



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

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΤΡΟΦΙΜΑ, ΔΙΑΤΡΟΦΗ ΚΑΙ ΥΓΕΙΑ**

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

Παραγωγή μεταβολικών προϊόντων κατά την αύξηση στελεχών ζυμών
του είδους *Rhodosporidium toruloides* στην ακάθαρτη γλυκερόλη

Βασίλειος Η. Αναστασόπουλος

Επιβλέπων καθηγητής:

Σεραφείμ Παπανικολάου, Καθηγητής ΓΠΑ

**ΑΘΗΝΑ
2022**

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

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

Παραγωγή μεταβολικών προϊόντων κατά την αύξηση στελεχών ζυμών
του είδους *Rhodosporidium toruloides* στην ακάθαρτη γλυκερόλη

Production of metabolic compounds by strains of *Rhodosporidium toruloides*
during their growth in crude glycerol.

Βασίλειος Η. Αναστασόπουλος

Εξεταστική επιτροπή:

Σεραφείμ Παπανικολάου, Καθηγητής ΓΠΑ (επιβλέπων)

Απόστολος Κουτίνας, Αναπληρωτής Καθηγητής ΓΠΑ

Ελευθέριος Δροσινός, Καθηγητής ΓΠΑ

Παραγωγή μεταβολικών προϊόντων κατά την αύξηση στελεχών ζυμών του είδους *Rhodosporidium toruloides* στην ακάθαρτη γλυκερόλη.

ΠΜΣ Τρόφιμα, Διατροφή και Υγεία

Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων & Διατροφής του Ανθρώπου

Εργαστήριο Μικροβιολογίας & Βιοτεχνολογίας Τροφίμων

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός της παρούσας πτυχιακής εργασίας είναι η μελέτη της φυσιολογικής συμπεριφοράς στελεχών της ελαιογόνου ζύμης *Rhodosporidium toruloides* (στελέχη NRRL Y-27010, Y-6985 και Y-17902), κατά την αύξησή τους σε υποστρώματα τα οποία περιείχαν ως πηγή άνθρακα τη βιομηχανική γλυκερόλη, η οποία είναι το κύριο υπόλειμμα της διεργασίας παραγωγής βιοντήζελ (βιολογικού πετρελαίου). Πιο συγκεκριμένα, μελετήθηκε η παραγωγή βιομάζας, ενδοπολυσακχαριτών και λιπιδίων καθώς και η επίδραση της συγκέντρωσης της γλυκερόλης στην φυσιολογική και κινητική συμπεριφορά στελεχών της ζύμης αυτής (μικροβιακή ανάπτυξη, παραγωγή λιπιδίων, σύσταση λιπιδίων και παραγωγή ενδοπολυσακχαριτών, σύσταση των λιπαρών οξέων).

Όλες οι ζυμώσεις εμπεριείχαν σαν μοναδική πηγή άνθρακα την βιομηχανική γλυκερόλη και έλαβαν χώρα σε περιοριστικές σε άζωτο συνθήκες. Πραγματοποιήθηκαν ζυμώσεις βυθού σε κωνικές φιάλες Erlenmeyer των 250 mL πεπληρωμένες κατά το 1/5 τους, με αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης 50 g/L, 90 g/L και 110 g/L. Οι συνθήκες όλων των ζυμώσεων ήταν pH=6,0±0,2, σε σταθερές συνθήκες ανάδευσης 180±5 rpm και θερμοκρασίας στους 28±1 °C. Ως πηγές αζώτου χρησιμοποιήθηκαν πεπτόνη σε αρχική συγκέντρωση 1,0 g/L και το εκχύλισμα ζύμης (yeast extract) σε αρχική συγκέντρωση 2,0 g/L. Συνεπώς, μελετήθηκε η επίδραση τόσο της αρχικής συγκέντρωσης γλυκερόλης όσο και του αρχικού λόγου C/N (ο οποίος αυξανόταν με την αύξηση της συγκέντρωσης γλυκερόλης) στη φυσιολογική συμπεριφορά των χρησιμοποιούμενων στελεχών.

Στο σύνολο των ζυμώσεων πραγματοποιήθηκε ποσοτικός προσδιορισμός της παραγόμενης βιομάζας, ποσοτικός προσδιορισμός ενδοκυτταρικού λίπους, ποσοτικός προσδιορισμός των παραγόμενων ενδοκυτταρικών πολυσακχαριτών, προσδιορισμός της κατανάλωσης υποστρώματος (βιομηχανική γλυκερόλη), μεθυλεστεροποίηση των παραγόμενων λιπαρών οξέων καθώς και ποιοτικός/ημιποσοτικός προσδιορισμός αυτών.

Στις πραγματοποιηθείσες ζυμώσεις, η μέγιστη τιμή συνολικής βιομάζας (29,28 g/L) παρατηρήθηκε από το στέλεχος NRRL Y-27010 στην ζύμωση με αρχική συγκέντρωση υποστρώματος 110 g/L, ενώ η μέγιστη παραγωγή λίπους παρατηρήθηκε από το ίδιο στέλεχος (NRRL Y-27010) και έφθασε τα 12,59 g/L. Στην ζύμωση με αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης 50 g/L, η μέγιστη τιμή βιομάζας (19,06 g/L) και λίπους (8,91 g/L) παρατηρήθηκε από το στέλεχος NRRL Y-17902. Τέλος, στην ζύμωση με αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης 90 g/L, η μέγιστη τιμή της βιομάζας (24,44 g/L) παρατηρήθηκε από το στέλεχος NRRL Y-6985, ενώ η μέγιστη παραγωγή λίπους παρατηρήθηκε από το στέλεχος NRRL Y-17902 και έφθασε τα 11,57 g/L. Τόσο η παραγωγή λιπιδίων όσο και η παραγωγή ενδοπολυσακχαριτών εποί ξηράς μικροβιακής μάζας αυξανόταν προϊούσης της ζύμωσης.

Με την βοήθεια της αέριας χρωματογραφίας βρέθηκε ότι το μικροβιακό λίπος που παράχθηκε από όλα τα στελέχη αποτελούσαν από τα ακόλουθα λιπαρά οξέα: Μυριστικό οξύ (C14:0), παλμιτικό οξύ (C16:0), παλμιτελαϊκό οξύ (C16:1), στεατικό οξύ (C18:0), ελαϊκό οξύ (^{Δ9}C18:1), λινελαϊκό οξύ

($\Delta^{9,12}\text{C18:2}$) και α-λινολενικό οξύ ($\Delta^{9,12,15}\text{C18:3}$), με κυρίαρχο λιπαρό οξύ σε όλες τις ζυμώσεις να αποτελεί το ελαϊκό οξύ($\Delta^9\text{C18:1}$).

Επιστημονική περιοχή: Αξιοποίηση βιομηχανικής γλυκερόλης

Λέξεις -κλειδιά: *Rhodosporidium toruloides*, Γλυκερόλη, Ελαιογόνες ζύμες, Μικροβιακά λίπη

Production of metabolic compounds by strains of *Rhodospiridium toruloides* during their growth in crude glycerol.

MSc Food, Nutrition & Health

Department of Food Science & Human Nutrition

Laboratory of Food Microbiology & Biotechnology

ABSTRACT

The aim of the present investigation was the study of the physiological behavior of strains of the oleaginous yeast species *Rhodospiridium toruloides*, namely NRRL Y-27010, NRRL Y-6985 and NRRL Y-17902, during batch-flask submerged cultures on biodiesel-derive glycerol employed as carbon source. In all cases, the production of total biomass, total cellular lipids and total cellular polysaccharides was assessed, whereas the effect of the initial concentration of the carbon source (glycerol) upon the composition of the cellular fatty acids, which constitute the precursor stage for the production of the second generation biodiesel, was also monitored.

The experiments were carried out by using industrial glycerol as carbon source and under nitrogen limiting conditions, employed to boost the production of storage compounds (viz. lipids and polysaccharides). Therefore, submerged fermentations were conducted in Erlenmeyer flasks of 250 mL filled with the $\frac{1}{5}$ of their volume, using Crude glycerol as a carbon source at initial concentrations ranging between 50 and 110 g/L with all other culture parameters (agitation, salt composition, initial nitrogen concentration, inoculum size, etc) remaining constant. The conditions of all fermentations were pH=5.5±0.2 under constant stirring conditions 180±5 rpm and temperature at 28±1 °C. Peptone at 1.0 g/L and yeast extract at 2.0 g/L were used as nitrogen sources, therefore besides the initial concentration of glycerol, also the impact of the initial C/N molar ratio (increasing with initial glycerol concentration into the medium) was also quantitatively investigated.

In all the fermentations performed the quantitative determination of the produced biomass, total intracellular lipid, total intracellular polysaccharides, and substrate consumption were assessed, while the fatty acid composition of total cellular lipids produced was also performed.

In the shake-flask trials performed, maximum total biomass value was observed for the strain NRRL Y-27010 (=29.28 g/L) whereas the maximum lipid production was observed for the same strain (Y-27010) (=12.59 g/L). These values were recorded for initial glycerol concentration adjusted to 100 g/L. In fermentation with initial glycerol concentration 50 g/L, the maximum biomass value (19.06 g/L) and lipid (8.91 g/L) were observed for the strain NRRL Y-17902. Finally, in fermentation with initial glycerol concentration 90 g/L, the maximum biomass value (24.44 g/L) was observed by the strain NRRL Y-6985, while the maximum fat production was observed by the strain NRRL Y-17902 and reached 11.57 g/L. For all strains and all initial concentrations of glycerol, values of lipid in DCW and polysaccharides in DCW increased with the time.

For all strains, the following cellular fatty acids were identified and quantified: palmitic acid (C16:0), 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) with the dominant fatty acid in all the fermentations being oleic acid (Δ^9 C18:1).

Scientific area: Utilization of crude glycerol

Keywords: *Rhodospiridium toruloides*, glycerol, microbial lipid, oleaginous yeast

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Σε αυτό το σημείο είναι σημαντικό για έμένα να εκφράσω ένα μεγάλο ευχαριστώ στους ανθρώπους που με βοήθησαν να ολοκληρώσω την μεταπτυχιακή διπλωματική εργασία. Αρχικά, ευχαριστώ θερμά τον κ. Σεραφείμ Παπανικολάου για τη συνεργασία, για την κατεύθυνση καθώς και για την υποστήριξη του καθ' όλη τη διάρκεια της πτυχιακής μελέτης μου.

Ακόμα, η υποψήφια διδάκτορα Σαββούλα Μίχου με την αποτελεσματική καθοδήγηση και συνεργασία της, αποτέλεσε σημαντικός παράγοντας αφού χωρίς την πολύτιμη βοήθεια της η πραγματοποίηση της παρούσας μελέτης δεν θα μπορούσε να ολοκληρωθεί.

Τέλος, είμαι ευγνώμων για την υπομονή και την συμπαράσταση που έλαβα όλη αυτή την περίοδο από το οικογενειακό μου περιβάλλον και τους φίλους μου.

«Με την άδειά μου, η παρούσα εργασία ελέγχθηκε από την Εξεταστική Επιτροπή μέσα από λογισμικό ανίχνευσης λογοκλοπής που διαθέτει το ΓΠΑ και διασταυρώθηκε η εγκυρότητα και η πρωτοτυπία της»

Περιεχόμενα

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	3
ABSTRACT.....	5
1: Εισαγωγή.....	12
1.1: Βιοντίζελ	12
1.2: Γλυκερόλη	15
1.3: Ελαιογόνοι μικροοργανισμοί - <i>Rhodospiridium toruloides</i>	16
1.4: Μικροβιακά Λιπίδια.....	19
1.5: Βιοσυσσώρευση λίπους.....	21
1.6: Ενδοπολυσακχαρίτες.....	24
1.7: Βιοσυσσώρευση ενδοπολυσακχαρίτων.....	25
1.8: Σκοπός Ερευνητικής μελέτης	27
2: Υλικά και μέθοδοι.....	29
2.1: Βιολογικό υλικό.....	29
2.2: Θρεπτικά υποστρώματα	29
2.2.1: Παρασκευή προκαλλιέργειας.....	29
2.2.2: Παρασκευή κυρίως καλλιέργειας.....	29
2.3: Αναλύσεις.....	30
2.3.1: Προσδιορισμός βιομάζας.....	30
2.3.2: Προσδιορισμός ενδοπολυσακχαριτών.....	31
2.3.3: Ποσοτικός προσδιορισμός γλυκερόλης.....	31
2.3.4: Ποσοτικός.....	32
2.3.5: Μεθυλεστερποίηση	32
2.3.6: Ανάλυση στον αέριο χρωματογράφο (GC).....	33
3: Αποτελέσματα	35
4: Συζήτηση-Συμπεράσματα	54
5: Βιβλιογραφία.....	65

Κατάλογος εικόνων

Εικόνα 1: Αντίδραση μετεστεροποίησης τριγλυκεριδίων για την παραγωγή μεθυλεστέρων λιπαρών οξέων (biodiesel).....	14
Εικόνα 2: Απεικόνιση της παραγωγής βιοντίζελ και της ακατέργαστης γλυκερόλης.	15
Εικόνα 3: Γενικά χαρακτηριστικά και συντακτικός τύπος της βιομηχανικής γλυκερόλης.	16
Εικόνα 4: Απεικόνιση της ζύμης <i>Rhodosporidium toruloides</i>	18
Εικόνα 5: Απεικόνιση μεταβολικού μοντέλου τριακυλογλυκερόλης που παράγει την ζύμη <i>Rhodosporidium toruloides</i>	19
Εικόνα 6: Η κύρια ακολουθία για την βιοσυσσώρευση των λιπιδίων.	24
Εικόνα 7: Υποθετικό σενάριο διάμεσου μεταβολισμού στα μυκήλια. Απεικονίζεται η πορεία του μεταβολισμού προς τη βιοσύνθεση ενδοπολυσακχαριτών (IPS), τριακυλογλυκερολών (TAGs) και προς τον κύκλο Krebs. PGI: ισομεράση φωσφογλυκόζης, PFK: φωσφοφρουκτοκινάση, ME: NAD	26

Κατάλογος γραφημάτων

Γράφημα 1: Κινητικά δεδομένα για την μεταβολή της βιομάζας, του αρχικού υποστρώματος και την παραγωγή λίπους του μικροοργανισμού <i>Rhodosporidium toruloides</i> NRRL Y-27010 ως προς τον χρόνο, με αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης 50 g/L.	37
Γράφημα 2: Κινητικά δεδομένα για την μεταβολή της βιομάζας, του αρχικού υποστρώματος και την παραγωγή λίπους του <i>Rhodosporidium toruloides</i> NRRL Y-6985 ως προς τον χρόνο, με αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης 50 g/L.....	37
Γράφημα 3: Κινητικά δεδομένα για την μεταβολή της βιομάζας, του αρχικού υποστρώματος και την παραγωγή λίπους του <i>Rhodosporidium toruloides</i> NRRL Y-17902 ως προς τον χρόνο, με αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης 50 g/L.....	38
Γράφημα 4: Παραγωγική καμπύλη των πολυσακχαριτών ως προς την παραχθείσα βιομάζα σε συνάρτηση με τον χρόνο και για τα τρία στελέχη στα 50 g/L γλυκερόλης.	38
Γράφημα 5: Παραγωγική καμπύλη του παραγόμενου λίπους ως προς την παραχθείσα βιομάζα σε συνάρτηση με τον χρόνο για το στέλεχος <i>Rhodosporidium toruloides</i> NRRL Y-6985.	39
Γράφημα 6: Κινητικά δεδομένα για την μεταβολή της βιομάζας, του αρχικού υποστρώματος και την παραγωγή λίπους του <i>Rhodosporidium toruloides</i> NRRL Y 27010 ως προς τον χρόνο, στα 90 g/L γλυκερόλης.	41
Γράφημα 7: Κινητικά δεδομένα για την μεταβολή της βιομάζας, του αρχικού υποστρώματος και την παραγωγή λίπους του <i>Rhodosporidium toruloides</i> NRRL Y 6985 ως προς τον χρόνο, στα 90 g/L γλυκερόλης.	41
Γράφημα 8: Κινητικά δεδομένα για την μεταβολή της βιομάζας, του αρχικού υποστρώματος και την παραγωγή λίπους του <i>Rhodosporidium toruloides</i> NRRL Y 17902 ως προς τον χρόνο, στα 90 g/L γλυκερόλης.	42
Γράφημα 9: Παραγωγική καμπύλη των πολυσακχαριτών ως προς την παραχθείσα βιομάζα σε συνάρτηση με τον χρόνο και για τα τρία στελέχη στα 90 g/L γλυκερόλης.	42
Γράφημα 10: Παραγωγική καμπύλη του παραγόμενου λίπους ως προς την παραχθείσα βιομάζα σε συνάρτηση με τον χρόνο και για τα τρία στελέχη στα 90 g/L γλυκερόλης.....	43
Γράφημα 11: Κινητικά δεδομένα για την μεταβολή της βιομάζας, του αρχικού υποστρώματος και την παραγωγή λίπους του <i>Rhodosporidium toruloides</i> NRRL Y 27010 ως προς τον χρόνο, στα 110 g/L γλυκερόλης.	45
Γράφημα 12: Κινητικά δεδομένα για την μεταβολή της βιομάζας, του αρχικού υποστρώματος και την παραγωγή λίπους του <i>Rhodosporidium toruloides</i> NRRL Y 6985 ως προς τον χρόνο, στα 110 g/L γλυκερόλης.	46

Γράφημα 13: Κινητικά δεδομένα για την μεταβολή της βιομάζας, του αρχικού υποστρώματος και την παραγωγή λίπους του <i>Rhodospiridium toruloides</i> NRRL Y 17902 ως προς τον χρόνο, στα 110 g/L γλυκερόλης.	46
Γράφημα 14: Παραγωγική καμπύλη των πολυσακχαριτών ως προς την παραχθείσα βιομάζα σε συνάρτηση με τον χρόνο και για τα τρία στελέχη στα 110 g/L γλυκερόλης.	47
Γράφημα 15: Παραγωγική καμπύλη παραγόμενου λίπους ως προς την παραχθείσα βιομάζα σε συνάρτηση με τον χρόνο και για τα τρία στελέχη στα 110 g/L γλυκερόλης.	47
Γράφημα 16: Μέγιστο ποσοστό βιομάζας, λίπους και ενδοπολυσακχαριτών κατά την αύξηση των στελεχών του <i>Rhodospiridium toruloides</i> NRRL Y-27010, <i>Rhodospiridium toruloides</i> NRRL Y-6985 και <i>Rhodospiridium toruloides</i> NRRL Y-17902 σε υπόστρωμα γλυκερόλης στα 50 g/L.	60
Γράφημα 17: Μέγιστο ποσοστό βιομάζας, λίπους και ενδοπολυσακχαριτών κατά την αύξηση των στελεχών του <i>Rhodospiridium toruloides</i> NRRL Y-27010, <i>Rhodospiridium toruloides</i> NRRL Y-6985 και <i>Rhodospiridium toruloides</i> NRRL Y-17902 σε υπόστρωμα γλυκερόλης στα 90 g/L.	61
Γράφημα 18: Μέγιστο ποσοστό βιομάζας, λίπους και ενδοπολυσακχαριτών κατά την αύξηση των στελεχών του <i>Rhodospiridium toruloides</i> NRRL Y-27010, <i>Rhodospiridium toruloides</i> NRRL Y-6985 και <i>Rhodospiridium toruloides</i> NRRL Y-17902 σε υπόστρωμα γλυκερόλης στα 110 g/L.	61

Κατάλογος Πινάκων

Πίνακας 1: Σύνθεση λιπαρών οξέων, των λιπιδίων που παράγονται από διάφορα, στελέχη ζυμομυκήτων που αναπτύσσονται σε υποστρώματα σακχάρων σε συνθήκες καλλιέργειας που ευνοούν την συσσώρευση των μικροβιακών λιπιδίων. (Papanikolaou and Aggelis 2011).	21
Πίνακας 2: Στον πίνακα αυτόν παρουσιάζεται η σύσταση μεταλλικών αλάτων (Papanikolaou et al., 2001).	30
Πίνακας 3: Ασυνεχής ζύμωση σε ανακινούμενες κωνικές φιάλες (180±5 grm), T=28±1 °C, αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης 50 g/L, pH=6±0.2 υπό αερόβιες και περιοριστικές σε άζωτο συνθήκες.	36
Πίνακας 4: Ασυνεχής ζύμωση σε ανακινούμενες κωνικές φιάλες (180±5 grm), T=28±1 °C, με συγκέντρωση γλυκερόλης 90 g/L, pH=6±0.2 υπό αερόβιες και περιοριστικές σε άζωτο συνθήκες.	39
Πίνακας 5: Ασυνεχής ζύμωση σε ανακινούμενες κωνικές φιάλες (180±5 grm), T=28±1 °C, με συγκέντρωση γλυκερόλης 110 g/L, pH=6±0.2 υπό αερόβιες και περιοριστικές σε άζωτο συνθήκες.	44
Πίνακας 6: Ασυνεχής ζύμωση σε ανακινούμενες κωνικές φιάλες (180±5 grm), T=28±1 °C, αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης 50 g/L, pH=6,0±0,2 υπό αερόβιες και περιοριστικές σε άζωτο συνθήκες.	48
Πίνακας 7: Ασυνεχής ζύμωση σε ανακινούμενες κωνικές φιάλες (180±5 grm), T=28±1 °C, αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης 90 g/L, pH=6,0±0,2 υπό αερόβιες και περιοριστικές σε άζωτο συνθήκες.	49
Πίνακας 8: Ασυνεχής ζύμωση σε ανακινούμενες κωνικές φιάλες (180±5 grm), T=28±1 °C, αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης 110 g/L, pH=6,0±0,2 υπό αερόβιες και περιοριστικές σε άζωτο συνθήκες.	51
Πίνακας 9: Παραγωγή λιπιδίων και βιομάζας από την ζύμη <i>Rhodospiridium toruloides</i> με μοναδική πηγή άνθρακα την γλυκερόλη προσαρμοσμένο από Diamantopoulou et al., (2020).	55
Πίνακας 10: Παραγωγή λιπιδίων και βιομάζας από την ζύμη <i>Rhodospiridium toruloides</i> σε διαφορετικές πηγές άνθρακα προσαρμοσμένο από Diamantopoulou et al., (2020).	56
Πίνακας 11: Παραγωγή ενδοπολυσακχαριτών σε διαφορετικές πηγές άνθρακα από διαφορετικές ζύμες προσαρμοσμένο από Diamantopoulou et al., (2020).	59

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1ο : Εισαγωγή

1: Εισαγωγή

1.1: Βιοντίζελ

Το βιοντίζελ από χημική άποψη αποτελείται από αλκυλεστέρες καρβοξυλικών οξέων με μακριά ανθρακική αλυσίδα, οι οποίοι παράγονται από την μετεστεροποίηση και /ή εστεροποίηση φυτικών ελαίων και ζωικών λιπών (Sitepu et al., 2014a). Το βιοντίζελ έχει προσελκύσει αυξανόμενο ενδιαφέρον ως εναλλακτική πηγή ενέργειας έναντι των ορυκτών καυσίμων, καθώς είναι ανανεώσιμο και φιλικό προς το περιβάλλον (Leiva-Candia et al., 2014). Τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του είναι όμοια με εκείνα του πετρελαίου κίνησης. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε πετρελαιοκινητήρες, είτε σε μείγμα με το πετρέλαιο κίνησης σε διάφορα ποσοστά, είτε αυτούσιο. Για την χρήση αυτούσιου βιοντίζελ απαιτείται σε ορισμένους πετρελαιοκινητήρες, κυρίως κατασκευασμένους πριν το 1990, μικροαλλαγές, όπως αντικατάσταση ελαστομερών (σωληνάκια κλπ).

Η σχέση μεταξύ του φαινομένου του θερμοκηπίου, που οδηγεί στην υπερθέρμανση του πλανήτη και της καύσης ορυκτών καυσίμων, είναι πλέον αδιαμφισβήτητη. Όλα τα στοιχειωδώς σοβαρά προγνωστικά μοντέλα διαφέρουν μεταξύ τους μόνον ως προς την ταχύτητα εξέλιξης της κλιματικής αλλαγής και επιδείνωσης των κλιματικών συνθηκών. Η χρήση βιοντίζελ στους πετρελαιοκινητήρες έχει σημαντικά περιβαλλοντικά οφέλη, όπως ελάττωση των συνεπειών του φαινομένου του θερμοκηπίου και μείωση των εκπομπών καυσαερίων. Επίσης, συμβάλλει ουσιαστικά στην βελτίωση της ενεργειακής ανεξαρτησίας και την ανάπτυξη της γεωργίας. Διάφορα ερευνητικά προγράμματα της Ευρωπαϊκής Επιτροπής (E.E.), αλλά και έρευνες ανεξάρτητων ιδρυμάτων παγκοσμίως, έχουν καταδείξει ότι η κατανάλωση ενός kg βιοντίζελ σε αντικατάσταση συμβατικού πετρελαίου, έχει σαν συνέπεια την μείωση του διοξειδίου του άνθρακα, (CO₂), κατά τουλάχιστον 1 kg, ενώ στην περίπτωση εξελιγμένων βιοκαυσίμων, όπως το βιοντίζελ από απόβλητα, (τηγανέλαια, ζωικά λίπη), η μείωση ξεπερνάει τα 3 kg. Επιπλέον, το βιοντίζελ έχει σχεδόν μηδενική περιεκτικότητα σε θείο ενώ είναι ταχέως βιοαποικοδομήσιμο. Η εκτεταμένη χρήση βιοντίζελ στην E.E. αποτελεί ένα από τα βασικά μέσα για την επίτευξη των στόχων μείωσης των αερίων του θερμοκηπίου που έχουν συμφωνηθεί με την συνθήκη του Κιότο. Για τον λόγο αυτόν, η E.E. έχει ορίσει δεσμευτικά ποσοστά χρήσης βιοκαυσίμων στα καύσιμα κίνησης στα κράτη – μέλη.

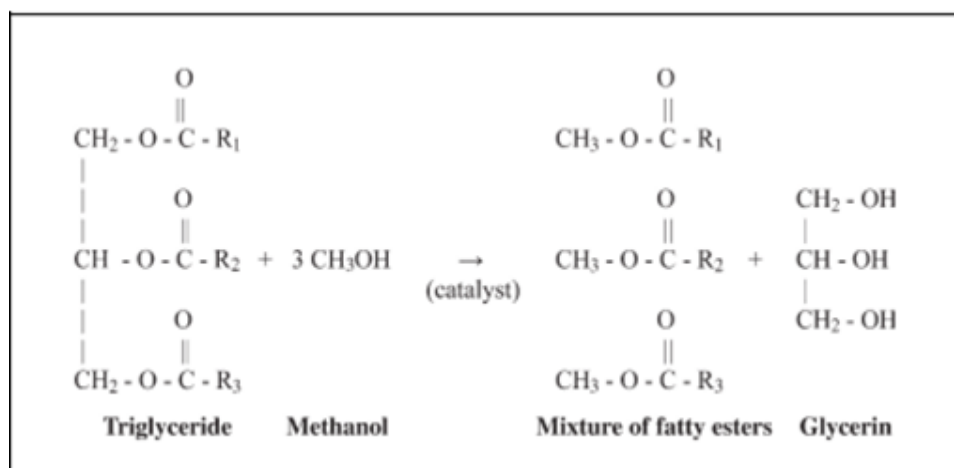
Οι χώρες με την μεγαλύτερη παραγωγή βιοντίζελ είναι οι Η.Π.Α (60 δισεκατομυρία λίτρα), η Βραζιλία (29.9 δισεκατομυρία λίτρα), η Γερμανία (4.3 δισεκατομύρια λίτρα) και η Κίνα (3.9 δισεκατομύρια λίτρα) (Abomohra et al., 2016). Τα τελευταία χρόνια στην Ελλάδα, το βιοντίζελ είναι

προαναμεμειγμένο σε ένα μικρό ποσοστό σε όλες ανεξαιρέτα τις ποσότητες του διατιθέμενου στη χώρα πετρελαίου κίνησης. Οι απαιτούμενες ετήσια ποσότητες προέρχονται κατά προτεραιότητα από ελληνικές ενεργειακές καλλιέργειες και πρώτες ύλες, οι οποίες απορροφούνται στο σύνολό τους και παράγονται είτε από εισαγόμενες πρώτες ύλες σε εγχώριες μονάδες, είτε εισάγονται ως έτοιμο μετατρέπονται σε βιοντίζελ στις μεταποιητικές μονάδες που λειτουργούν στη χώρα. Οι επιπλέον αυτών ποσότητες τελικό προϊόν από άλλα Κράτη Μέλη (www.ypeka.gr).

Το βιοντίζελ μπορεί να παραχθεί από edώδιμα φυτικά έλαια (συνήθως από ηλιέλαιο, σογιέλαιο, κραμβέλαιο, φοινικέλαιο), ζωικά λίπη, τηγανέλαια και μικροβιακά λίπη, τα οποία μοιάζουν με τα φυτικά έλαια (Pinzi et al., 2014). Το συνεχώς αυξανόμενο κόστος των edώδιμων φυτικών ελαίων, καθώς και το παγκόσμιο δίλλημα “τρόφιμα εναντίον καυσίμων”, ενθάρρυνε την ανάπτυξη του βιοντίζελ “2ης γενιάς” από μη edώδιμα φυτικά έλαια: έλαιο τζοτζόμπα (jojoba oil) και έλαιο της γιατρόφας (jatropha oil), ζωικά λίπη και τηγανέλαια. Εναλλακτικές πηγές για την παραγωγή του βιοντίζελ “2ης γενιάς” τελεί υπό έρευνα χρησιμοποιώντας μικροβιακά λιπίδια. Τα μικροβιακά λιπίδια εμφανίζουν πολλά πλεονεκτήματα, όπως το γεγονός ότι η περίοδος παραγωγής τους είναι σύντομη, δεν απαιτούν την δέσμευση γεωργικής έκτασης και δεν επηρεάζονται από τις κλιματικές συνθήκες (Fei et al., 2011). Βέβαια, το κόστος παραγωγής μικροβιακών λιπιδίων είναι υψηλότερο από εκείνο των φυτικών ελαίων (Koutinas et al., 2014), αλλά υπάρχουν πολλές μέθοδοι για να βελτιώσουν τα τεχνο-οικονομικά ζητήματα της παραγωγής των μικροβιακών λιπιδίων. Αρκετές ελαιογόνες ζύμες (*Cryptococcus curvatus*, *Lipomyces starkeyi*, *Yarrowia lipolytica* και *Rhodospiridium toruloides*) χρησιμοποιούν γλυκόζη, ολιγοσακχαρίτες (Papanikolaou and Aggelis 2011a;2011b; Athenaki M et al., 2018) και γλυκερόλη (Thiru et al., 2011) ως πηγή άνθρακα για την παραγωγή μικροβιακών λιπιδίων. Μεταξύ των παραπάνω, η γλυκόζη μπορεί να χρησιμοποιηθεί ευκολότερα, επειδή όμως είναι ακριβή, θεωρείται σκόπιμο να διερευνηθεί η χρήση πιο φθηνών πηγών άνθρακα. Πρόσφατες μελέτες έχουν επικεντρωθεί στην αναζήτηση φθηνότερων θρεπτικών μέσων, όπως γεωργικά απόβλητα (Ma et al., 2014; Yu et al., 2011), βιομηχανικά απόβλητα (Thiru et al., 2011) και αστικά στερεά απόβλητα (Seo et al., 2013). Επιπλέον, ο Soccol και η ερευνητική του ομάδα, πρότειναν μια επιτυχημένη πιλοτική διαδικασία για την παραγωγή βιοντίζελ από τα μικροβιακά λιπίδια της ζύμης *Rhodospiridium toruloides*, χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα ζαχαροκάλαμο (Soccol et al., 2015).

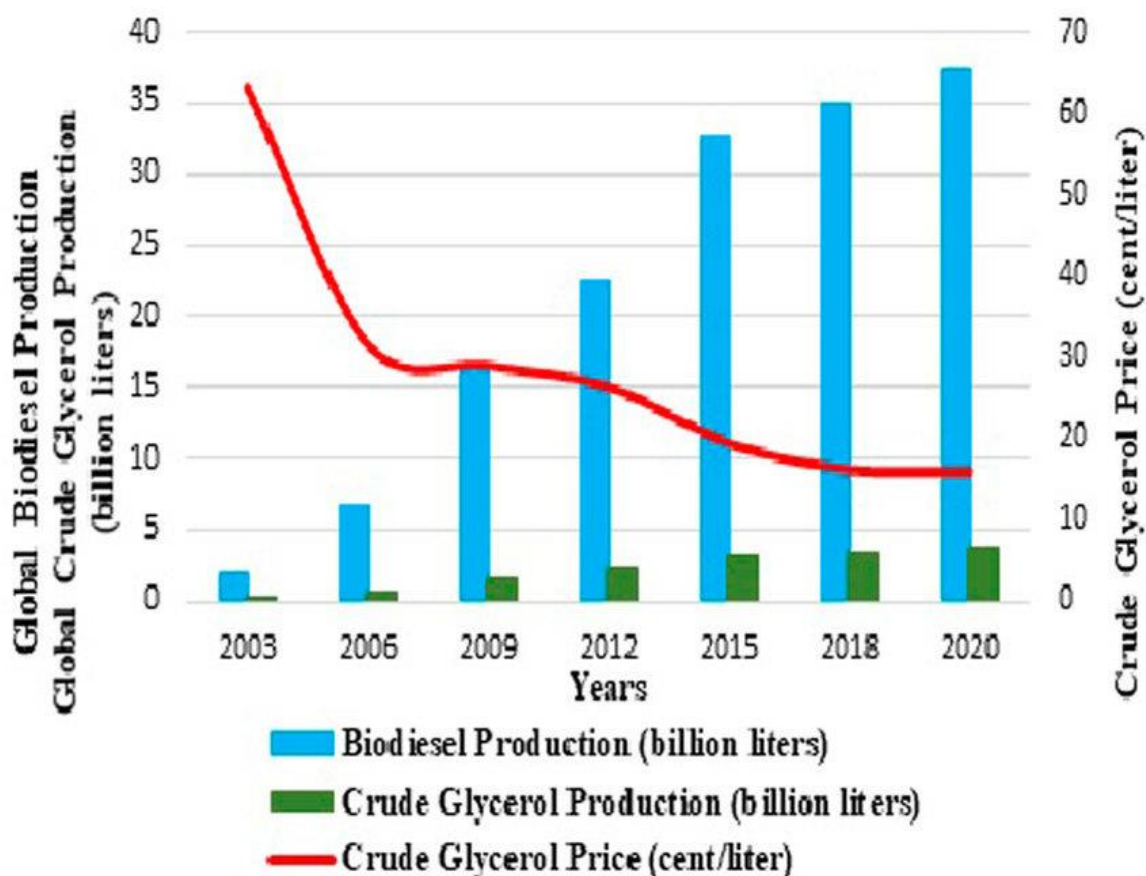
Το βιοντίζελ παράγεται με την μέθοδο της μετεστεροποίησης των τριγλυκεριδίων (TAGs), τα οποία αποτελούν το κύριο συστατικό σε ποσοστό έως 98% κ.β. των φυτικών ελαίων και ζωικών λιπών, με αλκοόλες μικρού μοριακού βάρους. Συνήθως χρησιμοποιείται η μεθανόλη λόγω του χαμηλού κόστους και των φυσικών και χημικών πλεονεκτημάτων που διαθέτει. Στην όλη διεργασία απαραίτητη είναι η

χρήση καταλύτη που θα ξεκινήσει την αντίδραση μεταξύ των TAGs και της αλκοόλης. Οι δυο κυριότεροι καταλύτες, που χρησιμοποιούνται, είναι το υδροξείδιο του νατρίου (NaOH) και το υδροξείδιο του καλίου (KOH). Συνήθως, επιλέγεται το υδροξείδιο του καλίου γιατί διαλύεται στη μεθανόλη πολύ καλύτερα από το υδροξείδιο του νατρίου. Χρησιμοποιείται κυρίως η βασικά καταλυόμενη μετεστεροποίηση, αφού είναι έως και 400 φορές γρηγορότερη από την όξινα καταλυόμενη μετεστεροποίηση (χρήση π. θεικού οξέος H₂SO₄) και οι βασικοί καταλύτες είναι λιγότερο διαβρωτικοί από τους όξινους (www.agroenergy.gr).



Εικόνα 1: Αντίδραση μετεστεροποίησης τριγλυκεριδίων για την παραγωγή μεθυλεστέρων λιπαρών οξέων (biodiesel).

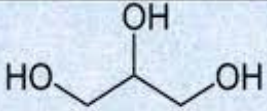
Τέλος με βάση τα αποτελέσματα από διάφορες μελέτες, παρατηρήθηκαν αυξημένα ποσοστά, σε ικανοποιητικά επίπεδα, σε κάποια λιπαρά οξέα όπως το παλμιτικό οξύ, το λινολενικό οξύ και το ελαϊκό οξύ τα οποία αποτελούν κύρια συστατικά για την παραγωγή του βιοντίζελ. Επιπλέον δεν παρατηρήθηκε γλυκερόλη στο τελικό προϊόν κάτι που είναι πολύ σημαντικό σύμφωνα με τα απαιτούμενα διεθνή πρότυπα.



Εικόνα 2: Απεικόνιση της παραγωγής βιοντίζελ και της ακατέργαστης γλυκερόλης.

1.2: Γλυκερόλη

Η γλυκερόλη με μοριακό τύπο $C_3H_8O_3$ ανήκει στην οικογένεια των πολυολών και αποτελεί μια χημική οργανική ένωση. Η γλυκερόλη ή αλλιώς 1,2,3 προπανοτριόλη συναντιέται σε όλα τα ζωικής και φυτικής προέλευσης λίπη και έχει εμπορική ονομασία γλυκερίνη. Επιπλέον χρησιμοποιείται ως κύριο υποπροϊόν για την δημιουργία του βιοντίζελ και μπορεί να παραχθεί από φυσικές πηγές, με την υδρόλυση των λιπών, των σακχάρων αλλά μπορεί να παραχθεί και συνθετικά (Papanikolaou et al., 2002; 2008; Tchakouteu et al., 2015; Bommarreddy et al., 2015). Το 1823 ονομάστηκε γλυκερίνη από τον Γάλλο χημικό Michel Eugene Chevreul ενώ ο μοριακός τύπος ($C_3H_8O_3$) δόθηκε το 1855 από τον Charles-Adolphe Wurtz (Kenar et al., 2007). Στην καθαρή μορφή της η γλυκερόλη είναι παχύρρευστη, άοσμη, διαφανής, υδατοδιαλυτή, μη τοξική, υγροσκοπική και με υψηλό σημείο βρασμού (Brady, 1990; Perry et al., 1990).

Γενικά χαρακτηριστικά		Συντακτικός τύπος
Χημική ονομασία:	1,2,3-προπανοτριόλη	
Μοριακός τύπος:	C ₃ H ₈ O ₃	
Μοριακή μάζα:	92,10 g/mol	
Χημικές Ιδιότητες		Φυσικές Ιδιότητες

Εικόνα 3: Γενικά χαρακτηριστικά και συντακτικός τύπος της βιομηχανικής γλυκερόλης.

Η γλυκερόλη χρησιμοποιείται σε πληθώρα προϊόντων όπως στα καλλυντικά, στα τρόφιμα, στα καπνικά προϊόντα, στα φαρμακευτικά σκευάσματα αλλά και στη σύνθεση της αλκυδικής ρητίνης και της πολυουρεθάνης (Stelmachowski et al., 2014). Στην αγορά συναντώνται τρία είδη γλυκερόλης: η “καθαρή” γλυκερόλη, η ακατέργαστη γλυκερόλη και η συνθετική γλυκερόλη. Η ακατέργαστη γλυκερόλη μπορεί να αξιοποιηθεί από πολλούς μικροοργανισμούς για την παραγωγή μεταβολιτών και προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας. Οι ελαιογόνες ζύμες *Rhodospiridium toruloides*, *Cryptococcus curvatus*, *Rhodotorula glutinis*, *Sporidiobolus pararoseus*, *Trichosporanoides spathulata* (Chi et al., 2007; Jung et al., 2011; Kitcha and Cheirilsilp, 2013; Gao et al., 2016; Uprety et al., 2017; Manowattana et al., 2017) αλλά και οι μύκητες *Thamnidium elegans*, *Mortierella alpina*, *M. isabellina* και *Cunninghamella echinulata* (Fakas et al., 2009b; Chatzifragkou et al., 2011; Dedyukhina et al., 2014) παράγουν λιπίδια σε υψηλό ποσοστό επί της βιομάζας τους. Ακόμα, σε παλαιότερες μελέτες είχε αποδειχθεί ότι η μέγιστη παραγωγή λίπους για την ζύμη *Rhodospiridium toruloides* ήταν με την χρήση της γλυκερόλης και όχι με την χρήση γλυκόζης ενώ η μέγιστη παραγωγή βιομάζας ήταν με πηγή άνθρακα την γλυκόζη σύμφωνα με τους Bommareddy et al., 2015.

1.3: Ελαιογόνοι μικροοργανισμοί - *Rhodospiridium toruloides*

Η ζύμη *Rhodospiridium toruloides* είναι μία κόκκινη ελαιογόνος, μη παθογόνος ζύμη, που ανήκει στην οικογένεια των Βασιδιομυκήτων (Akada et al., 1989; Zhu et al., 2012). Στην ταυτοποίησή της συνέβαλε η απομόνωση της από τον ξυλοπολτό κωνοφόρων δέντρων.

Η εν λόγω ζύμη έχει πολλές βιοτεχνολογικές εφαρμογές, αφού είναι παραγωγός ουδέτερων λιπιδίων, καροτενοειδών ουσιών (στις οποίες οφείλεται το κόκκινο χρώμα), καθώς και σημαντικών ενζύμων, όπως διαφαίνεται παρακάτω από την Εικόνα 4 (Passoth et al., 2017). Φυσιολογικές μελέτες έχουν δείξει την ικανότητά της να αναπτύσσεται σε ένα ευρύ φάσμα πηγών άνθρακα και αζώτου με αποτέλεσμα την παραγωγή προϊόντων υψηλής αξίας από υποστρώματα χαμηλού κόστους (Xu, and Liu, 2017). Ως εκ τούτου, η συγκεκριμένη ζύμη έχει μελετηθεί από το 1950 ως δυνητικός μικροοργανισμός, σε πληθώρα βιοτεχνολογικών εφαρμογών.

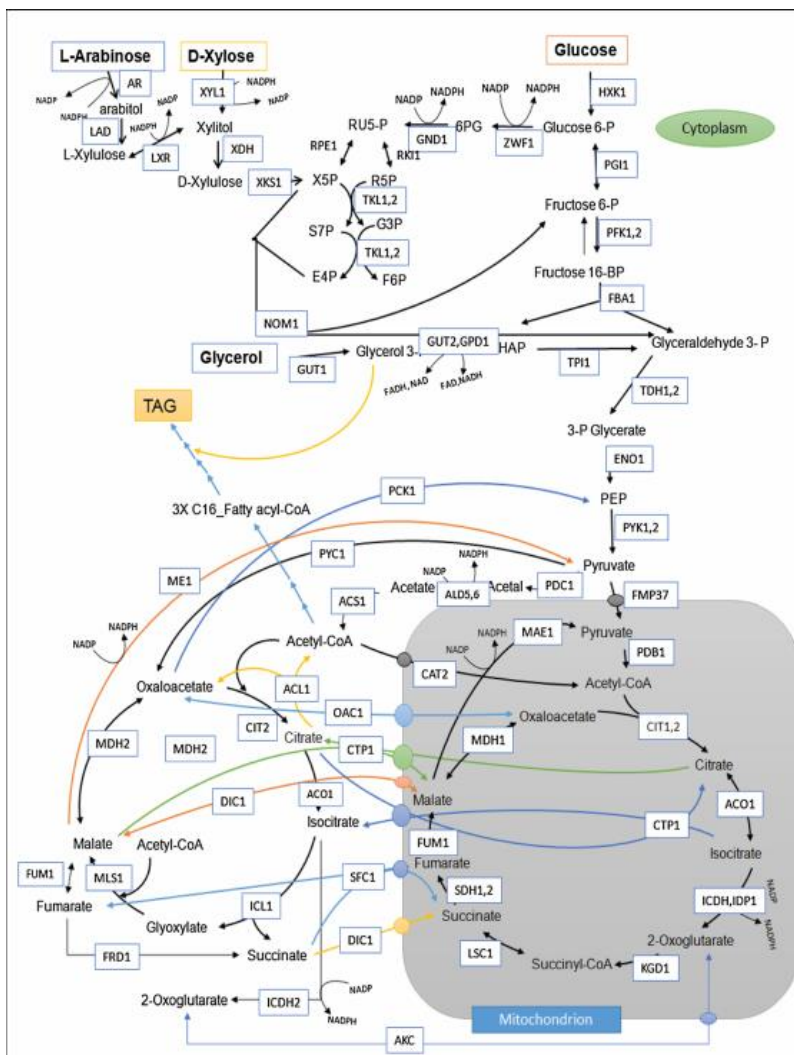
Στη φύση εντοπίζονται ορισμένοι μικροοργανισμοί, οι οποίοι έχουν τη δυνατότητα να παράγουν λίπος ενδοκυτταρικά. Συγκεκριμένα, ως ελαιογόνοι μικροοργανισμοί ορίζονται οι μικροοργανισμοί εκείνοι, οι οποίοι αναπτυσσόμενοι σε συγκεκριμένες συνθήκες δύνανται να συσσωρεύσουν ενδοκυτταρικό λίπος, σε ποσοστό μεγαλύτερο από 20% (w/w) επί της ξηράς ουσίας (Papanikolaou and Aggelis, 2011; Ageitos et al., 2011). Ο μικροοργανισμός *Rhodospiridium toruloides* είναι ικανός να συσσωρεύει λιπίδια σε ποσοστό πάνω από 70% (w/w) επί της ξηράς ουσίας (Ratledge and Wynn, 2002; Li et al., 2007). Ο Soccol και η ερευνητική του ομάδα πρότειναν μια επιτυχημένη πιλοτική διαδικασία για την παραγωγή βιοντίζελ από τα μικροβιακά λιπίδια της ζύμης *Rhodospiridium toruloides* (Soccol et al., 2016), ενώ τεχνοοικονομική μελέτη παραγωγής μικροβιακών λιπιδίων έλαβε χώρα από τους Koutinas et al., 2014 με βάση αποτελέσματα που προέκυψαν από ημι-συνεχή τροφοδοτούμενη καλλιέργεια του μικροοργανισμού *Rhodospiridium toruloides*.

Ορισμένες μελέτες υποστηρίζουν ότι η παραγωγή ενδοκυτταρικών λιπιδίων από τον ζυμομύκητα *Rhodospiridium toruloides* ίσως να συνδέεται με τον περιορισμό και άλλων θρεπτικών στοιχείων στο υπόστρωμα καλλιέργειας, εκτός του αζώτου. Πιο συγκεκριμένα, ο περιορισμός σε θείο και φώσφορο στο μέσο της καλλιέργειας έχει δείξει ότι επηρεάζει θετικά τη συσσώρευση λίπους στα κύτταρα της συγκεκριμένης ζύμης (Li et al., 2006; Wu et al., 2010; Wu et al., 2011). Ο μικροοργανισμός αξιοποιεί διάφορες πηγές άνθρακα όπως γλυκόζη, γλυκερόλη, αραβινόζη, ξυλόζη, σακχαρόζη και φρουκτόζη (Diamantopoulou et al., 2020; Sarantou et al., 2021;). Ωστόσο, η ζύμη δύναται να αναπτύσσεται και να καταβολίζει ως υπόστρωμα, απόβλητα όπως χυμό ζαχαροκάλαμου (Soccol et al., 2016) και πολλά άλλα.



Εικόνα 4: Απεικόνιση της ζύμης *Rhodosporidium toruloides*.

Συνοπλογίζοντας όλα τα παραπάνω, είναι λογικό η παρούσα ελαιογόνος ζύμη να θεωρείται ένας μικροοργανισμός με υψηλές βιοτεχνολογικές δυνατότητες στον τομέα της αειφόρου ανάπτυξης.



Εικόνα 5: Απεικόνιση μεταβολικού μοντέλου τριακυλογλυκερόλης που παράγει την ζύμη *Rhodosporidium toruloides*.

1.4: Μικροβιακά Λιπίδια

Τα μικροβιακά λιπίδια (SCO “Single Cell Oils”) μπορούν να παραχθούν από ελαιογόνους μύκητες, μικροφύκη, βακτήρια και ζύμες (Liu et al., 2013). Οι ελαιογόνοι μικροοργανισμοί έχουν την δυνατότητα να παράγουν SCOs πλούσια σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFAs-Polyunsaturated Fatty Acids) (Aggelis et al., 1987; Ratledge, 1993, 2004; Leman, 1997), ή τριγλυκερίδια (TAGs) σπάνιας δομής (Paranikolaou et al., 2001). Όσον αφορά την παραγωγή μικροβιακών λιπιδίων, οι ελαιογόνες ζύμες έχουν πολλά πλεονεκτήματα σε σχέση με άλλους μικροοργανισμούς. Σε αντίθεση με τα μικροφύκη, η ζύμωση των ζυμομυκήτων δεν επηρεάζεται από τις κλιματικές συνθήκες. Επίσης, οι ζύμες μπορούν να χρησιμοποιήσουν ποικίλα σάκχαρα ως πηγή άνθρακα απ’ ότι τα ετερότροφα

μικροφύκη. Σε σύγκριση με τους μύκητες, οι ζύμες εμφανίζουν μεγαλύτερη ανθεκτικότητα σε ιόντα μετάλλων αλλά και στην χαμηλή παροχή οξυγόνου. Τα κύτταρα των ζυμών μπορούν να συλλεχθούν πιο εύκολα λόγω του μεγάλου μεγέθους τους σε σχέση με τα κύτταρα των βακτηρίων (Santos and Reis, 2014; Shen et al., 2013) .

Ο μικροοργανισμός *Rhodospiridium toruloides* είναι γνωστό ότι συσσωρεύει μεγάλες ποσότητες λιπιδίων (μέχρι και 65% επί της ξηρής βιομάζας του), με την μορφή τριγλυκεριδίων κάτω από περιοριστικές σε άζωτο συνθήκες. Τα τριγλυκερίδια από μικροοργανισμούς ή φυτά μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την παραγωγή 2^{ης} γενιάς βιοντίζελ. Η σύνθεση λιπαρών οξέων από την συγκεκριμένη ζύμη εξαρτάται από το στέλεχος, την αναλογία άνθρακα/αζώτου στο υπόστρωμα, τη σύσταση του μέσου ανάπτυξης και τις περιβαλλοντολογικές συνθήκες (Xu, and Liu, 2017). Τα κύρια λιπαρά οξέα του μικροοργανισμού *Rhodospiridium toruloides* είναι το παλμιτικό οξύ (C16:0), στεατικό οξύ (C18:0), ελαϊκό οξύ (^{Δ9} C18:1) και λινελαϊκό οξύ (^{Δ9,12} C18:2).

Στην παρακάτω Πίνακα απεικονίζεται η σύνθεση από λιπαρά οξέα των λιπιδίων που δημιουργούνται από διαφορετικά στελέχη ζυμομυκήτων που εξελίσσονται σε υποστρώματα σακχάρων σε συνθήκες καλλιέργειας που καθιστούν ωφέλιμη την συσσώρευση των μικροβιακών λιπιδίων (Paranikolaou and Aggelis, 2011). Κάποια από τα πιο σημαντικά λιπαρά οξέα για τα μικροβιακά λιπίδια είναι το παλμιτικό οξύ (16:0), το παλμιτελαϊκό οξύ (16:1), το στεατικό οξύ (18:0), το ελαϊκό οξύ (18:1), το λινολενικό οξύ (18:2) και το λινολενικό οξύ (18:3).

Πίνακας 1: Σύνθεση λιπαρών οξέων, των λιπιδίων που παράγονται από διάφορα, στελέχη ζυμομυκήτων που αναπτύσσονται σε υποστρώματα σακχάρων σε συνθήκες καλλιέργειας που ευνοούν την συσσώρευση των μικροβιακών λιπιδίων.(Papanikolaou and Aggelis 2011).

Strain	Lipid (% w/w)	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3
<i>Candida</i> sp. 107 ^{a)}	37.1	37	1	14	36	7	T.
<i>Candida</i> sp. 107	n.r.	28	n.r.	8	41	17	17
<i>Candida</i> sp.	40.3	23	13	3	54	5	2
<i>Rhodotorula gracilis</i>	41.0	21	T.	13	51	11	3
<i>Candida curvata</i> ^{b)}	29.1	36	T.	14	40	7	T.
<i>Candida curvata</i> ^{b)}	28.0	37	T.	10	44	6	T.
<i>Apiotrichum curvatum</i> ^{b)}	31.0	34	T.	10	43	7	2
<i>Cryptococcus curvatus</i> ^{b)}	38.0	24	T.	10	46	9	6
<i>Cryptococcus curvatus</i> ^{b)}	25.0	18	T.	16	50	16	T.
<i>Cryptococcus curvatus</i> ^{b)}	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</i> ^{a)}	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 mucilaginosa</i>	48.6	22	2	9	55	11	T.
<i>Trichosporon capitatum</i>	37.6	12	1	2	74	9	n.r.
<i>Rhodotorula</i> sp.	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.: not reported.

^{a)} Representation of the neutral fraction of microbial lipids produced.

^{b)} *Cryptococcus curvatus* was formerly *Candida curvata* and then *Apiotrichum curvatum*; thus these microorganisms in fact are the same species.

1.5:Βιοσυσσώρευση λίπους

Οι ελαιογόνοι μικροοργανισμοί, όταν καλλιεργηθούν σε θρεπτικά μέσα στα οποία υπάρχει περίσσεια πηγή άνθρακα και περιοριστικές σε άζωτο συνθήκες, αρχικά εξαντλούν την πηγή αζώτου, ενώ συνεχίζουν να αφομοιώνουν την πηγή άνθρακα. Με την έλλειψη του αζώτου σταματά η κυτταρική αύξηση, καθώς αυτό είναι απαραίτητο για την παραγωγή πρωτεϊνών, που είναι ζωτικής σημασίας για την δημιουργία νέων κυττάρων. Η συνεχής κατανάλωση της πηγής άνθρακα έχει ως αποτέλεσμα την μετατροπή της σε ενδοκυτταρικό λίπος. Η συσσώρευση ενδοκυτταρικού λίπους συνεχίζεται μέχρι ενός

ορίου, το οποίο είναι γενετικά προκαθορισμένο για κάθε μικροοργανισμό (Ratledge and Wynn, 2006). Η φάση αυτή διαρκεί μέχρι την εξάντληση της πηγής άνθρακα ή κάποιου άλλου θρεπτικού συστατικού, που είναι απαραίτητο για τη διεργασία. Τέλος, ακολουθεί η φάση αποδόμησης λιπιδίων, κατά την οποία πολλοί ελαιογόνοι ετερότροφοι μικροοργανισμοί συνήθως αποδομούν και καταναλώνουν τα συσσωρευμένα λιπίδια (Holdsworth and Ratledge, 1988; Aggelis and Sourdis, 1997; Alvarez et al., 2000; Papanikolaou and Aggelis, 2003a, 2003b; Papanikolaou et al., 2004; Papanikolaou & Aggelis, 2011).

Οι μη ελαιογόνοι μικροοργανισμοί δεν έχουν την ικανότητα να συσσωρεύουν λίπος σε ποσοστό πάνω από 10% επί της ξηρής βιομάζας τους. Επομένως, όταν καλλιεργηθούν σε θρεπτικό μέσο με περιοριστικές σε άζωτο συνθήκες, συνεχίζουν να καταναλώνουν την πηγή άνθρακα είτε για την ανάπτυξη των κυττάρων τους, είτε για την ενδοκυτταρική συσσώρευση οργανικών ενώσεων, όπως για παράδειγμα διαφόρων οργανικών οξέων.

Με την εξάντληση του αζώτου στο θρεπτικό μέσο από τον μικροοργανισμό ξεκινά μια σειρά αντιδράσεων, που οδηγούν στο σχηματισμό του ακετυλοσυνενζύμου Α (Acetyl-CoA ή ακέτυλο-CoA). Το ακέτυλο-CoA, το οποίο δημιουργείται μέσω της οξειδωτικής αποκαρβοξυλίωσης του πυροσταφυλικού οξέος, είτε θα αποτελέσει το υλικό εκκίνησης του κύκλου των τρικαρβοξυλικών οξέων (TCA), είτε το υλικό δόμησης των ενδοκυτταρικών λιπιδίων. Η σύνθεση των ενδοκυτταρικών λιπιδιακών δομών δεν πραγματοποιείται στο μιτοχόνδριο, αλλά στο κυτταρόπλασμα και ως εκ τούτου το ακέτυλο-CoA θα πρέπει εκ νέου να μεταφερθεί στο κυτταρόπλασμα. Η μεμβράνη των μιτοχονδρίων δεν είναι περατή από το ακέτυλο-CoA, το οποίο εξέρχεται από τα μιτοχόνδρια σε σχετικά μικρά ποσά υπό την μορφή της ακέτυλο-καρνιτίνης και μόνο για τους μη-ελαιογόνους μικροοργανισμούς (Ratledge και Gilbert, 1985; Davies και Holdsworth, 1992). Έτσι, κατά την κατανάλωση του αζώτου ενεργοποιείται το ένζυμο AMP απαμινάση, με αποτέλεσμα την πολύ γρήγορη πτώση της περιεκτικότητας της μονο-φωσφορικής αδενοσίνης (AMP) προκειμένου να παραχθεί άζωτο σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση:



Η πτώση της συγκέντρωσης της AMP οδηγεί στην παρεμπόδιση της δράσης του ενζύμου ισοκιτρική αφυδραγονάση (ICDH). Με αυτό τον τρόπο, το κιτρικό οξύ δεν μπορεί να μεταβολιστεί και συσσωρεύεται στο μιτοχόνδριο του μικροοργανισμού. Έπειτα, το κιτρικό οξύ εισέρχεται στο κυτταρόπλασμα και διασπάται από το ένζυμο ATP-κιτρική λυάση (ACL) σε ακετυλοσυνένζυμο Α και οξαλοξικό οξύ. Το ακετυλοσυνένζυμο Α χρησιμοποιείται ως προάγγελος για την βιοσύνθεση των

λιπαρών οξέων, ενώ το οξαλοξικό οξύ μετατρέπεται σε μηλικό οξύ, το οποίο στη συνέχεια χρησιμοποιείται στον κύκλο κιτρικού/μηλικού οξέος (Ratledge, 2002;2004). Πραγματοποιείται η παρακάτω αντίδραση:



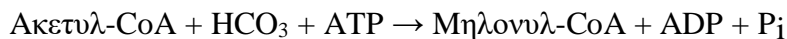
Για τη βιοσύνθεση των λιπαρών οξέων είναι απαραίτητη η παροχή επαρκούς ποσότητας NADPH. Το μηλικό ένζυμο λειτουργεί ως προμηθευτής NADPH σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση:



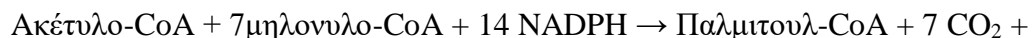
Τα λιπαρά οξέα, που βιοσυντίθενται, εστεροποιούνται με την γλυκερόλη σε τριγλυκερίδια και ενσωματώνονται μέσω του ενδοπλασματικού δικτύου σε σταγονίδια λιπαρών οξέων.

Συνοψίζοντας, τα δύο ένζυμα κλειδιά για την βιοσύνθεση ενδοκυτταρικού λίπους στους ελαιογόνους μικροοργανισμούς είναι η ATP-κιτρική λυάση (ACL) και το μηλικό ένζυμο. Ωστόσο, η παρουσία του ενζύμου ACL σε κάποιες ζύμες δεν οδήγησε στην παραγωγή μικροβιακού λίπους, γεγονός που δείχνει ότι απαιτείται και η δράση άλλων ενζύμων, για να οδηγηθεί ο μικροοργανισμός σε παραγωγή μικροβιακού λίπους (Ratledge and Wynn, 2002). Μελέτες έχουν δείξει ότι υπάρχουν ελαιογόνες ζύμες (*Lipomyces sp.* και *Candida sp.*), οι οποίες δύνανται να βιοσυνθέσουν λίπος παρά το γεγονός ότι δεν διαθέτουν το μηλικό ένζυμο. Πιθανόν αυτές οι ζύμες να διαθέτουν κάποιο ένζυμο υπεύθυνο για την παραγωγή NADPH (Ratledge, 2004).

Η βιοσύνθεση των λιπαρών οξέων ξεκινά με την καρβοξυλίωση του ακετύλο-CoA προς μηλονυλο-CoA από την καρβοξυλάση του ακετύλο-CoA (Acetyl-CoA carboxylase-ACC). Η αντίδραση αυτή δεν είναι αντιστρεπτή και αποτελεί το καθοριστικό βήμα της βιοσυνθετικής οδού (Ratledge, 1994; Papanikolaou και Aggelis, 2011α):



Στη συνέχεια, οι ακυλο-μεταφοράσες μεταφέρουν ακετυλο-ομάδες (CH₃CO-) και μηλονυλο-ομάδες (HOOC-CH₂-CO-) σε μια ακυλο-φέρουσα πρωτεΐνη (Acyl carrier protein-ACP). Έπειτα, το ενζυμικό σύστημα της συνθέσεως των λιπαρών οξέων (Fatty acid synthetase-FAS) προσθέτει διαδοχικά δυο άτομα άνθρακα στη μηλονυλο-ACP, έως ότου το μήκος της αλυσίδας φτάσει τα 16 άτομα άνθρακα.. Η στοιχειομετρία της σύνθεσης των λιπαρών οξέων είναι η εξής (Papanikolaou και Aggelis, 2011α):





Λιπαρά οξέα, που περιέχουν παραπάνω από 16 άτομα άνθρακα, συντίθενται από το παλμιτικό οξύ (C16:0) με προσθήκη δύο ατόμων άνθρακα με την βοήθεια ειδικών ενζύμων, τα οποία βρίσκονται στην κυτταροπλασματική πλευρά του λείου ενδοπλασματικού δικτύου

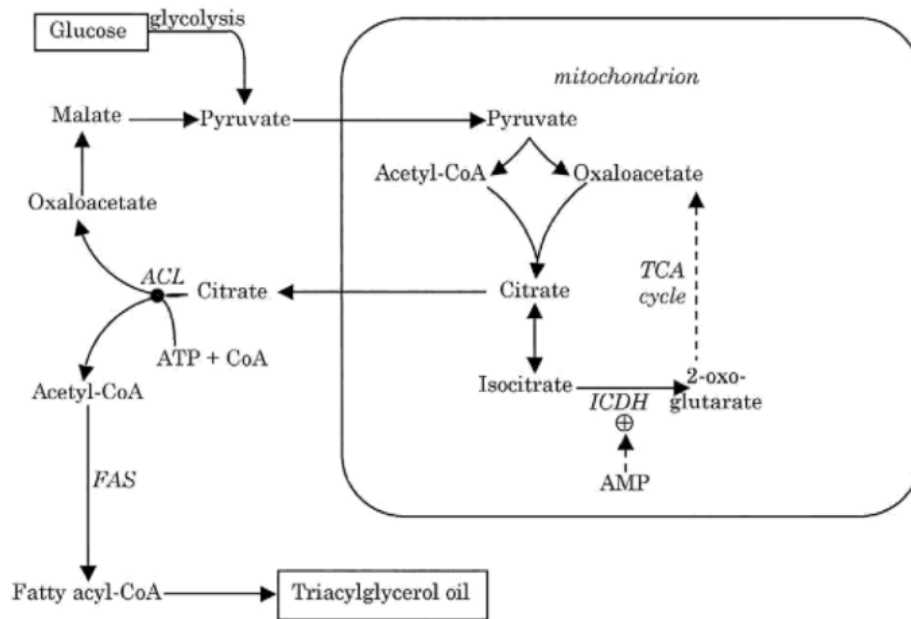


FIG. 5. Outline of the main sequence of events leading to lipid accumulation in oleaginous yeasts and molds. Lipid accumulation is triggered by a sequence of events described in the text. ICDH: isocitrate dehydrogenase (AMP dependent); TCA cycle: tricarboxylic acid cycle; ACL: ATP:citrate lyase; FAS: fatty acid synthase (see also Fig. 7).

Εικόνα 6: Η κύρια ακολουθία για την βιοσυσσώρευση των λιπιδίων.

1.6: Ενδοπολυσακχαρίτες

Οι πολυσακχαρίτες είναι πολυμερή υψηλού μοριακού βάρους των οποίων οι δομικές μονάδες αποτελούνται από μονοσακχαρίτες. Υπολογίζεται ότι περισσότερο από το 90% της συνολικής βιομάζας των υδατανθράκων στη φύση βρίσκεται υπό μορφή πολυσακχαριτών (BeMiller, 2019). Ο γενικός χημικός τους τύπος είναι $(\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5)_n$, όπου n ο βαθμός πολυμερισμού δηλαδή ο αριθμός των μορίων των μονοσακχαριτών που συνθέτουν έναν πολυσακχαρίτη. Πολλοί λίγοι φυσικοί πολυσακχαρίτες εμφανίζουν βαθμό πολυμερισμού <100 ενώ οι περισσότεροι κυμαίνονται στο εύρος 200-3000. Οι πιο συχνοί μονοσακχαρίτες που συναντώνται στους μικροοργανισμούς είναι οι εξής: D-

γλυκόζη, D-γαλακτόζη, D-μαννόζη, L-φουκόζη, L-ραμνόζη αλλά και ουρονικά οξέα όπως το γλυκουρονικό και το γαλακτουρονικό οξύ (Ahmad et al., 2015).

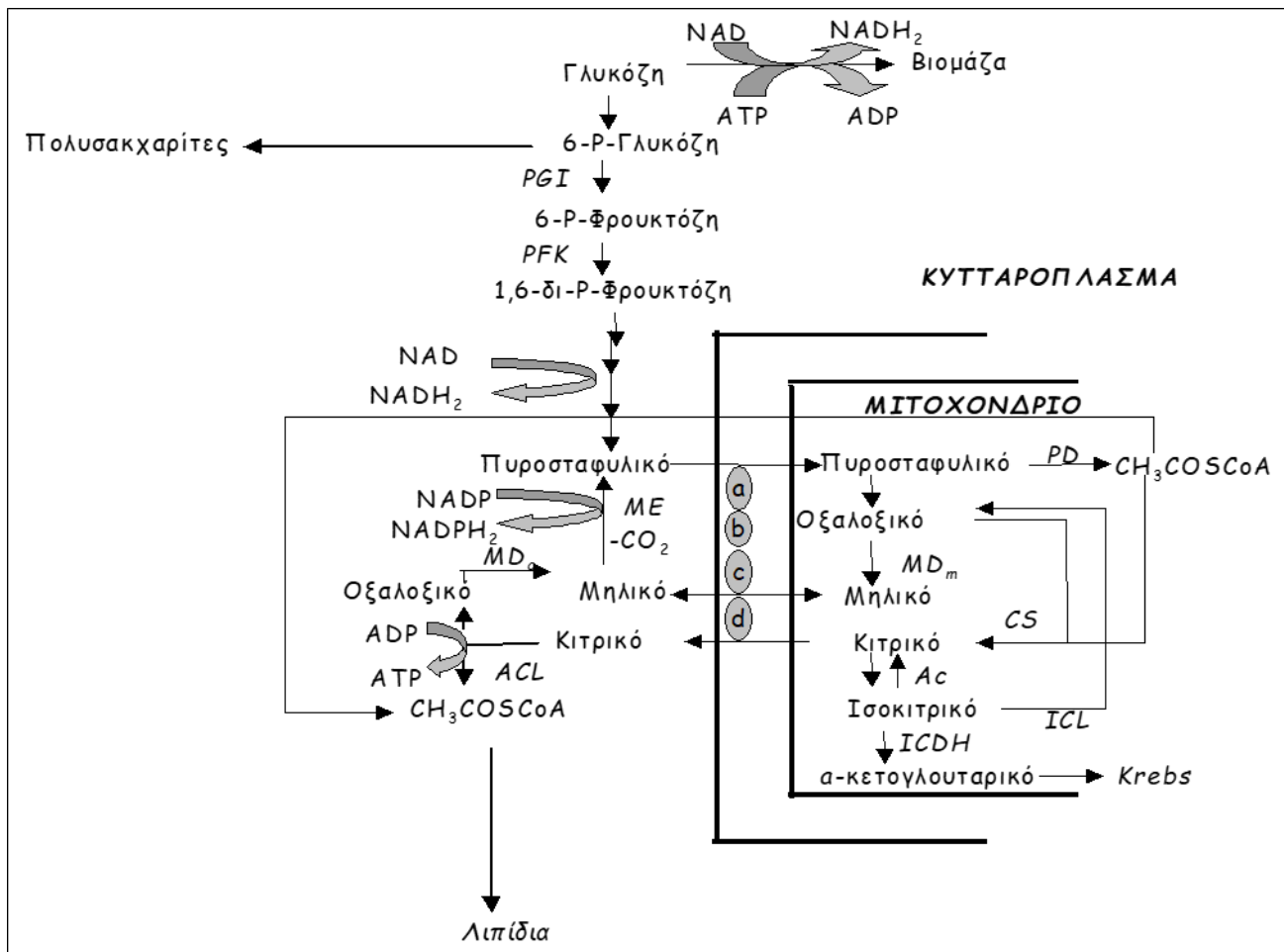
Οι πολυσακχαρίτες, των οποίων ο γενικός επιστημονικός όρος είναι γλυκάνες (Belitz et al., 2009), διακρίνονται σε διάφορες κατηγορίες ανάλογα με το είδος των σακχάρων από τα οποία αποτελούνται. Έτσι, πολυσακχαρίτες, όπως το άμυλο και η κυτταρίνη, καλούνται ομοπολυσακχαρίτες, ενώ οι πηκτίνες καλούνται ετεροπολυσακχαρίτες. Επίσης διακρίνονται και με την θέση τους στο κύτταρο. Στο εσωτερικό ονομάζονται ενδοπολυσακχαρίτες ενώ στο εξωτερικό του κυττάρου ονομάζονται εξωπολυσακχαρίτες. Οι ενδοπολυσακχαρίτες παράγονται από ανώτερους μύκητες και αποτελούνται από απλά σάκχαρα (π.χ. η γλυκόζη), δισακχαρίτες και πολυόλες (π.χ. η μαννιτόλη). Κυρίως, όμως, αποτελούνται από πολυσακχαρίτες, όπως γλυκογόνο και β-γλυκάνες (Fang and Zhong, 2002; Tang and Zhong, 2002; Galiotou-Panayotou et al., 1998; Seviour et al., 1992).

Οι πολυσακχαρίτες που παράγονται από μύκητες, προέρχονται από υγρές καλλιέργειες βυθού και καλλιέργειες στερεής κατάστασης. Την βιοσύνθεση αυτών την επηρεάζουν οι συνθήκες όπου πραγματοποιείται η ζύμωση και η σύσταση του θρεπτικού μέσου (Wu et al., 2006). Λόγω αυτής της επιρροής η γνώση των παραπάνω είναι απαραίτητη, γιατί ο μεταβολισμός των μυκήτων πρέπει να οδηγηθεί προς την παραγωγή των επιθυμητών μεταβολιτών. Όπως έχει προαναφερθεί την βιοσύνθεσή τους την ευνοούν, οι πηγές άνθρακα όπως η γλυκόζη και οι οργανικές πηγές αζώτου (πεπτόνη, yeast extract) (Gern et al., 2008; Fang and Zhong, 2002). Επιπλέον υπάρχουν και άλλοι σημαντικοί παράγοντες που παίζουν σημαντικό ρόλο στην βιοσύνθεση των πολυσακχαριδίων. Κάποιοι από αυτούς τους παράγοντες είναι η αρχική τιμή του pH, η θερμοκρασία της ζύμωσης αλλά και ο αερισμός. Τέλος, οι συνθήκες της καλλιέργειας, που βοηθούν την συσσώρευση των πολυσακχαριτών και ειδικά των εξωπολυσακχαριτών, μπορεί να μην βοηθήσουν την παραγωγή της βιομάζας και αυτό ισχύει και αντίστροφα (Tang and Zhong, 2002; Diamantopoulou et al., 2012 a; 2012b; 2014).

1.7: Βιοσυσσώρευση ενδοπολυσακχαριτών

Η σύνθεση ενδοπολυσακχαριτών πιθανόν να σχετίζεται με τη βιοσύνθεση λιπιδίων. Υπάρχουν πολλές βιβλιογραφικές αναφορές, που υποστηρίζουν πως η εξάντληση του αζώτου στο μέσο της καλλιέργειας, ευνοεί την βιοσυσσώρευση των συγκεκριμένων ενώσεων λόγω της υποχρεωτικής διάσπασης της AMP, ώστε να εξασφαλιστούν από τα κύτταρα οι απαιτήσεις τους σε άζωτο. Το ένζυμο 6-φωσφοροφρουκτοκινάση (6 PFK) ενεργοποιείται αλλοστερικά από το κυτταρικό AMP και έτσι η ελάττωση της συγκέντρωσης της AMP οδηγεί στην αναστολή της δράσης της 6 PFK (Galiotou-Panayotou et al.,

1998; Ratledge and Wynn, 2002; Papanikolaou and Aggelis, 2011a) που αυτό οδηγεί στην συσσώρευση των ενδοπολυσακχαρίτων.



Εικόνα 7: Υποθετικό σενάριο διάμεσου μεταβολισμού στα μυκήλια. Απεικονίζεται η πορεία του μεταβολισμού προς τη βιοσύνθεση ενδοπολυσακχαριτών (IPS), τριακυλογλυκερολών (TAGs) και προς τον κύκλο Krebs. PGI: ισομεράση φωσφογλυκόζης, PFK: φωσφοφρουκτοκινάση, ME: NAD

Τέλος, έχει δειχθεί ότι οι ενδοπολυσακχαρίτες μπορούν να βιοσυντίθεται και κατα την ισόρροπη φάση αυξήσεως ελαιογόνων ζυμών και μυκήτων (Tchakouteu et al., 2015; Dourou et al., 2017; Gardeli et al., 2017; Diamantopoulou et al., 2020; Sarantou et al., 2021).

1.8: Σκοπός Ερευνητικής μελέτης

Η ακάθαρτη-βιομηχανική γλυκερόλη, αποτελεί μια σημαντική εκροή υπόλειμμα ποικίλων βιομηχανικών διεργασιών (όπως τούτων της παραγωγής βιολογικού πετρελαίου βιοντίζελ, σαπώνων, αλκοολούχων ποτών, βιοαιθανόλης, κλπ) ο όγκος της οποίας παρουσιάζει συνεχή αύξηση τα τελευταία χρόνια. Ο σκοπός της παρούσας ερευνητικής προσπάθειας αναφέρεται στη δυνατότητα χρήσης της ακάθαρτης (απόβλητης) γλυκερόλης ως πηγής άνθρακα και ενέργειας για στελέχη της ζύμης *Rhodospiridium toruloides*, τα οποία θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για την παραγωγή μεταβολικών προϊόντων, τα οποία δύνανται να έχουν μεγάλο ενδιαφέρον για τη βιομηχανία τροφίμων, τη χημική βιομηχανία και τη βιομηχανία βιοκαυσίμων. Τα προϊόντα τα οποία προβλέπεται να παραχθούν έχουν ως εξής: (i) Ενδο-κυτταρικό μικροβιακό λίπος (ΜΛ) (το οποίο θα αποτελέσει τον προάγγελο της σύνθεσης μικροβιακής προέλευσης βιοντίζελ), (ii) Ενδο-κυτταρικοί πολυσακχαρίτες. Οι ζύμες οι οποίες θα μελετηθούν ως προς τη δυνατότητα αύξησης τους στην ακάθαρτη γλυκερόλη αναφορικά με την παραγωγή των ανωτέρω μεταβολιτών ανήκουν στο είδος *Rhodospiridium toruloides*.

Κεφάλαιο 2ο : Υλικά και μέθοδοι

2:Υλικά και μέθοδοι

2.1:Βιολογικό υλικό

Στη συγκεκριμένη ερευνητική μελέτη χρησιμοποιήθηκαν τα στελέχη από τη ζύμη *Rhodospiridium toruloides* και συγκεκριμένα το NRRL Y-27010, NRRL Y-17902 και NRRL Y-6985 (Peoria,USA).

Η συντήρηση των στελεχών πραγματοποιήθηκε σε slants δηλαδή σε κεκλιμένους σωλήνες όπου είχε τοποθετηθεί θρεπτικό μέσο YPDA (Yeast Peptone Dextrose Agar) στους 4°C. Οι ουσίες από τις οποίες αποτελείται το θρεπτικό υλικό ήταν η εξής: 10 g/L γλυκόζη, 10 g/L yeast extract, 10 g/L πεπτόνη και 20 g/L Άγαρ. ενώ πριν από κάθε εμβολιασμό του θρεπτικού μέσου τα στελέχη ανανεώνονταν προκειμένου να είναι ηλικίας περίπου 3 ημερών.

2.2: Θρεπτικά υποστρώματα

2.2.1: Παρασκευή προκαλλιέργειας

Στο αρχικό στάδιο του πειράματος, ετοιμαζόταν η υγρή προκαλλιέργεια, επειδή όταν η κυρίως καλλιέργεια θα πρέπει να εμβολιαστεί, ο μικροοργανισμός είναι απαραίτητο να βρίσκεται στην εκθετική φάση ανάπτυξης. Το υγρό θρεπτικό υπόστρωμα YPD (10 g/L γλυκόζη, 10 g/L yeast extract, 10 g/L πεπτόνη) που χρησιμοποιήθηκε στην υγρή προκαλλιέργεια τοποθετείται σε κωνικές φιάλες των 250mL αλλά χρησιμοποιώντας μόνο 50±1 mL του όγκου τους. Εν' συνεχεία όλες οι φιάλες σφραγίζονται με υδρόφοβο βαμβάκι και κατευθύνονται για αποστείρωση στους 121°C για 20 λεπτά. Με την ολοκλήρωση της αποστείρωσης και εφόσον οι κωνικές φιάλες δεν είναι πλέον ζεστές πραγματοποιείται ο εμβολιασμός τους υπό ασηπτικές συνθήκες. Τέλος, η προκαλλιέργεια τοποθετείται σε ανακινούμενο επωαστικό θάλαμο για επώαση σε σταθερές συνθήκες ανάδευσης 180±5 rpm και θερμοκρασία στους 28±1°C. Μετά από 48 ώρες χρησιμοποιείται κάποια ποσότητα της προκαλλιέργειας, η οποία αποτελεί το εμβόλιο της ζύμης για τον εμβολιασμό της κύριας καλλιέργειας.

2.2.2: Παρασκευή κυρίως καλλιέργειας

Στην κυρίως καλλιέργεια προστέθηκε ως μοναδική πηγή άνθρακα βιομηχανική γλυκερόλη καθαρότητας 88% σε συγκέντρωση 50 g/L 90 g/L και 110 g/L αντίστοιχα. Σαν μορφή πηγής αζώτου, προστέθηκαν 1 g/L yeast extract και 2 g/L πεπτόνη. Το σύνολο των ζυμώσεων πραγματοποιήθηκε υπό

περιοριστικές σε άζωτο συνθήκες, προκειμένου να οδηγηθεί ο μεταβολισμός των μικροοργανισμών στην παραγωγή λιπιδίων. Τέλος έγινε η προσθήκη των παρακάτω αλάτων:

Πίνακας 2: Στον πίνακα αυτόν παρουσιάζεται η σύσταση μεταλλικών αλάτων (Papanikolaou et al., 2001).

<u>Άλας</u>	<u>Συγκέντρωση (g/L)</u>
<u>MnSO₄*H₂O</u>	0,06
<u>MgSO₄*7H₂O</u>	1,5
<u>ZnSO₄*7H₂O</u>	0,02
<u>CaCl₂*6H₂O</u>	0,15
<u>FeCl₃*6H₂O</u>	0,15
<u>KH₂PO₄</u>	7
<u>Na₂HPO₄</u>	2,5

Αφού έγινε η προσθήκη όλων των συστατικών και του απιονισμένου νερού έως τον επιθυμητό όγκο, πραγματοποιήθηκε μοίρασμα της καλλιέργειας σε κωνικές φιάλες των 250 mL κατά το 1/5 του όγκου τους (50±1 mL). Στην συνέχεια οδηγήθηκαν οι κωνικές φιάλες για αποστείρωση σε αυτόκλειστο και αμέσως μετά εμβολιάστηκαν με 1 mL από την προκαλλιέργεια υπό ασηπτικές συνθήκες και τέλος τοποθετήθηκαν σε ανακινούμενο επωαστικό θάλαμο, σε σταθερές συνθήκες ανάδευσης 180±5 rpm και θερμοκρασία στους 28±1 °C.

Καθ' όλη την διάρκεια του πειράματος το pH είχε τιμή 6±0.2.

2.3:Αναλύσεις

2.3.1:Προσδιορισμός βιομάζας

Για να πραγματοποιηθεί ο προσδιορισμός της βιομάζας πάρθηκε δείγμα από την καλλιέργεια το οποίο οδηγούταν προς φυγοκέντρηση (9.000 rpm, 10 min, 4°C) και συγκεκριμένα σε φυγόκεντρο τύπου Hettich universal 320 (Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Germany) για να διαχωριστεί η βιομάζα από το υπερκείμενο υγρό. Μετά από έκπλυση με απιονισμένο νερό, ακολούθησε δεύτερη φυγοκέντρηση στις ίδιες συνθήκες. Στη συνέχεια, η νωπή βιομάζα μεταφέρεται σε προζυγισμένα φιαλίδια McCartney, τα οποία τοποθετούνται σε φούρνο τύπου Gallenkamp oven BS OV-160 προς ξήρανση στους 70°C για 72 ώρες. Τέλος, μετά την ξήρανση, το φιαλίδιο ζυγίζεται σε αναλυτικό ζυγό τύπου KERN EW 420-3NM και από την διαφορά του βάρους υπολογιζόταν η παραγόμενη βιομάζα εκφραζόμενη σε g/L.

2.3.2: Προσδιορισμός ενδοπολυσακχαριτών

Όσον αφορά την πραγματοποίηση του ποσοτικού προσδιορισμού των ενδοπολυσακχαριτών για όλες τις ζυμώσεις, πρέπει να ακολουθηθεί πιστά το πρωτόκολλο, το οποίο βασίζεται στους Liang et al., 2009. Αρχικά, πάρθηκε μικρή ποσότητα ξηρής βιομάζας 0.05g και τοποθετήθηκε σε δοκιμαστικό σωλήνα. Αμέσως μετά προστέθηκαν 10 mL υδροχλωρικού οξέος με συγκέντρωση HCl, 2M και ακολούθησε η υδρόλυση του σε υδατόλουτρο στους 80°C για 30 λεπτά. Μετά το πέρασμα των 30 λεπτών έγινε προσθήκη 10 mL υδροξειδίου του νατρίου NaOH 2M για να εξουδετερωθεί. Ακολουθεί, η διήθηση με διπλό διηθητικό χαρτί για να απομακρυνθεί η βιομάζα και το διήθημα να είναι πλέον διαυγές. Επιπλέον, για τον καθορισμό των ενδοπολυσακχαριτών χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος προσδιορισμού των αναγόντων σακχάρων με την βοήθεια της χρήσης του 3-5 δινιτροσαλικυλικού οξέος DNS (Miller, 1959). Εν συνεχεία προστέθηκαν 0.5 mL DNS και 0.5 mL διηθημένου δείγματος σε δοκιμαστικού σωλήνες και αναδεύτηκαν σε κυκλοαναμικτήρα vortex και ακολούθησε ο βρασμός του διαλύματος στους 100°C για 5 λεπτά. Αφού αφέθηκαν οι δοκιμαστικούς σωλήνες για να κρύνουν προστέθηκαν 5mL απιονισμένου νερού και αφού αναδεύτηκε το διάλυμα πραγματοποιήθηκε μέτρηση της απορρόφησης στα 540nm με την χρήση φασματόμετρου τύπου Hitachi U-2000 spectrophotometer.

2.3.3: Ποσοτικός προσδιορισμός γλυκερόλης

Αρχικά, ο ποσοτικός προσδιορισμός της γλυκερόλης σε όλες τις ζυμώσεις πραγματοποιήθηκε μέσω υγρής χρωματογραφίας HPLC. Ως διαλύτης χρησιμοποιήθηκε υδατικό διάλυμα θειικού οξέος (H₂SO₄)

συγκέντρωσης 10mM, με ρυθμό ροής στη στήλη 0.5 mL/min. Η θερμοκρασία λειτουργίας της στήλης είναι ρυθμισμένη στους 60°C ενώ ο χρόνος ανάλυσης ενός δείγματος είναι 31 λεπτά. Η χρησιμοποιούμενη στήλη για την τεχνική αυτή είναι τύπου Rezex™ ROA-Organic Acid H+(8%) διαστάσεων 300 x 7.8mm.

2.3.4: Ποσοτικός προσδιορισμός ενδοκυτταρικού λίπους

Το φιαλίδιο McCartney μέσα στο οποίο βρίσκεται η ξηρή βιομάζα συμπληρώνεται με μίγμα διαλυτών χλωροφορμίου/μεθανόλης με αναλογία CHCl₃/CH₃OH 2:1 (Folch et al., 1957;Papanikolaou et al., 2001). Εν 'συνεχεία το φιαλίδιο αυτό διατηρείται αεροστεγώς κλειστό, χωρίς την έκθεσή του σε φως για να μην γίνει οξείδωση των λιπαρών οξέων του λίπους τουλάχιστον για 72 ώρες για να πραγματοποιηθεί η εκχύλιση του λίπους.

Για την απομάκρυνση, των διαλυτών χρησιμοποιείται η τεχνική της εξάτμισης σε περιστροφικό εξατμιστήρα τύπου Rotavapor R-114 BUCHI. Το διήθημα που προκύπτει μεταφέρεται σε προζυγισμένη (σε αναλυτικό ζυγό τύπου KERN EW420-3NM) φιάλη εξάτμισης και τοποθετείται στον περιστροφικό εξατμιστήρα. Ακολουθεί μέτρηση της μάζας της φιάλης όπου από τη διαφορά σε σχέση με την κενή φιάλη εξάτμισης υπολογίζεται το ενδοκυτταρικό λίπος σε g/L.

2.3.5: Μεθυλεστερποίηση

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

Έπειτα στις σφαιρικές φιάλες που έχουν ληφθεί από το προηγούμενο στάδιο, τοποθετήθηκαν μέσα σε αυτές μία έως δύο πέτρες βρασμού και 10 ml μεθοξειδίου του νατρίου. Ακολουθεί ο βρασμός του

δείγματος για 20 λεπτά με την τοποθέτηση κάθετου ψυκτήρα και με την ολοκλήρωση του εντάσσεται υδροχλωρική μεθανόλη έως ότου να εξαλειφθεί το χρώμα από το δείγμα και ακολουθείται πάλι βρασμός για 20 λεπτά. Αφού ολοκληρώθηκε και ο δεύτερος βρασμός χρησιμοποιείται νερό έτσι ώστε η αντίδραση να σταματήσει. Στην συνέχεια το μίγμα τοποθετείται σε διαχωριστικές χοάνες και προστίθεται σε αυτό 6 ml εξάνιο. Αφού αναδευτεί πολύ καλά και αφηθεί για λίγα λεπτά μπορεί να πραγματοποιηθεί ο διαχωρισμός των δύο φάσεων. Η υδατική τελική φάση, πετάγεται και συλλέγεται μόνον η πάνω φάση στην οποία περιλαμβάνονται οι μεθυλεστέρες σε φιαλίδιο που περιέχει άνυδρο θεικού νατρίου Na_2SO_4 για να μην υπάρχει υγρασία. Το δείγμα στην συνέχεια οδειγείται στον αέριο χρωματογράφο για ανάλυση.

2.3.6: Ανάλυση στον αέριο χρωματογράφο (GC)

Για την μεθυλεστεροποίηση των λιπαρών οξέων χρησιμοποιήθηκε ο αέριος χρωματογράφος Fisons GC8000 ο οποίος είναι εξοπλισμένος με τριχοειδή στήλη CPWAX 52 CB μήκους 30 m και με ανιχνευτή FID (Flame ionization detector). Το He χρησιμοποιήθηκε ως φέρον αέριο με ροή 2 mL/min (25°C). Η κάθε ανάλυση διήρκεσε 25 λεπτά και η ταυτοποίηση των κορυφών λιπαρών οξέων πραγματοποιήθηκε με την βοήθεια πρότυπων μεθυλεστερών των βασικότερων λιπαρών οξέων αντιστοιχίζοντας τους χρόνους κατακράτησης τους (t_R). Τέλος το ποσοστό του κάθε λιπαρού οξέως υπολογίστηκε με βάση το εμβαδό της κάθε κορυφής στα χρωματογραφήματα με την χρήση του παρακάτω τύπου

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

Κεφάλαιο 3: Αποτελέσματα

3:Αποτελέσματα

Σε αυτή την ενότητα παρατίθενται όλα τα πειραματικά αποτελέσματα, τα οποία συλλέχθηκαν από την μελέτη της κινητικής όλων των ζυμώσεων, καθώς και τα πειραματικά αποτελέσματα από τις διάφορες αναλύσεις που πραγματοποιήθηκαν.

Αναλυτικότερα τα δεδομένα τα οποία ερευνήθηκαν για κάθε ζύμωση είναι τα εξής: παραγωγή βιομάζας, παραγωγή ενδοπολυσακχαριτών, κατανάλωση υποστρώματος, παραγωγή μικροβιακού λίπους, ποιοτικός προσδιορισμός λιπαρών οξέων. Οι παράμετροι που υπολογίστηκαν σχετικά με την μικροβιακή ανάπτυξη ήταν:

1. Το παραγόμενο λίπος ($Y_{L/x}$) ως προς την παραχθείσα βιομάζα (g/g).
2. Συντελεστής απόδοσης βιομάζας ($Y_{X/s}$) ως προς το καταναλωθέν υπόστρωμα (g/g).
3. Οι παραγόμενοι ενδοπολυσακχαρίτες ($Y_{IPS/x}$) ως προς την παραχθείσα βιομάζα (g/g).

Πραγματοποιήθηκαν εννέα ζυμώσεις με αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης 50 g/L, 90 g/L και 110 g/L με τα στελέχη *Rhodospiridium toruloides* NRRL Y-27010, NRRL Y-17902 και NRRL Y-6985, με σκοπό την μελέτη της δυνατότητας χρήσης της ακάθαρτης (απόβλητης) γλυκερόλης ως πηγής άνθρακα και ενέργειας για στελέχη αυτά τα οποία θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για την παραγωγή μεταβολικών προϊόντων τα οποία δύνανται να έχουν μεγάλο ενδιαφέρον για τη βιομηχανία τροφίμων, τη χημική βιομηχανία και τη βιομηχανία βιοκαυσίμων.

Τέλος, πραγματοποιήθηκε ποιοτικός προσδιορισμός των λιπαρών οξέων του παραγόμενου λίπους με την βοήθεια της αέριας χρωματογραφίας, καθώς και υπολογισμός του ποσοστού τους.

Παρακάτω παρουσιάζονται τα κινητικά δεδομένα που συλλέχθηκαν από τις ζυμώσεις βυθού των στελεχών *Rhodospiridium toruloides* με αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης 50 g/L.

Πίνακας 3: Ασυνεχής ζύμωση σε ανακινούμενες κωνικές φιάλες (180 ± 5 rpm), $T=28 \pm 1$ °C, αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης 50 g/L, $pH=6 \pm 0.2$ υπό αερόβιες και περιοριστικές σε άζωτο συνθήκες.

Ζύμωση		T (h)	X (g/L)	Glycerolcons (g/L)	L (g/L)	$Y_{X/S}$ (g/g)	$Y_{L/X}$ (g/g)	$Y_{IPS/X}$ (g/g)
<i>Rhodosporidium toruloides</i>	β	218	17,70	41,30	7,79	0,43	0,46	0,30
NRRL Y-27010	α, δ, γ	240	19,02	45,50	8,79	0,42	0,45	0,31
<i>Rhodosporidium toruloides</i>	α,β,γ,δ	240	18,24	46,70	8,57	0,39	0,47	0,32
NRRL Y-6985								
<i>Rhodosporidium toruloides</i>	α,β,γ,δ	240	19,06	46,60	8,91	0,41	0,47	0,33
NRRL Y-17902								

T (h): διάρκεια ζύμωσης.

X (g/L): βιομάζα.

Glycerolcons (g/L): καταναλωθέν υπόστρωμα.

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 παραχθείσα βιομάζα.

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

α=Το χρονικό σημείο με την μέγιστη παραγωγή βιομάζας (g/L).

β=Το χρονικό σημείο με το μέγιστο ποσοστό λίπους επί ξηρής βιομάζας (g/g).

γ= Το χρονικό σημείο με το μέγιστο ποσοστό ενδοπολυσακχαριτών επί ξηράς ουσίας (g/g).

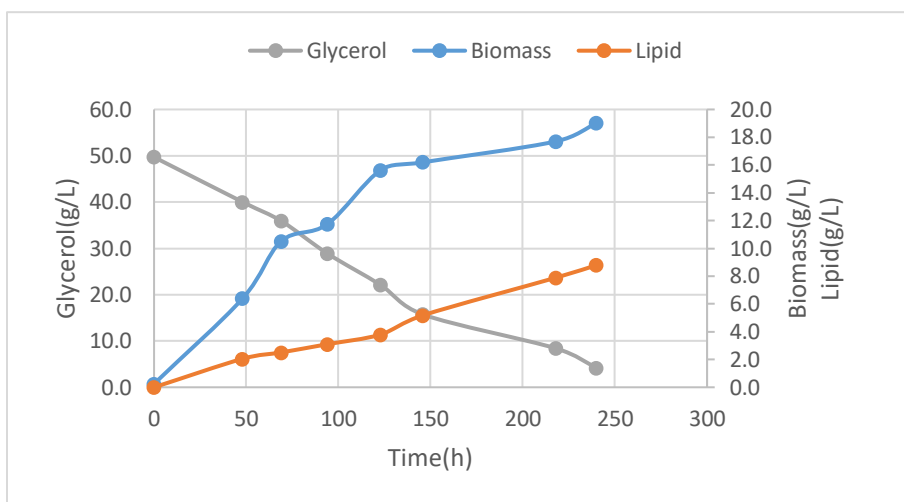
δ= Το χρονικό σημείο με την μέγιστη παραγωγή λίπους (g/L).

Από τον παραπάνω Πίνακα 2 προκύπτουν τα ακόλουθα:

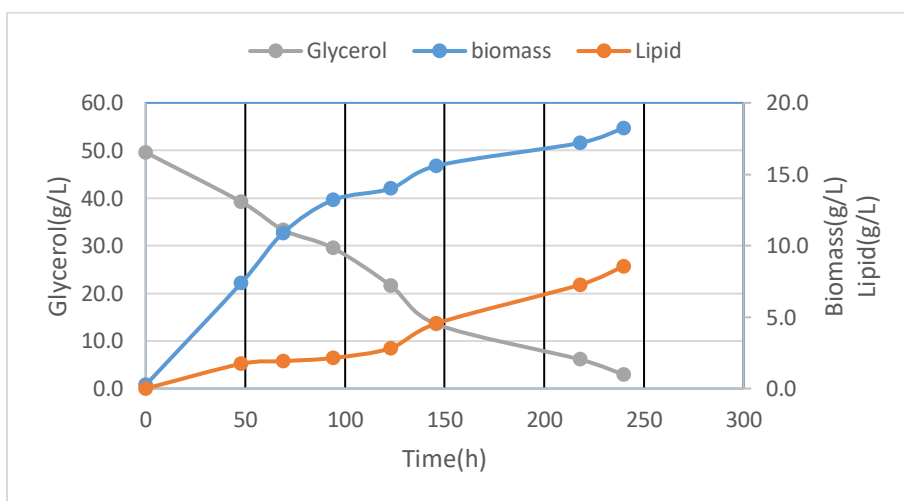
- Η μέγιστη παραγωγή λίπους ήταν στη ζύμωση του στελέχους *Rhodosporidium toruloides* NRRL Y-17902 η οποία είχε τιμή 8,91 g/L.
- Η μεγαλύτερη τιμή βιομάζας παρατηρήθηκε στην ζύμωση του στελέχους *Rhodosporidium toruloides* NRRL Y-17902, η οποία πλησίασε τα 19,06 g/L.

- Το μεγαλύτερο ποσοστό ενδοπολυσακχαριτών επί ξηράς ουσίας παρατηρήθηκε στη ζύμωση του στελέχους *Rhodosporidium toruloides* NRRL Y 17902, όπου είχε τιμή 0,33%.

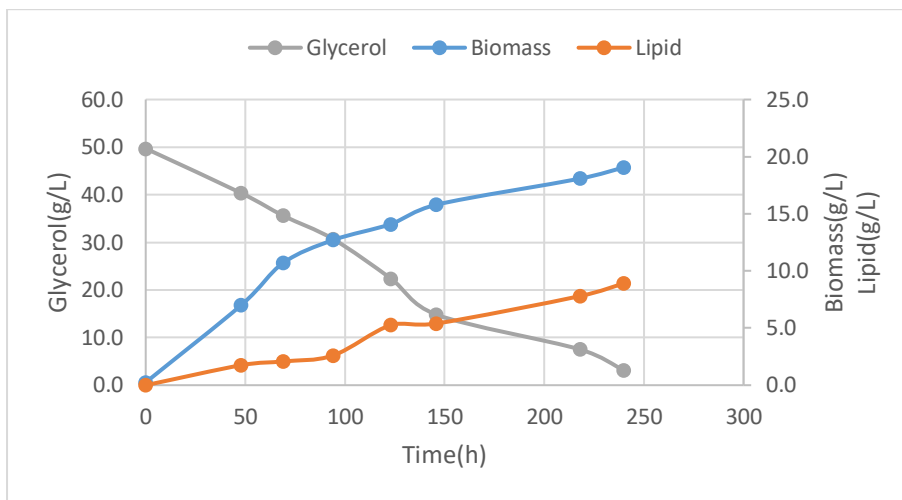
Ακολουθούν τα διαγράμματα της μεταβολής της βιομάζας, του αρχικού υποστρώματος και του μικροβιακού λίπους σε συνάρτηση με τον χρόνο ζύμωσης για τα τρία στελέχη.



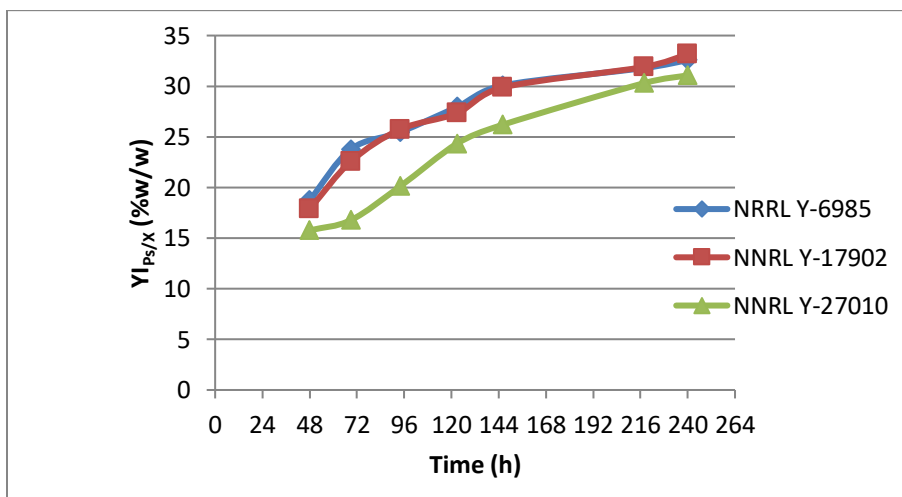
Γράφημα 1: Κινητικά δεδομένα για την μεταβολή της βιομάζας, του αρχικού υποστρώματος και την παραγωγή λίπους του μικροοργανισμού *Rhodosporidium toruloides* NRRL Y-27010 ως προς τον χρόνο, με αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης 50 g/L.



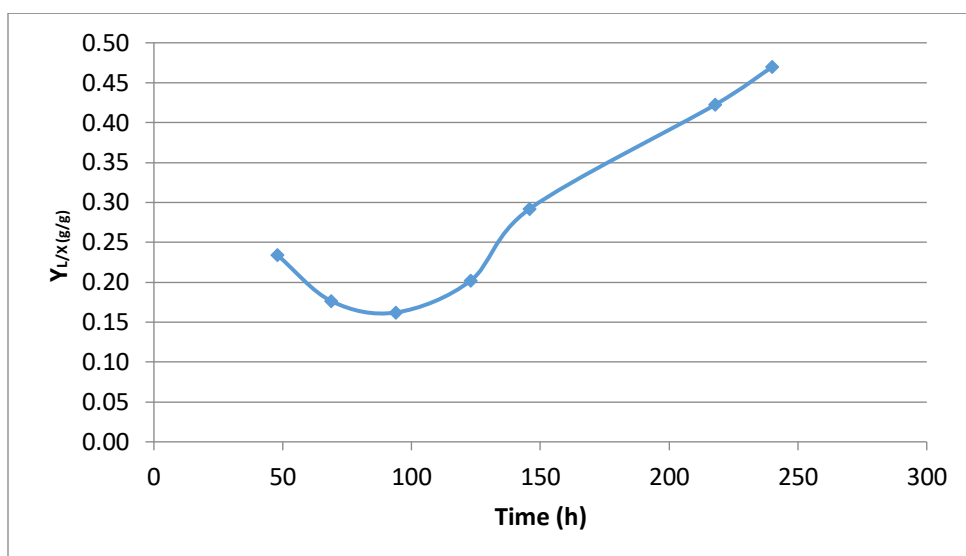
Γράφημα 2: Κινητικά δεδομένα για την μεταβολή της βιομάζας, του αρχικού υποστρώματος και την παραγωγή λίπους του *Rhodosporidium toruloides* NRRL Y-6985 ως προς τον χρόνο, με αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης 50 g/L.



Γράφημα 3: Κινητικά δεδομένα για την μεταβολή της βιομάζας, του αρχικού υποστρώματος και την παραγωγή λίπους του *Rhodosporidium toruloides* NRRL Y-17902 ως προς τον χρόνο, με αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης 50 g/L.



Γράφημα 4: Παραγωγική καμπύλη των πολυσακχαριτών ως προς την παραχθείσα βιομάζα σε συνάρτηση με τον χρόνο και για τα τρία στελέχη στα 50 g/L γλυκερόλης.



Γράφημα 5: Παραγωγική καμπύλη του παραγόμενου λίπους ως προς την παραχθείσα βιομάζα σε συνάρτηση με τον χρόνο για το στελεχος *Rhodosporidium toruloides* NRRL Y-6985.

Παρακάτω παρουσιάζονται τα κινητικά δεδομένα που συλλέχθηκαν από τις ζυμώσεις βυθού των στελεχών *Rhodosporidium toruloides* με αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης 90 g/L

Πίνακας 4: Ασυνεχής ζύμωση σε ανακινούμενες κωνικές φιάλες (180±5 grm), T=28±1 °C, με συγκέντρωση γλυκερόλης 90 g/L, pH=6±0.2 υπό αερόβιες και περιοριστικές σε άζωτο συνθήκες.

Ζύμωση		T (h)	X (g/L)	Glycerolcons (g/L)	L (g/L)	Y _{X/S} (g/g)	Y _{L/X} (g/g)	Y _{IPS/X} (g/g)
<i>Rhodosporidium toruloides</i> NRRL Y- 27010	α,β,γ,δ	264	23,44	70,42	11,12	0,33	0,47	0,35
<i>Rhodosporidium toruloides</i> NRRL Y- 6985	α,β,γ,δ	288	24,44	80,11	11,03	0,32	0,45	0,35

<i>Rhodosporidium toruloides</i> NRRL Y -17902	$\alpha, \beta, \gamma, \delta$	288	24,12	77,06	11,57	0,30	0,48	0,37
---	---	-----	-------	-------	--------------	------	-------------	-------------

T (h): διάρκεια ζύμωσης.

X (g/L): βιομάζα.

Glycerolcons (g/L): καταναλωθέν υπόστρωμα.

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 παραχθείσα βιομάζα.

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

α =Το χρονικό σημείο με την μέγιστη παραγωγή βιομάζας (g/L).

β = Το χρονικό σημείο με το μέγιστο ποσοστό λίπους επί ξηράς βιομάζας (g/g).

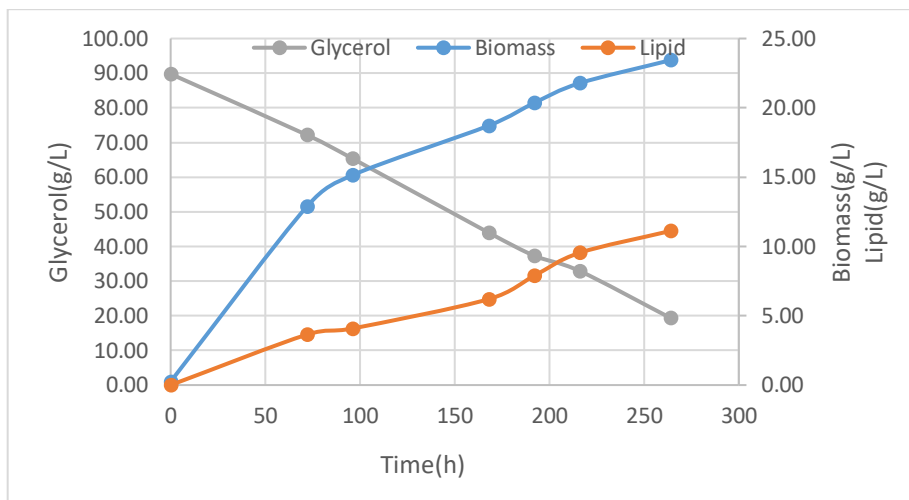
γ = Το χρονικό σημείο με το μέγιστο ποσοστό ενδοπολυσακχαριτών επί ξηράς ουσίας (g/g).

δ = Το χρονικό σημείο με την μέγιστη παραγωγή λίπους (g/L).

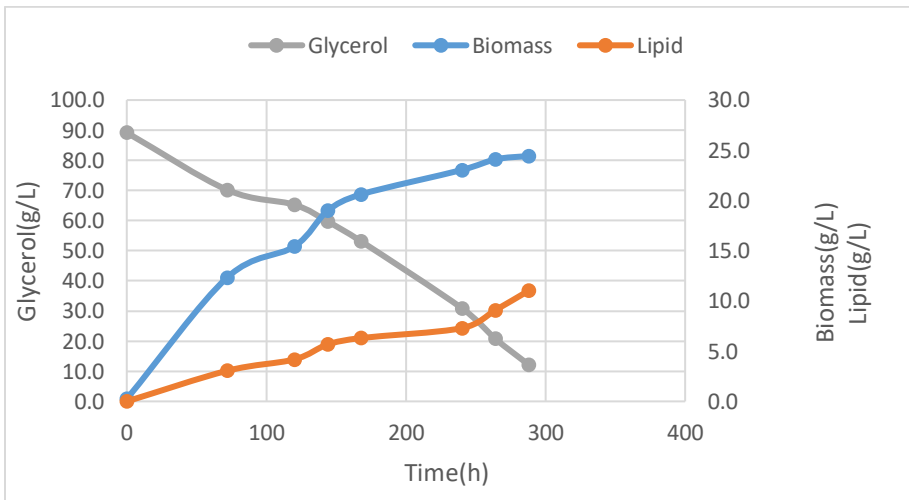
Από τον παραπάνω Πίνακα 3 προέρχονται τα ακόλουθα :

- Η μέγιστη παραγωγή λίπους ήταν στη ζύμωση του στελέχους *Rhodosporidium toruloides* NRRL Y- 17902 με τιμή 11,57 g/L.
- Η μεγαλύτερη τιμή βιομάζας ήταν στη ζύμωση του στελέχους *Rhodosporidium toruloides* NRRL Y- 6985, με τιμή 24,44 g/L.
- Το μεγαλύτερο ποσοστό ενδοπολυσακχαριτών επί ξηράς ουσίας βρέθηκε στη ζύμωση του στελέχους *Rhodosporidium toruloides* NRRL Y- 17902, με τιμή 0,37 % g/g.

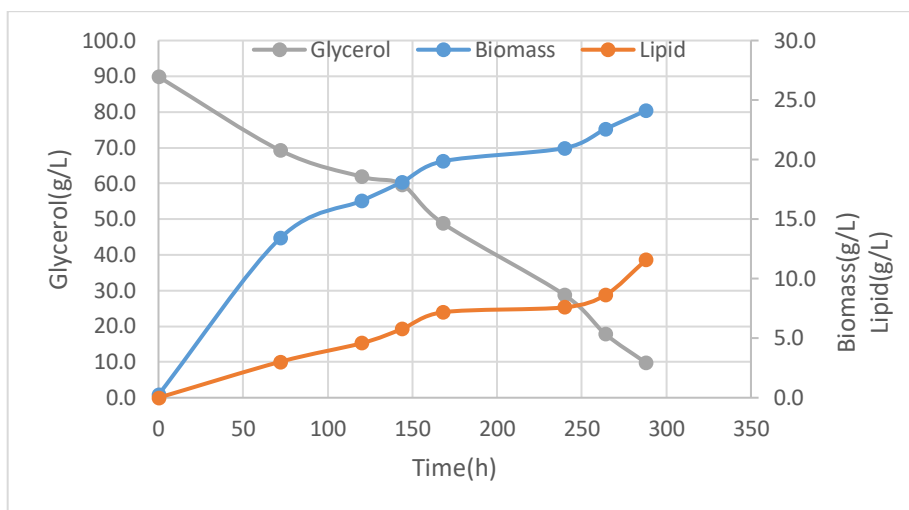
Ακολουθούν τα διαγράμματα της μεταβολής της βιομάζας, του αρχικού υποστρώματος και της μεταβολής του μικροβιακού λίπους σε συνάρτηση με τον χρόνο για τις ζυμώσεις βυθού, που πραγματοποιήθηκαν στα 90 g/L γλυκερόλης.



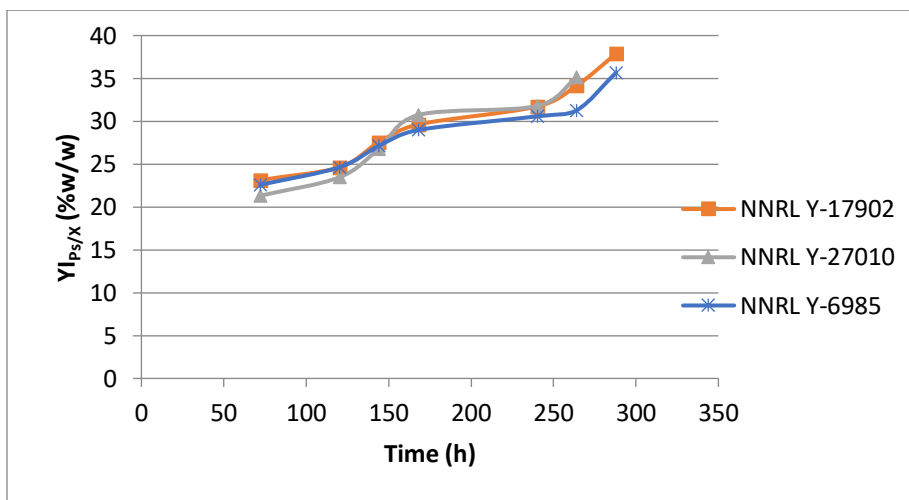
Γράφημα 6: Κινητικά δεδομένα για την μεταβολή της βιομάζας, του αρχικού υποστρώματος και την παραγωγή λίπους του *Rhodosporidium toruloides* NRRL Y 27010 ως προς τον χρόνο, στα 90 g/L γλυκερόλης.



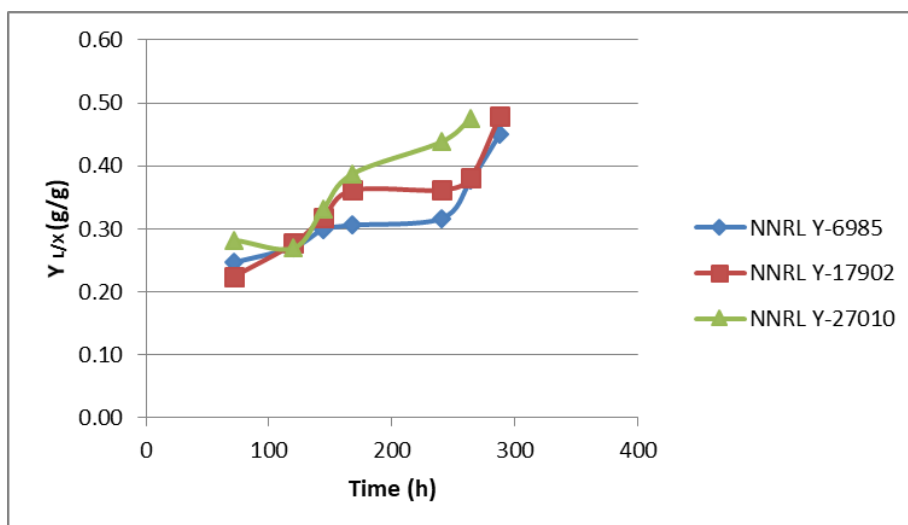
Γράφημα 7: Κινητικά δεδομένα για την μεταβολή της βιομάζας, του αρχικού υποστρώματος και την παραγωγή λίπους του *Rhodosporidium toruloides* NRRL Y 6985 ως προς τον χρόνο, στα 90 g/L γλυκερόλης.



Γράφημα 8: Κινητικά δεδομένα για την μεταβολή της βιομάζας, του αρχικού υποστρώματος και την παραγωγή λίπους του *Rhodosporidium toruloides* NRRL Y 17902 ως προς τον χρόνο, στα 90 g/L γλυκερόλης.



Γράφημα 9: Παραγωγική καμπύλη των πολυσακχαριτών ως προς την παραχθείσα βιομάζα σε συνάρτηση με τον χρόνο και για τα τρία στελέχη στα 90 g/L γλυκερόλης.



Γράφημα 10: Παραγωγική καμπύλη του παραγόμενου λίπους ως προς την παραχθείσα βιομάζα σε συνάρτηση με τον χρόνο και για τα τρία στελέχη στα 90 g/L γλυκερόλης.

Παρακάτω παρουσιάζονται τα κινητικά δεδομένα που συλλέχθηκαν από τις ζυμώσεις βυθού των στελεχών *Rhodospiridium toruloides* με συγκέντρωση γλυκερόλης 110 g/L.

Πίνακας 5: Ασυνεχής ζύμωση σε ανακινούμενες κωνικές φιάλες (180±5 gpm), T=28±1 °C, με συγκέντρωση γλυκερόλης 110 g/L, pH=6±0.2 υπό αερόβιες και περιοριστικές σε άζωτο συνθήκες.

Ζύμωση		T (h)	X (g/L)	Glycerolcons (g/L)	L (g/L)	Y _{X/S} (g/g)	Y _{L/X} (g/g)	Y _{IPS/X} (g/g)
<i>Rhodospiridium toruloides</i> NRRL Y - 27010	α,β,γ,δ	336	29,28	89,00	12,59	0,33	0,44	0,40
<i>Rhodospiridium toruloides</i> NRRL Y - 6985	α,β,γ,δ	336	29,08	90,86	12,56	0,32	0,43	0,41
<i>Rhodospiridium toruloides</i> NRRL Y - 17902	α	312	28,84	81,76	10,34	0,35	0,36	0,37
	β, δ	336	28,20	91,02	12,31	0,31	0,44	0,40

T (h): διάρκεια ζύμωσης.

X (g/L): βιομάζα.

Glycerolcons (g/L): καταναλωθέν υπόστρωμα.

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 παραχθείσα βιομάζα.

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

α= Το χρονικό σημείο με την μέγιστη παραγωγή βιομάζας (g/L).

β= Το χρονικό σημείο με το μέγιστο ποσοστό λίπους επί ξηρής βιομάζας (g/g).

γ= Το χρονικό σημείο με το μέγιστο ποσοστό ενδοπολυσακχαριτών επί ξηράς ουσίας (g/g).

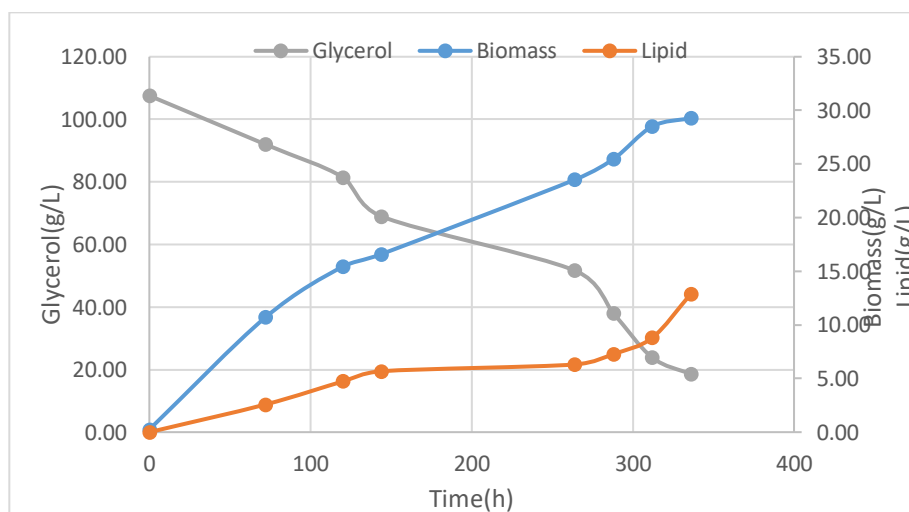
δ= Το χρονικό σημείο με την μέγιστη παραγωγή λίπους (g/L).

Από τον παραπάνω Πίνακα 4 προκύπτουν τα ακόλουθα :

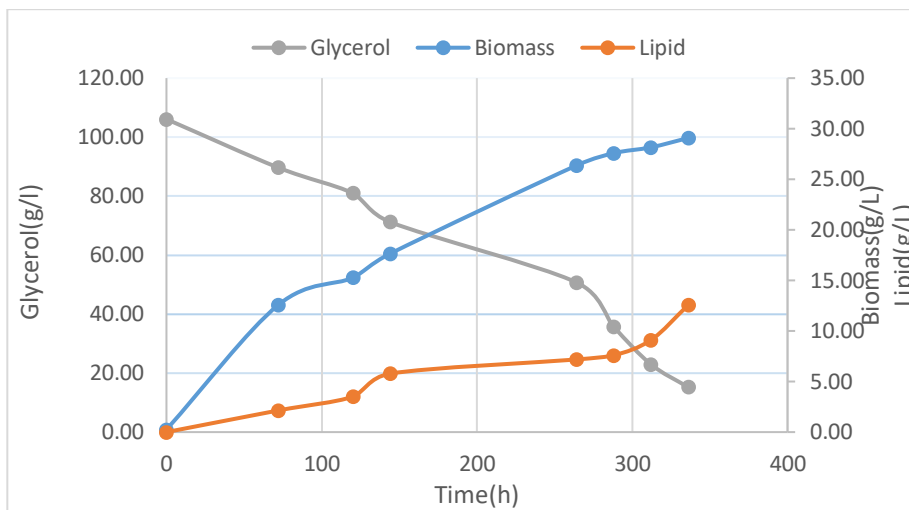
- Η μεγαλύτερη παραγωγή λίπους ήταν στη ζύμωση του στελέχους *Rhodospiridium toruloides* NRRL Y- 27010 με τιμή 12,59 g/L.

- Η μέγιστη τιμή βιομάζας βρέθηκε στη ζύμωση του στελέχους *Rhodosporidium toruloides* NRRL Y-27010, με τιμή 29,28 g/L.
- Το μέγιστο ποσοστό ενδοπολυσακχαριτών επί ξηράς ουσίας ήταν στη ζύμωση του στελέχους *Rhodosporidium toruloides* NRRL Y-6985, με τιμή 0,41 % g/g.

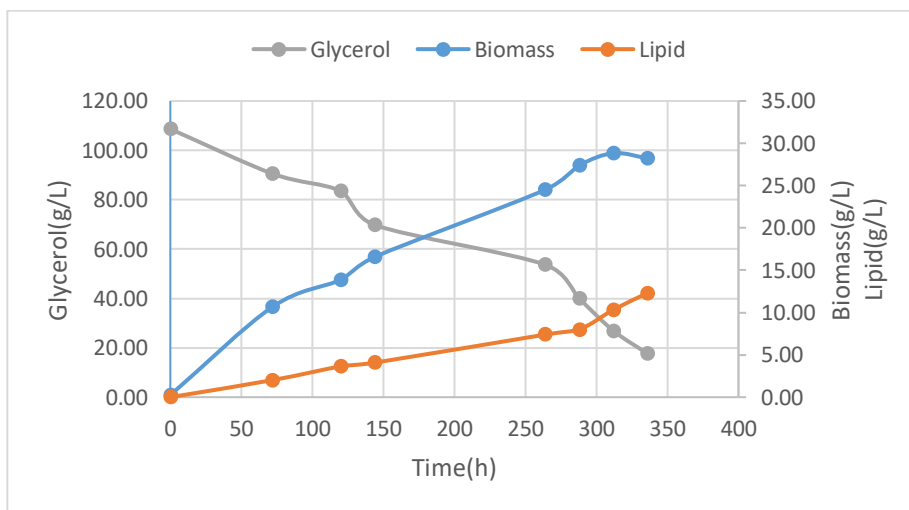
Ακολουθούν τα διαγράμματα της μεταβολής της βιομάζας, του αρχικού υποστρώματος και της μεταβολής του μικροβιακού λίπους σε συνάρτηση με τον χρόνο για τις ζυμώσεις βυθού, που πραγματοποιήθηκαν στα 110 g/L γλυκερόλης.



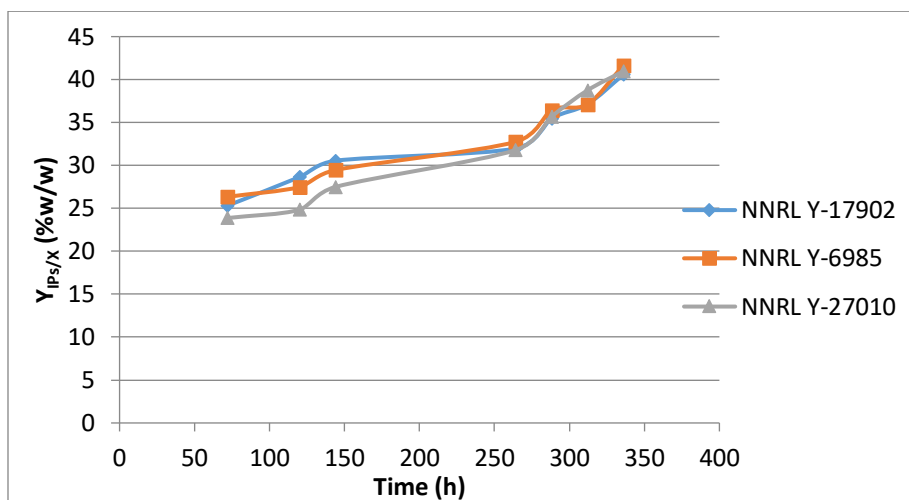
Γράφημα 11: Κινητικά δεδομένα για την μεταβολή της βιομάζας, του αρχικού υποστρώματος και την παραγωγή λίπους του *Rhodosporidium toruloides* NRRL Y 27010 ως προς τον χρόνο, στα 110 g/L γλυκερόλης.



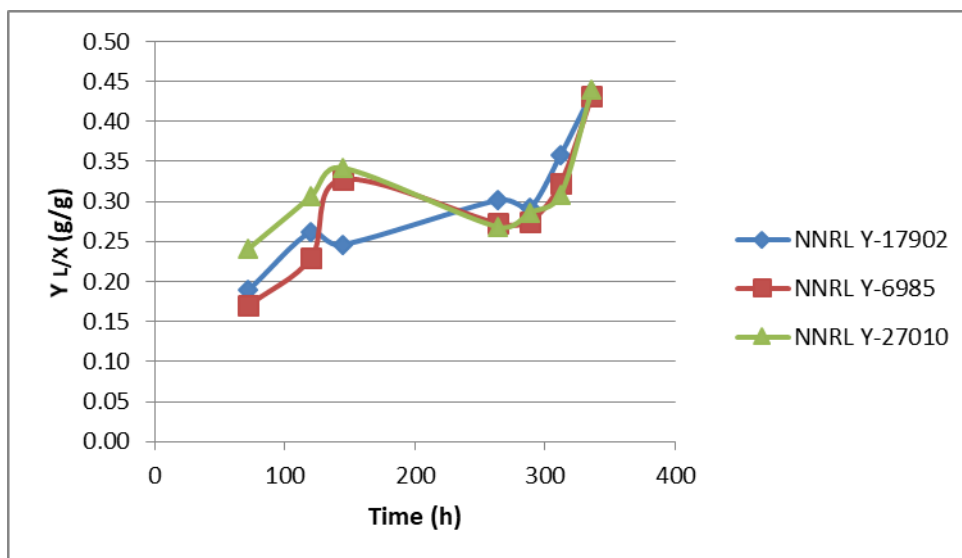
Γράφημα 12: Κινητικά δεδομένα για την μεταβολή της βιομάζας, του αρχικού υποστρώματος και την παραγωγή λίπους του *Rhodosporidium toruloides* NRRL Y 6985 ως προς τον χρόνο, στα 110 g/L γλυκερόλης.



Γράφημα 13: Κινητικά δεδομένα για την μεταβολή της βιομάζας, του αρχικού υποστρώματος και την παραγωγή λίπους του *Rhodosporidium toruloides* NRRL Y 17902 ως προς τον χρόνο, στα 110 g/L γλυκερόλης.



Γράφημα 14: Παραγωγική καμπύλη των πολυσακχαριτών ως προς την παραχθείσα βιομάζα σε συνάρτηση με τον χρόνο και για τα τρία στελέχη στα 110 g/L γλυκερόλης.



Γράφημα 15: Παραγωγική καμπύλη παραγόμενου λίπους ως προς την παραχθείσα βιομάζα σε συνάρτηση με τον χρόνο και για τα τρία στελέχη στα 110 g/L γλυκερόλης.

Το μικροβιακό λίπος το οποίο προέρχεται και από τα τρία στελέχη της ζύμης *Rhodosporidium toruloides* βρέθηκε με την χρήση της αέριας χρωματογραφίας ότι αποτελείται από τα ακόλουθα λιπαρά οξέα: μυριστικό οξύ (C14:0), παλμιτικό οξύ (C16:0), παλμιτελαικό οξύ (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).

Πίνακας 6: Ασυνεχής ζύμωση σε ανακινούμενες κωνικές φιάλες (180±5 g), T=28±1 °C, αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης 50 g/L, pH=6,0±0,2 υπό αερόβιες και περιοριστικές σε άζωτο συνθήκες.

Ζύμωση 50 g/L Glycerol	t (h)	C14:0	C16:0	C16:1	C18:0	^{Δ9}C18:1	^{Δ9,12}C18:2	^{Δ9,12,15}C18:3
<i>Rhodospiridium toruloides</i> NRRL Y- 27010	123	2,2	39,9	-	13,5	42,8	1,6	-
<i>Rhodospiridium toruloides</i> NRRL Y - 6985	123	-	30,1	10,3	2,6	54,2	2	0,8
<i>Rhodospiridium toruloides</i> NRRL Y - 17902	123	-	31,2	9,8	2,7	54,5	1,3	0,5

C 14:0: Μυριστικό οξύ
C16:1: Παλμιτελαϊκό οξύ
C 16:0: Παλμιτικό οξύ
C 18:0: Στεατικό οξύ
^{Δ9}C 18:1: Ελαϊκό οξύ
^{Δ9,12} C 18:2: Λινελαϊκό οξύ
^{Δ9,12,15} C 18:3(n-3): α-λινολενικό οξύ

Από τον πίνακα 5 προκύπτουν τα εξής συμπεράσματα :

- Επικρατέστερο όλων των ζυμώσεων είναι το ελαϊκό λιπαρό οξύ (Δ^9 C18:1) με τιμές από 42,8-54,5 %.
- Εν συνεχεία βρίσκεται το παλμιτικό οξύ (C16:0) το οποίο κυμαίνεται απο 30,1-39,9 %, στεατικό οξύ (C18:0) σε ποσοστό 2,6-13,5%,, λινελαϊκό οξύ ($\Delta^{9,12}$ C18:2) το οποίο κυμαίνεται απο 1,3-2% και τέλος το α -λινολενικό οξύ ($\Delta^{9,12,15}$ C18:3) σε ποσοστό 0,5-0,8%.
- Δεν μεταβάλλεται ιδιαίτερα η ποσοστιαία κατανομή των λιπαρών οξέων κατά την διάρκεια των ζυμώσεων.
- Λίπος με περιεκτικότητα σε ελαϊκό οξύ μεγαλύτερη του 50% είναι κατάλληλο για παραγωγή βιοντίζελ.

Πίνακας 7: Ασυνεχής ζύμωση σε ανακινούμενες κωνικές φιάλες (180±5 grm), T=28±1 °C, αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης 90 g/L, pH=6,0±0,2 υπό αερόβιες και περιοριστικές σε άζωτο συνθήκες.

Ζύμωση								
90 g/L	t (h)	C14:0	C16:0	C16:1	C18:0	Δ^9C18:1	$\Delta^{9,12}$C18:2	$\Delta^{9,12,15}$C18:3
Glycerol								
<i>Rhodosporidium toruloides</i> NRRL Y- 27010	96	2,1	25,3	-	11,1	51,5	6,7	3,3
<i>Rhodosporidium toruloides</i> NRRL Y- 6985	120	-	28,8	11,9	2,1	54,8	2,1	0,3

<i>Rhodospiridium toruloides</i> NRRL Y- 17902	120	-	18,9	10,6	2,3	53,8	4,1	0,3
--	------------	---	------	------	-----	------	-----	-----

C 14:0: Μυριστικό οξύ

C16:1: Παλμιτελαϊκό οξύ

C 16:0: Παλμιτικό οξύ

C 18:0: Στεατικό οξύ

^{Δ9}C 18:1: Ελαϊκό οξύ

^{Δ9,12} C 18:2: Λινελαϊκό οξύ

^{Δ9,12,15} C 18:3(n-3): α-λινολενικό οξύ

- Επικρατέστερο λιπαρό οξύ σύμφωνα με τον παραπάνω πίνακα είναι το ελαϊκό οξύ (^{Δ9}C18:1) σε ποσοστό 51,5-54,8%.
- Αμέσως μετά ακολουθεί το παλμιτικό οξύ (C16:0) σε ποσοστό 18,9-28,8 %, στεατικό οξύ (C18:0) σε ποσοστό 2,1-11,1%, λινελαϊκό οξύ (^{Δ9,12} C18:2) το οποίο κυμαίνεται απο 2,1-6,7% και τέλος το α-λινολενικό οξύ (^{Δ9,12,15} C18:3) σε ποσοστό 0,3-3,3%.
- Δεν μεταβάλλεται ιδιαίτερα η ποσοστιαία κατανομή των λιπαρών οξέων κατά την διάρκεια των ζυμώσεων
- Λίπος με περιεκτικότητα σε ελαϊκό οξύ μεγαλύτερη του 50% είναι κατάλληλο για παραγωγή βιοντίζελ

Πίνακας 8: Ασυνεχής ζύμωση σε ανακινούμενες κωνικές φιάλες (180±5 grm), T=28±1 °C, αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης 110 g/L, pH=6,0±0,2 υπό αερόβιες και περιοριστικές σε άζωτο συνθήκες.

Ζύμωση 110 g/L Glycerol	t (h)	C14:0	C16:0	C16:1	C18:0	Δ^9C18:1	$\Delta^{9,12}$C18:2	$\Delta^{9,12,15}$C18:3
<i>Rhodospiridium toruloides</i> NRRL Y- 27010	120	2,1	26,3	-	11	49,8	5,4	5,4
<i>Rhodospiridium toruloides</i> NRRL Y- 6985	120	-	27	10,9	3,1	55,2	3,1	0,7
<i>Rhodospiridium toruloides</i> NRRL Y- 17902	120	-	32,6	11,2	2,9	52,3	0,3	0,7

C 14:0: Μυριστικό οξύ

C16:1: Παλμιτελαϊκό οξύ

C 16:0: Παλμιτικό οξύ

C 18:0: Στεατικό οξύ

Δ^9 C 18:1: Ελαϊκό οξύ

$\Delta^{9,12}$ C 18:2: Λινελαϊκό οξύ

$\Delta^{9,12,15}$ C 18:3(n-3): α -λινολενικό οξύ

- Επικρατέστερο λιπαρό οξύ σύμφωνα με τον παραπάνω πίνακα είναι το ελαϊκό οξύ(Δ^9 C18:1) σε ποσοστό 49,8-55,2%.

- Αμέσως μετά το παλμιτικό οξύ (C16:0) που κυμαίνεται από 26,3-32,6 %, το στεατικό οξύ (C18:0) το οποίο κυμαίνεται από 2,9-11%, το λινελαϊκό οξύ (^{Δ9,12} C18:2) με τιμή 0,3-5,4% και τέλος το α-λινολενικό οξύ (^{Δ9,12,15} C18:3) σε ποσοστό 0,7-5,4%.

- Δεν μεταβάλλεται ιδιαίτερα η ποσοστιαία κατανομή των λιπαρών οξέων κατά την διάρκεια των ζυμώσεων

- Λίπος με περιεκτικότητα σε ελαϊκό οξύ μεγαλύτερη του 50% είναι κατάλληλο για παραγωγή βιοντήζελ.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

4:Συζήτηση-Συμπεράσματα

Η ακάθαρτη-βιομηχανική γλυκερόλη όπως έχει προαναφερθεί αποτελεί μια σημαντική εκροή (υπόλειμμα) ποικίλων βιομηχανικών διεργασιών (όπως τούτων της παραγωγής βιολογικού πετρελαίου - βιοντήζελ, σαπώνων, αλκοολούχων ποτών, βιοαιθανόλης, κλπ) ο όγκος της οποίας παρουσιάζει συνεχή αύξηση τα τελευταία χρόνια. Ο σκοπός της παρούσας ερευνητικής προσπάθειας αναφέρεται στη δυνατότητα χρήσης της ακάθαρτης (απόβλητης) γλυκερόλης ως πηγής άνθρακα και ενέργειας για από στελέχη της ζύμης *Rhodospiridium toruloides* τα οποία θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για την παραγωγή μεταβολικών προϊόντων τα οποία δύνανται να έχουν μεγάλο ενδιαφέρον για τη βιομηχανία τροφίμων, τη χημική βιομηχανία και τη βιομηχανία βιοκαυσίμων.

Στις ασυνεχείς ζυμώσεις βυθού των στελεχών *Rhodospiridium toruloides* NRRL Y- 27010, Y-6985 και Y-17902 η μέγιστη παράγωγή λίπους ήταν στη ζύμωση με 110 g/L ακάθαρτης γλυκερόλης και συγκεκριμένα το στέλεχος *Rhodospiridium toruloides* 27010 (12,59 g/L) όντας ελάχιστα μεγαλύτερη από τα άλλα στελέχη όπου το *Rhodospiridium toruloides* Y 17902 είχε μέγιστη τιμή λίπους 12,31 g/L και το στέλεχος *Rhodospiridium toruloides* Y-6985 είχε μέγιστη τιμή λίπους 12,56 g/L. Επιπλέον στις ασυνεχείς ζυμώσεις βυθού των στελεχών *Rhodospiridium toruloides* NRRL Y- 27010, Y-6985, Y-17902 η μέγιστη παραγωγή βιομάζας ήταν στη ζύμωση με 110 g/L ακάθαρτης γλυκερόλης και συγκεκριμένα το στέλεχος *Rhodospiridium toruloides* 27010 όπου η μέγιστη τιμή βιομάζας έφτασε τα 29,28g/L όντας ελάχιστα μεγαλύτερη από τα άλλα στελέχη όπου το *Rhodospiridium toruloides* NRRL Y- 17902 είχε μέγιστη τιμή βιομάζας 28,84 g/L και το στέλεχος *Rhodospiridium toruloides* Y-6985 είχε μέγιστη τιμή βιομάζας 29,08.

Στον πίνακα 9 γίνεται σύγκριση των αποτελεσμάτων (παραγωγής βιομάζας και μικροβιακού λίπους) από την ζύμη *Rhodospiridium toruloides* της παρούσας μελέτης με δημοσιευμένα αποτελέσματα άλλων μελετών με μοναδική πηγή άνθρακα την γλυκερόλη.

Πίνακας 9: Παραγωγή λιπιδίων και βιομάζας από την ζύμη *Rhodospiridium toruloides* με μοναδική πηγή άνθρακα την γλυκερόλη προσαρμοσμένο από Diamantopoulou et al., (2020).

Στέλεχος	Υπόστρωμα	Τύπος ζύμωσης	X (g/L)	Y _{L/X} (% w/w)	Αναφορές
<i>Rhodospiridium toruloides</i> AS2.1389	Glycerol	Shake flasks	19,2	47,7	Xu et al., 2012
<i>Rhodospiridium toruloides</i> AS2.1389	Glycerol	Batch bioreactor	26,7	69,5	Xu et al., 2012
<i>Rhodospiridium toruloides</i> DSM 4444	Crude glycerol	Fed-batch bioreactor	41,0	60,0	Signori et al., 2016
<i>Rhodospiridium toruloides</i> DSM 4444	Pure glycerol	Fed-batch bioreactor	40,4	60,9	Signori et al., 2016
<i>Rhodospiridium toruloides</i> NRRL Y-27010	Crude glycerol	Shake flasks	30,1	40,0	Tchakouteu et al., 2015
<i>Rhodospiridium toruloides</i> Y4	Crude glycerol	Shake flasks	24,9	48,9	Yang et al., 2014
<i>Rhodospiridium toruloides</i> Y4	Pure glycerol	Shake flasks	21,1	40,3	Yang et al., 2014
<i>Rhodospiridium toruloides</i> ATCC 10788	Pure glycerol	Shake flasks	10,3	34,0	Uprety et al., 2017
<i>Rhodospiridium toruloides</i> ATCC 10788	Crude glycerol	Shake flasks	21,2	53,3	Uprety et al., 2017
<i>Rhodospiridium toruloides</i> DSM 4444	Crude glycerol	Fed-batch bioreactor	37,4	51,3	Leiva-Candia et al., 2015
<i>Rhodospiridium toruloides</i> DSM 4444	Crude glycerol	Shake flasks	27,9	29,0	Leiva-Candia et al., 2015
<i>Rhodospiridium toruloides</i> NRRL Y-27012	Crude glycerol	Shake flasks	30,1	40,0	Tchakouteu et al., 2015
<i>Rhodospiridium toruloides</i> Y4	Crude glycerol	Batch bioreactor	35,3	46,0	Uckun Kiran, Trzcinski and

<i>Rhodospiridium toruloides</i> AS2.1389	Crude glycerol	Shake flasks	19.2	47.7	Xu et al., 2012
<i>Rhodospiridium toruloides</i> AS2.1389	Crude glycerol	Batch bioreactor	26.7	69.5	Xu et al., 2012
<i>Rhodospiridium toruloides</i> DSM 4444	Crude glycerol	Shake flasks	12,7	38,6	Diamantopoulou et al., 2020
<i>Rhodospiridium toruloides</i> DSM 4444	Crude glycerol	Shake flasks	28,9	43,3	Diamantopoulou et al., 2020
<i>Rhodospiridium toruloides</i> DSM 4444	Crude glycerol	Shake flasks	23.1	43.7	Diamantopoulou et al., 2020
<i>Rhodospiridium toruloides</i> NRRL Y-27010	Crude glycerol	Shake flasks	29,28	44.19	Παρούσα μελέτη
<i>Rhodospiridium toruloides</i> NRRL Y-17902	Crude glycerol	Shake flasks	28,84	44.10	Παρούσα μελέτη
<i>Rhodospiridium toruloides</i> NRRL Y-6985	Crude glycerol	Shake flasks	29,08	43,20	Παρούσα μελέτη

Στον παρακάτω πίνακα γίνεται σύγκριση των αποτελεσμάτων της παραγωγής του μικροβιακού λίπους από την ζύμη *Rhodospiridium toruloides* της παρούσας μελέτης με δημοσιευμένα αποτελέσματα άλλων μελετών σε διαφορετικά υποστρώματα.

Πίνακας 10: Παραγωγή λιπιδίων και βιομάζας από την ζύμη *Rhodospiridium toruloides* σε διαφορετικές πηγές άνθρακα προσαρμοσμένο από Diamantopoulou et al., (2020).

Στέλεχος	Υπόστρωμα	Τύπος ζύμωσης	X (g/L)	Y _{LX} (% w/w)	Αναφορές
<i>Rhodospiridium toruloides</i> Y4	glucose	Fed-batch bioreactor	106.5	67.5	Li, Zhao and Bai 2007
<i>Rhodospiridium toruloides</i> Y4	Glucose (phosphate-limited trial)	Fed-batch bioreactor	20.6	51.4	Wu et al., 2010
<i>Rhodospiridium toruloides</i> Y4	Jerusalem artichoke extracts	Fed-batch bioreactor	25.5	40.0	Zhao et al., 2010
<i>Rhodospiridium toruloides</i> Y4	Glucose (sulfate-limited trial)	Fed-batch bioreactor	14.2	55.6	Wu et al., 2011.
<i>Rhodospiridium toruloides</i> AS2.1389	glucose	Shake flasks	18.3	76.0	Li et al., 2006

<i>Rhodospiridioum toruloides</i> CCT 0783	Glucose/xylose blend	Batch bioreactor	13.3	42.0	Bonturi et al., 2015
<i>Rhodospiridioum toruloides</i> CBS14	Glucose	Fed-batch bioreactor	35.0	71.4	Wiebe et al., 2012
<i>Rhodospiridioum toruloides</i> CBS14	Glucose/xylose/ara binose blend	Fed-batch bioreactor	27.0	55.5	Wiebe et al., 2012
<i>Rhodospiridioum toruloides</i> DSM 4444	crude glycerol/commercial xylose	Shake flasks	22,3	38,8	Diamantopoulou et al., 2020
<i>Rhodospiridioum toruloides</i> DSM 4444	crude glycerol/commercial xylose	Shake flasks	22,3	31,9	Diamantopoulou et al., 2020
<i>Rhodospiridioum toruloides</i> DSM 4444	commercial xylose	Shake flasks	21,1	36,5	Diamantopoulou et al., 2020
<i>Rhodospiridioum toruloides</i> DSM 4444	commercial xylose	Shake flasks	13,6	36,2	Diamantopoulou et al., 2020
<i>Rhodospiridioum toruloides</i> 2F5	Inulin	Shake flasks	15.8	62.1	Wang et al., 2014
<i>Rhodospiridioum toruloides</i> 2F5	Inulin	Batch bioreactor	15.6	70.4	Wang et al., 2014
<i>Rhodospiridioum toruloides</i> DSM 4444	Crude glycerol/sunflower meal hydrolysate	Shake flasks	27.9	29.0	Leiva-Candia et al., 2015
<i>Rhodospiridioum toruloides</i> DSM 4444	Glucose	Batch bioreactor	~22	~40	Bommareddy et al., 2015
<i>Rhodospiridioum toruloides</i> DSM 4444	Pure glycerol	Batch bioreactor	~15	~57	Bommareddy et al., 2015
<i>Rhodospiridioum toruloides</i> CCT 0783	Glucose/xylose blend	Batch bioreactor	13.3	42.0	Bonturi et al., 2015
<i>Rhodospiridioum toruloides</i> DSM 4444	Glucose	Fed-batch bioreactor	49.0	57.5	Tsakona et al., 2016

<i>Rhodosporidioum toruloides</i> NRRL Y-27012	Molasses	Fed-batch bioreactor	41.0	61.0	Boviatsi et al., 2020
<i>Rhodosporidioum toruloides</i> NRRL Y-27010	Crude glycerol	Shake flasks	29,28	44.19	Παρούσα μελέτη
<i>Rhodosporidioum toruloides</i> NRRL Y-17902	Crude glycerol	Shake flasks	28,84	44.10	Παρούσα μελέτη
<i>Rhodosporidioum toruloides</i> NRRL Y-6985	Crude glycerol	Shake flasks	29,08	43.2	Παρούσα μελέτη

Επίσης για κάθε ζύμωση μετρήθηκε ο παραγόμενος ενδοπολυσακχαρίτης δηλαδή ο συντελεστής των παραγόμενων ενδοπολυσακχαριτών προς την παραχθείσα βιομάζα ($Y_{IPS/X}$). Στην διάρκεια της στάσιμης φάσης αύξησης γίνεται η βιοσύνθεση σύμφωνα με την βιβλιογραφία (Ratledge 1988; Papanikolaou and Aggelis 2011a; 2011b;). Η ελάττωση της συγκέντρωσης του AMP οδηγεί στην αναστολή της δράσης της 6 PFK (Galiotou-Panayotou et al., 1998; Ratledge and Wynn, 2002; Papanikolaou and Aggelis, 2011a). Η προαναφερθείσα κατάσταση μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα την συσσώρευση των ενδοπολυσακχαριτών. Στη συνέχεια στην παρούσα μελέτη οι τιμές των ενδοπολυσακχαριτών αυξάνονταν με την πάροδο του χρόνου και δεν μειώθηκαν όπως αναφέρεται σε πολλές μελέτες. Αυτή η μείωση μπορεί να υποδηλώνει ότι οι ενδοπολυσακχαρίτες χρησιμοποιούνται από την ζύμη για να καλύψουν διάφορες ενεργειακές ανάγκες. Επίσης, η ζύμη μπορεί να χρησιμοποιήσει τους ενδοπολυσακχαρίτες ως ενδοκυτταρικό υπόστρωμα προκειμένου να βιοσυντεθούν διάφορες ουσίες.

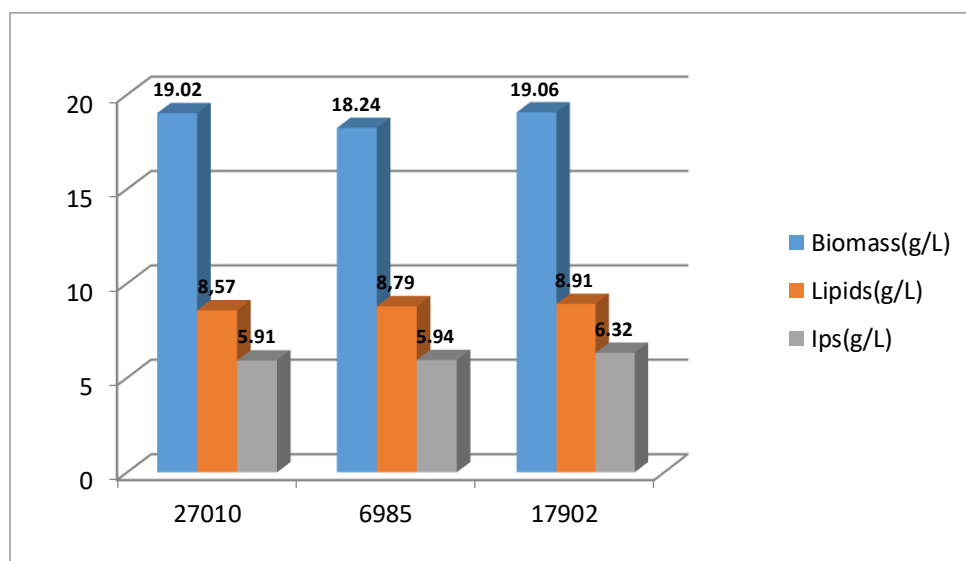
Στον παρακάτω πίνακα γίνεται σύγκριση των αποτελεσμάτων της παραγωγής των πολυσακχαριτών από διαφορετικές ζύμες με την ζύμη της παρούσας μελέτης σε διαφορετικά υποστρώματα.

Πίνακας 11: Παραγωγή ενδοπολυσακχαριτών σε διαφορετικές πηγές άνθρακα από διαφορετικές ζύμες προσαρμοσμένο από Diamantopoulou et al., (2020).

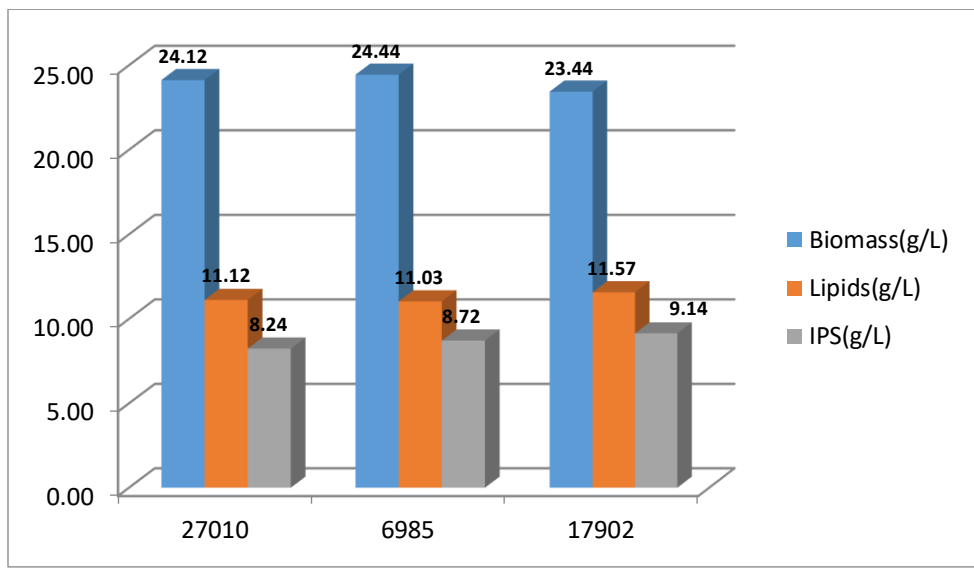
Στέλεχος	Υπόστρωμα	Τύπος ζύμωσης	IPS(g/L)	Y _{IPS/x} (%,w/w)	Αναφορές
<i>Cryptococcus curvatus</i> NRRL Y-1511	Lactose	Shake flasks	11.0	41.2	Tchakouteu et al., 2015a
<i>Cryptococcus curvatus</i> NRRL Y-1511	Sucrose	Shake flasks	10.9	41.2	Tchakouteu et al., 2015a
<i>Cryptococcus curvatus</i> NRRL Y-1511	Cheese-whey	Shake flasks	11.1	28.8	Tchakouteu et al., 2015a
<i>Cryptococcus curvatus</i> NRRL Y-1511	Molasses	Shake flasks	9.9	27.8	Tchakouteu et al., 2015a
<i>Lipomyces starkeyi</i> DSM 70 296	Crude glycerol	Shake flasks	6.7	28.9	Tchakouteu et al., 2015b
<i>Yarrowia lipolytica</i> H222	Pure glycerol	Shake flasks	N.I	≈17.0	Bhutada et al., 2017
<i>Yarrowia lipolytica</i> H222	Glucose	Shake flasks	N.I	≈12.0	Bhutada et al., 2017
<i>Metschnikowia sp.</i> V.V.-D4	Glycerol/O.M.W	Shake flasks	11.0	62.8	Diamantopoulou et al., 2020
<i>Yarrowia lipolytica</i> ACA-DC 50 109	Glucose	Shake flasks	≈6	≈45.0	Dourou et al., 2017
<i>Yarrowia lipolytica</i> FMCC Y75	Crude glycerol	Shake flasks	6.6	51.6	Filippousi et al., 2019
<i>Cryptococcus curvatus</i> NRRL Y-1511	Crude glycerol	Shake flasks	8.4	62.2	Filippousi et al., 2019
<i>Rhodospiridium kratochvilovae</i> FMCC Y71	Crude glycerol	Shake flasks	3.7	41.1	Filippousi et al., 2019
<i>Debaryomyces sp.</i> FMCC Y68	Crude glycerol	Shake flasks	7.1	33.0	Filippousi et al., 2019
<i>Debaryomyces sp.</i> FMCC Y69	Crude glycerol	Batch reactor	13.9	45.5	Filippousi et al., 2019

<i>Yarrowia lipolytica</i> ACA-DC 5029	Crude glycerol	Shake flasks	3.8	34.0	Sarris et al., 2019a
<i>Yarrowia lipolytica</i> ACA-DC 5029	Glycerol/O.M.W.	Shake flasks	2.4	20.8	Sarris et al., 2019a
<i>Yarrowia lipolytica</i> DC 5031	Glycerol/O.M.W.	Shake flasks	2.6	31.9	Tzirita et al., 2019
<i>Rhodospiridium</i> <i>toruloides</i> NRRL Y-27010	Crude glycerol	Shake flasks	12,00	40.10	Παρούσα μελέτη
<i>Rhodospiridium</i> <i>toruloides</i> NRRL Y-6985	Crude glycerol	Shake flasks	12,11	41.45	Παρούσα μελέτη
<i>Rhodospiridium</i> <i>toruloides</i> NRRL Y-17902	Crude glycerol	Shake flasks	11,44	40.15	Παρούσα μελέτη

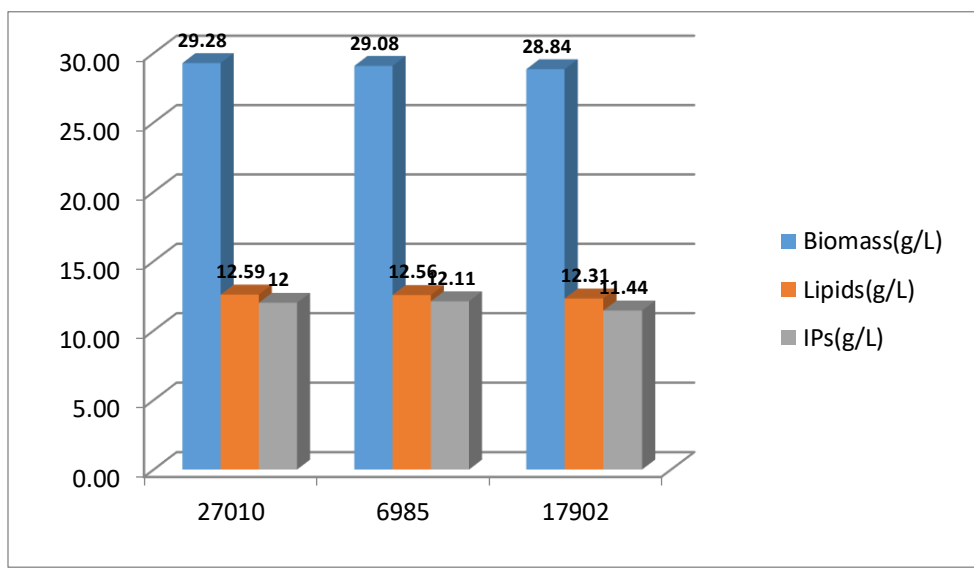
Στην συνέχεια παρουσιάζονται οι μέγιστες τιμές λίπους, βιομάζας και ενδοπολυσακχαριτών για τις ζυμώσεις βυθού των στελεχών *Rhodospiridium toruloides*.



Γράφημα 16: Μέγιστο ποσοστό βιομάζας, λίπους και ενδοπολυσακχαριτών κατά την αύξηση των στελεχών του *Rhodospiridium toruloides* NRRL Y-27010, *Rhodospiridium toruloides* NRRL Y-6985 και *Rhodospiridium toruloides* NRRL Y-17902 σε υπόστρωμα γλυκερόλης στα 50 g/L.



Γράφημα 17: Μέγιστο ποσοστό βιομάζας, λίπους και ενδοπολυσακχαριτών κατά την αύξηση των στελεχών του *Rhodosporidium toruloides* NRRL Y-27010, *Rhodosporidium toruloides* NRRL Y-6985 και *Rhodosporidium toruloides* NRRL Y-17902 σε υπόστρωμα γλυκερόλης στα 90 g/L.



Γράφημα 18: Μέγιστο ποσοστό βιομάζας, λίπους και ενδοπολυσακχαριτών κατά την αύξηση των στελεχών του *Rhodosporidium toruloides* NRRL Y-27010, *Rhodosporidium toruloides* NRRL Y-6985 και *Rhodosporidium toruloides* NRRL Y-17902 σε υπόστρωμα γλυκερόλης στα 110 g/L.

Το μικροβιακό λίπος το οποίο προέρχεται και από τα τρία στελέχη της ζύμης *Rhodosporidium toruloides* βρέθηκε με την χρήση της αέριας χρωματογραφίας ότι αποτελείται από τα ακόλουθα λιπαρά οξέα: μυριστικό οξύ (C14:0), παλμιτικό οξύ (C16:0), παλμιτελαικό οξύ (C16:1), στεατικό οξύ(C18:0),

ελαϊκό οξύ ($\Delta^9\text{C18:1}$), λινελαϊκό οξύ ($\Delta^9,12\text{C18:2}$) και α -λινολενικό οξύ ($\Delta^9,12,15\text{C18:3}$). Επιπλέον, βρέθηκε ότι σε όλες τις ζυμώσεις, κυρίαρχα λιπαρά οξέα είναι το ελαϊκό οξύ ($\Delta^9\text{C18:1}$) και το παλμιτικό οξύ (C16:0). Επιπρόσθετα, παρατηρήθηκε πως δεν μεταβάλλεται σημαντικά η ποσοστιαία κατανομή των λιπαρών οξέων κατά την διάρκεια των ζυμώσεων και για τα τρία στελέχη.

Επίσης όσον αφορά το παλμιτικό οξύ διαπιστώθηκε ότι η μέγιστη τιμή του την είχε το στέλεχος Y-27010 στα 50 g/L γλυκερόλης όπου έφτασε το 39,9%. Η τιμή του παλμιτικού οξέος για τα άλλα δύο στελέχη δηλαδή το Y-6985 και το Y-17902 έφτασε το 30,1% και το 32,6% αντίστοιχα. Το κυρίαρχο λιπαρό οξύ ήταν το ελαϊκό οξύ ($\Delta^9\text{C18:1}$), του οποίου η ποσοστιαία κατανομή κυμάνθηκε στα ίδια επίπεδα για όλες της ζυμώσεις σε ποσοστά από 51,5 % έως 55,2%. Σε πολύ μικρά ποσοστά βρέθηκε το μυριστικό οξύ (C14:0) και το α -λινολενικό οξύ ($\Delta^9,12,15\text{C18:3}$). Επιπλέον, η μέγιστη τιμή είναι 2,2 % για το μυριστικό (C14:0) το οποίο ανιχνεύθηκε μόνο στο στέλεχος Y-27010, σε αντίθεση με το α -λινολενικό οξύ ($\Delta^9,12,15\text{C18:3}$) όπου ανιχνεύθηκε και στα τρία στελέχη και η μέγιστη τιμή του ήταν στο στέλεχος Y-27010 όπου έφτασε τα 5,4% στα 110 g/L γλυκερόλη, ενώ τα υπόλοιπα στελέχη κυμάνθηκαν 0,3 % έως 0,8 %. Όσον αφορά το παλμιτελαϊκό οξύ(C16:1), ανιχνεύθηκε στα δύο από τα τρία στελέχη σε ποσοστά από 9,8% έως 11,9 % ενώ στο Y-27010 δεν ανιχνεύθηκε. Επιπλέον το στέλεχος Y-27010 είχε το μεγαλύτερο ποσοστό στεατικού οξέος με μέγιστη τιμή 13,5 % σε αντίθεση με τα υπόλοιπα στελέχη που κυμάνθηκαν από 2,1 έως 3,9 %. Τέλος, το λινελαϊκό οξύ ($\Delta^9,12\text{C18:2}$) κυμάνθηκε από 0,3% έως 6,7 % με την μέγιστη τιμή του να ανιχνεύθηκε στο στέλεχος Y-27010.

Συνοψίζοντας προκύπτουν τα ακόλουθα συμπεράσματα :

- Η προσθήκη μεγαλύτερης συγκέντρωσης γλυκερόλης προκάλεσε αύξηση της παραγωγής της βιομάζας και για τα τρία στελέχη της ζύμης *Rhodospiridium toruloides*.
- Η προσθήκη μεγαλύτερης συγκέντρωσης γλυκερόλης προκάλεσε αύξηση της παραγωγής του μικροβιακού λίπους και για τα τρία στελέχη της ζύμης *Rhodospiridium toruloides*.
- Η προσθήκη μεγαλύτερης συγκέντρωσης γλυκερόλης προκάλεσε αύξηση της παραγωγής των ενδοπολυσακχαριτών και για τα τρία στελέχη της ζύμης *Rhodospiridium toruloides*.

- Στην ζύμωση με την προσθήκη 50 g/L ακάθαρτης γλυκερόλης η μεγαλύτερη παραγωγή λίπους παρατηρήθηκε στη ζύμωση του στελέχους *Rhodosporidium toruloides* NRRL Y-17902 με τιμή 8,91 g/L και η μέγιστη τιμή βιομάζας παρατηρήθηκε στη ζύμωση του στελέχους *Rhodosporidium toruloides* NRRL Y-17902, η οποία έφθασε τα 19,06 g/L.
- Στην ζύμωση με την προσθήκη 90 g/L ακάθαρτης γλυκερόλης η μεγαλύτερη παραγωγή λίπους παρατηρήθηκε στη ζύμωση του στελέχους *Rhodosporidium toruloides* NRRL Y- 17902 με τιμή 11,57 g/L και η μέγιστη τιμή βιομάζας παρατηρήθηκε στη ζύμωση του στελέχους *Rhodosporidium toruloides* NRRL Y- 6985, η οποία έφθασε τα 24,44 g/L.
- Στην ζύμωση με την προσθήκη 110 g/L ακάθαρτης γλυκερόλης η μεγαλύτερη παραγωγή λίπους παρατηρήθηκε στη ζύμωση του στελέχους *Rhodosporidium toruloides* NRRL Y- 27010 με τιμή 12,59 g/L και η μέγιστη τιμή βιομάζας παρατηρήθηκε στη ζύμωση του στελέχους *Rhodosporidium toruloides* NRRL Y -27010, η οποία έφθασε τα 29,28 g/L.

Τα συμπεράσματα της παρούσας ερευνητικής μελέτης, που παρατίθενται και αναλύονται παραπάνω, αποδεικνύουν ότι η προσθήκη γλυκερόλης ως μόνη πηγή άνθρακα στο θρεπτικό υπόστρωμα της καλλιέργειας της ζύμης *Rhodosporidium toruloides* ασκεί θετική επίδραση στην κυτταρική ανάπτυξη και στην παραγωγή μικροβιακού λίπους. Τα εν λόγω συμπεράσματα ενισχύουν το ενδιαφέρον γύρω από τα μικροβιακά λιπίδια ως ερευνητικό πεδίο. Επιπροσθέτως, δικαιολογούν την ολοένα και μεγαλύτερη προσοχή που λαμβάνουν τα μικροβιακά λιπίδια από την επιστημονική κοινότητα, ως εναλλακτική πρώτη ύλη (μη-τροφική), για την παραγωγή 2^{ns} γενιάς βιοντίζελ. Είναι, λοιπόν, πολύ σημαντικό να συνεχίζονται οι έρευνες για το πώς μπορεί να ενισχυθεί η παραγωγή μικροβιακού λίπους από ελαιογόνες ζύμες.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

5:Βιβλιογραφία

Ahmad N, H, Mustafa S, & Man Y, B, C, (2015). Microbial polysaccharides and their modification approaches. A review. *International Journal of Food Properties*. 18, 332–347.

Athenaki M, Gardeli C, Diamantopoulou P, et al, (2018). Lipids from yeasts and fungi: physiology, production and analytical considerations. *Journal of Applied Microbiology*. 124, 336–67.

Bellou S, Triantaphyllidou I, Aggeli D, Elazzazy A, M, Baeshen M, N, & Aggelis G, (2016). ScienceDirect Microbial oils as food additives: recent approaches for improving microbial oil production and its polyunsaturated fatty acid content. *Current Opinion in Biotechnology*. 37, 24–35.

BeMiller J, N, (2019). Polysaccharides: Occurrence, Structures, and Chemistry. *Carbohydrate Chemistry for Food Scientists*. Elsevier. 75–101.

Bommareddy R, R, Sabra W, Maheshwari G, & Zeng A, P, (2015). Metabolic network analysis and experimental study of lipid production in *Rhodospiridium toruloides* grown on single and mixed substrates. *Microbial Cell Factories*. 14(1).

Dalvand P, & Mahdavian L, (2017). Calculation of the properties of biodiesel produced from castor seed by eggshell catalyst. *Biofuels*. 1–6.

Dias C, Silva C, Freitas C, Reis A, & da Silva T, L, (2016). Effect of Medium pH on *Rhodospiridium toruloides* NCYC 921 Carotenoid and Lipid Production 73 Evaluated by Flow Cytometry. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 179(5), 776–787.

Diamantopoulou P, Filippousi R, Antoniou D, Varfi E, Xenopoulos E, Sarris D, Papanikolaou S, (2020). Production of added-value microbial metabolites during growth of yeast strains on media composed of biodiesel-derived crude glycerol and glycerol/xylose blends. *FEMS Microbiology Letters*. 320, 10.

Fakas S, Papanikolaou S, Galiotou-Panayotou M, Komaitis M, & Aggelis G, (2006). Lipids of *Cunninghamella echinulata* with emphasis to γ -linolenic acid distribution among L-lipid classes. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 73(3), 676–683.

- Fei Q, O'Brien M, Nelson R, Chen X, Lowell A, & Dowe N, (2016). Enhanced lipid production by *Rhodospiridium toruloides* using different fed-batch feeding strategies with lignocellulosic hydrolysate as the sole carbon source. *Biotechnology for Biofuels*. 9(1), 130.
- Fukuda H, Kondo A, & Noda H, (2001). Biodiesel fuel production by transesterification of oils. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 92(5), 405–416.
- Holdsworth J, E, Veenhuis M, & Ratledge C, (1988). Enzyme Activities in Oleaginous Yeasts Accumulating and Utilizing Exogenous or Endogenous Lipids. *Microbiology*. 134(11), 2907–2915.
- Kara K, Ouanji F, Lotfi E, M, Mahi M, El, Kacimi M, & Ziyad M, (2018). Biodiesel production from waste fish oil with high free fatty acid content from Moroccan fish-processing industries. *Egyptian Journal of Petroleum*. 27(2), 249– 255.
- Koutinas A, Chatzifragkou A, Kopsahelis N, Papanikolaou S, Kookos I, (2014). Design and techno economic evaluation of microbial oil production as a renewable resource for biodiesel and oleochemical production. *Fuel*. 116, 566-577.
- Leiva-Candia D, E, Pinzi S, Redel-Macías M, D, Koutinas A, Webb C, & Dorado M, P, (2014). The potential for agro-industrial waste utilization using oleaginous yeast for the production of biodiesel. *Fuel*. 123, 33-42
- Li Y, Zhao Z,(Kent), & Bai F, (2007). High-density cultivation of oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides* Y4 in fed-batch culture. *Enzyme and Microbial Technology*. 41(3), 312–317.
- Liang M, H, & Jiang J, G, (2013). Advancing oleaginous microorganisms to produce lipid via metabolic engineering technology. *Progress in Lipid Research*. 52, 395–408.
- Ma Y, & Liu Y, (2019). *Biofuels: Alternative Feedstocks and Conversion Processes for the Production of Liquid and Gaseous Biofuels*. Elsevier 503–522.
- Ma Y, Gao Z, Wang Q, & Liu Y, (2018). Biodiesels from microbial oils: Opportunity and challenges. *Bioresource Technology*. 263, 631–641.
- Meng X, Yang J, Xu X, Zhang L, Nie Q, & Xian M, (2009). Biodiesel production from oleaginous microorganisms. *Renewable Energy*. 34(1), 1-5.

- Nda-Umar U, I, Ramli I, Taufiq-Yap Y, H, & Muhamad E, N, (2019). An overview of recent research in the conversion of glycerol into biofuels, fuel additives and other bio-based chemicals. *Catalysts*. 9(1), 15.
- Papanikolaou S, Aggelis G, (2011a). Lipids of oleaginous yeasts. Part I: Biochemistry of single cell oil production. *European Journal of Lipid Science and Technology*. 113(8), 1031–1051.
- Papanikolaou S, & Aggelis G, (2011b). Lipids of oleaginous yeasts. Part II: Technology and potential applications. *European Journal of Lipid Science and Technology*. 113(8), 1052–1073.
- Papanikolaou S, & Aggelis G, (2009). Biotechnological valorization of biodiesel derived glycerol waste through production of single cell oil and citric acid by *Yarrowia lipolytica*. *Lipid Technology*. 21(4), 83–87.
- Papanikolaou S, & Aggelis G, (2010). *Yarrowia lipolytica*: A model microorganism used for the production of tailor-made lipids. *European Journal of Lipid Science and Technology*. 112(6), 639–654.
- Papanikolaou S, Chevalot I, Komaitis M, Aggelis G, & Marc I, (2001). Kinetic profile of the cellular lipid composition in an oleaginous *Yarrowia lipolytica* capable of producing a cocoa-butter substitute from industrial fats. *Antonie van Leeuwenhoek. International Journal of General and Molecular Microbiology*. 80(3–4), 215–224.
- Quispe C, A, G, Coronado C, J, R, & Carvalho J, A, (2013). Glycerol: Production, consumption, prices, characterization and new trends in combustion. *Renewable Sustainable Energy Reviews*. 27, 475– 493.
- Ratledge C, (2002). Regulation of lipid accumulation in oleaginous microorganisms. *Biochemical Society*. 30(5), 1047-1050.
- Ratledge C, & Wynn J, P, (2002). The Biochemistry and Molecular Biology of Lipid Accumulation in Oleaginous Microorganisms. *Advances in Applied Microbiology*. 1–52.
- Sarantou S, Stoforos N, G, Kalantzi O, & Papanikolaou S, (2021). Biotechnological valorization of biodiesel-derived glycerol: Trials with the non-conventional yeasts *Yarrowia lipolytica* and *Rhodospiridium sp.* *Carbon Resources Conversion*. 4, 61–75.
- Soccol C, Dalmas N, Soccol T, Bittencourt S, Ferreira S, Pedroni B, Souza L, (2016). Pilot scale biodiesel production from *Rhodospiridium toruloides* DEBB 5533 microbial oil using sugarcane juice: Performance in diesel engine and preliminary economic study. *Bioresource Technology*. 223, 259-268.

- Stelmachowski M, Marchwicka M, Grabowska E, Diak M, & Zaleska A, (2014). The photocatalytic conversion of (biodiesel derived) glycerol to hydrogen: A short review and preliminary experimental results part 1: Photocatalytic conversion of glycerol to hydrogen in batch and semi-batch laboratory reactors. *Journal of Advanced Oxidation Technologies*. 17(2), 179–186.
- Tchakouteu S, S, Kalantzi O, Gardeli C, Koutinas A, et al., (2015). Lipid production by yeasts growing on biodiesel-derived crude glycerol: Strain selection and impact of substrate concentration on the fermentation efficiency. *Journal of Applied Microbiology*. 118(4), 911-927.
- Tchakouteu S, S, Kopsahelis N, Chatzifragkou A, Kalantzi O, Stoforos N, Koutinas A, Aggelis G, Papanikolaou S, (2016). *Rhodospiridium toruloides* cultivated in NaCl-enriched glucose-based media: Adaptation dynamics and lipid production. *Engineering in Life Sciences*. 17(3), 237–248.
- Wang Z, Zhuge J, Fang H, & Prior B, A, (2001). Glycerol production by microbial fermentation. *Biotechnology Advances*, 19(3), 201–223.
- Wiebe M, G, Koivuranta K, Penttilä M, & Ruohonen L, (2012). Lipid production in batch and fed-batch cultures of *Rhodospiridium toruloides* from 5 and 6 carbon carbohydrates. *BMC Biotechnology*. 12(1), 26.
- Wu S, Zhao X, Shen H, Wang Q, & Zhao K, Z, (2011). Microbial lipid production by *Rhodospiridium toruloides* under sulfate-limited conditions. *Bioresource Technology*. 102(2), 1803–1807.
- Zhang S, Skerker J, M, Rutter C, D, Maurer M, J, Arkin A, P, & Rao C, V, (2016). Engineering *Rhodospiridium toruloides* for increased lipid production. *Biotechnology and Bioengineering*. 113(5), 1056–1066.
- Zhao X, Hu C, Wu S, Shen H, & Zhao Z, K, (2011). Lipid production by *Rhodospiridium toruloides* Y4 using different substrate feeding strategies. 38(5), 627–632.