκερόλη	30,1	0,4	Tchakouteu et al., 2015
<i>R. toruloides</i> AS2.1389	βιο-αντιδραστήρας	Γλυκερόλη	26,7	0,69	Xu et al., 2012
<i>R. toruloides</i> DSM 4444	ημι-συνεχής σε βιο-αντιδραστήρα	Γλυκερόλη	37,4	0,51	Leiva-Candia et al., 2015
<i>R. toruloides</i> Y4	Αναδευόμενες φιάλες	Γλυκόζη	19,4	0,62	Wu et al., 2011
<i>R. toruloides</i> Y4	Αναδευόμενες φιάλες	Ακάθαρτη γλυκερόλη	19,4	0,35	Yang et al., 2014
<i>R. toruloides</i> CBS14	ημι-συνεχής σε βιο-αντιδραστήρα	Γλυκόζη	35	0,71	Wiebe et al., 2012
<i>R. toruloides</i> CBS14	βιο-αντιδραστήρας	Φρουκτόζη	8,7	0,39	Moreton, 1988
<i>R. toruloides</i> NRRL Y-6984	Αναδευόμενες φιάλες	Ακάθαρτη γλυκερόλη (Πεπτόνη)	16,4	0,2	Παρούσα μελέτη
<i>R. toruloides</i> NRRL Y-6984	Αναδευόμενες φιάλες	Ακάθαρτη γλυκερόλη (N. κάλιο)	16,2	0,21	Παρούσα μελέτη

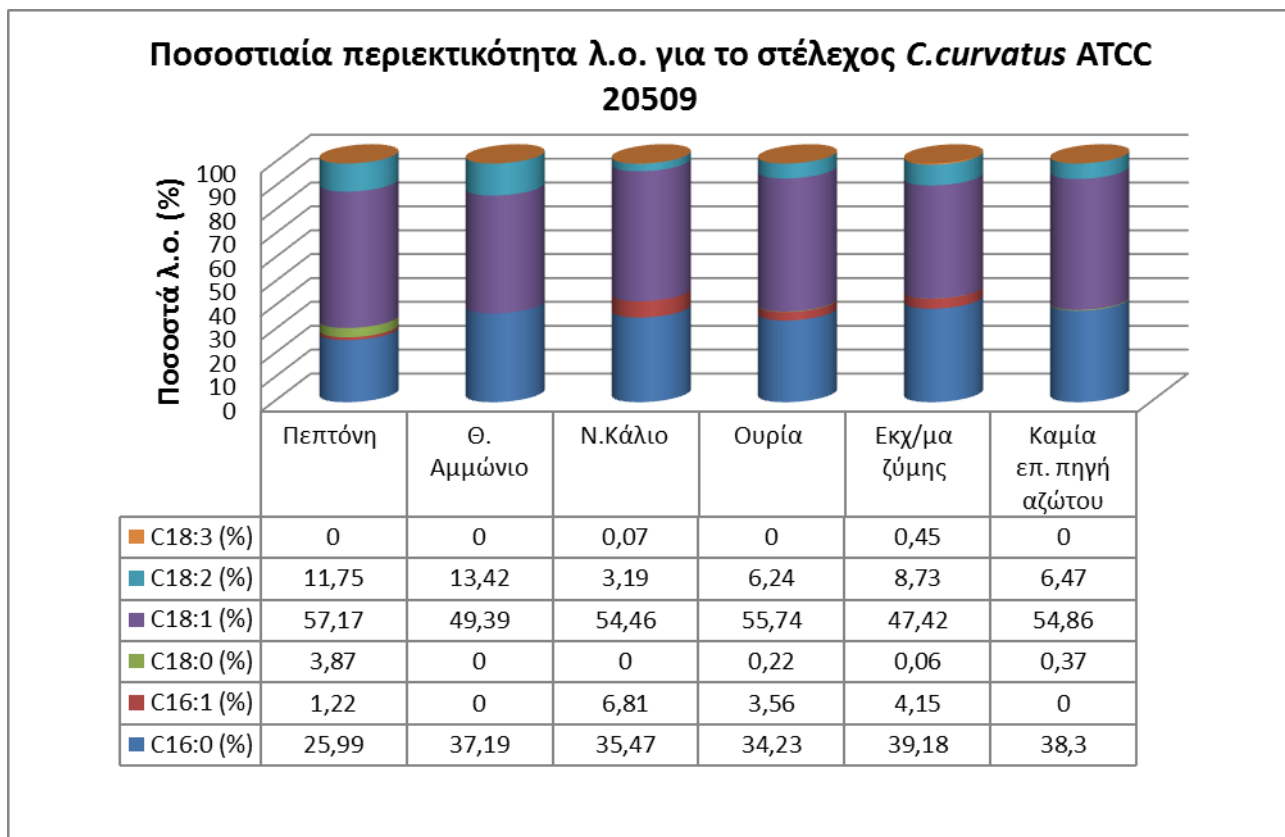
Παρόμοια μελέτη πραγματοποίησε ζυμώσεις για επτά μικροοργανισμούς, τέσσερις ελαιογόνους και τρεις μη ελαιογόνους, με τέσσερις διαφορετικές πηγές αζώτου. Οι πηγές αζώτου ήταν το θειικό αμμώνιο ((NH₄)₂SO₄), το νιτρικό κάλιο (KNO₃), η ουρία και το νιτρικό αμμώνιο ((NH₄)NO₃). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο γράφημα της Εικόνας 5-1 (Kolouchova et al., 2016).



Εικόνα 5-1: Απόδοση ξηρής βιομάζας στο λίτρο (μαύρες ράβδοι) και περιεκτικότητα λιπιδίων στην ξηρή βιομάζα (λευκές ράβδοι) για τα 7 στελέχη ζυμών που καλλιεργήθηκαν σε 4 διαφορετικές πηγές αζώτου (Kolouchova et al., 2016).

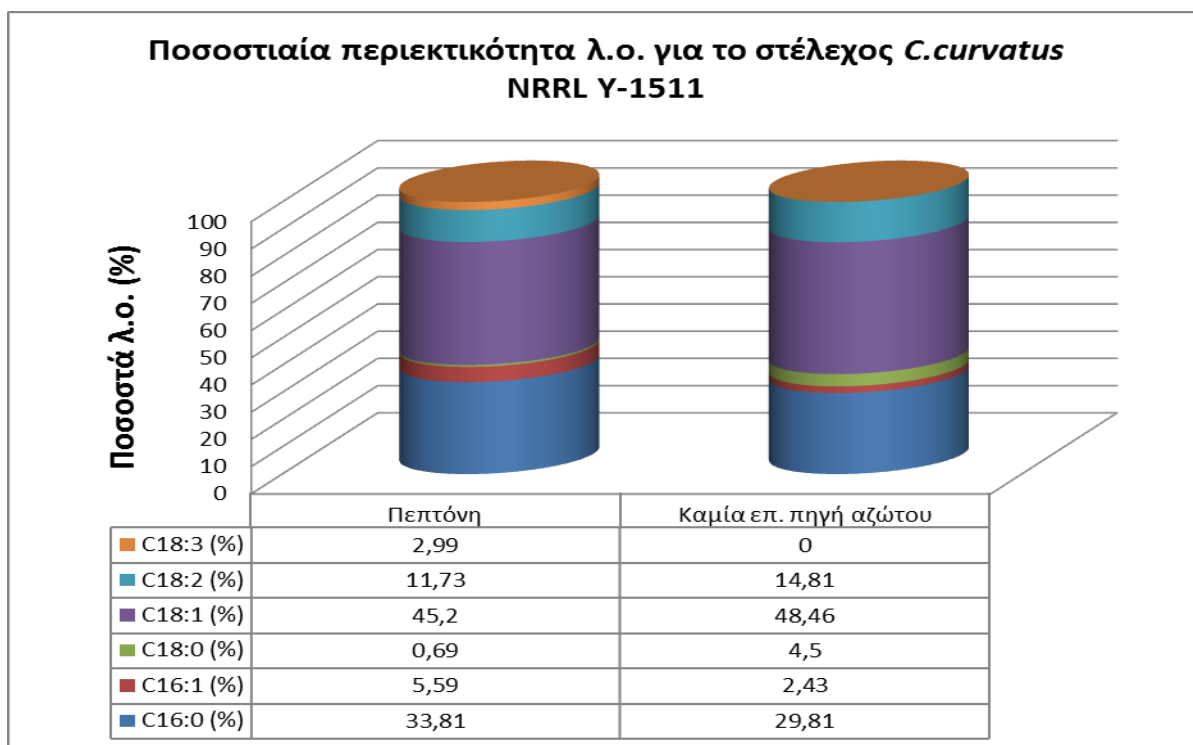
Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης και τις μελέτες που παρουσιάζονται πιο πάνω, συμπεραίνουμε ότι η καλύτερη πηγή αζώτου για συσσώρευση ενδοκυτταρικού λίπους είναι το νιτρικό κάλιο, ακολουθούμενο από την πεπτόνη και το θεικό αμμώνιο τα οποία είναι μια ιδανική πηγή αζώτου που υποστηρίζουν επαρκή ανάπτυξη βιομάζας με ταυτόχρονη αυξημένη λιποσυσσώρευση.

Τα παραγόμενα λιπαρά οξέα, όπως έδειξαν τα αποτελέσματα από όλες τις ζυμώσεις και για τα τρία στελέχη, είχαν ως κυρίαρχο το ελαϊκό οξύ (Δ^9 C18:1), σε ποσοστά από 45,2 - 59,98 % ακολουθούμενο από το παλμιτικό οξύ (C16:0) σε ποσοστά 25,99 - 39,18%. Παρακάτω παρουσιάζονται τα γραφήματα με τα ποσοστά των λιπαρών οξέων για όλες τις ζυμώσεις που πραγματοποιήθηκαν για τους τρεις μικροοργανισμούς.



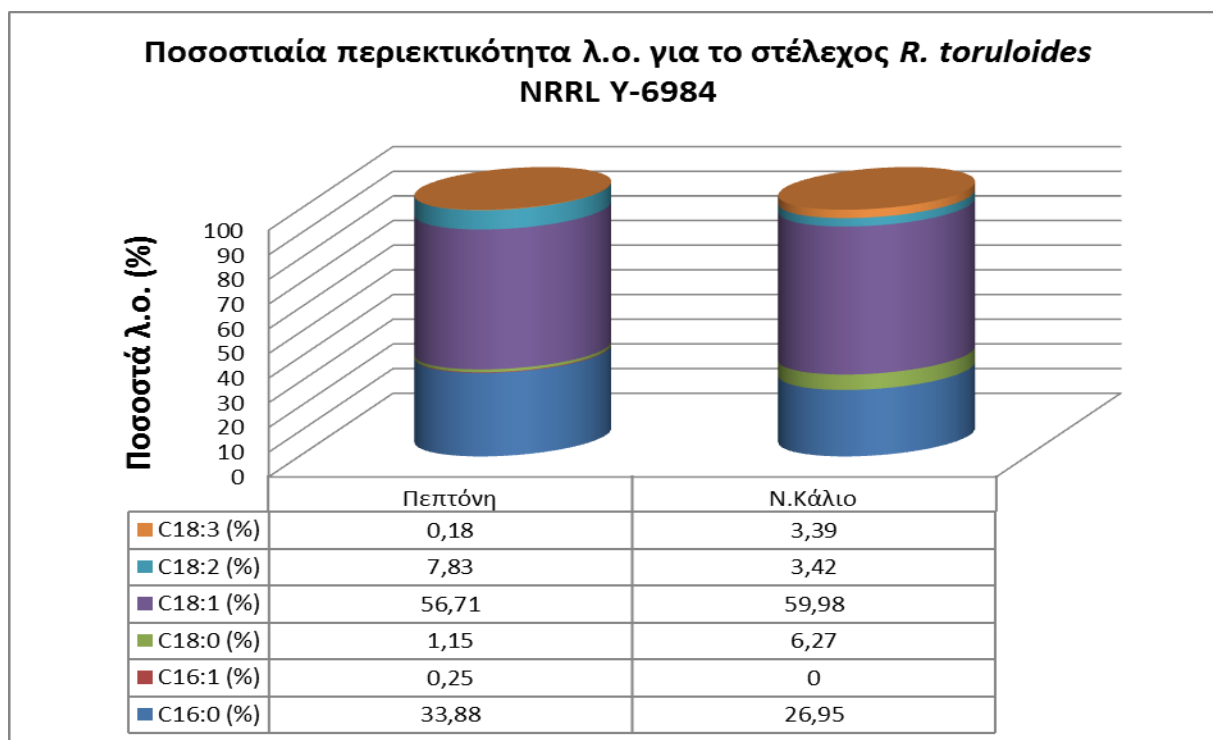
Γράφημα 5- 4: Ποσοστιαία κατανομή των λιπαρών οξέων του στελέχους *C. curvatus* ATCC 20509.

Όπως φαίνεται και από το Γράφημα 5-4, το ελαϊκό οξύ (Δ^9 C18:1) και το παλμτικό οξύ (C16:0) εμφανίζονται με την ίδια ποσοστιαία σειρά σε όλες τις ζυμώσεις. Το λινελαϊκό οξύ ($\Delta^{9,12}$ C18:2) είναι τρίτο σε ποσοστιαία κατανομή, σε ποσοστά 6,24 - 13,42%, εκτός από την περίπτωση με πηγή αζώτου το νιτρικό κάλιο, όπου παράχθηκε περισσότερο το παλμιτελαϊκό οξύ (Δ^9 C16:1) σε ποσοστό 6,81 %. Στις υπόλοιπες ζυμώσεις δεν παράχθηκε καθόλου ή παράχθηκε σε πολύ μικρό ποσοστό. Τέλος, το στεατικό οξύ (C18:0) και το α-λινολενικό οξύ ($\Delta^{9,12,15}$ C18:3) είτε παράχθηκαν σε πολύ μικρό ποσοστό είτε καθόλου σε κάποιες ζυμώσεις.



Γράφημα 5- 5: Ποσοστιαία κατανομή των λιπαρών οξέων του στελέχους *C. curvatus* NRRL Y-1511.

Για το στέλεχος *C. curvatus* NRRL Y-1511 παρατηρούμε ότι τα τρία μεγαλύτερα σε ποσοστιαία κατανομή λιπαρά οξέα, έχουν μικρή διακύμανση μεταξύ των δύο ζυμώσεων. Πιο συγκεκριμένα, το ελαϊκό οξύ (Δ^9 C18:1) είχε 45,2 και 48,46%, το παλμιτικό οξύ (C16:0) 33,81 και 29,81% και το λινελαϊκό οξύ ($\Delta^{9,12}$ C18:2) 11,73 και 14,81%. Στην περίπτωση της πεπτόνης παράχθηκε περισσότερο το παλμιτελαϊκό οξύ (Δ^9 C16:1) σε ποσοστό 5,59% ενώ στην περίπτωση χωρίς επιπλέον πηγή αζώτου παράχθηκε περισσότερο το στεατικό οξύ (C18:0), σε ποσοστό 4,5%. Το α-λινολενικό οξύ ($\Delta^{9,12,15}$ C18:3) στην περίπτωση της πεπτόνης έφτασε σε ποσοστό ίσο με 2,99% ενώ στην άλλη ζύμωση δεν παράχθηκε καθόλου.



Γράφημα 5- 6: Ποσοστιαία κατανομή των λιπαρών οξέων του στελέχους *R. toruloides* NRRL Y-6984.

Τα αποτελέσματα για τις ζυμώσεις του στελέχους *R. toruloides* NRRL Y-6984 ακολουθούν την ίδια σειρά με τα άλλα δύο στελέχη που μελετήθηκαν, με το ελαϊκό οξύ (Δ^9 C18:1) να έρχεται πρώτο, σε ποσοστά 56,71 και 59,98% αντίστοιχα και το παλμιτικό οξύ (C16:0) δεύτερο σε ποσοστά 33,88 και 26,95%. Στην περίπτωση της πεπτόνης παράχθηκε περισσότερο το λινελαϊκό οξύ ($\Delta^{9,12}$ C18:2) σε ποσοστό 7,38%, ενώ στην περίπτωση με πηγή αζώτου το νιτρικό κάλιο παράχθηκε περισσότερο το στεατικό οξύ (C18:0), σε ποσοστό 6,27%. Το παλμιτελαϊκό οξύ (Δ^9 C16:1) στην περίπτωση της πεπτόνης παράχθηκε σε πολύ μικρό ποσοστό, ίσο με 0,25% ενώ στην περίπτωση του νιτρικού καλίου δεν παράχθηκε καθόλου. Τέλος, το α-λινολενικό οξύ ($\Delta^{9,12,15}$ C18:3) στην περίπτωση της πεπτόνης είχε ποσοστό 0,18% ενώ στην περίπτωση του νιτρικού καλίου έφτασε την τιμή 3,39%.

Από τα αποτελέσματα που εξήχθησαν προκύπτει ότι η πηγή αζώτου δεν προκαλεί σημαντική διακύμανση στα ποσοστά των κυρίαρχων λιπαρών οξέων, φαίνεται όμως ότι επηρεάζει τα λιπαρά οξέα που παράγονται σε μικρότερο βαθμό. Προκειμένου να διαπιστωθεί αν κάποια πηγή αζώτου ευνοεί την αύξηση του ποσοστού συγκεκριμένων λιπαρών οξέων, θα πρέπει να γίνουν και άλλες μελέτες για περισσότερα στελέχη μικροοργανισμών.

Τα αποτελέσματα για τους παραγόμενους ενδοπολυσακχαρίτες εκφράστηκαν με την μορφή συντελεστή απόδοσης παραγόμενων ενδοπολυσακχαριτών προς παραγόμενη βιομάζα σε g/g. Και για τους τρεις μικροοργανισμούς παρατηρήθηκε

ότι ο συντελεστής αυτός ακολουθεί το ίδιο προφίλ ανεξάρτητα από την πηγή αζώτου, δηλαδή, αποκτά μια μέγιστη τιμή και μετά σταδιακά μειώνεται. Πιο συγκεκριμένα:

- Για το στέλεχος *C. curvatus* ATCC 20509 οι μέγιστες τιμές για όλες τις ζυμώσεις επιτεύχθηκαν από τις πρώτες 47 - 96 ώρες και ήταν από 0,27 g/g όπου ήταν η μέγιστη τιμή για την ζύμωση με θειικό αμμώνιο μέχρι 0,44 g/g όπου ήταν η μέγιστη τιμή για την περίπτωση της ουρίας. Σταδιακά άρχισαν να μειώνονται μέχρι και το τέλος της ζύμωσης, όπου όλες οι ζυμώσεις σε αυτό το σημείο είχαν τον μικρότερο συντελεστή που καταγράφηκε. Την μικρότερη τιμή την είχε η ζύμωση με νιτρικό κάλιο, ίση με 0,08 g/g και την μεγαλύτερη η ζύμωση με την ουρία, ίση με 0,32 g/g. Όπως παρατηρείται και από το Διάγραμμα 4-7, η ζύμωση με πηγή αζώτου την ουρία άργησε να φτάσει το μέγιστο σημείο για το συντελεστή απόδοσης (το οποίο ήταν και το μεγαλύτερο από όλες τις ζυμώσεις), όμως στο τέλος της ζύμωσης οι περιεκτικότητες των ενδοπολυσακχαριτών ήταν μεγαλύτερη από την μέγιστη τιμή που έφτασε η ζύμωση με πηγή αζώτου το θειικό αμμώνιο.
- Για το στέλεχος *C. curvatus* NRRL Y-1511 ο συντελεστής απόδοσης δεν ακολούθησε το ίδιο προφίλ με το στέλεχος *C. curvatus* ATCC 20509. Και στις δύο ζυμώσεις έφτασε μία τιμή ίση με 0,13 g/g στις πρώτες ~65 ώρες και την διατήρησε μέχρι και τις ~162 ώρες. Στην συνέχεια αυξάνεται ελαφρώς μέχρι την τιμή 0,14 g/g για την περίπτωση με την πειπτόνη και 0,16 g/g για την περίπτωση χωρίς επιπλέον πηγή αζώτου, και στη συνέχεια μειώνεται σταδιακά μέχρι τη τιμή 0,12 g/g για την πρώτη περίπτωση και 0,13 g/g για την περίπτωση χωρίς επιπλέον πηγή αζώτου.
- Για το στέλεχος *R. toruloides* NRRL Y-6984 ο συντελεστής απόδοσης και στις δύο ζυμώσεις είχε το ίδιο προφίλ και σχεδόν ίδιες τιμές σε όλη τη διάρκεια των ζυμώσεων. Πιο συγκεκριμένα, φτάνει την μέγιστη τιμή του στις ~48 πρώτες ώρες, ίση με 0,31 g/g και στις δύο ζυμώσεις και στην συνέχεια μειώνεται σταδιακά μέχρι την τιμή 0,16 g/g για την περίπτωση με την πειπτόνη και 0,14 g/g για την περίπτωση με το νιτρικό κάλιο.

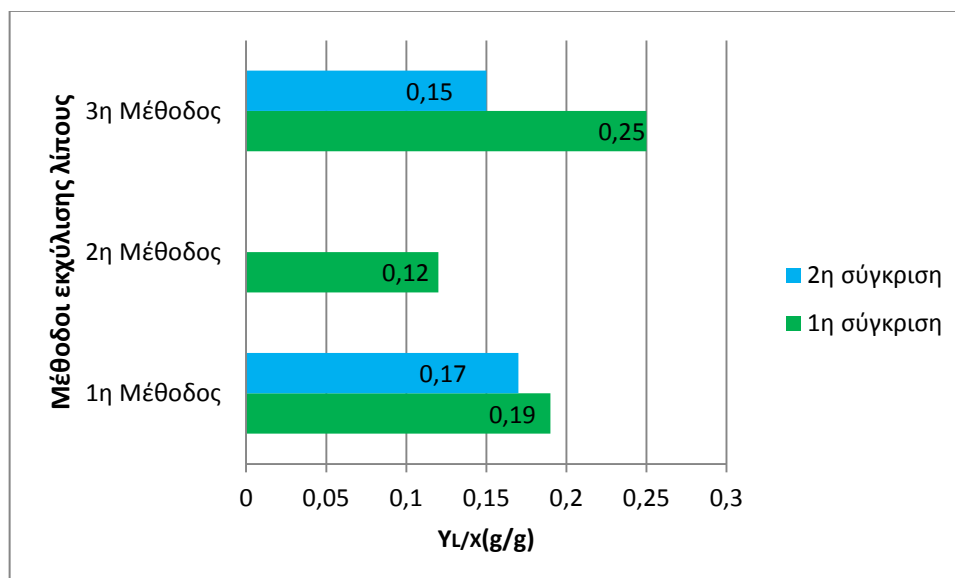
Σύμφωνα με την βιβλιογραφία (Paranikolaou & Aggelis, 2011), η βιοσύνθεση των ενδοπολυσακχαριτών πραγματοποιείται κατά τη στάσιμη φάση ανάπτυξης. Θεωρητικά ενεργοποιείται μόλις ελαττωθεί το άζωτο από το θρεπτικό μέσο της καλλιέργειας, το οποίο οδηγεί σε μείωση της συγκέντρωσης του AMP (μονοφωσφορική αδενοσίνη). Η ελάττωση του AMP οδηγεί στην αναστολή της δράσης της 6 PFK (6 φωσφορική φρουκτοκινάση), το οποίο μπορεί να έχει σαν αποτέλεσμα την συσσώρευση ενδοπολυσακχαριτών (Paranikolaou & Aggelis, 2011). Η σταδιακή μείωση της συγκέντρωσης των ενδοπολυσακχαριτών μπορεί να

υποδηλώνει ότι το κύτταρο τους χρησιμοποιεί ως αποθησαυριστική ουσία για να καλύψει διάφορες ενεργειακές ανάγκες.

Τελευταίο αντικείμενο της παρούσας μελέτης ήταν η σύγκριση τριών διαφορετικών μεθόδων εκχύλισης λίπους. Οι τρεις αυτοί μέθοδοι ήταν:

- 1) 1^η μέθοδος: σκέτο αντιδραστήριο Folch.
- 2) 2^η μέθοδος: HCL/Folch.
- 3) 3^η μέθοδος: αντιδραστήριο Folch και βρασμός σε μανδύα για 1 ώρα.

Η σύγκρισή τους έγινε με βάση τον συντελεστή του παραγόμενου ενδοκυτταρικού λίπους προς την παραγόμενη βιομάζα (g/g). Αρχικά συγκρίθηκαν και οι τρεις μέθοδοι και έπειτα συγκρίθηκαν εκ νέου η 1^η και η 3^η μέθοδος που έδωσαν τα μεγαλύτερα αποτελέσματα. Στο παρακάτω γράφημα παρουσιάζονται οι μέσοι όροι από τις τρεις εκχυλίσεις που έγιναν με κάθε μέθοδο σε κάθε μία σύγκριση.



Γράφημα 5- 7: Σύγκριση μεθόδων εκχύλισης ενδοκυτταρικού λίπους.

Όπως φαίνεται και στο παραπάνω γράφημα, η δεύτερη μέθοδος ήταν αυτή που έδωσε το μικρότερο αποτέλεσμα. Από την 1^η και 3^η μέθοδο που ξανά-συγκρίθηκαν διαπιστώθηκε ότι τα αποτελέσματα της 1^{ης} μεθόδου ήταν πιο κοντά μεταξύ τους, ενώ τα αποτελέσματα της 3^{ης} είχαν μεγάλη διαφορά. Αυτή η διαφορά δείχνει πως υπάρχει αδυναμία στην μέθοδο αυτή να εξάγει όμοια αποτελέσματα και όχι στο ότι μπορεί στην δεύτερη σύγκριση ο μικροοργανισμός να παρήγαγε λιγότερο λίπος, καθώς σε όλες τις μεθόδους χρησιμοποιήθηκε η ίδια βιομάζα, επομένως όπως στην 1^η μέθοδο ταιριάζουν τα αποτελέσματα, με τον ίδιο τρόπο θα έπρεπε να

ταιριάζουν και τα αποτελέσματα της 3^{ης} μεθόδου. Για το λόγο αυτό επιλέχθηκε η 1^η μέθοδος ως πιο αξιόπιστη και σταθερή στα αποτελέσματά της.

5.2 Συμπεράσματα

Συνοψίζοντας τα παραπάνω, προκύπτουν τα εξής συμπεράσματα:

- Το νιτρικό κάλιο είναι η καλύτερη πηγή αζώτου, από αυτές που μελετήθηκαν, για συσσώρευση ενδοκυτταρικού λίπους.
- Η πεπτόνη και το θειικό αμμώνιο είναι μια ιδανική πηγή αζώτου που υποστηρίζουν επαρκή ανάπτυξη βιομάζας με ταυτόχρονη αυξημένη λιποσυσσώρευση.
- Η πηγή αζώτου δεν προκαλεί σημαντική διακύμανση στα ποσοστά των κυρίαρχων λιπαρών οξέων, φαίνεται όμως ότι επηρεάζει τα λιπαρά οξέα που παράγονται σε μικρότερο βαθμό.
- Στη ζύμωση με πηγή αζώτου την ουρία παρατηρήθηκε η μεγαλύτερη συσσώρευση ενδοπολυσακχαριτών.
- Η μέθοδος εκχύλισης του ενδοκυτταρικού λίπους η οποία ήταν πιο σταθερή στα αποτελέσματά της με ταυτόχρονα ικανοποιητική απόδοση ήταν η μέθοδος με το αντιδραστήριο Folch.

Τα συμπεράσματα της παρούσας μελέτης, που παρατίθενται και αναλύονται παραπάνω, αποδεικνύουν ότι η πηγή αζώτου ασκεί επίδραση στην παραγωγή βιομάζας και δευτερογενών μεταβολιτών (μικροβιακού λίπους και ενδοπολυσακχαριτών). Για να μπορέσει όμως να διευκρινιστεί ποια πηγή αζώτου βοηθάει στην παραγωγή συγκεκριμένων μεταβολιτών, θα πρέπει να πραγματοποιηθούν περισσότερες μελέτες και για διαφορετικούς μικροοργανισμούς.

Βιβλιογραφικές Αναφορές

ADRIO, José L. Oleaginous yeasts: promising platforms for the production of oleochemicals and biofuels. *Biotechnology and bioengineering*, 2017, 114.9: 1915-1920.

AWAD, Dania, et al. Multi-factorial-guided media optimization for enhanced biomass and lipid formation by the oleaginous yeast *Cutaneotrichosporon oleaginosus*. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 2019, 7: 54.

AYOUB, Muhammad; ABDULLAH, Ahmad Zuhairi. Critical review on the current scenario and significance of crude glycerol resulting from biodiesel industry towards more sustainable renewable energy industry. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2012, 16.5: 2671-2686.

BEOPOULOS, Athanasios; NICAUD, Jean-Marc; GAILLARDIN, Claude. An overview of lipid metabolism in yeasts and its impact on biotechnological processes. *Applied microbiology and biotechnology*, 2011, 90.4: 1193-1206.

BROCK, Thomas Dale, et al. *Brock biology of microorganisms*. Upper Saddle River (NJ): Prentice-Hall, 2003.

CUI, Yi; BLACKBURN, James W.; LIANG, Yanna. Fermentation optimization for the production of lipid by *Cryptococcus curvatus*: use of response surface methodology. *biomass and bioenergy*, 2012, 47: 410-417.

DEMAIN, A. L.; PHAFF, H. J.; KURTZMAN, C. P. The industrial and agricultural significance of yeasts. In: *The Yeasts*. Elsevier, 1998. p. 13-19.

DYAL, Sandra D.; NARINE, Suresh S. Implications for the use of *Mortierella* fungi in the industrial production of essential fatty acids. *Food Research International*, 2005, 38.4: 445-467.

ELEONORA, Carota, et al. A sustainable use of Ricotta Cheese Whey for microbial biodiesel production. 2017.

FARSALINOS, Konstantinos E., et al. *Analytical assessment of e-cigarettes: From contents to chemical and particle exposure profiles*. Elsevier, 2016, 75-122.

HAMMOND, E. G., et al. Oil production by *Candida curvata* and extraction, composition and properties of the oil. *AOCS Monogr.:(United States)*, 1981, 9.

HARDE, S. M., et al. Microbial lipid production from SPORL-pretreated Douglas fir by *Mortierella isabellina*. *Fuel*, 2016, 175: 64-74.

HASSAN, M., et al. Selection of fatty acid auxotrophs from the oleaginous yeast *Cryptococcus curvatus* and production of cocoa butter equivalents in batch culture. *Biotechnology letters*, 1994, 16.8: 819-824.

KOLOUCHOVÁ, I., et al. Production of palmitoleic and linoleic acid in oleaginous and nonoleaginous yeast biomass. *International Journal of Analytical Chemistry*, 2016.

LEIVA-CANDIA, D. E., et al. Biorefining of by-product streams from sunflower-based biodiesel production plants for integrated synthesis of microbial oil and value-added co-products. *Bioresource Technology*, 2015, 190: 57-65.

LEIVA-CANDIA, D. E. Agro-industrial waste used as substrate to produce microbial oil by yeast fermentation. *TITULO: Second generation biofuels from microbial oil*, 2014, 159.

LIU, J., et al. Bioconversion of mixed volatile fatty acids into microbial lipids by *Cryptococcus curvatus* ATCC 20509. *Bioresource technology*, 2017, 241: 645-651.

LÓPEZ, J. A. S., et al. Anaerobic digestion of glycerol derived from biodiesel manufacturing. *Bioresource technology*, 2009, 100.23: 5609-5615.

MA, Fangrui; HANNA, M. A. Biodiesel production: a review. *Bioresource technology*, 1999, 70.1: 1-15.

MEESTERS, P. A. E. P.; HUIJBERTS, G. N. M.; EGGINK, G. High-cell-density cultivation of the lipid accumulating yeast *Cryptococcus curvatus* using glycerol as a carbon source. *Applied microbiology and biotechnology*, 1996, 45.5: 575-579.

MOON, N. J.; HAMMOND, E. G. Oil production by fermentation of lactose and the effect of temperature on the fatty acid composition¹. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 1978, 55.10: 683-688.

MORETON, R. S. Physiology of lipid accumulating yeasts. *Single cell oil*, 1988, 1-32.

- MUNIRAJ, I. K., et al. Microbial lipid production from renewable and waste materials for second-generation biodiesel feedstock. *Environmental Technology Reviews*, 2015, 4.1: 1-16.
- OOI, T. L., et al. Crude glycerine recovery from glycerol residue waste from a palm kernel oil methyl ester plant. *Journal of Oil Palm Research*, 2001, 13.2: 16-22.
- PAGLIARO, Mario, et al. From glycerol to value-added products. *Angewandte Chemie International Edition*, 2007, 46.24: 4434-4440.
- PAPANIKOLAOU, S., et al. Kinetic profile of the cellular lipid composition in an oleaginous *Yarrowia lipolytica* capable of producing a cocoa-butter substitute from industrial fats. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2001, 80.3-4: 215-224.
- PAPANIKOLAOU, S.; AGGELIS, G. Biotechnological valorization of biodiesel derived glycerol waste through production of single cell oil and citric acid by *Yarrowia lipolytica*. *Lipid technology*, 2009, 21.4: 83-87.
- PAPANIKOLAOU, S.; AGGELIS, G. Lipids of oleaginous yeasts. Part I: Biochemistry of single cell oil production. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 2011, 113.8: 1031-1051.
- PAPANIKOLAOU, S.; KOMAITIS, M.; AGGELIS, G. Single cell oil (SCO) production by *Mortierella isabellina* grown on high-sugar content media. *Bioresource Technology*, 2004, 95.3: 287-291.
- PASSOTH, V. Lipids of yeasts and filamentous fungi and their importance for biotechnology. In: *Biotechnology of yeasts and filamentous fungi*. Springer, Cham, 2017. p. 149-204.
- PROBST, K. V., et al. Oleaginous yeast: a value-added platform for renewable oils. *Critical reviews in biotechnology*, 2016, 36.5: 942-955.
- RATLEDGE, C. Fatty acid biosynthesis in microorganisms being used for single cell oil production. *Biochimie*, 2004, 86.11: 807-815.
- RATLEDGE, C. Microorganisms for lipids. *Acta Biotechnologica*, 1991, 11.5: 429-438.
- RATLEDGE, C.; COHEN, Z. Microbial and algal oils: do they have a future for biodiesel or as commodity oils?. *Lipid Technology*, 2008, 20.7: 155-160.
- SATYANARAYANA, T.; KUNZE, Gotthard (ed.). *Yeast biotechnology: diversity and applications*. Dordrecht: Springer, 2009, vii-ix

SHEEHAN, J., et al. *Life cycle inventory of biodiesel and petroleum diesel for use in an urban bus*. National Renewable Energy Lab.(NREL), Golden, CO (United States), 1998.

SPIER, F.; BUFFON, J. G.; BURKERT, C.A.V. Bioconversion of raw glycerol generated from the synthesis of biodiesel by different oleaginous yeasts: lipid content and fatty acid profile of biomass. *Indian journal of microbiology*, 2015, 55.4: 415-422.

STIDHAM, William D.; SEAMAN, Donald W.; DANZER, Myron F. *Method for preparing a lower alkyl ester product from vegetable oil*. U.S. Patent No 6,127,560, 2000.

TAN, H. W.; AZIZ, AR Abdul; AROUA, M. K. Glycerol production and its applications as a raw material: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2013, 27: 118-127.

TCHAKOUTEU, S. S., et al. Lipid production by yeasts growing on biodiesel-derived crude glycerol: strain selection and impact of substrate concentration on the fermentation efficiency. *Journal of Applied Microbiology*, 2015, 118.4: 911-927.

TCHAKOUTEU, S. S., et al. Oleaginous yeast *Cryptococcus curvatus* exhibits interplay between biosynthesis of intracellular sugars and lipids. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 2015, 117.5: 657-672.

VAN GERPEN, Jon. Biodiesel processing and production. *Fuel processing technology*, 2005, 86.10: 1097-1107.

WEN, Z.; PYLE, D. J.; ATHALYE, S. K. Glycerol waste from biodiesel manufacturing. *Microbial conversions of raw glycerol*, 2009, 1-7.

WIEBE, Marilyn G., et al. Lipid production in batch and fed-batch cultures of *Rhodospiridium toruloides* from 5 and 6 carbon carbohydrates. *BMC biotechnology*, 2012, 12.1: 26.

WU, Siguo, et al. Microbial lipid production by *Rhodospiridium toruloides* under sulfate-limited conditions. *Bioresource technology*, 2011, 102.2: 1803-1807.

XU, Jingyang, et al. Exploration of sodium lignosulphonate's effects on lipid production by *Rhodospiridium toruloides*. *Process Biochemistry*, 2015, 50.3: 424-431.

XU, Jingyang, et al. Microbial conversion of biodiesel byproduct glycerol to triacylglycerols by oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides* and the individual effect of some impurities on lipid production. *Biochemical engineering journal*, 2012, 65: 30-36.

YANG, Xiaobing, et al. Recycling biodiesel-derived glycerol by the oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides* Y4 through the two-stage lipid production process. *Biochemical engineering journal*, 2014, 91: 86-91.

YU, Xiaochen, et al. Co-utilization of glucose, xylose and cellobiose by the oleaginous yeast *Cryptococcus curvatus*. *Biomass and bioenergy*, 2014, 71: 340-349.

ZHU, Zhiwei, et al. A multi-omic map of the lipid-producing yeast *Rhodospiridium toruloides*. *Nature communications*, 2012, 3.1: 1-12.

ΔΙΑΜΑΝΤΙΔΗΣ, Γρηγόριος. *Εισαγωγή στη βιοχημεία*. University Studio Press, Θεσσαλονίκη, 2007.

ΨΑΡΙΑΝΟΣ, Δημήτριος Μ. Παραγωγή κυτταρικής μάζας και μικροβιακών λιπιδίων κατά την αύξηση του μικροοργανισμού *Cryptococcus curvatus* σε υποστρώματα με βάση την ξυλόζη. 2015.