



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

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ**  
**ΒΙΟΔΙΕΡΓΑΣΙΕΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΒΙΟΔΥΛΙΣΤΗΡΙΑ**

**Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία**

Αύξηση της ζύμης *Lipomyces starkeyi* σε χαμηλού κόστους υδρόφιλα υποστρώματα προς παραγωγή λιπιδίων και δευτερογενών μεταβολιτών

**Δημήτριος Μ. Κατσάμπουλας**

Επιβλέπων καθηγητής:

Σεραφείμ Παπανικολάου, Αναπληρωτής Καθηγητής Γ.Π.Α.

**ΑΘΗΝΑ, 2016**

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

**Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία**

Αύξηση της ζύμης *Lipomyces starkeyi* σε χαμηλού κόστους υδρόφιλα υποστρώματα προς παραγωγή λιπιδίων και δευτερογενών μεταβολιτών

“Growth of yeast strain *Lipomyces starkeyi* on low-cost hydrophilic carbon sources for production of lipids and secondary metabolites”

**Δημήτριος Μ. Κατσάμπουλας**

Εξεταστική Επιτροπή:

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

Απόστολος Κουτίνας, Επίκουρος Καθηγητής Γ.Π.Α.

Νικόλαος Στοφόρος, Καθηγητής Γ.Π.Α.

## **Αύξηση της ζύμης *Lipomyces starkeyi* σε χαμηλού κόστους υδρόφιλα υποστρώματα προς παραγωγή λιπιδίων και δευτερογενών μεταβολιτών**

ΠΜΣ: Βιοδιεργασίες Τροφίμων & Βιοδιυλιστήρια  
Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων & Διατροφής του Ανθρώπου  
Εργαστήριο Μικροβιολογίας & Βιοτεχνολογίας Τροφίμων

### **ΠΕΡΙΛΗΨΗ**

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η διερεύνηση της ικανότητας της ζύμης *Lipomyces starkeyi* να αναπτύσσεται σε υποστρώματα ανανεώσιμων πρώτων υλών, συγκεκριμένα σε ακάθαρτη βιομηχανική γλυκερόλη, η οποία είναι το κύριο παραπροϊόν της βιομηχανικής παραγωγής βιοκαυσίμου (biodiesel) και σε διάφορα σακχαρούχα προϊόντα (γλυκόζη, ξυλόζη). Συγκεκριμένα, μελετήθηκε η δυνατότητα αύξησης βιομάζας ζύμης σε ακάθαρτη βιομηχανική γλυκερόλη, εμπορική γλυκόζη, εμπορική ξυλόζη και σε μείγματα αυτών σε διαφορετικές αναλογίες, καθώς και η εν δυνάμει παραγωγή δευτερογενών μεταβολιτών, ειδικότερα μικροβιακού λίπους και ενδοπολυσακχαριτών. Αναλυτικότερα, στο θρεπτικό μέσο γλυκόζη ο μικροοργανισμός παρήγαγε 12,1 g/L μικροβιακού λίπους και 5,4 g/L ενδοπολυσακχαριτών. Παρόμοια συμπεριφορά εμφάνισε στο θρεπτικό μέσο γλυκερόλη με παραγωγή ενδοκυτταρικού λίπους 10,0 g/L και ενδοπολυσακχαριτών 5,6 g/L. Τα επίπεδα ενδοσακχαριτών διατηρήθηκαν σε γενικές γραμμές στο θρεπτικό μέσο ξυλόζη με 5,9 g/L και 7,3 g/L ενδοκυτταρικού λίπους. Σημαντική σύνθεση των παραπάνω μεταβολικών προϊόντων παρατηρήθηκε και στα μείγματα σακχαρούχων υποστρωμάτων. Ειδικότερα, σε μείγμα γλυκόζης-ξυλόζης, 20 g/L και 60 g/L αντίστοιχα, μετρήθηκε ενδοκυτταρικό λίπος 7,1 g/L και ενδοπολυσακχαρίτες 6,0 g/L. Σε σχετικές τιμές κυμάνθηκαν οι μετρήσεις όταν για τα ίδια σάκχαρα η αναλογία που επιλέχθηκε ήταν 40g/L και για τα δύο, με μικροβιακό λίπος 7,0 g/L και ενδοπολυσακχαρίτες 5,2 g/L. Ο μικροοργανισμός απέδωσε αποτελεσματικότερα στην ανάμειξη των σακχάρων αυτών όταν χρησιμοποιήθηκαν 60g/L γλυκόζης και 20 g/L ξυλόζης, όπου παρατηρήθηκε ενδοκυτταρικό λίπος 8,4 g/L και ενδοπολυσακχαρίτες 7,8 g/L.

Στη συνέχεια επιλέχθηκαν σαν θρεπτικό μέσο μείγματα γλυκερόλης- ξυλόζης. Αξιοσημείωτα αποτελέσματα παρατηρήθηκαν στην αναλογία 60g/L γλυκερόλης και 20 g/L ξυλόζης, με ενδοκυτταρικό λίπος 9,6 g/L και ενδοπολυσακχαρίτες 4,8 g/L. Με παρόμοιο τρόπο συμπεριφέρθηκε η ζύμη στην αναλογία 40 g/L γλυκερόλης και 40 g/L ξυλόζης, όπου παρήγαγε 9,5 g/L μικροβιακό λίπος και 4,4 g/L ενδοπολυσακχαρίτες. Η παραγωγή των μεταβολικών προϊόντων ελαττώθηκε στα 20 g/L γλυκερόλης και 60 g/L ξυλόζης, όπου το ενδοκυτταρικό λίπος δεν ξεπέρασε τα 7,7 g/L, ενώ οι ενδοπολυσακχαρίτες περιορίστηκαν στα 4,4 g/L. Όταν χρησιμοποιήθηκε μείγμα 20 g/L γλυκερόλης και 60 g/L γλυκόζης, μετρήθηκαν ενδοκυτταρικό λίπος 4,7 g/L και ενδοπολυσακχαρίτες έως και 12,8 g/L. Στην αναλογία 60 g/L γλυκερόλης και 20 g/L γλυκόζης παρατηρήθηκαν 9,7 g/L μικροβιακού λίπους και 9,7 g/L ενδοπολυσακχαρίτες. Αντίστοιχη αύξηση επέδειξε η ζύμη στο θρεπτικό μέσο που αποτελούνταν από 40 g/L γλυκερόλης και 40 g/L γλυκόζης με 5,9 g/L μικροβιακό λίπος και 9,1 g/L ενδοπολυσακχαρίτες. Τέλος, πραγματοποιήθηκε ανάλυση της σύστασης του ενδοκυτταρικού λίπους σε λιπαρά οξέα και των κλάσεων αυτών σε επιλεγμένο δείγμα (ουδέτερα λιπίδια, σφινγγο-και γλυκολιπίδια και φωσφολιπίδια).

**Επιστημονική περιοχή:** Βιοτεχνολογία

**Λέξεις κλειδιά:** *Lipomyces starkeyi*, Γλυκερόλη, Γλυκόζη, Ξυλόζη, Σακχαρούχα υποπροϊόντα, Δευτερογενείς μεταβολίτες, Μικροβιακό λίπος, Ενδοπολυσακχαρίτες

## **Growth of yeast strain *Lipomyces starkeyi* on low-cost hydrophilic carbon sources for production of lipids and secondary metabolites**

*Msc: Food Bioprocesses & Biorefineries*  
*Department of Food Science & Human Nutrition*  
*Laboratory of Microbiology & Biotechnology*

### **ABSTRACT**

The aim of these experiments was to determine the ability of the yeast strain *Lipomyces starkeyi* to grow on media containing several types of hydrophilic low-cost carbon sources. More particularly, we studied the possibility of growth of yeast biomass in crude industrial glycerol, commercial glucose, xylose and commercial mixtures thereof in different proportions and the potential production of secondary metabolites, in particular single cell oil and intracellular microbial polysaccharides (IPS). During the experimental process, the yeast showed growth capacity in all substrates used and produced significant amounts of fat and IPS. Specifically, in the medium glucose, the microorganism produced 12,1 g/L microbial oil and 5,4 g/L IPs. Similar behavior is exhibited in the medium glycerol, where the intracellular oil reached 10,0 g/L and the IPs 5,6 g/L. The IPs levels in xylose medium was 5,9 g/L, while a slight decrease was observed in the lipid production with 7,3 g/L intracellular oil. Significant synthesis of the above metabolic products was also observed in mixtures of low-cost carbon sources substrates. Specifically, a mixture of glucose-xylose, 20 g/L and 60 g/L, respectively, showed oil increase of 7,1 g/L and IPs increase of 6.0 g/L. The measurements ranged in relative terms when the same sugars ratio chosen was 40g/L for both, with 7,0 g/L of microbial oil and 5,2 g/L of IPs. The microorganism grew efficiently when mixing these sugars, where 60 g/L glucose and 20 g/L xylose were used, wherein intracellular oil was observed 8,4 g/L and IPs 7,8 g/L.

Then, mixtures of glycerol-xylose were selected as media. Satisfying results were observed in the media which included 60g/L glycerol and 20g/L xylose, with intracellular oil reaching 9,6 g/L and the IPs reaching 4,8 g/L. The yeast behaved in a similar manner in the ratio of 40 g/L glycerol and 40 g/L xylose, which yielded 9,5 g/L microbial oil and 4,4 g/L IPs. The production of metabolic products was reduced when the mixture of 20g/L glycerol and 60 g/L xylose was used as media, wherein the intracellular oil did not exceed 7,7 g/L, while the IPs reduced to 4,4 g/L. When using a mixture of 20 g/L glycerol and 60 g/L glucose, we measured intracellular oil at 4,7 g/L and up to 12,8 g/L IPs. At the ratio of 60 g/L glycerol and 20 g/L glucose, we observed 9,7 g/L microbial oil and 9,7 g/L IPS. The microorganism showed corresponding development in the medium consisting of 40 g/L glycerol and 40 g/L glucose with 5,9 g / L microbial oil and 9,1 g/L IPs. Finally, an analysis of the composition of intracellular fat into fatty acids and their headings in the selected samples (neutral lipids , clench-and glycolipids and phospholipids ) took place.

**Scientific area:** Biotechnology

**Keywords:** *Lipomyces starkeyi*, Glycerol, Glucose, Xylose, Sugar Byproducts, Secondary Metabolites, Microbial Fat, Endopolysaccharides

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα ερευνητική μελέτη εκπονήθηκε στο εργαστήριο Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, στα πλαίσια του Π.Μ.Σ. «Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου». Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον κο. Παπανικολάου, επιβλέποντα καθηγητή μου, για την άριστη συνεργασία στα πλαίσια του πρακτικού τμήματος της έρευνας, την επιστημονικής καθοδήγηση αλλά και την εμπιστοσύνη που επέδειξε στο πρόσωπό μου. Επιπλέον, θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες στον υποψήφιο διδάκτορα κο.Βαγγέλη Ξενόπουλο για την υπερπολύτιμη βοήθειά του σε κάθε στάδιο της μελέτης αυτής, συμπεριλαμβανόμενων της άρτιας καθοδήγησης στην πειραματική διαδικασία, της θεωρητικής υποστήριξης περί του θέματος της έρευνας και των συμβουλών κατά την συγγραφή. Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τις υποψήφιες διδάκτορες κα. Ροζανίνα Φιλιπούση, κα. Νατάσα Παλαιογιώργου, κα. Κατερίνα Παπαδάκη και την κα. Ερμίντα Τσούκο καθώς και τον υποψήφιο διδάκτορα κο. Δημήτρη Λαδάκη, τους συμφοιτητές μου και τις συμφοιτήτριες μου για την άριστη συνεργασία μας και το ευχάριστο κλίμα που επικράτησε στο χώρο του εργαστηρίου καθόλη τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας. Τέλος, θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στην οικογένειά μου για την αδιάκοπη στήριξη κι ενθάρρυνση που προσφέρουν όλα αυτά τα χρόνια όπως και κατά την εκπόνηση της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής.

# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

|  |           |
|--|-----------|
| <b>1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....</b>  | <b>1</b>  |
| 1.1 Βιομηχανικά παραπροϊόντα και απόβλητα.....                         | 1         |
| 1.2 Υποστρώματα στις ζημώσεις για την παραγωγή μικροβιακού λίπους..... | 4         |
| 1.2.1 Σακχαρούχα υποστρώματα.....                                      | 4         |
| 1.2.2 Γλυκερόλη.....   | 6         |
| 1.2.3 Μεταβολισμός γλυκόζης, ξυλόζης, γλυκερόλης.....                  | 9         |
| 1.3 Ελαιογόνοι μικροοργανισμοί.....                                    | 12        |
| 1.3.1 Χαρακτηριστικά ελαιογόνων μικροοργανισμών.....                   | 12        |
| 1.3.2 Ελαιογόνες ζύμες.....  | 13        |
| 1.3.3 Ζύμη <i>Lipomyces starkeyi</i> .....                             | 14        |
| 1.4 Βιοχημεία συσσώρευσης μεταβολικών προϊόντων.....                   | 15        |
| 1.4.1 Βιοχημεία συσσώρευσης ενδοκυτταρικού λίπους.....                 | 15        |
| 1.4.2 Βιοχημεία συσσώρευσης ενδοπολυσακχαριτών.....                    | 18        |
| 1.5 Σκοπός της μελέτης.....  | 20        |
| <b>2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....</b>                                       | <b>21</b> |
| 2.1 Βιολογικό υλικό.....   | 21        |
| 2.2 Συνθηκες καλλιέργειας.....   | 21        |
| 2.2.1 Παρασκευή υγρού εμβολίου.....                                    | 21        |
| 2.2.2 Θρεπτικό μέσο καλλιέργειας.....                                  | 22        |
| 2.3 Μέθοδοι.....   | 24        |
| 2.3.1 Προσδιορισμός pH.....  | 24        |
| 2.3.2 Προσδιορισμός βιομάζας (X) .....                                 | 24        |
| 2.3.3 Μελέτη ενδοκυτταρικού λίπους.....                                | 24        |
| 2.3.3.1 Εκχύλιση λίπους .....  | 25        |
| 2.3.3.2 Παρασκευή μεθυλεστέρων λιπαρών οξέων .....                     | 26        |

|   |           |
|---|-----------|
| 2.3.3.3 Εφαρμογή της μεθόδου.....   | 26        |
| 2.3.3.4 Ανάλυση στον αέριο χρωματογράφο (GC).....   | 27        |
| 2.3.3.5 Κλασμάτωση λιπιδίων.....  | 28        |
| 2.3.4 Προσδιορισμός Ενδοπολυσακχαριτών (IPS) .....  | 29        |
| <b>3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....</b>   | <b>31</b> |
| 3.1 Σφαιρική παρουσίαση.....  | 31        |
| 3.2 Καλλιέργεια ζύμης <i>Lipomyces starkeyi</i> σε εμπορική γλυκόζη (Glu = 80 g/L)..  | 32        |
| 3.3 Καλλιέργεια ζύμης <i>Lipomyces starkeyi</i> σε εμπορική ξυλόζη (Xyl = 80 g/L) ...   | 34        |
| 3.4 Καλλιέργεια ζύμης <i>Lipomyces starkeyi</i> σε ακάθαρτη γλυκερόλη (Glo1 = 80 g/L)<br>.....  | 36        |
| 3.5 Καλλιέργεια της ζύμης <i>Lipomyces starkeyi</i> σε μίγμα 20 g/L γλυκόζη – 60 g/L<br>ξυλόζη (Glu = 20g/L, Xyl = 60 g/L) .....              | 38        |
| 3.6 Καλλιέργεια της ζύμης <i>Lipomyces starkeyi</i> σε μίγμα 60 g/L γλυκόζη – 20 g/L<br>ξυλόζη (Glu = 60g/L, Xyl = 20 g/L).....               | 40        |
| 3.7 Καλλιέργεια της ζύμης <i>Lipomyces starkeyi</i> σε μίγμα 40 g/L γλυκόζη – 40 g/L<br>ξυλόζη (Glu = 40g/L, Xyl = 40 g/L).....               | 41        |
| 3.8 Καλλιέργεια της ζύμης <i>Lipomyces starkeyi</i> σε μίγμα 20 g/L ακάθαρτη γλυκερόλη<br>– 60 g/L ξυλόζη (Glo1 = 20g/L, Xyl = 60 g/L).....   | 43        |
| 3.9 Καλλιέργεια της ζύμης <i>Lipomyces starkeyi</i> σε μίγμα 60 g/L ακάθαρτη γλυκερόλη<br>– 20 g/L ξυλόζη (Glo1 = 60g/L, Xyl = 20 g/L).....   | 44        |
| 3.10 Καλλιέργεια της ζύμης <i>Lipomyces starkeyi</i> σε μίγμα 40 g/L ακάθαρτη<br>γλυκερόλη – 40 g/L ξυλόζη (Glo1 = 40g/L, Xyl = 40 g/L).....  | 46        |
| 3.11 Καλλιέργεια της ζύμης <i>Lipomyces starkeyi</i> σε μίγμα 20 g/L ακάθαρτη<br>γλυκερόλη – 60 g/L γλυκόζη (Glo1 = 20g/L, Glu = 60 g/L)..... | 47        |
| 3.12 Καλλιέργεια της ζύμης <i>Lipomyces starkeyi</i> σε μίγμα 60 g/L ακάθαρτη<br>γλυκερόλη – 20 g/L γλυκόζη (Glo1 = 60g/L, Glu = 20 g/L)..... | 49        |
| 3.13 Καλλιέργεια της ζύμης <i>Lipomyces starkeyi</i> σε μίγμα 40 g/L ακάθαρτη<br>γλυκερόλη – 40 g/L γλυκόζη (Glo1 = 40g/L, Glu = 40 g/L)..... | 50        |
| <b>4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....</b>   | <b>52</b> |
| <b>5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....</b>   | <b>56</b> |

## ΠΙΝΑΚΕΣ

|  |    |
|--|----|
| <b>Πίνακας 1:</b> Σύσταση αλάτων .....   | 23 |
| <b>Πίνακας 2:</b> Συγκεντρωτικός πίνακας αποτελεσμάτων της καλλιέργειας της ζύμης <i>Lipomyces starkeyi</i> σε σακχαρούχα ανανεώσιμα υποστρώματα με πηγές άνθρακα τη γλυκερόλη, τη γλυκόζη, τη ξυλόζη και μίγματα αυτών..... | 31 |
| <b>Πίνακας 3:</b> Σύσταση των λιπιδίων σε λιπαρά οξέα της ζύμης <i>Lipomyces starkeyi</i> σε υπόστρωμα γλυκόζης 80 g/L.....  | 34 |
| <b>Πίνακας 4:</b> Σύσταση των λιπιδίων σε λιπαρά οξέα της ζύμης <i>Lipomyces starkeyi</i> σε υπόστρωμα ξυλόζης 80 g/L.....   | 35 |
| <b>Πίνακας 5:</b> Σύσταση των λιπιδίων σε λιπαρά οξέα της ζύμης <i>Lipomyces starkeyi</i> σε υπόστρωμα γλυκερόλης 80 g/L.....  | 37 |
| <b>Πίνακας 6:</b> Σύσταση των λιπιδίων σε λιπαρά οξέα της ζύμης <i>Lipomyces starkeyi</i> σε αρχική συγκέντρωση γλυκόζης (Glu) 20 g/L και ξυλόζης (Xyl) 60 g/L, αρχικό pH=6.0± 0.1.....                                      | 39 |
| <b>Πίνακας 7:</b> Σύσταση των λιπιδίων σε λιπαρά οξέα της ζύμης <i>Lipomyces starkeyi</i> σε αρχική συγκέντρωση γλυκόζης (Glu) 60 g/L και ξυλόζης (Xyl) 20 g/L, αρχικό pH=6.0± 0.1.....                                      | 41 |
| <b>Πίνακας 8:</b> Σύσταση των λιπιδίων σε λιπαρά οξέα της ζύμης <i>Lipomyces starkeyi</i> σε αρχική συγκέντρωση γλυκόζης (Glu) 40 g/L και ξυλόζης (Xyl) 40 g/L, αρχικό pH=6.0± 0.1.....                                      | 42 |
| <b>Πίνακας 9:</b> Σύσταση των λιπιδίων σε λιπαρά οξέα της ζύμης <i>Lipomyces starkeyi</i> σε αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης (Glo) 20 g/L και ξυλόζης (Xyl) 60 g/L, αρχικό pH=6.0± 0.1.....                                    | 44 |
| <b>Πίνακας 10:</b> Σύσταση λιπιδίων σε λιπαρά οξέα της ζύμης <i>Lipomyces starkeyi</i> σε αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης (Glo) 60 g/L και ξυλόζης (Xyl) 20 g/L, αρχικό pH=6.0± 0.1.....                                       | 45 |
| <b>Πίνακας 11:</b> Σύσταση των λιπιδίων σε λιπαρά οξέα της ζύμης <i>Lipomyces starkeyi</i> σε αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης (Glo) 40 g/L και ξυλόζης (Xyl) 40 g/L, αρχικό pH=6.0± 0.1.....                                   | 47 |
| <b>Πίνακας 12:</b> Σύσταση των λιπιδίων σε λιπαρά οξέα της ζύμης <i>Lipomyces starkeyi</i> σε αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης (Glo) 20 g/L και γλυκόζης (Glu) 60 g/L, αρχικό pH=6.0± 0.1.....                                  | 48 |
| <b>Πίνακας 13:</b> Σύσταση των λιπιδίων σε λιπαρά οξέα της ζύμης <i>Lipomyces starkeyi</i> σε αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης (Glo) 60 g/L και γλυκόζης (Glu) 20 g/L, αρχικό pH=6.0± 0.1.....                                  | 50 |
| <b>Πίνακας 14:</b> Σύσταση των λιπιδίων σε λιπαρά οξέα της ζύμης <i>Lipomyces starkeyi</i> σε αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης (Glo) 40 g/L και γλυκόζης (Glu) 40 g/L, αρχικό pH=6.0± 0.1.....                                  | 51 |



## ΠΙΝΑΚΑΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

|  |    |
|--|----|
| <b>Εικόνα 1:</b> Απόβλητα ελαιοτριβείου.....   | 3  |
| <b>Εικόνα 2:</b> Συντακτικός τύπος της γλυκερόλης.....   | 6  |
| <b>Εικόνα 3:</b> Μεθοδολογικό διάγραμμα ροής διεργασίας παραγωγής βιοντίζελ από εξευγενισμένα έλαια.....   | 7  |
| <b>Εικόνα 4:</b> Ενδιάμεσος μεταβολισμός της γλυκόζης και της γλυκερόλης προς παραγωγή κιτρικού οξέος και/ή μικροβιακού λίπους.....  | 10 |
| <b>Εικόνα 5:</b> Αποικοδόμηση της ξυλόζης μέσω της οδού των κετολασών και ή της οδού των φωσφορικών πεντοζών.....  | 11 |
| <b>Εικόνα 6:</b> Αποικία του <i>Lipomyces starkeyi</i> στο μικροσκόπιο.....  | 15 |
| <b>Εικόνα 7:</b> Απεικόνιση του κύκλου του Krebs (transhydrogenase cycle) και του κύκλου του κιτρικού/μηλικού οξέος (citrate/malate cycle) ως προάγγελοι στην παραγωγή του ακετυλο συνένζυμου Α και NADPH, για τη λιπογένεση στους ελαιογόνους μικροοργανισμούς..... | 17 |
| <b>Εικόνα 8:</b> Υποθετικό σενάριο συσσώρευσης ενδοπολυσακχαριτών (IPS) και λιπιδίων από μικροοργανισμούς.....   | 20 |
| <b>Εικόνα 9:</b> Κωνικές φιάλες 250 ml εμβολιασμένες με κύτταρα ζύμης <i>Lipomyces starkeyi</i> .....  | 22 |
| <b>Εικόνα 10:</b> Εκχέλιση μικροβιακού λίπους με διαλύτη Folch.....  | 25 |
| <b>Εικόνα 11:</b> Εξάτμιση του διηθήματος από την φιάλη εξάτμισης με τη βοήθεια περιστροφικού εξατμιστήρα (Flash Evaporator - Rotavapor R-114) υπό κενό.....   | 26 |

## ΠΙΝΑΚΑΣ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ

**Διάγραμμα 1:** Κινητική εξέλιξη της βιομάζας, της κατανάλωσης γλυκόζης και της παραγωγής λιπιδίων και IPS, συναρτήσει του χρόνου για το στέλεχος *Lipomyces starkeyi* σε ακάθαρτη γλυκόζη ως μόνη πηγή άνθρακα, σε περιοριστικές σε άζωτο συνθήκες. Συνθήκες καλλιέργειας: ανάπτυξη σε ανακινούμενες φιάλες όγκου 250 mL (180±5 rpm), θερμοκρασία 30 oC, αρχική συγκέντρωση γλυκόζης (Glu) 80 g/L, αρχικό pH=6.0± 0.1.....33

**Διάγραμμα 2:** Κινητική εξέλιξη της βιομάζας, της κατανάλωσης ξυλόζης και της παραγωγής λιπιδίων και IPS, συναρτήσει του χρόνου για το στέλεχος *Lipomyces starkeyi* σε ακάθαρτη ξυλόζη ως μόνη πηγή άνθρακα, σε περιοριστικές σε άζωτο συνθήκες. Συνθήκες καλλιέργειας: ανάπτυξη σε ανακινούμενες φιάλες όγκου 250 mL (180±5 rpm), θερμοκρασία 30 oC, αρχική συγκέντρωση ξυλόζης (Xyl) 80 g/L, αρχικό pH=6.0± 0.1.....35

**Διάγραμμα 3:** Κινητική εξέλιξη βιομάζας, της κατανάλωσης γλυκερόλης και παραγωγής λιπιδίων και IPS, συναρτήσει του χρόνου για το στέλεχος *Lipomyces starkeyi* σε βιομηχανική γλυκερόλη ως μόνη πηγή άνθρακα, σε περιοριστικές σε άζωτο συνθήκες. Συνθήκες καλλιέργειας: ανάπτυξη σε ανακινούμενες φιάλες όγκου 250 mL (180±5 rpm), θερμοκρασία 30 oC, αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης (GloI) 80 g/L, αρχικό pH=6.0± 0.1.....36

**Διάγραμμα 4:** Ποσοστιαία κατανομή των κλασμάτων (ουδέτερα, σφιγγο-γλυκολιπίδια και φωσφολιπίδια) επί του συνόλου των ολικών λιπιδίων (TL) της ζύμης *Lipomyces starkeyi* με τη γλυκερόλη ως μόνη πηγή άνθρακα στην στάσιμη φάση. Συνθήκες καλλιέργειας: ασυνεχής ζύμωση σε ανακινούμενες κωνικές φιάλες (180 rpm) και θερμοκρασία T = 30 oC, αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης (So GloI = 80 g/L) και πηγές αζώτου 1 g/L yeast extract και 3 g/L πεπτόνη, υπό αερόβιες συνθήκες.....38

**Διάγραμμα 5:** Κινητική εξέλιξη της βιομάζας, της κατανάλωσης γλυκόζης-ξυλόζης και της παραγωγής λιπιδίων και IPS, συναρτήσει του χρόνου για το στέλεχος *Lipomyces starkeyi* σε μίγμα γλυκόζης-ξυλόζης ως πηγή άνθρακα, σε περιοριστικές σε άζωτο συνθήκες. Συνθήκες καλλιέργειας: ανάπτυξη σε ανακινούμενες φιάλες όγκου 250 mL (180±5 rpm), θερμοκρασία 30 oC, αρχική συγκέντρωση γλυκόζης (Glu) 20 g/L και ξυλόζης (Xyl) 60 g/L, αρχικό pH=6.0± 0.1..... 39

**Διάγραμμα 6:** Κινητική εξέλιξη της βιομάζας, της κατανάλωσης γλυκόζης-ξυλόζης και της παραγωγής λιπιδίων και IPS, συναρτήσει του χρόνου για το στέλεχος *Lipomyces starkeyi* σε μίγμα γλυκόζης-ξυλόζης ως πηγή άνθρακα, σε περιοριστικές σε άζωτο συνθήκες. Συνθήκες καλλιέργειας: ανάπτυξη σε ανακινούμενες φιάλες όγκου 250 mL (180±5 rpm), θερμοκρασία 30 oC, αρχική συγκέντρωση γλυκόζης (Glu) 60 g/L και ξυλόζης (Xyl) 20 g/L, αρχικό pH=6.0± 0.1..... 40

**Διάγραμμα 7:** Κινητική εξέλιξη της βιομάζας, της κατανάλωσης γλυκόζης-ξυλόζης και της παραγωγής λιπιδίων και IPS, συναρτήσει του χρόνου για το στέλεχος *Lipomyces starkeyi* σε μίγμα γλυκόζης-ξυλόζης ως πηγή άνθρακα, σε περιοριστικές σε άζωτο συνθήκες. Συνθήκες καλλιέργειας: ανάπτυξη σε ανακινούμενες φιάλες όγκου 250 mL (180±5 rpm), θερμοκρασία 30 oC, αρχική συγκέντρωση γλυκόζης (Glu) 40 g/L και ξυλόζης (Xyl) 40 g/L, αρχικό pH=6.0± 0.1.....42

**Διάγραμμα 8:** Κινητική εξέλιξη της βιομάζας, της κατανάλωσης γλυκερόλης-ξυλόζης και της παραγωγής λιπιδίων και IPS, συναρτήσει του χρόνου για το στέλεχος *Lipomyces starkeyi* σε μίγμα γλυκερόλης-ξυλόζης ως πηγή άνθρακα, σε περιοριστικές σε άζωτο συνθήκες. Συνθήκες καλλιέργειας: ανάπτυξη σε ανακινούμενες φιάλες όγκου 250 mL (180±5 rpm), θερμοκρασία 30 °C, αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης (G1ol) 20 g/L και ξυλόζης (Xyl) 60 g/L, αρχικό pH=6.0± 0.1.....43

**Διάγραμμα 9:** Κινητική εξέλιξη της βιομάζας, της κατανάλωσης γλυκερόλης - ξυλόζης και της παραγωγής λιπιδίων και IPS, συναρτήσει του χρόνου για το στέλεχος *Lipomyces starkeyi* σε μίγμα γλυκερόλης - ξυλόζης ως πηγή άνθρακα, σε περιοριστικές σε άζωτο συνθήκες. Συνθήκες καλλιέργειας: ανάπτυξη σε ανακινούμενες φιάλες όγκου 250 mL (180±5 rpm), θερμοκρασία 30 °C, αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης (G1ol) 60 g/L και ξυλόζης (Xyl) 20 g/L, αρχικό pH=6.0± 0.1.....45

**Διάγραμμα 10:** Κινητική εξέλιξη της βιομάζας, της κατανάλωσης γλυκερόλης-ξυλόζης και της παραγωγής λιπιδίων και IPS, συναρτήσει του χρόνου για το στέλεχος *Lipomyces starkeyi* σε μίγμα γλυκόζης-ξυλόζης ως πηγή άνθρακα, σε περιοριστικές σε άζωτο συνθήκες. Συνθήκες καλλιέργειας: ανάπτυξη σε ανακινούμενες φιάλες όγκου 250 mL (180±5 rpm), θερμοκρασία 30 °C, αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης (G1ol) 40 g/L και ξυλόζης (Xyl) 40 g/L, αρχικό pH=6.0± 0.1.....46

**Διάγραμμα 11:** Κινητική εξέλιξη της βιομάζας, της κατανάλωσης γλυκερόλης - γλυκόζης και της παραγωγής λιπιδίων και IPS, συναρτήσει του χρόνου για το στέλεχος *Lipomyces starkeyi* σε μίγμα γλυκόζης-ξυλόζης ως πηγή άνθρακα, σε περιοριστικές σε άζωτο συνθήκες. Συνθήκες καλλιέργειας: ανάπτυξη σε ανακινούμενες φιάλες όγκου 250 mL (180±5 rpm), θερμοκρασία 30 °C, αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης (G1ol) 20 g/L και γλυκόζης (Glu) 60 g/L, αρχικό pH=6.0± 0.1.....48

**Διάγραμμα 12:** Κινητική εξέλιξη της βιομάζας, της κατανάλωσης γλυκερόλης - γλυκόζης και της παραγωγής λιπιδίων και IPS, συναρτήσει του χρόνου για το στέλεχος *Lipomyces starkeyi* σε μίγμα γλυκόζης-ξυλόζης ως πηγή άνθρακα, σε περιοριστικές σε άζωτο συνθήκες. Συνθήκες καλλιέργειας: ανάπτυξη σε ανακινούμενες φιάλες όγκου 250 mL (180±5 rpm), θερμοκρασία 30 °C, αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης (G1ol) 60 g/L και γλυκόζης (Glu) 20 g/L, αρχικό pH=6.0± 0.1.....49

**Διάγραμμα 13:** Κινητική εξέλιξη της βιομάζας, της κατανάλωσης γλυκερόλης - γλυκόζης και της παραγωγής λιπιδίων και IPS, συναρτήσει του χρόνου για το στέλεχος *Lipomyces starkeyi* σε μίγμα γλυκόζης-ξυλόζης ως πηγή άνθρακα, σε περιοριστικές σε άζωτο συνθήκες. Συνθήκες καλλιέργειας: ανάπτυξη σε ανακινούμενες φιάλες όγκου 250 mL (180±5 rpm), θερμοκρασία 30 °C, αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης (G1ol) 40 g/L και γλυκόζης (Glu) 40 g/L, αρχικό pH=6.0± 0.1.....51

**Διάγραμμα 14:** Στο παρόν γράφημα παρουσιάζονται οι μέγιστες τιμές παραγωγής βιομάζας (g/L), λιπιδίων (g/L), ενδοκυτταρικών πολυσακχαριτών IPS (g/L), καθώς και το % ποσοστό λιποσυσσώρευσης YL/X για καθεμία από τις 12 ζυμώσεις που πραγματοποιήθηκαν. Για κάθε ζύμωση αναγράφεται η αρχική συγκέντρωση σακχάρων (g/L).....54

# 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

## 1.1 Βιομηχανικά παραπροϊόντα και απόβλητα

Ως απόβλητο νοείται οποιοδήποτε προϊόν της βιομηχανίας του οποίου η περεταίρω επεξεργασία θεωρείται οικονομικά ασύμφορη. Ως παραπροϊόν θεωρείται ένα βιομηχανικό προϊόν ευτελούς αξίας το οποίο παράγεται παραπλεύρως του κύριου προϊόντος της βιομηχανικής διεργασίας. Στη σημερινή εποχή η διαχείριση και η επεξεργασία των βιομηχανικών παραπροϊόντων και αποβλήτων αποτελεί σημαντικό και δυσεπίλυτο πρόβλημα καθώς ο όγκος τους αυξάνει ραγδαία τα τελευταία χρόνια με άμεσες δυσμενείς επιπτώσεις στο περιβάλλον και την ανθρώπινη υγεία. Είναι γεγονός ότι περίπου το 15% κ.β όλων των εδώδιμων προϊόντων της βιομηχανίας τροφίμων απολήγουν στην κατηγορία των αποβλήτων. Τα βιομηχανικά απόβλητα είναι συνήθως παραπροϊόντα της παραγωγικής διαδικασίας, ακαθαρσίες της πρώτης ύλης και λάσπες που παράγονται κατά την διάρκεια των βιομηχανικών διεργασιών. Τα βιομηχανικά παραπροϊόντα και απόβλητα προέρχονται από τη δραστηριότητα διαφόρων γεωργικών βιομηχανιών και επιχειρήσεων μεταποίησης, επεξεργασίας τροφίμων και γεωργικών προϊόντων. Πρόκειται για παραπροϊόντα και απόβλητα, των οποίων ο όγκος αυξάνει με ταχύτατους ρυθμούς (Koutinas et al., 2014).

Η διαχείριση των εν λόγω αποβλήτων και παραπροϊόντων προκαλεί τεράστια προβλήματα στην βιομηχανία διότι αποτελούν πηγή ρύπανσης του περιβάλλοντος και η μετακομιδή τους απαιτεί υψηλό κόστος. Στις ανεπτυγμένες χώρες, τα δύο τρίτα των οργανικών αποβλήτων και παραπροϊόντων παράγονται από τις γεωργικές και βιομηχανικές εκμεταλλεύσεις. Συγκεκριμένα στις ΗΠΑ παράγονται ετησίως 10 δις τόνοι στερεών αποβλήτων. Υπολογίζονται περίπου 700 κιλά αστικών απορριμμάτων ετησίως ανά κάτοικο, δύο με τρεις φορές περισσότερα από όσα στις υπόλοιπες ανεπτυγμένες χώρες.

Τα στερεά απόβλητα δύναται να είναι απόβλητα που προέρχονται από το φυτικό υλικό και στερεά απόβλητα τύπου «ληγμένων» εδώδιμων προϊόντων που είναι πλούσια σε περιεκτικότητα σακχάρων όπως τα προερχόμενα από ληγμένα προϊόντα (παιδικές τροφές, απορριφθέντα προϊόντα κατά την παραγωγική διαδικασία, απόβλητη ζάχαρη, και άλλα). Για τον συγκεκριμένο τύπο αποβλήτων, η βιομηχανία πληρώνει από 0,1-0,5 ευρώ ανά κιλό αποβλήτου για να απαχθούν αυτά τα απόβλητα,

τα οποία συνήθως σε επόμενο στάδιο υφίστανται διεργασία κομποστοποίησης (Papanikolaou & Aggelis, 2010). Τεράστιες είναι και οι ποσότητες των υγρών ή ημιστερεών αποβλήτων τα οποία παράγονται κατά την γεωργική πρακτική και στον βιομηχανικό χώρο. Αυτά μπορεί να είναι απόβλητα:

- πλούσια σε υδατάνθρακες (σάκχαρα απλά ή σύνθετα),
- πλούσια σε λίπος (βιομηχανικά λίπη και έλαια), όπου προέρχονται από σφαγεία, εστιατόρια και βιομηχανίες παρασκευής έτοιμων εδεσμάτων
- υγρά απόβλητα ελαιουργείων, τα οποία είναι πλούσια σε σάκχαρα, οργανικά οξέα, φαινολικά συστατικά και άλατα (Koutinas et al., 2014).

Η σύσταση τους ποικίλλει ανάλογα με την πηγή προέλευσης τους και το στάδιο της κατεργασίας από το οποίο προέρχονται. Χαρακτηρίζονται από υψηλά επίπεδα υγρασίας (70-80%) και η υπόλοιπη ξηρά ουσία αποτελείται από βιοαποικοδομήσιμη ύλη. Ο σύγχρονος βιομηχανικός τρόπος ζωής έχει οδηγήσει στην αύξηση των παραγόμενων λυμάτων και αποβλήτων, ιδιαίτερα αυτών που δεν έχουν υποστεί επεξεργασία, με σοβαρές επιπτώσεις στο οικοσύστημα. Η ανεξέλεγκτη διάθεση των αποβλήτων είναι μόνιμη απειλή για το περιβάλλον, τους υδατικούς πόρους, το έδαφος και τη δημόσια υγεία. Κατά την παραμονή τους, τα απόβλητα και τα παραπροϊόντα αποσυντίθενται αρκετά γρήγορα, παράγοντας οργανικά οξέα και δύσοσμα συστατικά, κάνοντας δύσκολη την αποθήκευση και τα χρήση τους. Τα λύματα είναι πλούσια σε οργανικά θρεπτικά συστατικά και όταν αποβάλλονται στους υδάτινους αποδέκτες (θάλασσα, λίμνες, ποτάμια), δημιουργούν μεγάλες απαιτήσεις σε οξυγόνο, προκειμένου να διασπαστούν αερόβια από βακτήρια και μύκητες. Η διαρροή των στοιχείων αυτών προκαλεί το φαινόμενο του ευτροφισμού με αποτέλεσμα να διαταράσσεται η ισορροπία του οικοσυστήματος. Επίσης η διαρροή αζώτου προς τα υπόγεια ύδατα, τα καθιστά ακατάλληλα για πόση. Ακόμη ένα πρόβλημα που δημιουργείται είναι η έκλυση αερίων όπως η αμμωνία και το μεθάνιο, τα οποία ρυπαίνουν την ατμόσφαιρα (Lin et al., 2015).

Τα τελευταία χρόνια, έχοντας υπόψη την ρύπανση του περιβάλλοντος, καθώς και τα διάφορα οικονομικά κίνητρα και την ανάγκη για τη διατήρηση της ενέργειας και των νέων υλικών, καινούριες μέθοδοι και πολιτικές έχουν προταθεί για την ανάκτηση, τη βιομετατροπή και τη χρησιμοποίηση των θρεπτικών συστατικών των

αποβλήτων επεξεργασίας τροφίμων. Η επεξεργασία των αποβλήτων και των παραπροϊόντων αποβλέπει στην ανακύκλωση τους, στην χρησιμοποίησή τους σε βιομηχανίες, τη μετατροπή τους σε προϊόντα υψηλής προστιθέμενης αξίας ή και τη χρήση ως ζωοτροφές μετά από βιολογική επεξεργασία.

Η χρήση των ανανεώσιμων γεωργικών και βιομηχανικών απόβλητων ως πρώτες ύλες για την παραγωγή ζυμώσιμων σακχάρων βοηθούν στη μείωση του κόστους παραγωγής και την εξάρτηση από τις καλλιέργειες τροφίμων (Zahari et al., 2012). Πολλές βιοτεχνολογικές διεργασίες έχουν αναπτυχθεί, με σπουδαιότερες τις μικροβιακές ζυμώσεις, για την αξιοποίησή των παραπροϊόντων. Τα παραπροϊόντα μπορούν να αντικαταστήσουν τα καθαρά σάκχαρα ως πρώτη ύλη στις μικροβιακές ζυμώσεις, συμβάλλοντας στη μείωση του κόστους των βιοδιεργασιών (Peters, 2006)



**Εικόνα 1:** Απόβλητα ελαιτριβείου (Διαδίκτυο, 1)

## **1.2 Υποστρώματα στις ζυμώσεις για την παραγωγή μικροβιακού λίπους**

### **1.2.1 Σακχαρούχα υποστρώματα**

Οι μικροοργανισμοί που συμμετέχουν στις μικροβιακές ζυμώσεις έχουν την ικανότητα να αναπτύσσονται σε πλήθος υποστρωμάτων. Τα υποστρώματα αυτά μπορεί να είναι υδρόφιλα συστατικά όπως σάκχαρα και παρομοίως μεταβολιζόμενα συστατικά όπως πολυσακχαρίδια, άμυλο (Aggelis et al., 1996; Chen & Chang, 1997) και γλυκερόλη, ή υδρόφοβα συστατικά όπως λίπος (Aggelis & Sourdis, 1997), μίγματα ελεύθερων λιπαρών οξέων (Papanikolaou et al., 2001; 2002a; Mlickova et al., 2004a; b) και n-αλκάνια). Τα υποστρώματα αυτά χαρακτηρίζονται ως ανανεώσιμες πηγές άνθρακα και ενέργειας λόγω των υψηλής αξίας συστατικών τους όπως τα σάκχαρα, οι πρωτεΐνες και λίπη που μπορούν να βιομετατραπούν σε πρωτεΐνη, βιοαέριο, λίπασμα, οργανικά οξέα, λιπίδια, οργανικά οξέα, βιοπλαστικά, βιοαιθανόλη, 1,3-προπανοδιόλη και πληθώρα άλλων προϊόντων (Peters, 2006).

Πέραν καμίας αμφιβολίας, οι μικροοργανισμοί αποτελούν σημαντικό εργαλείο στα χέρια των επιστημόνων καθιστώντας εφικτή την παραγωγή, μέσω βιομετατροπής ή ζυμωτικών διεργασιών, προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας. Για το λόγο αυτό, το βιοτεχνολογικό ενδιαφέρον έχει στραφεί προς την αξιοποίηση βιομηχανικών αποβλήτων ως υποστρωμάτων για την καλλιέργεια τους. Αξίζει να σημειωθεί ότι τα σακχαρούχα υποστρώματα προερχόμενα ως απόβλητα ή παραπροϊόντα της βιομηχανίας τροφίμων, λόγω της υψηλής περιεκτικότητας τους σε σάκχαρα αποτελούν άριστο υπόστρωμα για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών, ενώ υπό δεδομένες συνθήκες καλλιέργειας δύναται να ευνοηθεί η συσσώρευση του ενδοκυτταρικού λίπους.

Τα σακχαρούχα υποπροϊόντα που χρησιμοποιούνται για ζυμώσεις και παραγωγή μικροβιακών λιπιδίων ποικίλουν. Αυτά αποτελούνται από απλά σάκχαρα όπως, γλυκόζη, φρουκτόζη, λακτόζη και σουκρόζη. Επίσης σακχαρούχα υποπροϊόντα τα οποία είναι κατάλληλα για παραγωγή μικροβιακού λίπους είναι το τυρόγαλα, απόβλητα εμπλουτισμένα με γλυκόζη καθώς και η μελάσσα, τα οποία προέρχονται από βιομηχανίες τροφίμων (Papanikolaou et al., 2004; Fakas et al., 2007; Fakas et al., 2008; Angerbauer et al., 2008; Chatzifragkou et al., 2010; Papanikolaou et al., 2010; Wu et al., 2011; Tsakona et al., 2014, 2016). Επίσης, ζυμώσεις με χρήση της ξυλόζης

ως υπόστρωμα έχουν γίνει αντικείμενο μελέτης λόγω της αφθονίας της ξυλόζης στο περιβάλλον, καθώς απομονώνεται μετά από χημική υδρόλυση ποικίλων λιγνοκυτταρινούχων πρώτων υλών (Zhao et al., 2008; Fakas et al., 2009a,b; Huang et al., 2009; Pan et al., 2009; Zikou et al., 2013).

Τα τελευταία χρόνια, οι λιγνοκυτταρινούχες πρώτες ύλες έχουν γίνει αντικείμενο μελέτης και έχουν χρησιμοποιηθεί ως θρεπτικά μέσα σε βιομηχανικές ζυμώσεις. Το ξύλο, το γρασίδι, τα διάφορα γεωργικά και δασικά υπολείμματα, καθώς και τα θειούχα υδατικά διαλύματα χαρτοποιίας, που είναι άφθονα στη φύση και δύνανται να βιο-αποικοδομηθούν, αποτελούν τις κύριες πηγές των λιγνοκυτταρινούχων υποστρωμάτων. Ιδιαίτερη σημασία πρέπει να δοθεί στην αξιοποίηση των λιγνοκυτταρινούχων υλικών από τα υπολείμματα των γεωργικών καλλιεργειών, ο όγκος των οποίων αυξάνει συνεχώς και οδηγεί στην υποβάθμιση του περιβάλλοντος και στην απώλεια ωφέλιμων υλικών, τα οποία μπορούν να χρησιμοποιηθούν για παραγωγή βιο-καυσίμων, για δημιουργία προϊόντων κομποστοποίησης (compost) καθώς και για τη διατροφή του ανθρώπου και των ζώων. Τα λιγνοκυτταρινούχα υλικά αποτελούνται από κυτταρίνη σε μεγαλύτερο ποσοστό (30–60%), ημικυτταρίνες (20–40%) και λιγνίνη (10–30%). Η κυτταρίνη και οι ημικυτταρίνες είναι μακρομόρια που αποτελούνται από διάφορα σάκχαρα, ενώ η λιγνίνη είναι ένα φαινολικό πολυμερές (Peters, 2007).

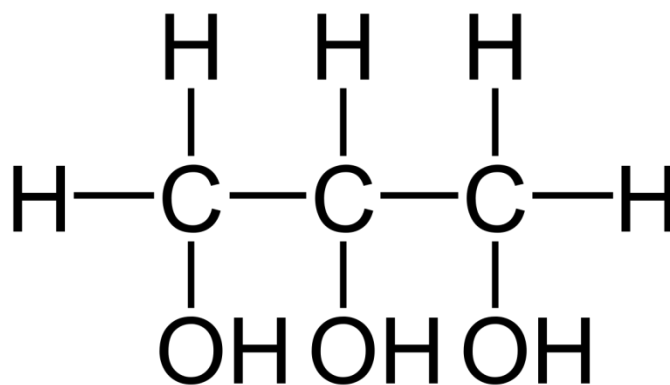
Στη λίστα των προϊόντων προστιθέμενης αξίας που μπορούν να παραχθούν από την αξιοποίηση των λιγνοκυτταρινούχων υπολειμμάτων συμπεριλαμβάνονται προϊόντα, όπως οργανικά οξέα, αμινοξέα, βιταμίνες και πλήθος σακχάρων από βακτήρια και μύκητες (ξανθίνες), σε ζυμώσεις που ως πηγή άνθρακα χρησιμοποιείται η γλυκόζη (Sánchez, 2009). Αξίζει να σημειωθεί ότι η παραγωγή μικροβιακού λίπους και ιδιαίτερος λιπιδίων που περιέχουν πολυακόρεστα λιπαρά οξέα σπανίως απαντώμενα στη φύση, αποτελεί ακόμη μια κατηγορία προϊόντων που μπορούν να παραχθούν από την αξιοποίηση των λιγνοκυτταρινούχων υπολειμμάτων. Κάποιοι μικροοργανισμοί, κυρίως μύκητες, όταν αναπτύσσονται σε υπόστρωμα με υψηλή συγκέντρωση πηγής άνθρακα, έχουν τη δυνατότητα να συσσωρεύουν λίπος σε σημαντικές ποσότητες, στο οποίο ενδέχεται να περιέχονται σε ποικίλα ποσά το λιπαρό οξύ γ-λινολενικό (GLA). Το συγκεκριμένο λιπαρό οξύ παρουσιάζει εξαιρετικό ενδιαφέρον εξαιτίας των φαρμακευτικών και διατροφικών ιδιοτήτων που διαθέτει. Ωστόσο, το κόστος της παραγωγής μικροβιακού ενδοκυτταρικού λίπους



είναι υψηλό. Για το λόγο αυτό, το βιοτεχνολογικό ενδιαφέρον έχει στραφεί προς την αξιοποίηση υπολειμμάτων ως υποστρωμάτων για την καλλιέργεια αυτών των μικροοργανισμών. Αξίζει δε να σημειωθεί ότι τα προϊόντα υδρόλυσης των λιγνοκυτταρινούχων υλικών (π.χ. γλυκόζη και ξυλόζη) αποτελούν άριστο υπόστρωμα για την ανάπτυξη των μυκήτων, ενώ υπό δεδομένες συνθήκες καλλιέργειας δύναται να ευνοηθεί η συσσώρευση του ενδοκυτταρικού λίπους.

### 1.2.2 Γλυκερόλη

Η γλυκερόλη εντοπίστηκε το 1779 από τον Σουηδό χημικό Carl W. Scheele, ο οποίος ανακάλυψε ένα νέο διαφανές, παχύρευστο υγρό θερμαίνοντας το ελαιόλαδο με λιθάργυρο (PbO- χρησιμοποιούνταν σε μολυβδόχα υαλώματα στην κεραμική). Η γλυκερόλη περιέχει τρεις υδρόφιλες αλκοολικές υδροξυλομάδες, οι οποίες είναι υπεύθυνες για τη διαλυτότητα της στο νερό και της υγροσκοπικής της φύση, επίσης, είναι ελαφρά διαλυτή σε πολλούς κοινούς διαλύτες (π.χ. αιθέρας), όμως είναι αδιάλυτη σε υδρογονάνθρακες.



**Εικόνα 2:** Συντακτικός τύπος της γλυκερόλης (Διαδίκτυο, 2)

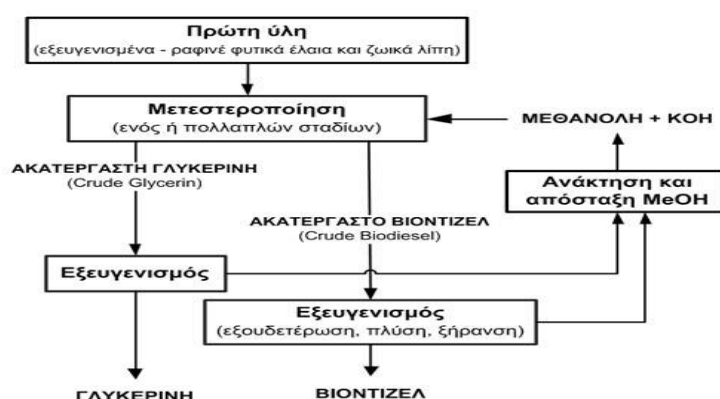
Στην καθαρή άνυδρη κατάστασή της, η γλυκερόλη έχει ειδικό βάρος 1.261g/mL, σημείο τήξης 18.2°C και σημείο ζέσεως 290°C, η οποία συνοδεύεται από αποσύνθεση, υπό συνθήκες κανονικής ατμοσφαιρικής πίεσης. Σε χαμηλές θερμοκρασίες, η γλυκερόλη μπορεί να σχηματίσει κρυστάλλους οι οποίοι τήκονται σε T=17.9°C. Συνολικά, διαθέτει ένα μοναδικό συνδυασμό φυσικών και χημικών ιδιοτήτων, οι οποίες χρησιμοποιούνται σε πολλές χιλιάδες εμπορικά προϊόντα. Πράγματι, έχει πάνω από 1500 γνωστές χρήσεις, συμπεριλαμβανομένων των

εφαρμογών της ως συστατικό ή ενισχυτικό στη μεταποίηση σε καλλυντικά, σε είδη προσωπικής υγιεινής, σε προϊόντα προσωπικής φροντίδας, σε φαρμακευτικά σκευάσματα και σε τρόφιμα. Επιπλέον, είναι εξαιρετικά σταθερή υπό κανονικές συνθήκες αποθήκευσης, συμβατή με πολλές άλλες χημικές ουσίες, σχεδόν μη ερεθιστική σε διάφορες χρήσεις της και δεν έχει γνωστές αρνητικές περιβαλλοντικές επιπτώσεις (Pagliaro et al., 2010).

Η γλυκερόλη είναι προϊόν χαμηλού ή μηδενικού κόστους επιδεκτικό για περαιτέρω αξιοποίηση, (Papanikolaou & Aggelis, 2009). Γενικά η γλυκερόλη παράγεται από:

- Βιομηχανίες παραγωγής αιθανόλης και αλκοολούχων ποτών (thin stillage).
- Βιομηχανίες παραγωγής βιοντίζελ.
- Βιομηχανίες παραγωγής σαπώνων και ελαιοχημικών υλικών.
- Λόγω ενδοκυτταρικής αποθήκευσης μέχρι 85% κ.β σε στελέχη φυκών.

Ουσιαστικά πρόκειται για μια τρισθενής αλκοόλη η οποία απαντάται στη φύση σε όλα τα ζωικά και φυτικά λίπη στη μορφή γλυκεριδίων. Όταν αυτά τα λίπη υποστούν μετεστεροποίηση με την προσθήκη αλκοόλης (συνήθως μεθανόλη) για τον σχηματισμό βιοντίζελ, η γλυκερόλη ανακτάται στην αρχική της μορφή ως παραπροϊόν της αντίδρασης.



**Εικόνα 3:** Μεθοδολογικό διάγραμμα ροής διεργασίας παραγωγής βιοντίζελ από εξευγενισμένα έλαια (Διαδίκτυο, 3).

Τα τελευταία χρόνια παρατηρείται παγκοσμίως μια αλματώδη αύξηση στην σύνθεση βιοντίζελ. Στην Ευρώπη για παράδειγμα, η ετήσια παραγωγή του συγκεκριμένου βιοκαυσίμου, από 1.065.000 τόνους το 2002 ανήλθε στους 3.184.000 τόνους το 2005 και στους 6.069.000 τόνους το 2006. Αποτέλεσμα αυτής της αύξησης είναι να συσσωρεύονται σημαντικές ποσότητες γλυκερόλης που όπως αναφέρθηκε είναι το κύριο παραπροϊόν της παραγωγής βιοντίζελ.

Σήμερα η γλυκερόλη χρησιμοποιείται σε πολλές εφαρμογές όπως στα καλλυντικά, τις βαφές, την αυτοκινητοβιομηχανία, τα τρόφιμα, τον καπνό, τη φαρμακοβιομηχανία, τις βιομηχανίες υφασμάτων και δερμάτων. Χρησιμοποιείται, επίσης, ως πρώτη ύλη για την παραγωγή διαφόρων χημικών. Επιπροσθέτως, η χρήση της γλυκερόλης ως πρώτης ύλης σε βιομηχανικές ζυμώσεις παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον (Wang et al., 2001). Επομένως παρκετά υποσχόμενη εφαρμογή είναι η βιομετατροπή της γλυκερόλης σε προϊόντα υψηλής προστιθέμενης αξίας μέσω μικροβιακών ζυμώσεων.

Η γλυκερόλη δεν είναι μόνο φτηνή και διαθέσιμη σε μεγάλες ποσότητες, αλλά επιπλέον, ο μεγάλος βαθμός αναγωγής της την καθιστά αποδοτικότερο υπόστρωμα παραγωγής προϊόντων όπως η αιθανόλη, η ξυλιτόλη, το υδρογόνο κτλ. σε σύγκριση με τα σάκχαρα. Αναλυτικότερα, η γλυκερόλη χρησιμοποιείται ως υπόστρωμα στις μικροβιακές ζυμώσεις προς παραγωγή:

- Τριγλυκεριδίων
- Αλκοόλης
- Εστέρων
- Βιοαερίου
- Χρωστικών
- Οργανικών οξέων
- Μικροβιακής μάζας
- Πολυολών
- Μικροβιακού λίπους
- Βιοπλαστικών

Ακόμη δύναται να χρησιμοποιηθεί ως υπόστρωμα για την βιομετατροπή με χρήση βακτηρίων προς παραγωγή 1,3-προπανοδιόλης και πιθανόν 2,3-βουτανοδιόλης και αιθανόλης.

### 1.2.3 Μεταβολισμός γλυκόζης, ξυλόζης, γλυκερόλης

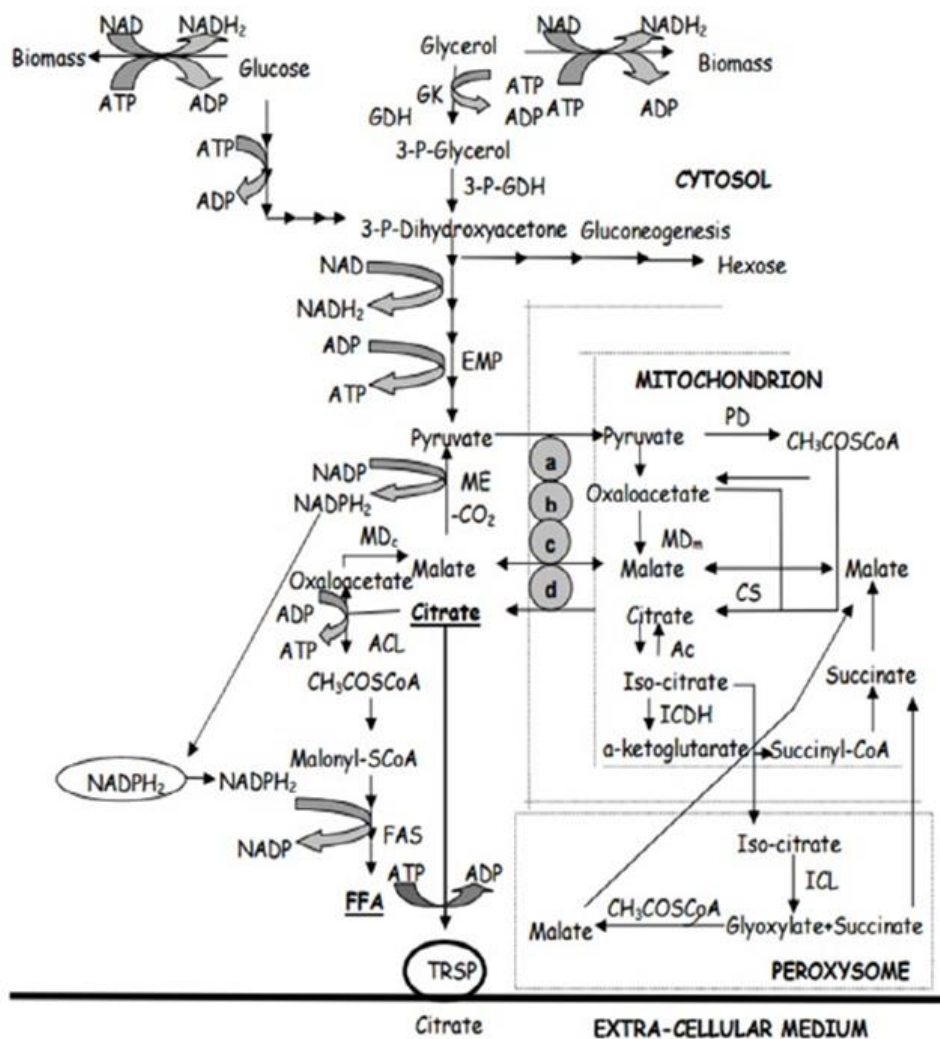
Σύμφωνα με την καταβολική οδό EMP (Embden- Meyerh of-Parnas) η οποία χρησιμοποιείται από τους ευκαριωτικούς μικροοργανισμούς και από κάποια βακτήρια η γλυκόζη και η φρουκτόζη μετατρέπονται σε πυροσταφυλικό οξύ χωρίς απώλειες άνθρακα. Το γλυκολιτικό σχήμα συνεισφέρει ενεργειακά στο μικροβιακό κύτταρο με την απόδοση δύο ανηγμένων συνενζύμων NADH και την αναγέννηση δύο μορίων ATP. Από ένα μόριο γλυκόζης παράγονται 2 μόρια πυροσταφυλικού οξέος μεγάλης βιολογικής σημασίας αφού το πυρουβικό οξύ τη βιοσυνθετική κεφαλή πολλών αναβολικών προδρόμων. Η συνολική αντίδραση του γλυκολυτικού σχήματος EMP, (Bellou et al., 2016) έχει ως εξής:



Σε μύκητες, ζύμες και σε αερόβια βακτήρια πραγματοποιείται ο αερόβιος μεταβολισμός της γλυκερόλης. Στις περισσότερες περιπτώσεις η είσοδος της γλυκερόλης στο μικροβιακό κύτταρο γίνεται με διευκολυνόμενη διάχυση κατά την οποία η πρωτεΐνη φορέας που εδράζει στην κυτταροπλασματική μεμβράνη προσδένεται στο μόριο και το μεταφέρει χωρίς όμως τι τελευταίο να υφίσταται φωσφορυλίωση επομένως δεν υπάρχει κατανάλωση ενέργειας. Εάν ο μικροοργανισμός δεν μπορεί να τελέσει την γλυκόλυση EMP δεν μπορεί να καταναλώσει την γλυκερόλη ως πηγή άνθρακα. Οποιοδήποτε και από τα τρία καταβολικά μονοπάτια της γλυκερόλης λαμβάνει χώρα στο τέλος υπάρχει σχηματισμός ενός ενδιάμεσου του C3 μονοπατιού της γλυκόλυσης EMP. Ακόμη από κάθε μόριο καταβολιζόμενης γλυκερόλης παράγεται ένα μόριο πυρουβικού οξέος, 2 αναγωγικά συνένζυμα NADH που θα ανακυκλωθούν είτε μέσω της βιοσύνθεσης υλικών είτε μέσω της αναπνοής και ένα μόριο ATP. Η συνολική αντίδραση του αερόβιου μεταβολισμού της γλυκερόλης, (Fakas et al., 2009) έχει ως εξής:



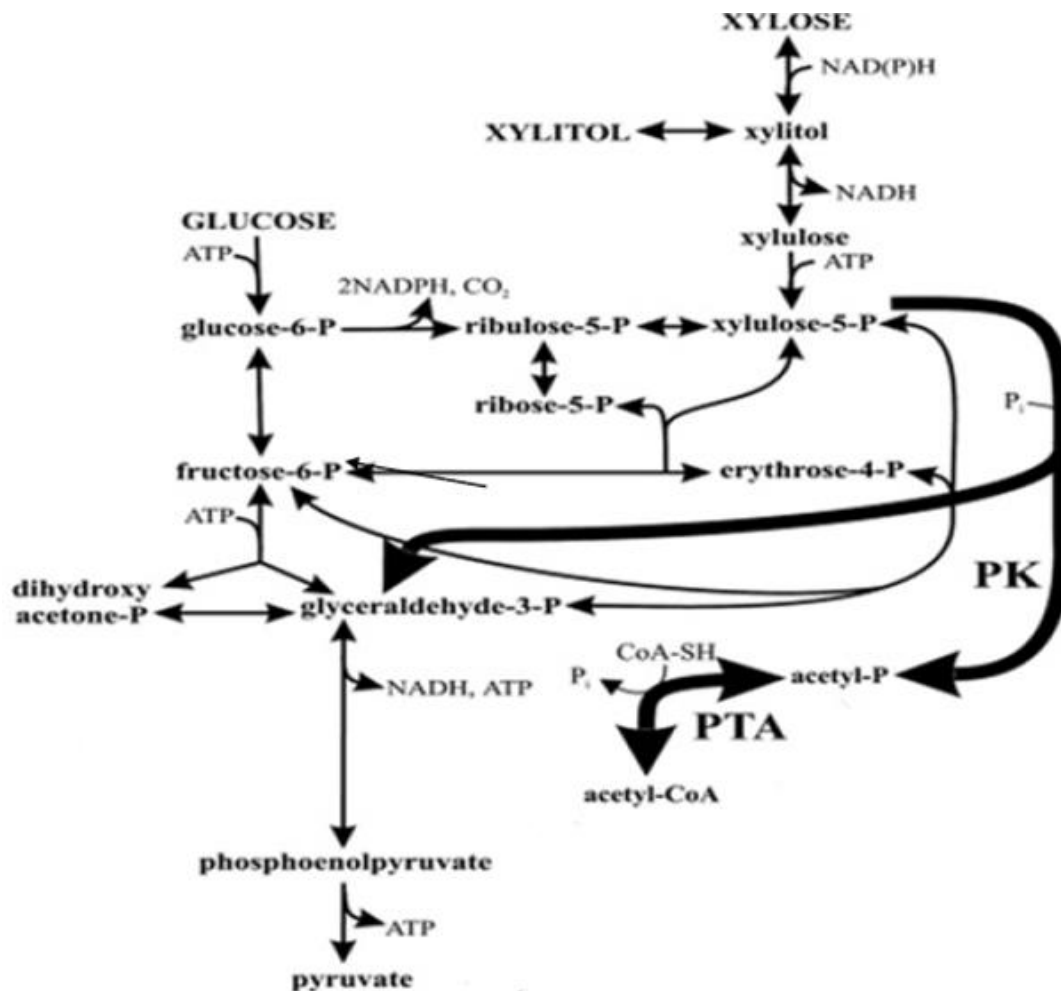
Στο παρακάτω σχήμα παρουσιάζεται αναλυτικά ο διάμεσος μεταβολισμός της γλυκόζης και της γλυκερόλης προς παραγωγή ενδοκυτταρικού λίπους - Single Cell Oil (SCO). Τόσο η γλυκόζη όσο και η γλυκερόλη, ύστερα από μετατροπή της σε 3-P-γλυκερόλη μέσω του ενζύμου κινάση της γλυκερόλης (GK), μετατρέπονται σε 3-P-διυδροξυακετόνη. Στη συνέχεια μέσω της καταβολικής οδού EMP μεταβολίζονται σε πυρρουβικό οξύ το οποίο από το κυτταρόπλασμα μεταφέρεται στο μιτοχόνδριο και συμβάλλει σημαντικά στην βιοσύνθεση λιπιδίων, διαδικασία που θα αναλυθεί στο επόμενο κεφάλαιο της παρούσας μελέτης.



**Εικόνα 4:** Ενδιάμεσος μεταβολισμός της γλυκόζης και της γλυκερόλης προς παραγωγή κιτρικού οξέος και/ή μικροβιακού λίπους. (Papanikolaou & Aggelis, 2011)

Το μονοπάτι των φωσφορικών πεντοζών (pentose phosphate pathway-PPP), το οποίο είναι το βασικό βιοχημικό μονοπάτι για τον μεταβολισμό της ξυλόζης, έχει

βρεθεί σε όλους τους ευκαρυωτικούς μικροοργανισμούς όπου προσφέρει D-ριβόζη για σύνθεση νουκλεοτιδίων, 4 φωσφορο-D-ερυθρόζη για σύνθεση αρωματικών αμινοξέων και NADPH για αναβολικές διεργασίες. Το PPP θεωρείται ότι χωρίζεται σε δύο φάσεις. Στην οξειδωτική φάση η εξόζη 6-P-γλυκόζη μετατρέπεται στην πεντόζη 5-P-ριβουλόζη σε CO<sub>2</sub> και σε NADPH. Στην μη-οξειδωτική φάση από την 5-P-ριβουλόζη παράγονται μόρια με 3-7 άτομα C, όπως 5-P-ριβόζη, 5-P-ξυλουλόζη, 7-P-σεδοεπτουλόζη, 6-P-φρουκτόζη, 4-P-ερυθρόζη και P-γλυκεριναλδεΐδη. Η είσοδος της D-ξυλόζης και της L-αραβινόζης στο PPP μονοπάτι πραγματοποιείται μέσω της D-ξυλουλόζης. Στις ζύμες, σε ορισμένους μύκητες και σε άλλους ευκαρυωτικούς μικροοργανισμούς η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται σε δύο στάδια οξείδωσης, με τη μεσολάβηση των ενζύμων ρεδουκτάση της ξυλόζης και αφυδρογονάση της ξυλιτόλης (Jeffries, 2006).



**Εικόνα 5:** Αποικοδόμηση της ξυλόζης μέσω της οδού των κετολασών και ή της οδού των φωσφορικών πεντοζών (Sarris & Papanikolaou, 2016).

## 1.3 Ελαιογόνοι μικροοργανισμοί

### 1.3.1 Χαρακτηριστικά ελαιογόνων μικροοργανισμών

Στην 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 περιβάλλοντος, δύναται να συσσωρεύσουν ενδοκυτταρικό λίπος, σε ποσοστό μεγαλύτερο από 20% (w/w) επί της ξηράς ουσίας (Papanikolaou and Aggelis, 2011; Ageitos et al., 2011).

Ο άνθρωπος από τα αρχαία χρόνια χρησιμοποίησε τους μικροοργανισμούς ως πηγή θρεπτικών συστατικών και τροφής, όπως τα ζυμούμενα τρόφιμα (γιαούρτι, τυρί, αλλαντικά) και τα αλκοολούχα ποτά τα οποία έχουν υποστεί ζυμώσεις (μπύρα, κρασί). Με το ίδιο σκεπτικό της παραγωγής μικροβιακής βιομάζας ως πηγή πρωτεϊνών για τα τρόφιμα, γίνεται προσπάθεια παραγωγής λίπους και ελαίων αξιοποιώντας τους μικροοργανισμούς. Το μικροβιακό λίπος, γνωστό ως Single Cell Oil (SCO), αφορά στο λίπος που παραλαμβάνεται από ένα μικροοργανισμό, ενώ παρουσιάζει συνηθέστερα σύσταση ομοιάζουσα με εκείνης των ελαίων φυτικής ή/και ζωϊκής προέλευσης. Ωστόσο, υπάρχουν κάποιες βασικές αρχές που θα πρέπει να ληφθούν υπ' όψιν (Ratledge and Wynn, 2006; Papanikolaou and Aggelis, 2011):

Η συσσώρευση λίπους δεν επιτελείται από όλους τους μικροοργανισμούς.

Οι κύριοι οργανισμοί παραγωγοί λίπους είναι οι μύκητες και οι ζύμες.

Κάποιοι μικροοργανισμοί συσσωρεύουν μεγαλύτερες ποσότητες λίπους από κάποιους άλλους.

Η συσσώρευση λίπους σε ένα μικροοργανισμό ενεργοποιείται από την εξάντληση κάποιου θρεπτικού συστατικού (συνήθως αζώτου) στο θρεπτικό μέσο και η υπάρχουσα πηγή άνθρακα (συνήθως γλυκόζη ή παρόμοιο μεταβολικό συστατικό) συνεχίζει να αφομοιώνεται από το μικροοργανισμό και αποθηκεύεται αποθησαυριστικά σε λίπος.

Τα έλαια που συσσωρεύονται από τους μικροοργανισμούς έχουν την ίδια σύσταση με αυτά που απαντώνται στους σπόρους των ελαιογόνων φυτών (τριγλυκερίδια και εστεροποιημένα λιπαρά οξέα).

Σύμφωνα με την βιβλιογραφία, ορισμένοι μικροοργανισμοί είναι ικανοί να συσσωρεύσουν λίπος έως 70- 80% (w/w) επί της ξηράς ουσίας (Ratledge, 2002; Ageitos et al., 2011). Ιστορικές πηγές αναφέρουν την χρησιμοποίηση των ελαιογόνων μικροοργανισμών (oleaginous ή oil-bearing microorganisms) προς παραγωγή λίπους από τον δεύτερο παγκόσμιο πόλεμο. Η λεπτομερής μελέτη αυτών των κυττάρων έχει πραγματοποιηθεί τα τελευταία χρόνια με βάση την βιβλιογραφία (Aggelis et al., 1988;1990;Ratledge, 1994;2002;2004; Ratledge & Cohen, 2008; Certik & Shimizu, 1999; Aggelis, 2007; Papanikolaou et al., 2007; Papanikolaou & Aggelis, 2011; Ageitos et al., 2011).

### **1.3.2 Ελαιογόνες ζύμες**

Οι ελαιογόνοι μικροοργανισμοί μπορεί να είναι κυρίως ζύμες και μύκητες αλλά και βακτήρια, καθώς και αυτότροφα φωτοσυνθέοντα μικροφύκη. Οι ζύμες ήταν οι πρώτοι μικροοργανισμοί που αναγνωρίστηκαν ικανοί για την συσσώρευση μικροβιακού λίπους (Papanikolaou & Aggelis, 2011). Υπάρχουν αναφορές ότι τουλάχιστον 25 διαφορετικά είδη ζυμών μπορούν να συσσωρεύσουν λίπος εντός των κυττάρων τους σε ποσοστά μεγαλύτερα από το 20% w/w επί της ξηράς τους ουσίας σε αντίθεση με τους μύκητες των οποίων λιγότερα από 50 είδη μπορούν να συσσωρεύσουν ενδοκυτταρικό λίπος πάνω από το 25% w/w επί της ξηράς τους ουσίας (Ratledge, 1989).

Τα γένη των ζυμών *Yarrowia* spp., *Cryptococcus* spp., *Candida* spp., *Rhodotorula* spp., *Rhodosporidium* spp., *Trichosporon* spp. και *Lipomyces* spp. έχουν χαρακτηριστεί ως τυπικά ελαιογόνα γένη (Ageitos et al., 2011). Η δυνατότητα παραγωγής λιπιδίων σε βιομηχανική κλίμακα χρησιμοποιώντας ελαιογόνες ζύμες έχει μελετηθεί από αρκετούς ερευνητές (Turcotte & Kosaric, 1988;1989; Jacob, 1992; Ratledge, 2004; Angerbauer et al. 2008; Li et al. 2008; Xu et al., 2012). Τα μικροβιακά λιπίδια έχουν βιομηχανικό ενδιαφέρον, λόγω των βιοχημικών και φυσικοχημικών ιδιοτήτων τους.



Θα πρέπει να τονίσουμε ότι οι ελαιογόνες ζύμες παράγουν λίπος, με την μορφή τριγλυκεριδίων, πλούσιων σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (Paranikolaou et al., 2001). Επίσης, δύναται να συσσωρεύουν λίπος μέχρι και 80%(w/w) κατά βάρος, επί της ξηρής μάζας τους (Picataggio & Smittle, 1979; Boulton & Ratledge, 1984; Pan et al., 2009).

Έρευνες αναφέρουν ότι ελαιογόνες ζύμες μπορούν να παράγουν λιπίδια από διαφορετικές πηγές αζώτου, ακόμα και από λιπίδια που βρίσκονται στο μέσο ανάπτυξης (Iassonova et al., 2008; Katre et al., 2012).

### 1.3.3 Ζύμη *Lipomyces starkeyi*

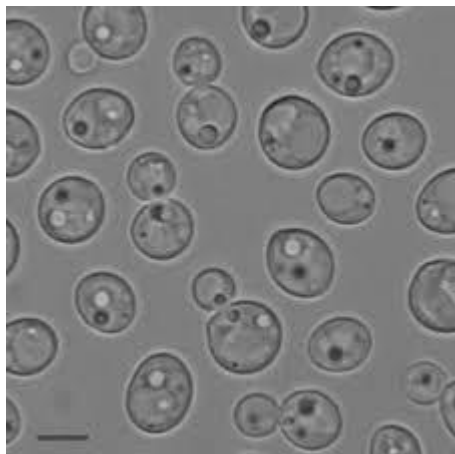
Η ζύμη *Lipomyces starkeyi* έχει προσελκύσει πρόσφατα την προσοχή, καθώς μπορεί να αξιοποιήσει με μεγάλη αποδοτικότητα διάφορες πηγές άνθρακα, όπως γλυκόζη, φρουκτόζη, σακχαρόζη, ξυλόζη και αραβινόζη.

Σύμφωνα με διάφορες πειραματικές μελέτες οι αποδόσεις της ζύμης *Lipomyces starkeyi*, όσον αφορά τη συσσώρευση ενδοκυτταρικών λιπιδίων, ήταν αρκετά υψηλές, συγκεκριμένα έφθασαν το 61,5% επί της συνολικής ξηρής βιομάζας, όταν η ανάπτυξη της ζύμης πραγματοποιήθηκε σε μίγματα γλυκόζης και ξυλόζης (Zhao et al., 2008), 56,3% και 72,3% σε γλυκόζη (Angerbauer et al., 2008), 40% σε μη ρευστοποιημένο άμυλο γλυκοπατάτας (Wild, 2010) και 31,2% σε άχυρο σίτου, που είχε υποστεί υδρόλυση με διάλυμα αραιού θεικού οξέος.

Ακόμη σύμφωνα με μελέτες του δυναμικού συσσώρευσης λιπιδίων του *Lipomyces starkeyi*, κατά την καλλιέργειά του σε λυματολάσπη, παρατηρήθηκε ότι σε ένα συνθετικό μέσο η συσσώρευση λιπιδίων εξαρτάται σημαντικά από την αναλογία C/N και συγκεκριμένα η υψηλότερη περιεκτικότητα λιπιδίων βρέθηκε σε αναλογία C/N: 150 με 68% λιπίδια επί της ξηρής βιομάζας, ενώ σε μια αναλογία C/N: 60 η συσσώρευση λιπιδίων μειώθηκε σε 40%.

Επιπλέον, το pH του μέσου καλλιέργειας φαίνεται να επηρεάζει τη συσσώρευση λιπιδίων, καθώς σε ένα εύρος pH από 5,00 έως 7,50 η υψηλότερη συσσώρευση λιπιδίων βρέθηκε σε pH ίσο με 5,00, ενώ η υψηλότερη απόδοση ανά λίτρο σημειώθηκε σε pH ίσο με 6,50.

Επίσης, μετά τη συγκριτική μελέτη των ζυμών *Candida curvata*, *Trichosporoncuruloides*, *Rhodospiridium toruloides* και *Lipomyces starkeyi*, ο τελευταίος μικροοργανισμός φάνηκε ότι μπορεί να αποθηκεύσει τις μεγαλύτερες ποσότητες λιπιδίων.



**Εικόνα 6:** Αποικία του *Lipomyces starkeyi* στο μικροσκόπιο. [Διαδίκτυο, 4]

## **1.4 Βιοχημεία συσσώρευσης μεταβολικών προϊόντων**

### **1.4.1 Βιοχημεία συσσώρευσης ενδοκυτταρικού λίπους**

Η συσσώρευση του λίπους εντός των κυττάρων του ελαιογόνου μικροοργανισμού απαιτεί ως αναγκαία συνθήκη την καλλιέργεια του μικροοργανισμού σε περιβάλλον με περίσσεια πηγή άνθρακα και περιορισμό σε άζωτο. Όταν το άζωτο του θρεπτικού μέσου εξαντληθεί, οι ελαιογόνοι μικροοργανισμοί συνεχίζουν να αφομοιώνουν την πηγή άνθρακα (στην παρούσα μελέτη πηγή άνθρακα είναι η γλυκόζη), μετατρέποντας την σε τριγλυκερίδια, τα οποία συσσωρεύονται εντός των κυττάρων (Ratledge, 2004; Paranikolaou and Aggelis, 2011).

Ο χαρακτηρισμός ενός μικροοργανισμού ως ελαιογόνου οφείλεται σε δύο κυρίως παραμέτρους. Η πρώτη αφορά την δυνατότητα συνεχόμενης παραγωγής ακέτυλο συνενζύμου Α (Acetyl-CoA) απευθείας στο κυτταρόπλασμα του κυττάρου, ενεργώντας ως προαπαιτούμενος προάγγελος για την σύνθεση των λιπαρών οξέων. Η δεύτερη αφορά την ικανότητα του μικροοργανισμού να παράγει επαρκείς ποσότητες

NADPH, δηλαδή ενός βασικού αναγωγικού μέσου που συμμετέχει στο μηχανισμό βιοσύνθεσης των λιπαρών οξέων (Papanikolaou & Aggelis, 2011).

Ο σχηματισμός του ακετυλο συνένζυμου Α στους ελαιογόνους μικροοργανισμούς αποδίδεται στην παρουσία της ATP κιτρικής λυάσης (ACL), η οποία δεν απαντάται στην πλειοψηφία των μη-ελαιογόνων μικροοργανισμών. Η εξάντληση της πηγής αζώτου στο θρεπτικό μέσο από το μικροοργανισμό οδηγεί σε μια σειρά αντιδράσεων με αποτέλεσμα το σχηματισμό του ακετυλοσυνένζυμου Α. Έτσι, κατά την κατανάλωση του αζώτου ενεργοποιείται το ένζυμο AMP- απαμινάση με αποτέλεσμα την ταχύτατη πτώση της περιεκτικότητας του κυττάρου σε AMP και την παρεμπόδιση της δράσης του ενζύμου ισοκιτρική αφυδρογονάση. Με αυτό τον τρόπο το κιτρικό οξύ δε μπορεί να μεταβολιστεί και συσσωρεύεται στο μιτοχόνδριο. Στη συνέχεια, το κιτρικό οξύ εισέρχεται στο κυτταρόπλασμα και διασπάται από την ATP κιτρική λυάση (ACL) σε ακετυλοσυνένζυμο Α και σε οξαλοξικό οξύ. Έπειτα, το ακετυλοσυνένζυμο Α χρησιμοποιείται ως προάγγελος για τη βιοσύνθεση των λιπαρών οξέων, ενώ το οξαλοξικό οξύ μετατρέπεται μέσω της αφυδρογονάσης του μηλικού οξέος σε μηλικό, το οποίο στη συνέχεια χρησιμοποιείται στον κύκλο κιτρικού/μηλικού οξέος (Ratledge, 2002; 2004) (Σχήμα I.4). Η αντίδραση που λαμβάνει χώρα είναι η εξής:



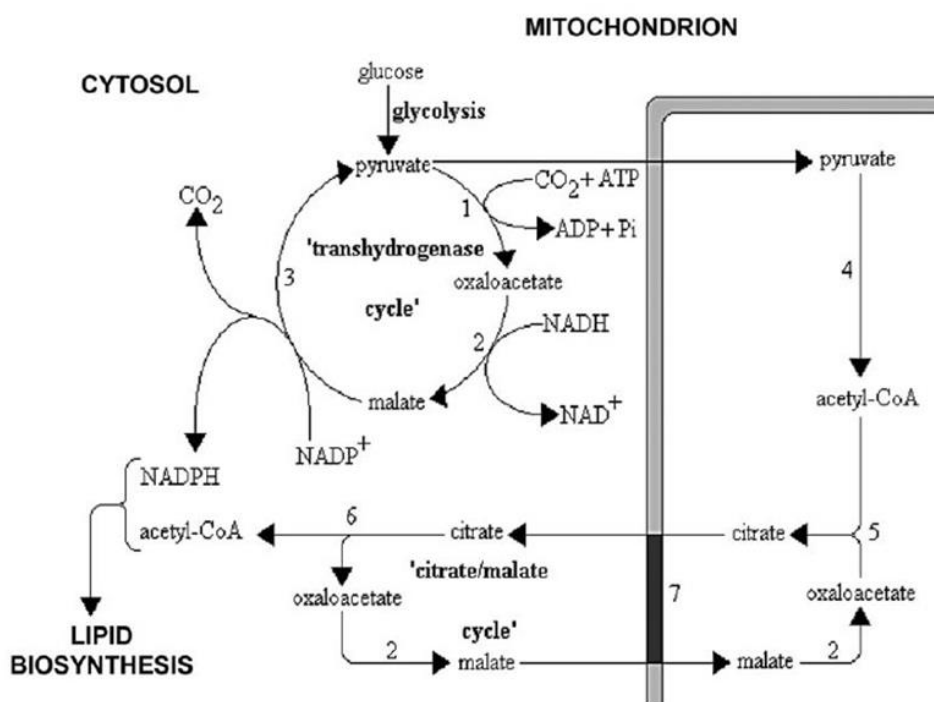
Για τη βιοσύνθεση των λιπαρών οξέων, εκτός από την παραγωγή του ακετυλοσυνένζυμου Α, είναι απαραίτητη η παροχή επαρκούς ποσότητας NADPH. Το μηλικό ένζυμο λειτουργεί ως προμηθευτής NADPH κατά την ακόλουθη εξίσωση:



Το μηλικό ένζυμο πιθανότατα σχηματίζει ένα σταδιακό μεταβολικό σύμπλοκο το οποίο συνδυάζεται με την ATP-κιτρική λυάση και την συνθάση των λιπαρών οξέων, για την εξασφάλιση μια άμεσης διόδου επικοινωνίας κατά τη μετατροπή του ακετυλο συνένζυμου Α (acetyl-CoA) σε λιπαρά οξέα. Τα οποία εστεροποιούνται τελικώς με γλυκερόλη σε σταγονίδια λιπαρών οξέων (Ratledge, 2004).

Θα πρέπει να τονίσουμε, εάν το ένζυμο ATP- κιτρική λυάση απουσιάζει από έναν μικροοργανισμό ή είναι ανενεργό, η εξάντληση των αποθεμάτων αζώτου από το θρεπτικό μέσο της καλλιέργειας οδηγεί σε απέκκριση του παραγόμενου

ενδοκυτταρικού κιτρικού οξέος εντός του κυτταροπλάσματος. Στην περίπτωση αυτή το κιτρικό οξύ είτε δύναται να εκκριθεί στο θρεπτικό μέσο της καλλιέργειας είτε μπορεί να προκαλέσει την παρεμπόδιση του ενζύμου 6-φώσφορο-φρουκτοκινάση, έχοντας ως αποτέλεσμα την συσσώρευση ενδοκυτταρικών πολυσακχαριτών με βάση την 6-φώσφορο -γλυκόζη. Επομένως, οι διεργασίες συσσώρευσης ενδοκυτταρικού λίπους και συσσώρευσης κιτρικού οξέος, κατά τα πρώτα στάδια τους θα μπορούσαμε να πούμε ότι είναι βιοχημικά ταυτόσημες.



**Εικόνα 7:** Απεικόνιση του κύκλου του Krebs (transhydrogenase cycle) και του κύκλου του κιτρικού/μηλικού οξέος (citrate/malate cycle) ως προάγγελοι στην παραγωγή του ακετυλο συνένζυμου Α και NADPH, για τη λιπογένεση στους ελαιογόνους μικροοργανισμούς. Ένζυμα: 1. αποκαρβοξυλάση του πυροσταφυλικού οξέος, 2. αφυδρογονάση του μηλικού οξέος, 3. μηλικό ένζυμο, 4. αφυδρογονάση του πυροσταφυλικού οξέος, 5. κιτρική συνθάση, 6. ATP:κιτρική λύση, 7. ένζυμο υπεύθυνο για τη λειτουργία του συστήματος μεταφοράς κιτρικού/μηλικού οξέος μεταξύ μιτοχόνδριου και κυτταροπλάσματος (Ratledge, 2004).

Με βάση όλα τα βιοχημικά μονοπάτια που έχουμε αναφέρει (η ενεργοποίηση των οποίων προκαλείται από τον υψηλό λόγο C/N στο θρεπτικό μέσο) οι μικροοργανισμοί κατηγοριοποιούνται σε αυτούς οι οποίοι δύναται να συνθέσουν λίπος και σε αυτούς οι οποίοι συνθέτουν κιτρικό οξύ ( Aggelis, 2007; Papanikolaou & Aggelis, 2011).

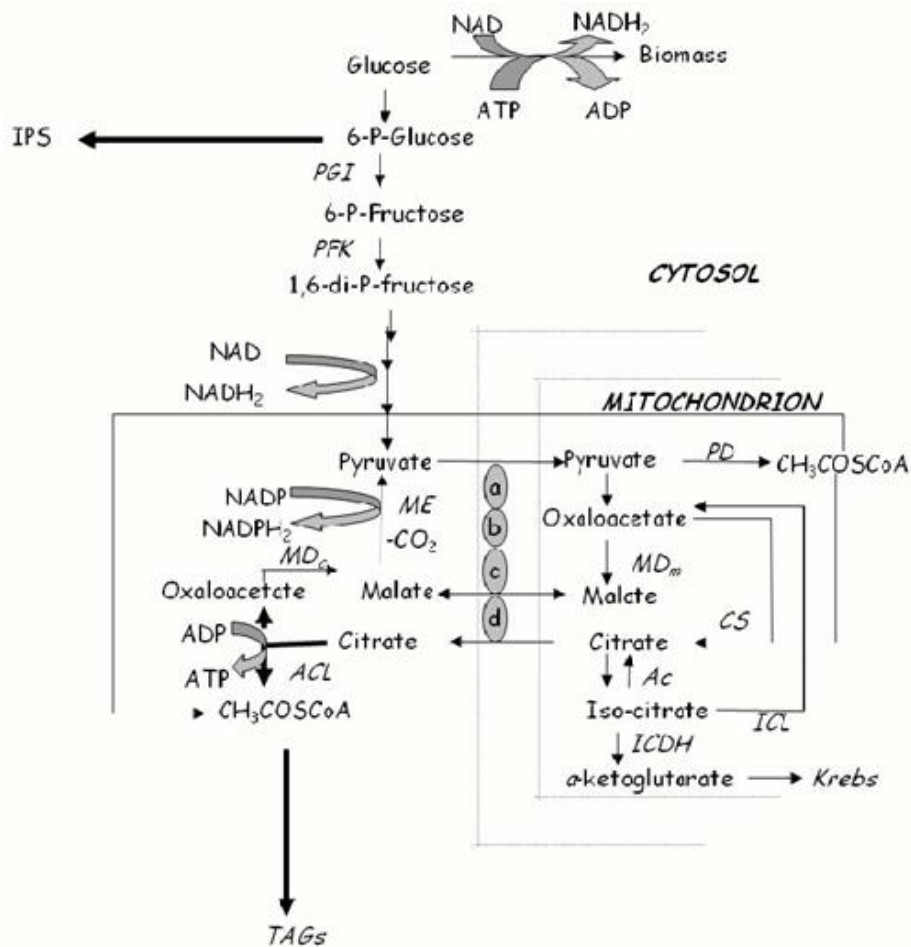
#### 1.4.2 Βιοχημεία συσσώρευσης ενδοπολυσακχαριτών

Οι πολυσακχαρίτες είναι πολυμερή αποτελούμενα από μονοσακχαρίτες και ο γενικός χημικός τους τύπος είναι  $(C_6H_{10}O_5)_n$ , συνήθως με  $n > 100$ . Προκύπτουν από την ένωση περισσότερων από 10 μονοσακχαριτών με γλυκοσιδικό δεσμό, ο οποίος αναπτύσσεται μεταξύ του υδροξυλίου του C-1 του πρώτου σακχάρου και το υδροξύλιο ενός εκ των C-2, C-3, C-4 ή C-6 του επόμενου. Πολυσακχαρίτες όπως το άμυλο, το γλυκογόνο και η δεξτράνη αποτελούνται από αρκετά χιλιάδες μόρια D-γλυκόζης. Ο αριθμός των μονάδων μονοσακχαρίτη σε έναν πολυσακχαρίτη, που ονομάζεται βαθμός πολυμερισμού (ΒΠ), ποικίλλει. Μόνο λίγοι πολυσακχαρίτες έχουν ένα ΒΠ μικρότερο από 100, οι περισσότεροι έχουν ΒΠ εντός του εύρους 200-3000. Οι μεγαλύτεροι από αυτούς, όπως η κυτταρίνη, έχουν ένα ΒΠ από 7000-15000. Επίσης, χρησιμεύουν ως αποταμιευτικές και δομικές ύλες σε ζωικούς και φυτικούς οργανισμούς. Εκτιμάται ότι περισσότερο από το 90% της σημαντικής μάζας υδατάνθρακα στη φύση είναι στη μορφή των πολυσακχαριτών. Πολυσακχαρίτες μπορούν να είναι είτε γραμμικά ή διακλαδισμένα μόρια. Ο γενικός επιστημονικός όρος για τους πολυσακχαρίτες είναι ο όρος γλυκάνες (BeMiller et al., 1996; Belitz et al., 2009).

Η αριστοποίηση της παραγωγής IPS από μακρομύκητες έχει μελετηθεί με τη χρήση διαφόρων πηγών άνθρακα, με πρώτη τη γλυκόζη (Pokhrel & Ohga, 2007 – για τον *Lyophyllum decastes*; Tang & Zhong, 2002 – για τον *G. lucidum*; Tang et al., 2008 – για τον *T. sinense*). Σε περιορισμένο αριθμό εργασιών έχει αναφερθεί και η χρήση λακτόζης (π.χ. για την παραγωγή πολυσακχαριτών και γανοδεरिकού οξέος από τον *G. lucidum* (Tang & Zhong, 2002), όπως και σακχαρόζης (π.χ. για την καλλιέργεια του μύκητα *G. lucidum* σε μελέτη του Chen, 2002) ή για τον *T. sinense* από τους Tang κ.α., 2008), αλλά και σακχαρόζης, μαννόζης, λακτόζης και συνδυασμούς αυτών για την ανάπτυξη του *M. elata* (Winder, 2006), ενώ ως πηγή αζώτου προτιμούνται συνήθως η πεπτόνη και το εκχύλισμα ζύμης. Επιπρόσθετα, έχουν γίνει έρευνες για δυνατότητα ανάπτυξης κάποιων ειδών μακρομυκήτων π.χ. *Pleurotus* spp., *Ganoderma* spp. και *L. edodes* σε υγρά θρεπτικά υποστρώματα από αγροβιομηχανικά παραπροϊόντα όπως γλυκερόλη ή απόβλητα όπως υγρά απόβλητα ελαιουργείου (Tsioulpas et al, 2002; Fountoulakis et al, 2002; Aggelis et al, 2003; André et al, 2010; Lakhtar et al, 2010; Ntougias et al, 2012).

Διάφορα υποστρώματα έχουν χρησιμοποιηθεί σε ζυμώσεις βυθού του μακρομύκητα *G. lucidum* (Han et al, 2005). Στην Κίνα παράγεται ένα ζυμούμενο γάλα σόγιας από το συγκεκριμένο μύκητα που αποτελεί υγιεινό πρωτεϊνούχο αναψυκτικό (Shao & Tang, 2002), για τη ζύμωση του οποίου, οι Yang και Zhang (2009) εξέτασαν πιθανές αλλαγές στην περιεκτικότητα των πολυσακχαριτών, των σακχάρων, της ακατέργαστης πρωτεΐνης, της βιταμίνης Β, των ελεύθερων αμινοξέων και των ισοφλαβονών. Επίσης, οι Chang κ.α. (2006) εξέτασαν την ανάπτυξη στελέχους *G. lucidum* σε διάφορες πηγές άνθρακα και αζώτου σε καλλιέργειες βυθού, αναδεδυμένης φάσης. Από τις πηγές άνθρακα, η σακχαρόζη και το εκχύλισμα βύνης εμφάνισαν τα πιο θετικά αποτελέσματα κατά την μυκηλιακή ανάπτυξη και κατά την παραγωγή πολυσακχαριτών, ενώ από τις πηγές αζώτου το εκχύλισμα ζύμης και το αποβουτυρωμένο γάλα ήταν τα πιο αποτελεσματικά. Η προσθήκη ελαιοσπέρματος από το άνθος του φυτού κρόκος (*Crocus sativus*, σαφράν) στο θρεπτικό υπόστρωμα προώθησε εξίσου σημαντικά τη μυκηλιακή ανάπτυξη, όπως επίσης και η προσθήκη ανθρακικού νατρίου συνέβαλε στη μυκηλιακή αύξηση και στην παραγωγή πολυσακχαριτών. Ακόμη, κατά τη μελέτη των Yang κ.α. (2000) ο μύκητας *G. lucidum* σε υπόστρωμα γλυκόζης 50 g/L παράγαγε 2,0 g/L μυκηλιακής βιομάζας και με τη προσθήκη ελαϊκού οξέος η βιομάζα αυξήθηκε σε 4,6 g/L. Τέλος, οι Lee κ.α. (2003) χρησιμοποίησαν ως υπόστρωμα σε καλλιέργειες βυθού για την ανάπτυξη του συγκεκριμένου μύκητα, αποπρωτεϊνωμένο ορρό γάλακτος τυριού και συμπέραναν ότι το συγκεκριμένο είδος καλλιέργειας θα μπορούσε να προσφέρει μία αποδοτική οικονομική λύση για την εναλλακτική εκμετάλλευση του αποπρωτεϊνωμένου ορρού τυρογάλακτος, εντείνοντας τη χρήση του από την βιομηχανία παραγωγής τυριού.

Από βιοχημική πλευρά, σε πολλές βιβλιογραφικές μελέτες έχει βρεθεί και τονιστεί ότι ο περιορισμός σε άζωτο στην καλλιέργεια επιδρά θετικά στην συσσώρευση αυτών των συστατικών (ο μηχανισμός είναι παρόμοιος σε σχέση με αυτόν κατά την συσσώρευση λιπιδίων) εξαιτίας του θετικού αλλοστερικού ελέγχου του AMP, όπου απενεργοποιεί το ένζυμο 6-φωσφοροφρουκτοκινάση (6-PFK) έτσι ώστε να εξασφαλιστούν οι απαιτήσεις των κυττάρων σε άζωτο (Galiotou-Panayotou et al., 1998; Ratledge & Wynn, 2002; Papanikolaou & Aggelis, 2011a). Η παραπάνω κατάσταση μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα την συσσώρευση ενδοπολυσακχαριτών. Στο παρακάτω διάγραμμα απεικονίζεται μια δυνητικά πιθανή μεταβολική διαδικασία προς συσσώρευση ενδοπολυσακχαριτών.



**Εικόνα 8:** Υποθετικό σενάριο συσσώρευσης ενδοπολυσακχαριτών (IPS) και λιπιδίων από μικροοργανισμούς (Paranikolaou & Aggelis, 2009; Diamantopoulou, 2012).

### 1.5 Σκοπός της μελέτης

Στη μελέτη που πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια της μεταπτυχιακής αυτής διατριβής, διερευνήθηκε η ικανότητα ανάπτυξης της ζύμης *Lipomyces starkeyi* σε θρεπτικά μέσα αποτελούμενα από ανανεώσιμες πρώτες ύλες. Πιο συγκεκριμένα, τα υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν η γλυκόζη, η ξυλόζη, η γλυκερόλη, καθώς και μείγματα των προαναφερθέντων σακχάρων σε διάφορες αναλογίες. Επιπλέον, μελετήθηκε η ικανότητα του μικροοργανισμού να συνθέτει, μεταβολίζοντας τα θρεπτικά αυτά υλικά, βιομάζα, μικροβιακό λίπος και ενδοπολυσακχαρίτες. Οι καλλιέργειες διενεργήθηκαν σε σταθερές αρχικές συγκεντρώσεις υποστρώματος και σε σταθερές συνθήκες ανάδευσης και θερμοκρασίας. Η γλυκερόλη που χρησιμοποιήθηκε ήταν διαχωρισμένη και καθαρότητας 88% κατά βάρος.

## 2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 2.1 Βιολογικό υλικό

Στην παρούσα πτυχιακή μελέτη χρησιμοποιήθηκε ο ζυμομύκητας *Lipomyces starkeyi*, ο οποίος ανήκει στο φύλο των Ασκομυκήτων. Το στέλεχος που μελετήθηκε είναι το DSM 70296, το οποίο έχει ευρεία χρήση σε βιομηχανική κλίμακα και ανήκει στη συλλογή του εργαστηρίου Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών.

Η ζύμη *Lipomyces starkeyi* διατηρούνταν σε κεκλιμένους σωλήνες (slants) πεπληρωμένους με στερεό θρεπτικό μέσο Glucose Peptone Yeast Agar (GPYA) που περιείχε Yeast extract (10 g/L), D-glucose (10 g/L), Peptone (5 g/L) και Agar (25 g/L). Κατά την ανανέωση του μικροοργανισμού, η οποία λάμβανε χώρα σε τακτά χρονικά διαστήματα για την διατήρηση της ζωτικότητάς του, τα slants με τον ζυμομύκητα επωάζονταν σε θερμοκρασία  $28 \pm 1$  °C για 2 μέρες. Η συντήρηση των καλλιιεργειών γινόταν σε θερμοκρασία 4 °C. Πριν από κάθε εμβολιασμό του θρεπτικού μέσου της καλλιέργειας πραγματοποιούνταν ανανέωση του στελέχους σε υγρή καλλιέργεια εντός κωνικής φιάλης (προκαλλιέργεια). Η προκαλλιέργεια επωαζόταν 48 ώρες πριν τον εμβολιασμό του μικροοργανισμού στο θρεπτικό μέσο, προκειμένου οι μικροοργανισμοί να βρίσκονται κάθε φορά στην ίδια φάση ανάπτυξης (εκθετική φάση).

### 2.2 Συνθήκες καλλιέργειας

#### 2.2.1 Παρασκευή υγρού εμβολίου

Οι προκαλλιέργειες πραγματοποιήθηκαν με σκοπό την παραγωγή εμβολίου περιέχοντας κύτταρα του ίδιου φυσιολογικού σταδίου. Πραγματοποιήθηκαν σε κωνικές φιάλες Erlenmeyer των 250 mL, πληρωμένες κατά το 1/5 του όγκου τους, οι οποίες περιείχαν 50 mL YPD (Yeast Peptone D-glucose). Μετά την αποστείρωση σε θερμοκρασία  $T = 121$  °C για 20 min οι φιάλες εμβολιάστηκαν, υπό ασηπτικές συνθήκες, με κύτταρα ζυμών προερχόμενα από καλλιέργειες ηλικίας 2 ημερών. Οι



προκαλλιέργειες επώστηκαν σε θερμοκρασία  $T = 28 \pm 1^\circ\text{C}$  σε ανακινούμενο επωαστικό θάλαμο (New Brunswick Sc, Usa), υπό συνεχή ανάδευση 180 r.p.m για 48 ώρες.



**Εικόνα 9:** Κωνικές φιάλες 250 ml εμβολιασμένες με κύτταρα ζύμης *Lipomyces starkeyi*.

### 2.2.2 Θρεπτικό μέσο καλλιέργειας

Οι ζυμώσεις που πραγματοποιήθηκαν κατά τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας ήταν ζυμώσεις βυθού κλειστού τύπου σε κωνικές φιάλες Erlenmeyer όγκου 250 mL, πληρωμένες κατά το 1/5 τους ( $50 \pm 1$  mL) με το αντίστοιχο θρεπτικό μέσο κάθε φορά. Η σύσταση των αλάτων κάθε καλλιέργειας δίνεται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 2.2.1). Οι πηγές άνθρακα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν βιομηχανική γλυκερόλη (περιείχε 1-2% μονογλυκερίδια, διγλυκερίδια και ελεύθερα λιπαρά οξέα, 2-4% NaCl, 0.1 % μεθανόλη και 2-4% νερό και ήταν καθαρότητας 88% κατά βάρος (w/w), (Kachrimanidou et al., 2013) προερχόμενη από την εταιρία Πέττας ΑΕ, Πάτρα-Ελλάδα και εμπορική γλυκόζη (προερχόμενη από την Ελληνική Βιομηχανία Ζάχαρης) και ξυλόζη (Sigma-Aldrich, 99%). Η τιμή του pH του μέσου καλλιέργειας

ρυθμιζόταν στο 5.5-6 με προσθήκη, υπό ασηπτικές συνθήκες, με τη χρήση διαλύματος KOH 5 M.

**Πίνακας 1:** Σύσταση αλάτων (Paranikolaou et al, 2001; Sarris et al., 2011; 2013)

| Συστατικό                              | Συγκεντρώση (g/l) |
|--|-------------------|
| KH <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>       | 7.00              |
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>       | 2.50              |
| MgSO <sub>4</sub> × 7H <sub>2</sub> O  | 1.50              |
| FeCl <sub>3</sub> × 6H <sub>2</sub> O  | 0.15              |
| ZnSO <sub>4</sub> × 7 H <sub>2</sub> O | 0.02              |
| MnSO <sub>4</sub> × H <sub>2</sub> O   | 0.06              |
| CaCl <sub>2</sub> × 2H <sub>2</sub> O  | 0.15              |

Οι αρχικές συγκεντρώσεις άνθρακα που επιλέχθηκαν για την διεξαγωγή των πειραμάτων ήταν βιομηχανική γλυκερόλη (80 g/L), εμπορική γλυκόζη (80 g/L), εμπορική ξυλόζη (80 g/L) και μείγματα αυτών σε αναλογίες 1:1, 1:3, 3:1, με συνολική αρχική συγκέντρωση 80 g/L. Όλες οι ζυμώσεις πραγματοποιήθηκαν σε περιοριστικές σε άζωτο συνθήκες. Οι πηγές αζώτου που χρησιμοποιήθηκαν ήταν η Peptone (3 g/L) και το εκχύλισμα ζύμης (Yeast extract) (1 g/L) σε αναλογία 3:1. Επίσης ο λόγος άνθρακας προς άζωτο (C/N), στην αρχή της καλλιέργειας ήταν 115 g/g.

Μετά την παρασκευή του εκάστοτε υποστρώματος ακολουθούσε η μεταφορά του σε κωνικές φιάλες των 250 mL, κάθε μια εκ των οποίων περιείχε 50±1 mL θρεπτικού μέσου και στη συνέχεια τοποθετούνταν στο αυτόκλειστο για αποστείρωση (121 °C, 20 min). Μετά την αποστείρωση των φιαλών, πραγματοποιούνταν ο εμβολιασμός του θρεπτικού μέσου στις φιάλες. Οι φιάλες εμβολιάζονταν με 1 mL

προκαλλιέργειας και μεταφέρονταν σε ανακινούμενο επωαστικό θάλαμο (New Brunswick Sc, Usa) στις 180 r.p.m και θερμοκρασία T= 28 οC.

## **2.3. Μέθοδοι**

### **2.3.1 Προσδιορισμός pH:**

Το pH της εκάστοτε καλλιέργειας μετρήθηκε με pH-μετρο τύπου Hanna instruments HI 2211 pH meter. Μετά την μέτρηση του εκάστοτε σημείου της κινητικής, πραγματοποιείτο διόρθωση του pH στο θρεπτικό μέσο της καλλιέργειας, όπου ήταν αναγκαίο, έτσι ώστε η τιμή του pH να επιστρέψει στην επιθυμητή τιμή του (5-6). Η διόρθωση του pH γινόταν με προσθήκη διαλύματος καυστικού καλίου (KOH) 5M υπό ασηπτικές συνθήκες.

### **2.3.2 Προσδιορισμός βιομάζας (X)**

Ο προσδιορισμός της βιομάζας στις φιάλες πραγματοποιούνταν με μέτρηση του ξηρού βάρους. Η συλλογή της βιομάζας πραγματοποιήθηκε μετά από φυγοκέντρηση του δείγματος σε 9000 rpm για 10 min σε θερμοκρασία 4ο C και έκπλυση των κυττάρων με απιονισμένο νερό, διαδικασία που επαναλήφθηκε μία φορά. Η βιομάζα, απαλλαγμένη υπολειμμάτων θρεπτικού μέσου, μεταφέρθηκε σε προζυγισμένο φιαλίδιο McCartney και τοποθετήθηκε σε κλίβανο θερμοκρασίας (95±5οC), όπου αφέθηκε προς ξήρανση μέχρι σταθερού βάρους. Μετά την απομάκρυνση του νερού προσδιορίστηκε το βάρος της ολικής ξηρής βιομάζας (X), σε ζυγό ακριβείας τύπου Kern τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων.

### **2.3.3 Μελέτη ενδοκυτταρικού λίπους**

Σε κάθε ζύμωση που έλαβε χώρα πραγματοποιήθηκε ποσοτική και ποιοτική ανάλυση του παραγόμενου ενδοκυτταρικού λίπους στην πλειοψηφία των δειγμάτων που προέκυψαν από κάθε καλλιέργεια.

### 2.3.3.1 Εκχύλιση λίπους

Η ξηρή βιομάζα λειοτριβήθηκε εντός φιαλιδίου McCartney και το λίπος εκχειρίστηκε με διαλύτη Folch που αποτελείται από μίγμα διαλυτών χλωροφορμίου ( $\text{CHCl}_3$ )-μεθανόλης σε αναλογία 2:1 (Folch et al., 1957; τροποποιημένο από Aggelis et al., 1995). Το χρησιμοποιούμενο διάλυμα έχει την δυνατότητα να εκχυλίζει το συνολικό μικροβιακό λίπος. Η εκχύλιση πραγματοποιήθηκε στο σκοτάδι και σε θερμοκρασία δωματίου για τουλάχιστον 72 h. Ακολούθησε απομάκρυνση της βιομάζας με διήθηση μέσω ηθμού και στη συνέχεια το εκχύλισμα συλλέχθηκε σε προζυγισμένη σε ζυγό ακριβείας σφαιρική φιάλη. Έπειτα, ακολουθούσε εξάτμιση του διηθήματος από την φιάλη εξάτμισης με τη βοήθεια περιστροφικού εξάτμιστήρα (Flash Evaporator - Rotavapor R-114) υπό κενό, σε θερμοκρασία 50-55 °C έτσι ώστε να απομακρυνθούν οι διαλύτες και να παραμείνει μόνο το μικροβιακό λίπος, το οποίο υπολογιζόταν σε g λιπιδίων ανά g ξηρής ουσίας και συνακολούθως σε g λιπιδίων/L καλλιέργειας μετά τη ζύγισή του σε ζυγό ακριβείας.



**Εικόνα 10:** Εκχείλιση μικροβιακού λίπους με διαλύτη Folch.



**Εικόνα 11:** Εξάτμιση του διηθήματος από την φιάλη εξάτμισης με τη βοήθεια περιστροφικού εξατμιστήρα (Flash Evaporator - Rotavapor R-114) υπό κενό.

### 2.3.3.2 Παρασκευή μεθυλεστέρων λιπαρών οξέων

Ο προσδιορισμός της σύστασης λιπιδίων σε λιπαρά οξέα μέσω αέριας χρωματογραφίας προϋποθέτει μεθανόλυση των λιπιδίων και μετατροπή των λιπαρών οξέων στους αντίστοιχους μεθυλεστέρες, που είναι μόρια περισσότερο πτητικά και λιγότερο πολικά των λιπαρών οξέων. Το κυτταρικό λίπος μετατρέπεται με μεθυλίωση στους αντίστοιχους μεθυλικούς εστέρες, με τη γενικευμένη μέθοδο AFNOR (1984) (Paranikolaou et al., 2001). Η εστεροποίηση είναι μια διαδικασία που τελείται σε δυο στάδια, το πρώτο σε αλκαλικό περιβάλλον, το δεύτερο σε όξινο. Κατά το πρώτο στάδιο, τελείται η πυρηνόφιλη υποκατάσταση στο μόριο τριγλυκεριδίων και φωσφολιπιδίων, με τελικό προϊόν τους αντίστοιχους μεθυλεστέρες λιπαρών οξέων.

Παράλληλα, τα ήδη υπάρχοντα ελεύθερα λιπαρά οξέα αντιδρούν με το διάλυμα του μεθόξυ νατρίου και παραλαμβάνονται οι αντίστοιχοι σάπωνες. Στο δεύτερο στάδιο, πραγματοποιείται η μετατροπή των σαπώνων των λιπαρών οξέων προς τους αντίστοιχους μεθυλεστέρες.

### 2.3.3.3 Εφαρμογή της μεθόδου

Στις φιάλες εξάτμισης που έχουν εξατμιστεί οι διαλύτες και έχει παραμείνει το ζυγισθέν κυτταρικό λίπος, προσθέτουμε 1-2 πέτρες βρασμού και 10 mL μεθανολικού

νατρίου (MeO-Na<sup>+</sup>). Στη συνέχεια, το δείγμα τοποθετείται προς βρασμό για 15 min σε κάθετο ψυκτήρα. Μετά το πέρας του χρόνου, προστίθεται στο δείγμα ποσότητα υδροχλωρικής μεθανόλης έτσι ώστε το δείγμα να αποχρωματιστεί και αφήνεται προς βρασμό για άλλα 15 min. Έπειτα, προστίθεται νερό στο δείγμα έτσι ώστε η αντίδραση να λάβει τέλος και το δείγμα μεταφέρεται σε χοάνη διαχωρισμού. Προστίθενται 6 mL εξάνιου και το δείγμα αναδεύεται έντονα και στη συνέχεια αφήνεται σε ηρεμία έως ότου διαχωριστούν οι δυο φάσεις (η οργανική με το εξάνιο και η υδατική). Η πάνω φάση, που αποτελείται από τους εστέρες των λιπαρών οξέων και το εξάνιο, παραλαμβάνεται σε φιαλίδιο και προστίθεται μικρή ποσότητα άνυδρου Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> για απορρόφηση της υγρασίας, ενώ η κάτω φάση απορρίπτεται. Τέλος, το δείγμα που συλλέγεται οδηγείται στον αέριο χρωματογράφο (GC) για ανάλυση.

#### **2.3.3.4 Ανάλυση στον αέριο χρωματογράφο (GC)**

Τα δείγματα που προκύπτουν από τη μεθυλεστεροποίηση, οδηγούνται στον αέριο χρωματογράφο για την ανάλυση της σύστασης των λιπιδίων στα επιμέρους λιπαρά οξέα. Πραγματοποιείται έγχυση 1-2  $\mu$ L δείγματος με ειδική σύριγγα στην υποδοχή του αέριου χρωματογράφου 8000 series FISONs.

Συνθήκες αέριου χρωματογράφου:

Θερμοκρασία εισαγωγέα 250  $^{\circ}$ C

Θερμοκρασία ανιχνευτή (FID) 250  $^{\circ}$ C

Φέρον αέριο He (ροή 1.38 mL/ min), H<sub>2</sub> (60 kPa), O<sub>2</sub> (110 kPa)

Τύπος στήλης Fused silica WCOT: CP-Sill 88 (0.2  $\mu$ L)

Μήκος 50 m

Διάμετρος 0.32 m

Πάχος επικάλυψης εσωτερικά που έρχεται σε επαφή με το δείγμα DF=0.32  $\mu$ m.

Η θερμοκρασία της στήλης παρέμενε σταθερή στους 200 $^{\circ}$ C για 20 min. (Fakas et al., 2006). Με τη χρήση πρότυπων μεθυλεστέρων των κυριότερων λιπαρών οξέων, ταυτοποιήθηκαν οι αντίστοιχοι χρόνοι κατακράτησης για τους μεθυλεστέρες κάθε λιπαρού οξέος. Η συγκέντρωση του κάθε λιπαρού οξέος στο δείγμα των λιπιδίων υπολογίστηκε με βάση το εμβαδόν της κάθε κορυφής του αντίστοιχου χρωματογραφήματος.

### 2.3.3.5 Κλασμάτωση λιπιδίων

Αρχικά έχουμε εκχύλιση λιπιδίων από την βιομάζα με Folch και στη συνέχεια έκπλυση των λιπιδίων με 0.88% (w/w) KCl : (σε 25 ml λιπιδίων προστίθενται 5 ml KCl και παραλαμβάνεται η κάτω φάση). Τα λιπίδια ξηραίνονται παρουσία Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (προσθήκη Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> στο ποτήρι ζέσεως με την κάτω φάση του προηγούμενου βήματος τόση ώστε να δημιουργηθεί ένα στρώμα Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> και διαχωρισμός της υγρής φάσης με διήθηση) και συμπυκνώνονται μέχρι ξηρού βάρους (evaporator) και ζυγίζονται. Για την κλασμάτωση ζυγίζεται 10πλάσια ποσότητα silicic acid από αυτή των παραληφθέντων λιπιδίων και τοποθετείται στο φούρνο (110o C).

Προετοιμασία στήλης: Το silicic acid διαλύεται σε Dichloromethane (ποτήρι ζέσης) και προστίθεται στη στήλη ως εξής: το εναίωρημα προστίθεται (ανακινώντας το) στο κέντρο της στήλης, έτσι ώστε να πέσει όσο λιγότερο γίνεται στα τοιχώματα της στήλης. Στη συνέχεια προστίθεται στο ποτήρι Dichloromethane και η διαδικασία επαναλαμβάνεται μέχρι να παραληφθεί το σύνολο σχεδόν του silicic acid.

Πακετάρισμα στήλης: Σε καθαρό ποτήρι ζέσεως μεταφέρονται περίπου 100 ml Dichloromethane και προστίθενται στα τοιχώματα της στήλης ώστε να απομακρυνθεί το silicic acid που είχε επικαθίσει στο εσωτερικό της στήλης (στρόφιγγα κλειστή). Ανοίγεται η στρόφιγγα ώστε να περάσει με πίεση ο διαλύτης απ' το silicic acid. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται 5-6 φορές ρίχνοντας το διαλύτη στα τοιχώματα της στήλης όχι απ' ευθείας πάνω στο silicic acid προσέχοντας να μην το αναταράξουμε. Προσέχουμε ώστε η επιφάνεια του silicic acid να είναι όσο το δυνατόν επίπεδη.

Κλασμάτωση: αφού τελειώσει το πακετάρισμα αδειάζουμε τη στήλη απ' το διαλύτη και αφήνουμε τόσο ώστε η στάθμη του να είναι λίγο πάνω απ' την επιφάνεια του silicic acid. Τα λιπίδια διαλύονται σε μια μικρή ποσότητα χλωροφόρμιου (1-2 ml). Με μια γυάλινη πιπέτα προσθέτουμε τα λιπίδια στη στήλη, ρίχνοντάς τα γύρω-γύρω στα τοιχώματα της στήλης με κυκλική κίνηση, προσέχοντας να μην αναταράξουμε το silicic acid. Με την ίδια πιπέτα ρίχνουμε στα τοιχώματα της στήλης χλωροφόρμιο (περίπου 5-10 mL) ώστε να παραληφθεί το σύνολο των λιπιδίων. Ανοίγουμε πολύ λίγο τη στρόφιγγα μέχρι να δούμε τα λιπίδια να εισέρχονται στο silicic acid (το silicic acid γίνεται καφετί) και στη συνέχεια κλείνουμε τη στρόφιγγα. Προσθέτουμε με την πιπέτα χλωροφόρμιο μέχρις ότου η στάθμη του να ανέβει αρκετά πάνω απ' το επίπεδο του το silicic acid, τόσο ώστε προσθέτοντας το διαλύτη

με το ποτήρι ζέσης να μην αναταράσσεται το silicic acid. Ανοίγουμε τη στρόφιγγα και παραλαμβάνουμε το κλάσμα σε προ-ζυγισμένη σφαιρική φιάλη προσθέτοντας συνεχώς διαλύτη μέχρι την απαιτούμενη ποσότητα (100 ml ανά 100 mg λιπιδίων). Στη συνέχεια, απομακρύνεται ο διαλύτης και ζυγίζεται η σφαιρική φιάλη. Με τον ίδιο τρόπο προσθέτω στη στήλη ακετόνη και μεθανόλη για τον διαχωρισμό και την παραλαβή των σφιγγο-γλυκολιπιδίων και φωσφολιπιδίων αντίστοιχα. Τέλος ακολουθεί η μέθοδος της μεθυλεστεροποίησης για τον ποιοτικό προσδιορισμό των λιπιδίων.

#### **2.3.4 Προσδιορισμός Ενδοπολυσακχαριτών (IPS)**

Σε κάθε καλλιέργεια που πραγματοποιήθηκε, κατά την διάρκεια της παρούσας μελέτης, διενεργήθηκε ποσοτικός προσδιορισμός των παραγόμενων ενδοπολυσακχαριτών (IPS, Intra-cellular polysaccharides) σε όλα τα δείγματα και ποιοτικός προσδιορισμός των ενδοπολυσακχαριτών σε αντιπροσωπευτικό μέρος των δειγμάτων, που προέκυψαν από κάθε καλλιέργεια.

Η ολική συγκέντρωση των ενδοπολυσακχαριτών μετρήθηκε με την διαδικασία η οποία είναι βασισμένη σε ένα τροποποιημένο πρωτόκολλο μεθόδου, το οποίο εκδόθηκε από τους Liang et al., (2009). Εν συντομία, η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν ότι σε 0,05g ξηρής βιομάζας γίνονταν προσθήκη 10 mL υδροχλωρικού οξέος (HCl, 2M), το διάλυμα που προέκυπτε υδrolύονταν στους 80°C για 30 λεπτά, ακολουθούσε εξουδετέρωση του HCl σε pH 7 με προσθήκη 10 mL καυστικού νατρίου (NaOH, 2M) και διήθησή με διπλό διηθητικό χαρτί, ώστε το διήθημα που προκύπτει να είναι διαυγές.

Για την ποσοτική ανάλυση των ενδοπολυσακχαριτών εφαρμόστηκε η μέθοδος για τον προσδιορισμό των αναγόντων σακχάρων με την φωτομετρική μέθοδο του δινιτροσαλικυλικού οξέος (DNS) (Miller, 1959). Η μέθοδος στηρίζεται στην αναγωγή του 3,5-δινιτροσαλικυλικού οξέος προς 3-αμινο-5-νιτροσαλικυλικό οξύ παρουσία NaOH και την ταυτόχρονη οξειδωση της γλυκόζης προς γλυκονικό οξύ.

Σε 0.5 mL δείγματος προστίθενται 0,5 mL αντιδραστηρίου DNS και αναδεύονται. Στην συνέχεια μεταφέρονται τα δείγματα σε υδατόλουτρο (100°C) για 5 min ακριβώς και ψύχονται αμέσως με H<sub>2</sub>O (25°C) για άλλα 5 min. Έπειτα



προστίθενται 5 mL απιονισμένο H<sub>2</sub>O, ακολουθεί ανάδευση και μέτρηση της απορρόφησης στα 540nm. Η συγκέντρωση του δείγματος σε ανάγοντα σάκχαρα υπολογίστηκε με βάση τη καμπύλη αναφοράς της γλυκόζης, εκφρασμένες σε g/L. Όλες οι απορροφήσεις μετρήθηκαν με φασματοφωτόμετρο τύπου Hitachi U-2000 Spectrophotometer.

### 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

#### 3.1 Σφαιρική παρουσίαση

Σκοπός της παρούσας έρευνας είναι η μελέτη της βιοφυσιολογικής συμπεριφοράς της ζύμης *Lipomyces starkeyi*, η βιοσύνθεση ενδοκυτταρικού λίπους καθώς και η διερεύνηση της σύστασης των μικροβιακών λιπιδίων και των κλάσεων αυτών, κατά την καλλιέργεια του σε υποπροϊόντα βιομηχανιών (ακάθαρτη γλυκερόλη) και σε σακχαρούχα ανανεώσιμα υποστρώματα (εμπορική γλυκόζη, ξυλόζη). Η εν λόγω ζύμη κατά την καλλιέργεια της σε συνθήκες που ευνοούν την υψηλή συγκέντρωση μικροβιακού λίπους (καλλιέργεια σε ζυμώσεις βυθού με υψηλό λόγο C/N), δύναται να συσσωρεύσει λίπος σε υψηλές συγκεντρώσεις, στο οποίο περιέχονται σε ποικίλα ποσά λιπαρά οξέα τα οποία ομοιάζουν με αυτά των φυτικών λιπών. Συγκεκριμένα, τα υποστρώματα τα οποία χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη αυτή ήταν κυρίως η ακάθαρτη γλυκερόλη, η γλυκόζη, η ξυλόζη καθώς και μίγματα αυτών σε διαφορετικές αναλογίες. Ως πηγή αζώτου προστέθηκαν 1 g/L yeast extract και 3 g/L πεπτόνη.

Αναλυτικότερα, πραγματοποιήθηκαν 12 ζυμώσεις υγρής καλλιέργειας, με τις αρχικές συγκεντρώσεις πηγής άνθρακα: 80 g/L γλυκόζη, 80 g/L ξυλόζη, 80 g/L γλυκερόλη, 20 g/L γλυκόζη – 60 g/L ξυλόζη, 60 g/L γλυκόζη – 20 g/L ξυλόζη, 40 g/L γλυκόζη – 40 g/L ξυλόζη, 20 g/L γλυκερόλη – 60 g/L ξυλόζη, 60 g/L γλυκερόλη – 20 g/L ξυλόζη, 40 g/L γλυκερόλη – 40 g/L ξυλόζη, 20 g/L γλυκερόλη – 60 g/L γλυκόζη, 60 g/L γλυκερόλη – 20 g/L γλυκόζη, 40 g/L γλυκερόλη – 40 g/L γλυκόζη, ενώ ο λόγος C/N ήταν υψηλός σε κάθε περίπτωση (115 mol/mol) προκειμένου να ευνοηθεί η συσσώρευση ενδοκυτταρικού λίπους.

**Πίνακας 2:** Συγκεντρωτικός πίνακας αποτελεσμάτων της καλλιέργειας της ζύμης *Lipomyces starkeyi* σε σακχαρούχα ανανεώσιμα υποστρώματα με πηγές άνθρακα τη γλυκερόλη, τη γλυκόζη, τη ξυλόζη και μίγματα αυτών.

| Υπόστρωμα (g/L) | S0Glu (g/L) | S0Xyl (g/L) | S0Glol (g/L) | Time (h) | Scon (g/L) |     |      |
|-----------------|-------------|-------------|--------------|----------|------------|-----|------|
|                 |             |             |              |          | Glu        | Xyl | Glol |
| 80 Glu          | 80          | -           | -            | 288      | 0          | -   | -    |

|                        |    |    |    |                    |      |      |      |
|------------------------|----|----|----|--------------------|------|------|------|
| <b>80 Xyl</b>          | -  | 80 | -  | 264<br>(α),(β)     | -    | 77,8 | -    |
| <b>80 Glol</b>         | -  | -  | 80 | 264<br>(α),(β),(γ) | -    | -    | 77,2 |
| <b>20 Glu -60 Xyl</b>  | 20 | 60 | -  | 288                | 0    | 0    | -    |
| <b>60 Glu - 20 Xyl</b> | 60 | 20 | -  | 264 (β)            | 77,2 | 0    | -    |
| <b>40 Glu - 40 Xyl</b> | 40 | 40 | -  | 264                | 0    | 0    | -    |
| <b>20 Glol -60 Xyl</b> | -  | 60 | 20 | 312<br>(α),(β)     | -    | 57,4 | 19,6 |
| <b>60 Glol -20 Xyl</b> | -  | 20 | 60 | 312<br>(α),(β),(γ) | -    | 0    | 55,3 |
| <b>40 Glol -40 Xyl</b> | -  | 40 | 40 | 288<br>(α),(β)     | -    | 34,7 | 35,3 |
| <b>20 Glol -60 Glu</b> | 60 | -  | 20 | 288 (α)            | 59,7 | -    | 0    |
| <b>60 Glol -20 Glu</b> | 20 | -  | 60 | 288                | 0    | -    | 19,6 |
| <b>40 Glol -40 Glu</b> | 40 | -  | 40 | 288                | 0    | -    | 0    |

S0: Αρχική συγκέντρωση υποστρώματος (g/L)

Scon: Καταναλωθέν υπόστρωμα (g/L)

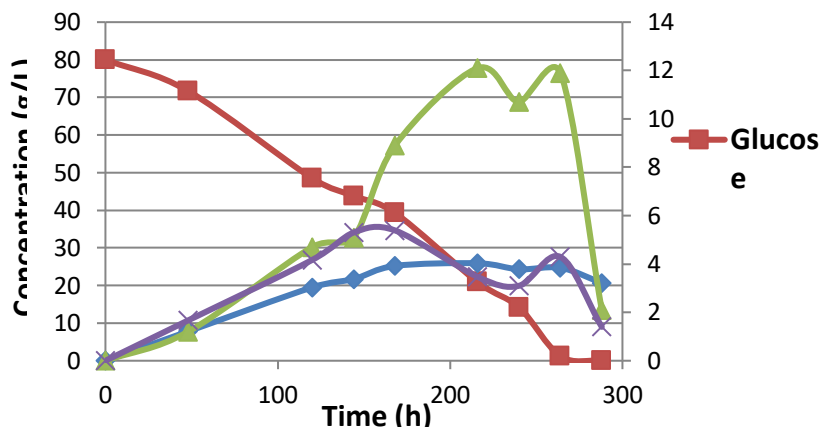
\*α: Παρατηρήθηκε μέγιστη παραγωγή βιομάζας.

\*β: Παρατηρήθηκε μέγιστη παραγωγή μικροβιακού λίπους.

\*γ: Παρατηρήθηκε μέγιστη παραγωγή IPs.

### 3.2 Καλλιέργεια ζύμης *Lipomyces starkeyi* σε εμπορική γλυκόζη (Glu = 80 g/L)

Πρώτο υπόστρωμα που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη ήταν η εμπορική γλυκόζη, μια πηγή άνθρακα εύκολα αφομοιώσιμη, η οποία χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας για τα υπόλοιπα πειράματα. Στο παρακάτω γράφημα (Γράφημα III.2.1) παρουσιάζεται η κινητική εξέλιξη της βιομάζας, της κατανάλωσης του υποστρώματος και της παραγωγής μεταβολικών προϊόντων από τη ζύμη *Lipomyces starkeyi* κατά την αύξηση της σε θρεπτικό μέσο με το άζωτο ως το περιοριστικό της αύξησης στοιχείο.



**Διάγραμμα 1:** Κινητική εξέλιξη της βιομάζας, της κατανάλωσης γλυκόζης και της παραγωγής λιπιδίων και IPS, συναρτήσει του χρόνου για το στέλεχος *Lipomyces starkeyi* σε ακάθαρτη γλυκόζη ως μόνη πηγή άνθρακα, σε περιοριστικές σε άζωτο συνθήκες. Συνθήκες καλλιέργειας: ανάπτυξη σε ανακινούμενες φιάλες όγκου 250 mL ( $180 \pm 5$  rpm), θερμοκρασία 30 °C, αρχική συγκέντρωση γλυκόζης (Glu) 80 g/L, αρχικό pH=6.0± 0.1.

Η αρχική συγκέντρωση της γλυκόζης είναι περίπου 80 g/L και παρατηρούμε πως εξαντλείται μετά από 264 h ζύμωσης, ενώ η μέγιστη παραγωγή βιομάζας έφτασε τα 25,9 g/L και παρατηρήθηκε μετά από 216 h ζύμωσης. Μπορούμε να δούμε πως όταν η ποσότητα της γλυκόζης στο μέσο ανάπτυξης μειωθεί περίπου στη μέση της αρχικής ποσότητας της, τότε παρατηρείται αύξηση της λιποσυσσώρευσης του ζυμομύκητα ενώ παραγωγή των IPS ξεκινάει από τις πρώτες ώρες της ζύμωσης και φτάνει τα 5,4 g/g. Η μέγιστη ποσότητα ενδοκυτταρικού λίπους έφθασε τα 12,1 g/L μετά από 216 h ζύμωσης με ποσοστό λιποσυσσώρευσης YL/X 47% (0.47 g λίπους ανά g παραγόμενης βιομάζας).

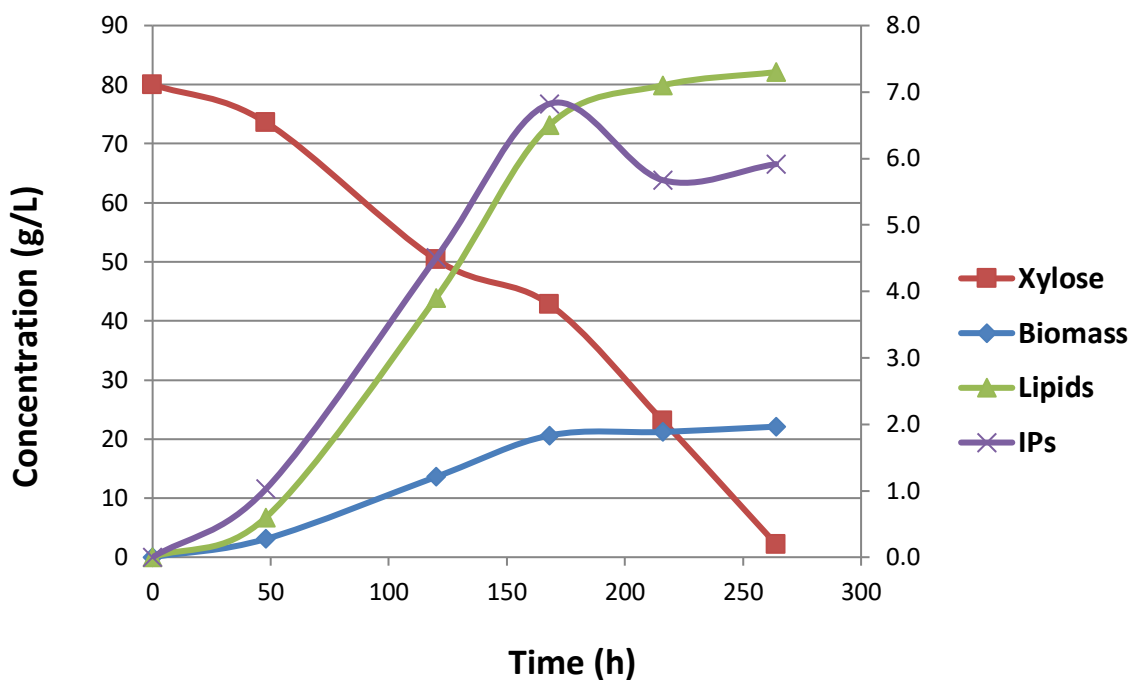
Μετά την παραλαβή του ενδοκυτταρικού λίπους από το μικροοργανισμό ακολούθησε η ανάλυση της σύστασης των λιπιδίων σε λιπαρά οξέα με τη βοήθεια του αέριου χρωματογράφου. Η ανάλυση της σύστασης των λιπιδίων σε λιπαρά οξέα πραγματοποιήθηκε επιλεκτικά στα δείγματα που προέκυψαν από τη ζύμωση αυτή. Επιλέχθηκαν δείγματα από την μέση και το τέλος της ζύμωσης. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης από τον αέριο χρωματογράφο φαίνονται στον παρακάτω πίνακα.

**Πίνακας 3:** Σύσταση των λιπιδίων σε λιπαρά οξέα της ζύμης *Lipomyces starkeyi* σε υπόστρωμα γλυκόζης 80 g/L.

| Time | Λιπαρά οξέα % (w/w) – Folch |       |       |                  |                     |
|------|-----------------------------|-------|-------|------------------|---------------------|
|      | C16:0                       | C16:1 | C18:0 | $\Delta^9$ C18:1 | $\Delta^9,12$ C18:2 |
| 120  | 22,7                        | 3,6   | 6,2   | 41,8             | 12,9                |
| 264  | 31,9                        | 6,3   | 5,2   | 49,1             | 2,8                 |

### 3.3 Καλλιέργεια της ζύμης *Lipomyces starkeyi* σε εμπορική ξυλόζη (Xyl = 80 g/L)

Το επόμενο υπόστρωμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν η εμπορική ξυλόζη, μια πηγή άνθρακα πιο δύσκολα αφομοιώσιμη. Η ζύμη *Lipomyces starkeyi* φάνηκε ότι είναι ικανή να τη μεταβολίσει τη ξυλόζη σε ικανοποιητικό βαθμό, όπως φαίνεται από το παρακάτω γράφημα (Γράφημα III.3.1), καθώς επιτυγχάνει ικανοποιητική κυτταρική αύξηση. Αυτό παρατηρείται στις 264 h ζύμωσης, όπου η βιομάζα έφτασε τα 22,1 g/L υποστρώματος. Η παραγωγή λιπιδίων όπως και ενδοκυτταρικών πολυσακχαριτών παρατηρήθηκε ανάλογη με την κατανάλωση της ξυλόζης, με τις βέλτιστες τιμές στα 7,3 g/L και 6,8 g/g, αντίστοιχα. Το μέγιστο ποσοστό λιποσυσσώρευσης, YL/X 33,5%, εμφανίστηκε στις 216 h ζύμωσης.



**Διάγραμμα 2:** Κινητική εξέλιξη της βιομάζας, της κατανάλωσης ξυλόζης και της παραγωγής λιπιδίων και IPs, συναρτήσει του χρόνου για το στέλεχος *Lipomyces starkeyi* σε ακάθαρτη ξυλόζη ως μόνη πηγή άνθρακα, σε περιοριστικές σε άζωτο συνθήκες. Συνθήκες καλλιέργειας: ανάπτυξη σε ανακινούμενες φιάλες όγκου 250 mL ( $180 \pm 5$  rpm), θερμοκρασία 30 °C, αρχική συγκέντρωση ξυλόζης (Xyl) 80 g/L, αρχικό pH=6.0± 0.1.

Μετά την παραλαβή του ενδοκυτταρικού λίπους από το μικροοργανισμό ακολούθησε η ανάλυση της σύστασης των λιπιδίων σε λιπαρά οξέα με τη βοήθεια του αέριου χρωματογράφου. Η ανάλυση της σύστασης των λιπιδίων σε λιπαρά οξέα πραγματοποιήθηκε επιλεκτικά στα δείγματα που προέκυψαν από τη ζύμωση αυτή. Επιλέχθηκαν δείγματα από την μέση και το τέλος της ζύμωσης. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης από τον αέριο χρωματογράφο φαίνονται στον παρακάτω πίνακα.

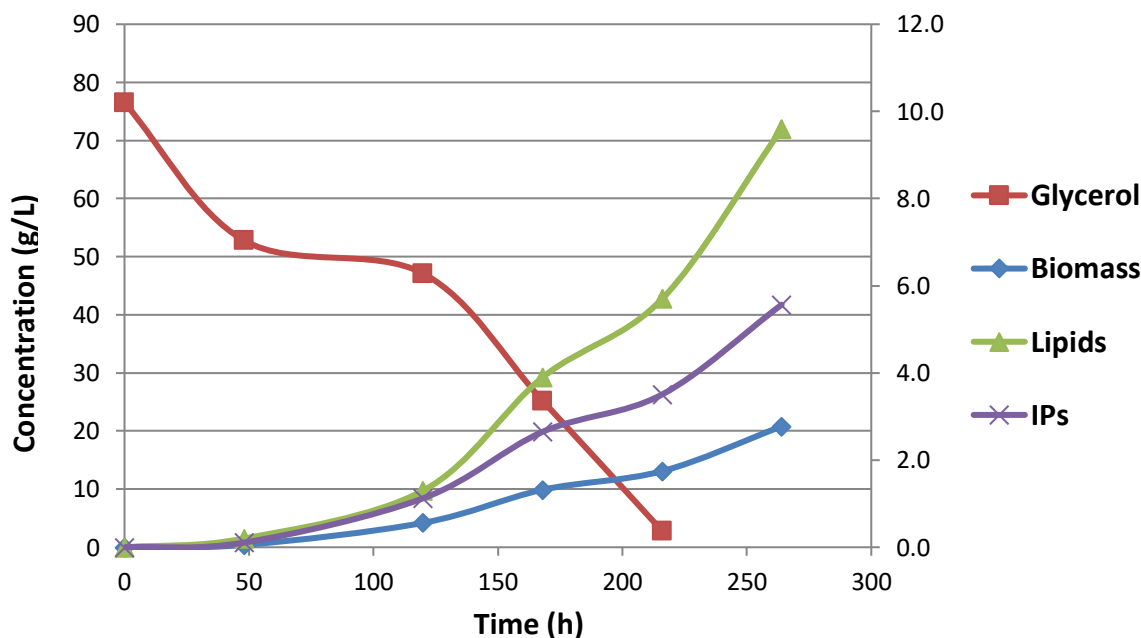
**Πίνακας 4:** Σύσταση των λιπιδίων σε λιπαρά οξέα της ζύμης *Lipomyces starkeyi* σε υπόστρωμα ξυλόζης 80 g/L.

| Time<br>(h) | Λιπαρά οξέα % (w/w) – Folch |       |       |                 |                    |
|-------------|-----------------------------|-------|-------|-----------------|--------------------|
|             | C16:0                       | C16:1 | C18:0 | $\Delta$ 9C18:1 | $\Delta$ 9,12C18:2 |
| 120         | 20,1                        | 4,1   | 5,2   | 43,4            | 12,2               |
| 264         | 33,4                        | 4,9   | 6,5   | 47,7            | 2,7                |

### 3.4 Καλλιέργεια της ζύμης *Lipomyces starkeyi* σε ακάθαρτη γλυκερόλη (Glol = 80 g/L)

Στη μελέτη αυτή χρησιμοποιήθηκε σαν υπόστρωμα βιομηχανική γλυκερόλη, μια πηγή άνθρακα μηδενικού κόστους, καθώς προέρχεται από τη βιομηχανία παραγωγής βιοντίζελ. Η αρχική συγκέντρωση της γλυκερόλης είναι περίπου 80 g/L και παρατηρούμε πως εξαντλείται μετά από 264 h ζύμωσης, ενώ η μέγιστη παραγωγή βιομάζας έφτασε τα 20,8 g/L και παρατηρήθηκε στον ίδιο χρόνο με την εξάντληση του υποστρώματος. Η μέγιστη τιμή του ενδοκυτταρικού λίπους έφτασε τα 10,0 g/L μετά από 264 h ζύμωσης, επιτυγχάνοντας ποσοστό λιποσυσσώρευσης YL/X 48,1%. Ικανοποιητική κρίνεται και η παραγωγή ενδοκυτταρικών πολυσακχαριτών που έφτασε τα 5,6 g/g κατά τις τελευταίες ώρες της ζύμωσης.

Στο παρακάτω γράφημα (Γράφημα III.4.1) παρουσιάζεται η κινητική εξέλιξη της βιομάζας, της κατανάλωσης του υποστρώματος και της παραγωγής μεταβολικών προϊόντων από τη ζύμη *Lipomyces starkeyi* κατά την αύξηση της σε θρεπτικό μέσο με το άζωτο ως το περιοριστικό της αύξησης στοιχείο και μόνη πηγή άνθρακα βιομηχανική γλυκερόλη.



**Διάγραμμα 3:** Κινητική εξέλιξη βιομάζας, της κατανάλωσης γλυκερόλης και παραγωγής λιπιδίων και IPS, συναρτήσει του χρόνου για το στέλεχος *Lipomyces starkeyi* σε βιομηχανική γλυκερόλη ως μόνη πηγή άνθρακα, σε περιοριστικές σε άζωτο συνθήκες. Συνθήκες καλλιέργειας: ανάπτυξη σε ανακινούμενες φιάλες όγκου 250 mL ( $180 \pm 5$  rpm), θερμοκρασία 30 °C, αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης (Glol) 80 g/L, αρχικό pH=6.0± 0.1.

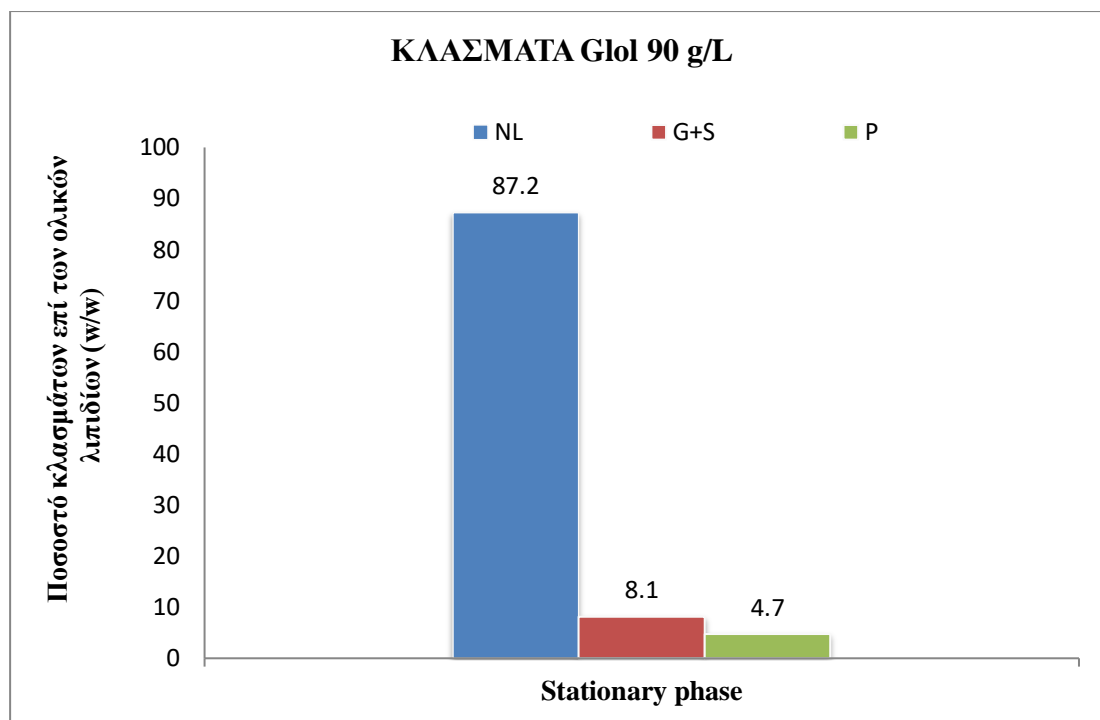
Μετά την παραλαβή του ενδοκυτταρικού λίπους από το μικροοργανισμό ακολούθησε η ανάλυση της σύστασης των λιπιδίων σε λιπαρά οξέα με τη βοήθεια του αέριου χρωματογράφου. Η ανάλυση της σύστασης των λιπιδίων σε λιπαρά οξέα πραγματοποιήθηκε επιλεκτικά στα δείγματα που προέκυψαν από τη ζύμωση αυτή. Επιλέχθηκαν δείγματα από την μέση και το τέλος της ζύμωσης. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης από τον αέριο χρωματογράφο φαίνονται στον παρακάτω πίνακα.

**Πίνακας 5:** Σύσταση των λιπιδίων σε λιπαρά οξέα της ζύμης *Lipomyces starkeyi* σε υπόστρωμα γλυκερόλης 80 g/L.

| Time<br>(h) | Λιπαρά οξέα % (w/w) – Folch |       |       |         |            |
|-------------|-----------------------------|-------|-------|---------|------------|
|             | C16:0                       | C16:1 | C18:0 | Δ9C18:1 | Δ9,12C18:2 |
| 120         | 21,1                        | 5,3   | 5,7   | 41,8    | 13,6       |
| 264         | 32,4                        | 4,8   | 5,9   | 45,7    | 2,2        |

Σε επόμενο στάδιο, πραγματοποιήθηκε η ανάλυση του μικροβιακού λίπους στα επιμέρους κλάσματα των ουδέτερων λιπιδίων, των σφιγγο-γλυκολιπιδίων και των φωσφολιπιδίων. Το δείγμα που επιλέχθηκε για την ανάλυση αυτή αντιπροσωπεύει τη στάσιμη (240 h) φάση. Το παρακάτω γράφημα (Γράφημα III.4.2) παρουσιάζει τα ποσοστά των κλασμάτων επί των ολικών λιπιδίων στο δείγμα που αντιπροσωπεύει τη στάσιμη φάση του αυξητικού κύκλου. Από το γράφημα αυτό είναι εμφανές ότι τα ουδέτερα λιπίδια (NL) αποτελούν το μεγαλύτερο ποσοστό επί του συνόλου των λιπιδίων (TL), ενώ τα σφιγγο-γλυκολιπίδια (S+G) και τα φωσφολιπίδια (P) απαντώνται σε πολύ χαμηλότερα ποσοστά (4–8%).

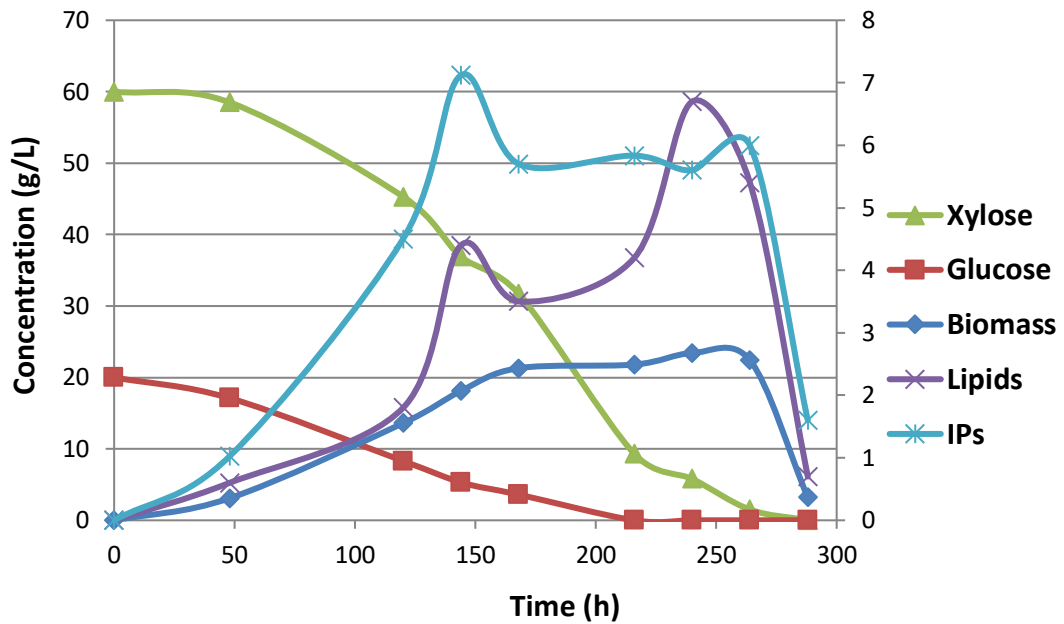




**Διάγραμμα 4:** Ποσοστιαία κατανομή των κλασμάτων (ουδέτερα, σφιγγο-γλυκολιπίδια και φωσφολιπίδια) επί του συνόλου των ολικών λιπιδίων (TL) της ζύμης *Lipomyces starkeyi* με τη γλυκερόλη ως μόνη πηγή άνθρακα στην στάσιμη φάση. Συνθήκες καλλιέργειας: ασυνεχής ζύμωση σε ανακινούμενες κωνικές φιάλες (180 rpm) και θερμοκρασία  $T = 30\text{ }^{\circ}\text{C}$ , αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης ( $So\ Glol = 80\text{ g/L}$ ) και πηγές αζώτου  $1\text{ g/L}$  yeast extract και  $3\text{ g/L}$  πεπτόνη, υπό αερόβιες συνθήκες.

### 3.5 Καλλιέργεια της ζύμης *Lipomyces starkeyi* σε μίγμα $20\text{ g/L}$ γλυκόζη – $60\text{ g/L}$ ξυλόζη (Glu = $20\text{ g/L}$ , Xyl = $60\text{ g/L}$ )

Στη συνέχεια της παρούσας έρευνας χρησιμοποιήθηκαν σαν πηγή άνθρακα μίγματα των υποστρωμάτων που αναλύθηκαν παραπάνω, σε διαφορετικές αναλογίες. Το πρώτο υπόστρωμα που μελετήθηκε περιείχε  $20\text{ g/L}$  γλυκόζη και  $60\text{ g/L}$  ξυλόζη, όπου τα δύο σάκχαρα καταναλώνονταν ικανοποιητικά και ταυτόχρονα από τον μικροοργανισμό κι εξαντλήθηκαν μετά από 216 και 264 h ζύμωσης αντίστοιχα, ενώ παρουσιάστηκε κυτταρική αύξηση μέχρι και  $23,4\text{ g/L}$ . Η παραγωγή των λιπιδίων παρουσίασε μέγιστη τιμή τα  $7,1\text{ g/L}$  στις 240 h ζύμωσης, ενώ για τους ενδοκυτταρικούς πολυσακχαρίτες έφτασε τα  $7,1\text{ g/g}$  στις 144 h, όπου σε εκείνο το σημείο παρατηρήθηκε μια μείωση στην παραγωγή και των δύο μεταβολικών προϊόντων, μέχρι αυτή να αυξηθεί πάλι μετά τις 200 h ζύμωσης. Τέλος, το ποσοστό λιποσυσσώρευσης εμφανίστηκε μέγιστο στις 240 h, με  $YL/X\ 30,3\%$ .



**Διάγραμμα 5:** Κινητική εξέλιξη της βιομάζας, της κατανάλωσης γλυκόζης-ξυλόζης και της παραγωγής λιπιδίων και IPs, συναρτήσεως του χρόνου για το στέλεχος *Lipomyces starkeyi* σε μίγμα γλυκόζης-ξυλόζης ως πηγή άνθρακα, σε περιοριστικές σε άζωτο συνθήκες. Συνθήκες καλλιέργειας: ανάπτυξη σε ανακινούμενες φιάλες όγκου 250 mL ( $180 \pm 5$  rpm), θερμοκρασία 30 °C, αρχική συγκέντρωση γλυκόζης (Glu) 20 g/L και ξυλόζης (Xyl) 60 g/L, αρχικό pH=6.0± 0.1.

Μετά την παραλαβή του ενδοκυτταρικού λίπους από το μικροοργανισμό ακολούθησε η ανάλυση της σύστασης των λιπιδίων σε λιπαρά οξέα με τη βοήθεια του αέριου χρωματογράφου. Η ανάλυση της σύστασης των λιπιδίων σε λιπαρά οξέα πραγματοποιήθηκε επιλεκτικά στα δείγματα που προέκυψαν από τη ζύμωση αυτή. Επιλέχθηκαν δείγματα από την μέση και το τέλος της ζύμωσης. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης από τον αέριο χρωματογράφο φαίνονται στον παρακάτω πίνακα.

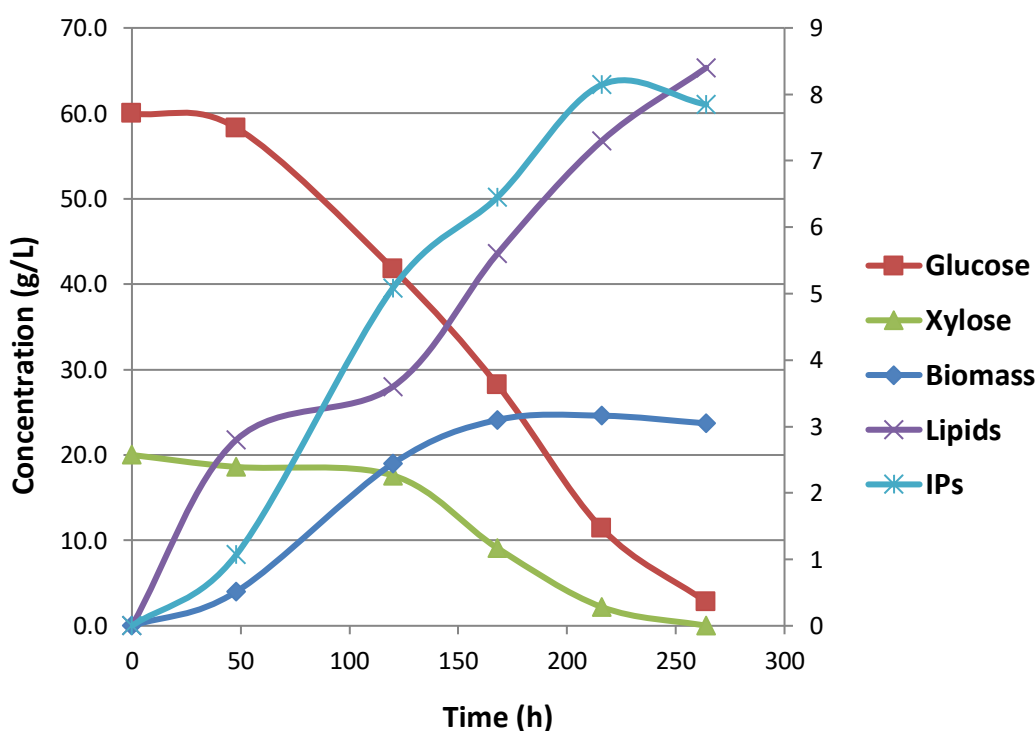
**Πίνακας 6:** Σύσταση των λιπιδίων σε λιπαρά οξέα της ζύμης *Lipomyces starkeyi* σε αρχική συγκέντρωση γλυκόζης (Glu) 20 g/L και ξυλόζης (Xyl) 60 g/L, αρχικό pH=6.0± 0.1.

| Time<br>(h) | Λιπαρά οξέα % (w/w) – Folch |       |       |                  |                     |
|-------------|-----------------------------|-------|-------|------------------|---------------------|
|             | C16:0                       | C16:1 | C18:0 | $\Delta^9$ C18:1 | $\Delta^9,12$ C18:2 |
| 120         | 17,2                        | 6,5   | 4,8   | 40,8             | 12,4                |
| 264         | 33,1                        | 7,1   | 5,3   | 42,4             | 3,5                 |

### 3.6 Καλλιέργεια της ζύμης *Lipomyces starkeyi* σε μίγμα 60 g/L γλυκόζη – 20 g/L ξυλόζη (Glu = 60g/L, Xyl = 20 g/L)

Το επόμενο μίγμα που χρησιμοποιήθηκε αποτελούνταν από 60 g/L γλυκόζης και 20 g/L ξυλόζης, αρχική συγκέντρωση, και καταναλώθηκε ομοιόμορφα και αποτελεσματικά από τη ζύμη. Αναλυτικότερα, τα δύο σάκχαρα εξαντλήθηκαν μετά από 264 h ζύμωσης, ενώ η κυτταρική αύξηση έφτασε τα 24,6 g/L. Η παραγωγή λιπιδίων παρουσίασε μέγιστη τιμή τα 8,4 g/L με ποσοστό λιποσυσσώρευσης YL/X 35,4% στις τελευταίες ώρες της ζύμωσης, ενώ η αντιστοιχία για τους ενδοκυτταρικούς πολυσακχαρίτες ήταν 8,1 g/g.

Στο παρακάτω γράφημα (Γράφημα III.6.1) παρουσιάζεται η κινητική εξέλιξη της βιομάζας, της κατανάλωσης του υποστρώματος και της παραγωγής μεταβολικών προϊόντων από τη ζύμη *Lipomyces starkeyi* κατά την αύξηση της σε θρεπτικό μέσο με το άζωτο ως το περιοριστικό της αύξησης στοιχείο και πηγή άνθρακα μίγμα γλυκόζης (60 g/L) – ξυλόζης (20 g/L).



**Διάγραμμα 6:** Κινητική εξέλιξη της βιομάζας, της κατανάλωσης γλυκόζης-ξυλόζης και της παραγωγής λιπιδίων και IPS, συναρτήσει του χρόνου για το στέλεχος *Lipomyces starkeyi* σε μίγμα γλυκόζης-ξυλόζης ως πηγή άνθρακα, σε περιοριστικές σε άζωτο συνθήκες. Συνθήκες καλλιέργειας: ανάπτυξη σε ανακινούμενες φιάλες όγκου 250 mL ( $180 \pm 5$  rpm), θερμοκρασία 30 °C, αρχική συγκέντρωση γλυκόζης (Glu) 60 g/L και ξυλόζης (Xyl) 20 g/L, αρχικό pH=6.0± 0.1.

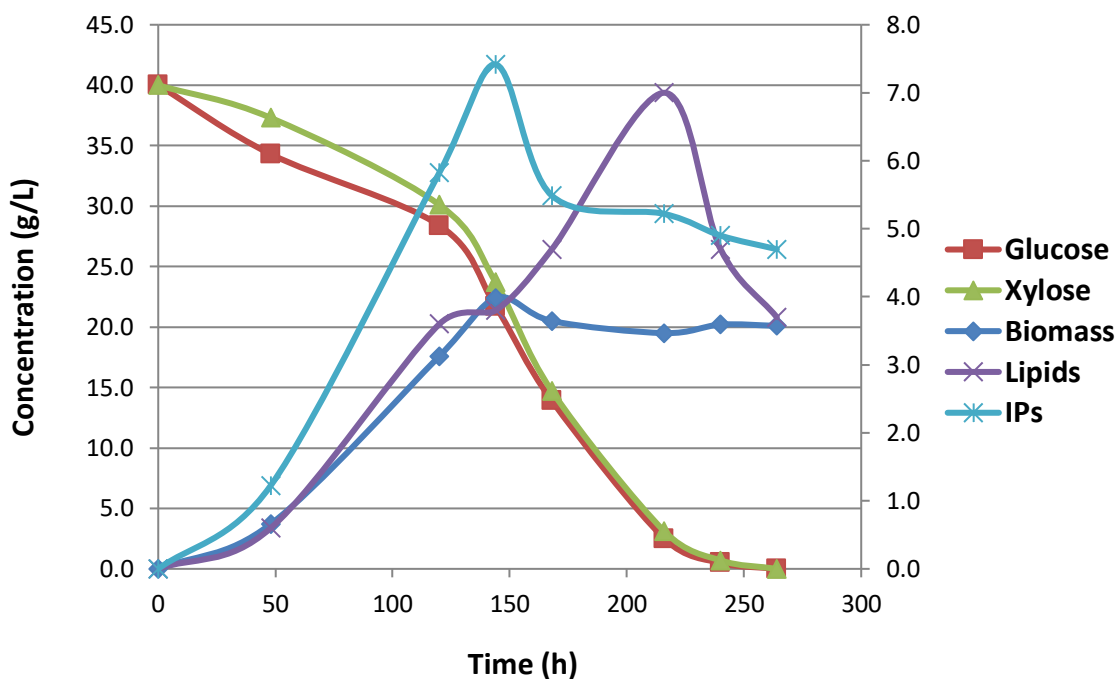
Μετά την παραλαβή του ενδοκυτταρικού λίπους από το μικροοργανισμό ακολούθησε η ανάλυση της σύστασης των λιπιδίων σε λιπαρά οξέα με τη βοήθεια του αέριου χρωματογράφου. Η ανάλυση της σύστασης των λιπιδίων σε λιπαρά οξέα πραγματοποιήθηκε επιλεκτικά στα δείγματα που προέκυψαν από τη ζύμωση αυτή. Επιλέχθηκαν δείγματα από την μέση και το τέλος της ζύμωσης. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης από τον αέριο χρωματογράφο φαίνονται στον παρακάτω πίνακα.

**Πίνακας 7:** Σύσταση των λιπιδίων σε λιπαρά οξέα της ζύμης *Lipomyces starkeyi* σε αρχική συγκέντρωση γλυκόζης (Glu) 60 g/L και ξυλόζης (Xyl) 20 g/L, αρχικό pH=6.0± 0.1.

| Time<br>(h) | Λιπαρά οξέα % (w/w) – Folch |       |       |         |            |
|-------------|-----------------------------|-------|-------|---------|------------|
|             | C16:0                       | C16:1 | C18:0 | Δ9C18:1 | Δ9,12C18:2 |
| 120         | 19,7                        | 6,1   | 4,6   | 41,3    | 11,4       |
| 264         | 32,2                        | 6,8   | 5,1   | 42,9    | 4,2        |

### 3.7 Καλλιέργεια της ζύμης *Lipomyces starkeyi* σε μίγμα 40 g/L γλυκόζη – 40 g/L ξυλόζη (Glu = 40g/L, Xyl = 40 g/L)

Στη συνέχεια της μελέτης χρησιμοποιήσαμε σαν πηγή άνθρακα για την ανάπτυξη της ζύμης μίγμα γλυκόζης – ξυλόζης με την ίδια αρχική συγκέντρωση, 40 g/L για το κάθε σάκχαρο (συνολικά 80 g/L υποστρώματος). Παρατηρήθηκε ότι τα δύο σάκχαρα καταναλώθηκαν με τον ίδιο ρυθμό από τον μικροοργανισμό καθόλη τη διάρκεια της ζύμωσης μέχρι εξαντλήσεώς τους μετά από 264 h, εμφανίζοντας κυτταρική αύξηση μέχρι και 22,4 g/L. Όταν η συγκέντρωση του υποστρώματος έγινε η μισή της αρχικής σημειώθηκε η μέγιστη παραγωγή ενδοκυτταρικών πολυσακχαριτών, 7,4 g/L. Το παραγόμενο ενδοκυτταρικό λίπος έφτασε τα 7,0 g/L στις 216 h ζύμωσης, με ποσοστό λιποσυσσώρευσης YL/X 33,0%.



**Διάγραμμα 7:** Κινητική εξέλιξη της βιομάζας, της κατανάλωσης γλυκόζης-ξυλόζης και της παραγωγής λιπιδίων και IPS, συναρτήσει του χρόνου για το στέλεχος *Lipomyces starkeyi* σε μίγμα γλυκόζης-ξυλόζης ως πηγή άνθρακα, σε περιοριστικές σε άζωτο συνθήκες. Συνθήκες καλλιέργειας: ανάπτυξη σε ανακινούμενες φιάλες όγκου 250 mL (180±5 g/m), θερμοκρασία 30 oC, αρχική συγκέντρωση γλυκόζης (Glu) 40 g/L και ξυλόζης (Xyl) 40 g/L, αρχικό pH=6.0± 0.1.

Μετά την παραλαβή του ενδοκυτταρικού λίπους από το μικροοργανισμό ακολούθησε η ανάλυση της σύστασης των λιπιδίων σε λιπαρά οξέα με τη βοήθεια του αέριου χρωματογράφου. Η ανάλυση της σύστασης των λιπιδίων σε λιπαρά οξέα πραγματοποιήθηκε επιλεκτικά στα δείγματα που προέκυψαν από τη ζύμωση αυτή. Επιλέχθηκαν δείγματα από την μέση και το τέλος της ζύμωσης. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης από τον αέριο χρωματογράφο φαίνονται στον παρακάτω πίνακα.

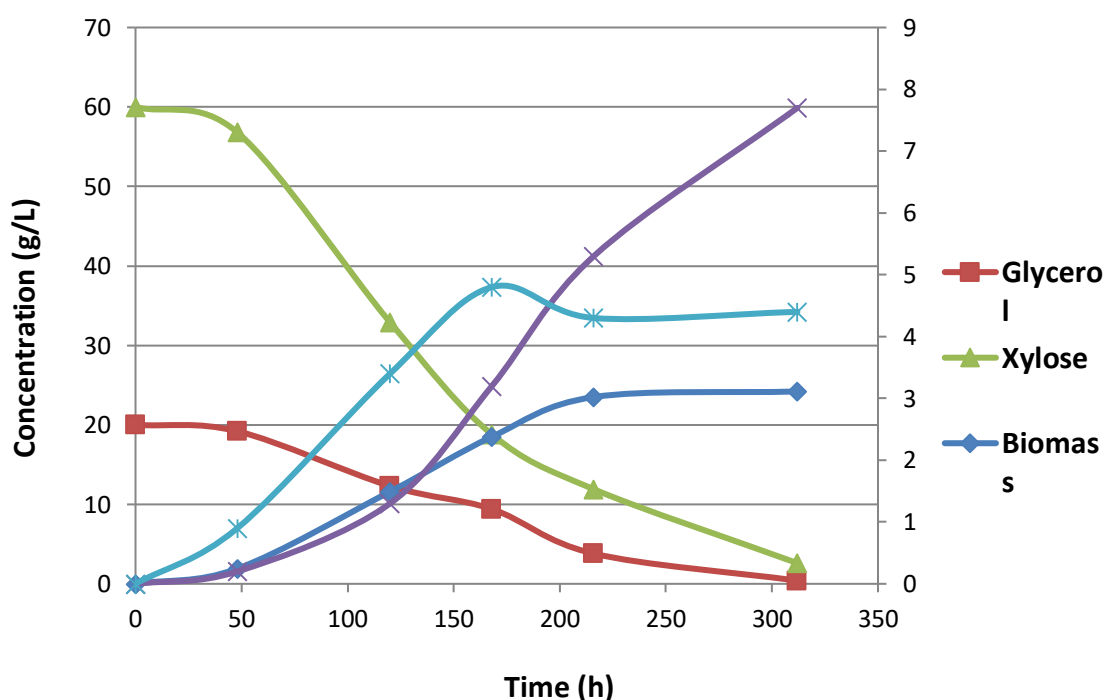
**Πίνακας 8:** Σύσταση των λιπιδίων σε λιπαρά οξέα της ζύμης *Lipomyces starkeyi* σε αρχική συγκέντρωση γλυκόζης (Glu) 40 g/L και ξυλόζης (Xyl) 40 g/L, αρχικό pH=6.0± 0.1.

| Time<br>(h) | Λιπαρά οξέα % (w/w) – Folch |       |       |         |            |
|-------------|-----------------------------|-------|-------|---------|------------|
|             | C16:0                       | C16:1 | C18:0 | Δ9C18:1 | Δ9,12C18:2 |
| 120         | 20,8                        | 4,9   | 4,4   | 40,8    | 11,8       |
| 264         | 31,2                        | 5,4   | 5,6   | 41,9    | 6,2        |

### 3.8 Καλλιέργεια της ζύμης *Lipomyces starkeyi* σε μίγμα 20 g/L ακάθαρτη γλυκερόλη – 60 g/L ξυλόζη (Glol = 20g/L, Xyl = 60 g/L)

Στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκε σαν υπόστρωμα μίγμα ακάθαρτης γλυκερόλης 20 g/L και ξυλόζης 60 g/L, το οποίο καταναλώθηκε σε ικανοποιητικό βαθμό από τον μικροοργανισμό. Τα δύο αυτά σάκχαρα έφτασαν στην εξάντλησή τους μετά το πέρας 312 h ζύμωσης, με παραγόμενη βιομάζα έως και 24,2 g/L. Η μέγιστη σύνθεση λιπιδίων που μετρήθηκε ήταν 7,7 g/L, με παρατηρούμενη λιποσυσσώρευση YL/X 31,8%. Τέλος, αξιοσημείωτη κρίνεται και η παραγωγή ενδοπολυσακχαριτών που ανέρχεται έως τα 4,8 g/L.

Στο παρακάτω γράφημα (Γράφημα III.8.1) παρουσιάζεται η κινητική εξέλιξη της βιομάζας, της κατανάλωσης του υποστρώματος και της παραγωγής μεταβολικών προϊόντων από τη ζύμη *Lipomyces starkeyi* κατά την αύξηση της σε θρεπτικό μέσο με το άζωτο ως το περιοριστικό της αύξησης στοιχείο και πηγή άνθρακα μίγμα γλυκερόλης (20 g/L) – ξυλόζης (60 g/L).



**Διάγραμμα 8:** Κινητική εξέλιξη της βιομάζας, της κατανάλωσης γλυκερόλης-ξυλόζης και της παραγωγής λιπιδίων και IPS, συναρτήσεως του χρόνου για το στέλεχος *Lipomyces starkeyi* σε μίγμα γλυκερόλης-ξυλόζης ως πηγή άνθρακα, σε περιοριστικές σε άζωτο συνθήκες. Συνθήκες καλλιέργειας: ανάπτυξη σε ανακινούμενες φιάλες όγκου 250 mL ( $180 \pm 5$  rpm), θερμοκρασία 30 °C, αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης (Glol) 20 g/L και ξυλόζης (Xyl) 60 g/L, αρχικό pH=6.0± 0.1.

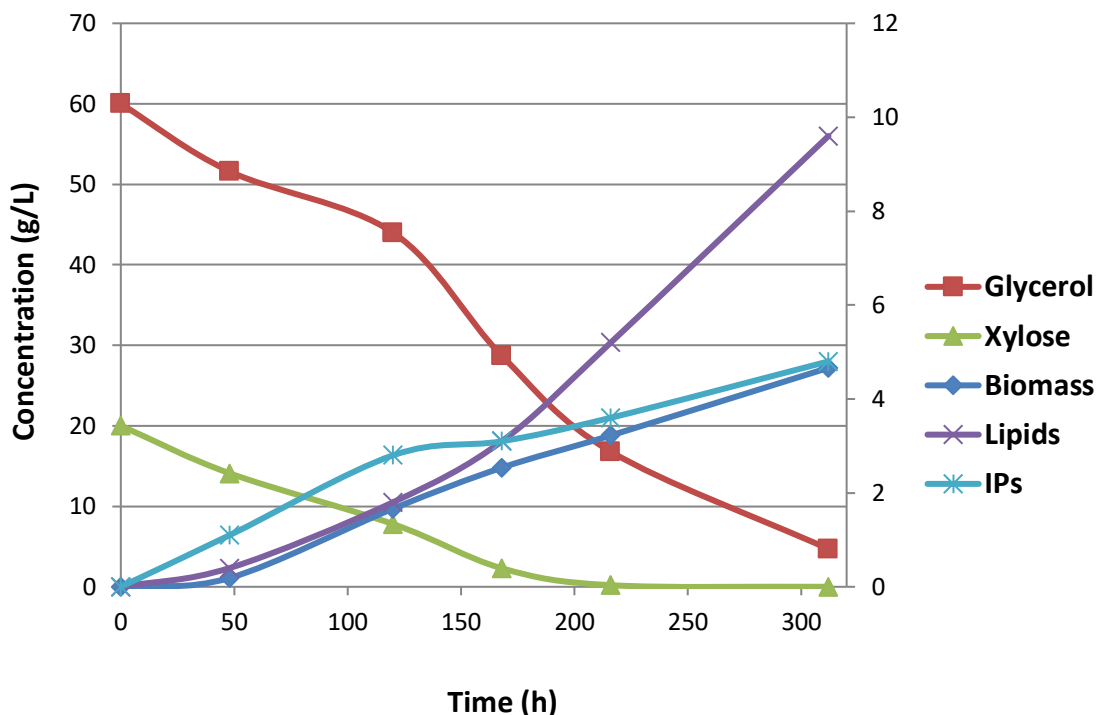
Μετά την παραλαβή του ενδοκυτταρικού λίπους από το μικροοργανισμό ακολούθησε η ανάλυση της σύστασης των λιπιδίων σε λιπαρά οξέα με τη βοήθεια του αέριου χρωματογράφου. Η ανάλυση της σύστασης των λιπιδίων σε λιπαρά οξέα πραγματοποιήθηκε επιλεκτικά στα δείγματα που προέκυψαν από τη ζύμωση αυτή. Επιλέχθηκαν δείγματα από την μέση και το τέλος της ζύμωσης. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης από τον αέριο χρωματογράφο φαίνονται στον παρακάτω πίνακα.

**Πίνακας 9:** Σύσταση των λιπιδίων σε λιπαρά οξέα της ζύμης *Lipomyces starkeyi* σε αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης (Glol) 20 g/L και ξυλόζης (Xyl) 60 g/L, αρχικό pH=6.0± 0.1.

| Time<br>(h) | Λιπαρά οξέα % (w/w) – Folch |       |       |         |            |
|-------------|-----------------------------|-------|-------|---------|------------|
|             | C16:0                       | C16:1 | C18:0 | Δ9C18:1 | Δ9,12C18:2 |
| 120         | 19,2                        | 4,7   | 4,9   | 42,1    | 13,3       |
| 216         | 33,5                        | 5,4   | 5,4   | 43,4    | 5,8        |

### 3.9 Καλλιέργεια της ζύμης *Lipomyces starkeyi* σε μίγμα 60 g/L ακάθαρτη γλυκερόλη – 20 g/L ξυλόζη (Glol = 60g/L, Xyl = 20 g/L)

Το επόμενο υπόστρωμα που μελετήθηκε περιείχε 60 g/L ακάθαρτη γλυκερόλη και 20 g/L ξυλόζη, όπου τα δύο σάκχαρα καταναλώνονταν ικανοποιητικά και ταυτόχρονα από τον μικροοργανισμό κι εξαντλήθηκαν μετά από 312 h ζύμωσης, ενώ παρουσιάστηκε κυτταρική αύξηση μέχρι και 27,2 g/L. Η παραγωγή των λιπιδίων παρουσίασε μέγιστη τιμή τα 9,6 g/L στις 312 h ζύμωσης, ενώ για τους ενδοκυτταρικούς πολυσακχαρίτες έφτασε τα 4,8 g/g στον ίδιο χρόνο, όπου το ποσοστό λιποσυσσώρευσης εμφανίστηκε μέγιστο YL/X 35,3%.



**Διάγραμμα 9:** Κινητική εξέλιξη της βιομάζας, της κατανάλωσης γλυκερόλης - ξυλόζης και της παραγωγής λιπιδίων και IPs, συναρτήσεως του χρόνου για το στέλεχος *Lipomyces starkeyi* σε μίγμα γλυκερόλης - ξυλόζης ως πηγή άνθρακα, σε περιοριστικές σε άζωτο συνθήκες. Συνθήκες καλλιέργειας: ανάπτυξη σε ανακινούμενες φιάλες όγκου 250 mL ( $180 \pm 5$  rpm), θερμοκρασία 30 °C, αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης (GloI) 60 g/L και ξυλόζης (Xyl) 20 g/L, αρχικό pH=6.0± 0.1.

Μετά την παραλαβή του ενδοκυτταρικού λίπους από το μικροοργανισμό ακολούθησε η ανάλυση της σύστασης των λιπιδίων σε λιπαρά οξέα με τη βοήθεια του αέριου χρωματογράφου. Η ανάλυση της σύστασης των λιπιδίων σε λιπαρά οξέα πραγματοποιήθηκε επιλεκτικά στα δείγματα που προέκυψαν από τη ζύμωση αυτή. Επιλέχθηκαν δείγματα από την μέση και το τέλος της ζύμωσης. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης από τον αέριο χρωματογράφο φαίνονται στον παρακάτω πίνακα.

**Πίνακας 10:** Σύσταση λιπιδίων σε λιπαρά οξέα της ζύμης *Lipomyces starkeyi* σε αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης (GloI) 60 g/L και ξυλόζης (Xyl) 20 g/L, αρχικό pH=6.0± 0.1.

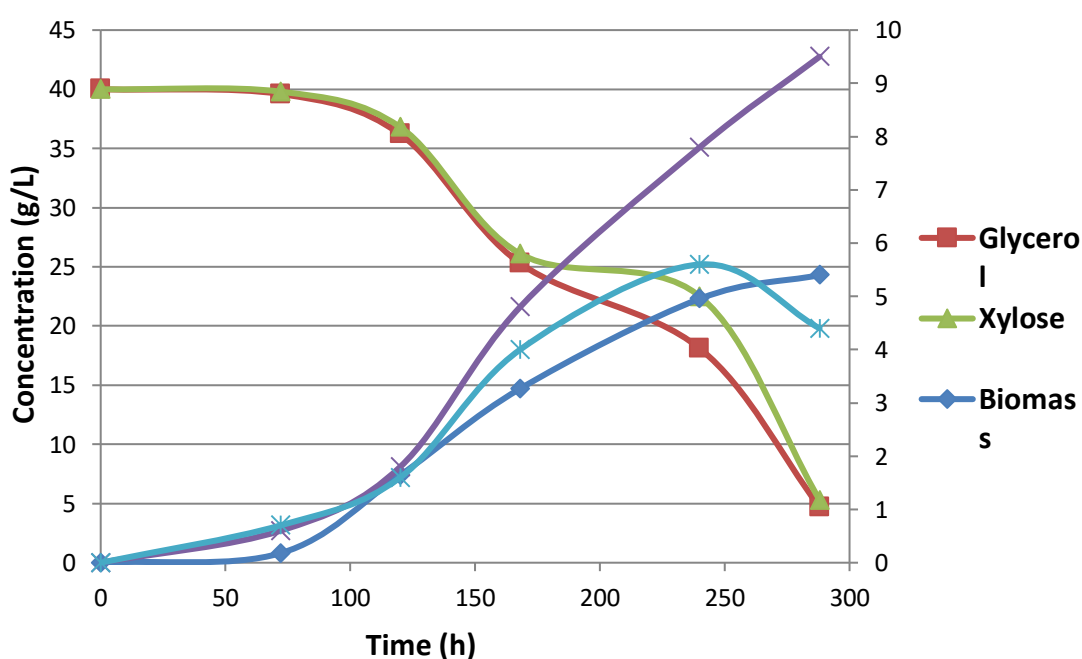
| Time<br>(h) | Λιπαρά οξέα % (w/w) – Folch |       |       |                  |                     |
|-------------|-----------------------------|-------|-------|------------------|---------------------|
|             | C16:0                       | C16:1 | C18:0 | $\Delta^9$ C18:1 | $\Delta^9,12$ C18:2 |
| 120         | 18,5                        | 5,1   | 4,7   | 40,5             | 12,9                |
| 216         | 31,5                        | 6,2   | 5,7   | 41,7             | 7,3                 |



### 3.10 Καλλιέργεια της ζύμης *Lipomyces starkeyi* σε μίγμα 40 g/L ακάθαρτη γλυκερόλη – 40 g/L ξυλόζη (Glol = 40g/L, Xyl = 40 g/L)

Το θρεπτικό υλικό που ερευνήθηκε έπειτα ήταν μίγμα αναλογίας 1:1 ακάθαρτης γλυκερόλης και ξυλόζης. Πιό συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκαν 40 g/L από το εκάστοτε σάκχαρο, με αρχική συγκέντρωση μίγματος περίπου 80 g/L. Η κυτταρική αύξηση που εμφανίστηκε ήταν σημαντική με τιμή που έφτασε τα 24,3 g/L, ενώ για παραγωγή λιπιδίων αντίστοιχα έφτασε τα 9,5 g/L. Μετρήθηκαν επιπλέον οι ενδοκυτταρικοί πολυσακχαρίτες που συνέθεσε η ζύμη και το αποτέλεσμα ήταν 5,6 g/L στις 240 h ζύμωσης. Το μεγαλύτερο ποσοστό λιποσυσσώρευσης που παρατηρήθηκε ήταν  $Y_{L/X}$  39,0%.

Στο παρακάτω γράφημα (Γράφημα III.10.1) παρουσιάζεται η κινητική εξέλιξη της βιομάζας, της κατανάλωσης του υποστρώματος και της παραγωγής μεταβολικών προϊόντων από τη ζύμη *Lipomyces starkeyi* κατά την αύξηση της σε θρεπτικό μέσο με το άζωτο ως το περιοριστικό της αύξησης στοιχείο και πηγή άνθρακα μίγμα γλυκερόλης (40 g/L) – ξυλόζης (40 g/L).



**Διάγραμμα 10:** Κινητική εξέλιξη της βιομάζας, της κατανάλωσης γλυκερόλης-ξυλόζης και της παραγωγής λιπιδίων και IPS, συναρτήσει του χρόνου για το στέλεχος *Lipomyces starkeyi* σε μίγμα γλυκόζης-ξυλόζης ως πηγή άνθρακα, σε περιοριστικές σε άζωτο συνθήκες. Συνθήκες καλλιέργειας: ανάπτυξη σε ανακινούμενες φιάλες όγκου 250 mL ( $180 \pm 5$  rpm), θερμοκρασία 30 °C, αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης (Glol) 40 g/L και ξυλόζης (Xyl) 40 g/L, αρχικό pH=6.0 ± 0.1.

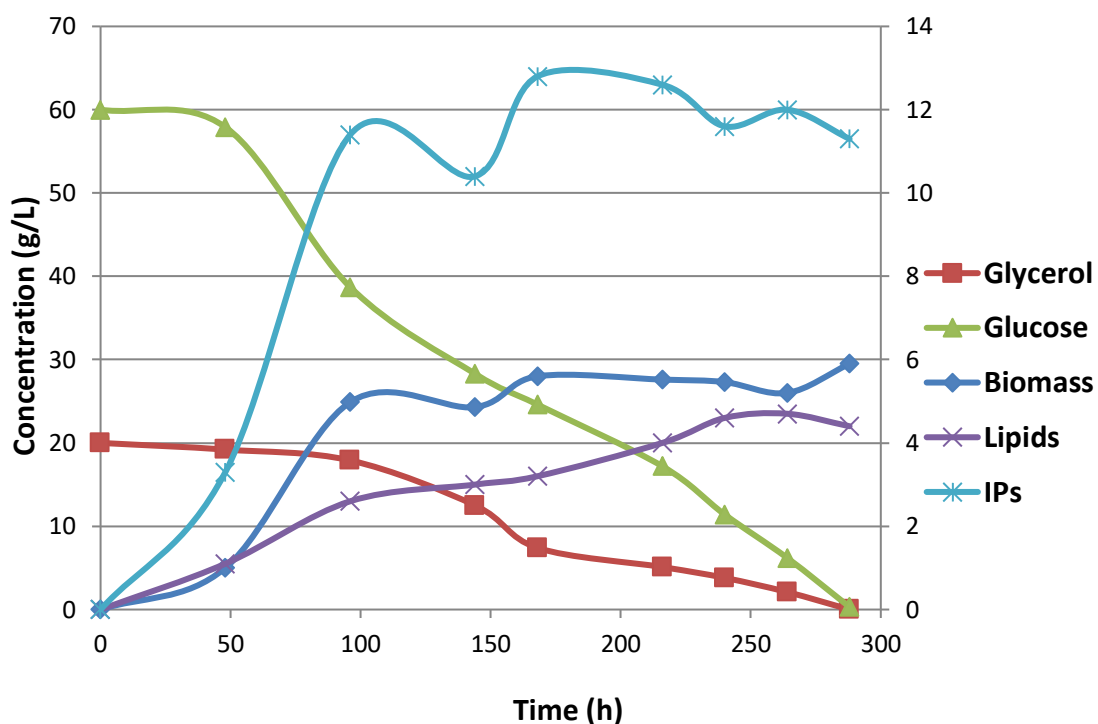
Μετά την παραλαβή του ενδοκυτταρικού λίπους από το μικροοργανισμό ακολούθησε η ανάλυση της σύστασης των λιπιδίων σε λιπαρά οξέα με τη βοήθεια του αέριου χρωματογράφου. Η ανάλυση της σύστασης των λιπιδίων σε λιπαρά οξέα πραγματοποιήθηκε επιλεκτικά στα δείγματα που προέκυψαν από τη ζύμωση αυτή. Επιλέχθηκαν δείγματα από την μέση και το τέλος της ζύμωσης. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης από τον αέριο χρωματογράφο φαίνονται στον παρακάτω πίνακα.

**Πίνακας 11:** Σύσταση των λιπιδίων σε λιπαρά οξέα της ζύμης *Lipomyces starkeyi* σε αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης (GloI) 40 g/L και ξυλόζης (Xyl) 40 g/L, αρχικό pH=6.0± 0.1.

| Time<br>(h) | Λιπαρά οξέα % (w/w) – Folch |       |       |                  |                       |
|-------------|-----------------------------|-------|-------|------------------|-----------------------|
|             | C16:0                       | C16:1 | C18:0 | $\Delta^9$ C18:1 | $\Delta^{9,12}$ C18:2 |
| 120         | 17,2                        | 5,4   | 4,2   | 43,6             | 13,2                  |
| 240         | 33,4                        | 6,6   | 5,3   | 43,7             | 5,6                   |

### 3.11 Καλλιέργεια της ζύμης *Lipomyces starkeyi* σε μίγμα 20 g/L ακάθαρτη γλυκερόλη – 60 g/L γλυκόζη (GloI = 20g/L, Glu = 60 g/L)

Το επόμενο μίγμα που χρησιμοποιήσαμε σαν θρεπτικό υλικό αποτελούνταν από 20 g/L γλυκερόλη και 60 g/L γλυκόζη, με τα δύο σάκχαρα να καταναλώνονται ικανοποιητικά και ταυτόχρονα σχεδόν από τον μικροοργανισμό. Πιο συγκεκριμένα, η εξάντληση του θρεπτικού μέσου παρατηρήθηκε έπειτα από 288 ώρες, κατά την διάρκεια των οποίων η κυτταρική αύξηση έφτασε μέχρι τα 29,5 g/L. Η μέγιστη τιμή παραγωγής λιπιδίων ήταν τα 4,7 g/L που συνεπάγεται ποσοστό λιποσυσσώρευσης  $Y_{L/X}$  18,1% και η αντίστοιχη για τους ενδοκυτταρικούς πολυσακχαρίτες ήταν 12,8 g/L.



**Διάγραμμα 11:** Κινητική εξέλιξη της βιομάζας, της κατανάλωσης γλυκερόλης - γλυκόζης και της παραγωγής λιπιδίων και IPS, συναρτήσει του χρόνου για το στέλεχος *Lipomyces starkeyi* σε μίγμα γλυκόζης-ξυλόζης ως πηγή άνθρακα, σε περιοριστικές σε άζωτο συνθήκες. Συνθήκες καλλιέργειας: ανάπτυξη σε ανακινούμενες φιάλες όγκου 250 mL (180±5 rpm), θερμοκρασία 30 oC, αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης (GloI) 20 g/L και γλυκόζης (Glu) 60 g/L, αρχικό pH=6.0± 0.1.

Μετά την παραλαβή του ενδοκυτταρικού λίπους από το μικροοργανισμό ακολούθησε η ανάλυση της σύστασης των λιπιδίων σε λιπαρά οξέα με τη βοήθεια του αέριου χρωματογράφου. Η ανάλυση της σύστασης των λιπιδίων σε λιπαρά οξέα πραγματοποιήθηκε επιλεκτικά στα δείγματα που προέκυψαν από τη ζύμωση αυτή. Επιλέχθηκαν δείγματα από την μέση και το τέλος της ζύμωσης. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης από τον αέριο χρωματογράφο φαίνονται στον παρακάτω πίνακα.

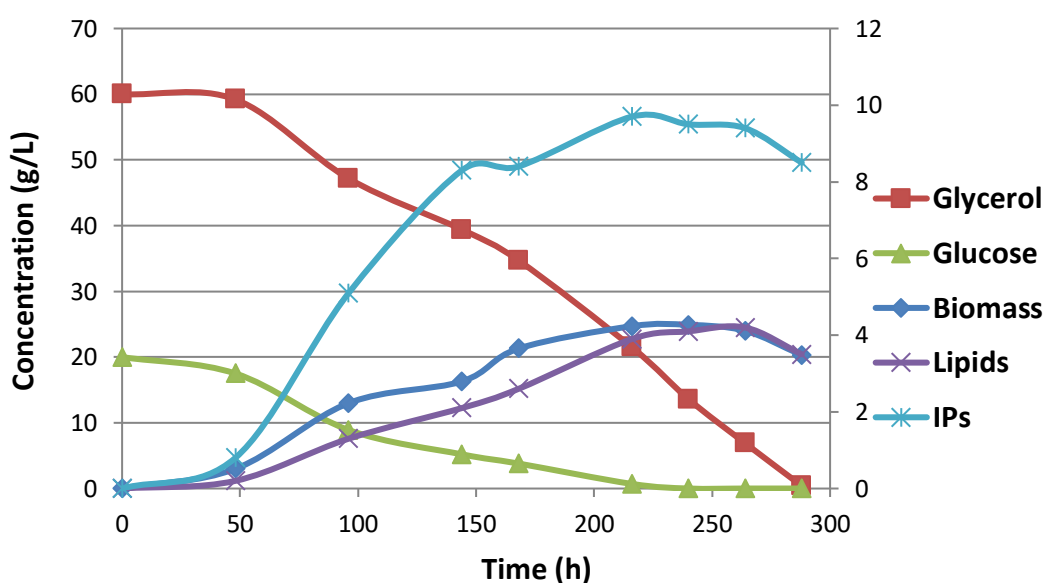
**Πίνακας 12:** Σύσταση των λιπιδίων σε λιπαρά οξέα της ζύμης *Lipomyces starkeyi* σε αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης (GloI) 20 g/L και γλυκόζης (Glu) 60 g/L, αρχικό pH=6.0± 0.1.

| Time (h) | Λιπαρά οξέα % (w/w) – Folch |       |       |                  |                       |
|----------|-----------------------------|-------|-------|------------------|-----------------------|
|          | C16:0                       | C16:1 | C18:0 | $\Delta^9$ C18:1 | $\Delta^{9,12}$ C18:2 |
| 96       | 19,5                        | 5,4   | 4,7   | 43,7             | 12,9                  |
| 264      | 32,7                        | 6,3   | 5,2   | 44,5             | 6,3                   |

### 3.12 Καλλιέργεια της ζύμης *Lipomyces starkeyi* σε μίγμα 60 g/L ακάθαρτη γλυκερόλη – 20 g/L γλυκόζη (Glol = 60g/L, Glu = 20 g/L)

Στη συνέχεια μελετήθηκε μίγμα ακάθαρτης γλυκερόλης – γλυκόζης με αρχική συγκέντρωση 60 g/L και 20 g/L αντίστοιχα για κάθε σάκχαρο, με ικανοποιητική κατανάλωσή τους από τη ζύμη μέχρι εξαντλήσεώς τους μετά από 288 h ζύμωσης. Όσον αφορά τη σύνθεση λιπιδίων, η μέγιστη ποσότητα που μετρήθηκε ήταν 4,2 g/L με λιποσυσώρευση YL/X 17,5%, μειωμένη σε σχέση με προηγούμενα δείγματα. Από την άλλη, παρατηρήθηκε αυξημένη παραγωγή εωδοκυτταρικών πολυσακχαριτών, που έφτασαν έως και 9,7 g/L, ενώ η αύξηση της βιομάζας σταμάτησε στην τιμή 24,9 g/L.

Στο παρακάτω γράφημα (Γράφημα III.10.1) παρουσιάζεται η κινητική εξέλιξη της βιομάζας, της κατανάλωσης του υποστρώματος και της παραγωγής μεταβολικών προϊόντων από τη ζύμη *Lipomyces starkeyi* κατά την αύξηση της σε θρεπτικό μέσο με το άζωτο ως το περιοριστικό της αύξησης στοιχείο και πηγή άνθρακα μίγμα γλυκερόλης (40 g/L) – γλυκόζης (40 g/L).



**Διάγραμμα 12:** Κινητική εξέλιξη της βιομάζας, της κατανάλωσης γλυκερόλης - γλυκόζης και της παραγωγής λιπιδίων και IPS, συναρτήσει του χρόνου για το στέλεχος *Lipomyces starkeyi* σε μίγμα γλυκόζης-ξυλόζης ως πηγή άνθρακα, σε περιοριστικές σε άζωτο συνθήκες. Συνθήκες καλλιέργειας: ανάπτυξη σε ανακινούμενες φιάλες όγκου 250 mL ( $180 \pm 5$  rpm), θερμοκρασία 30 °C, αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης (Glol) 60 g/L και γλυκόζης (Glu) 20 g/L, αρχικό pH=6.0± 0.1.

Μετά την παραλαβή του ενδοκυτταρικού λίπους από το μικροοργανισμό ακολούθησε η ανάλυση της σύστασης των λιπιδίων σε λιπαρά οξέα με τη βοήθεια του αέριου χρωματογράφου. Η ανάλυση της σύστασης των λιπιδίων σε λιπαρά οξέα πραγματοποιήθηκε επιλεκτικά στα δείγματα που προέκυψαν από τη ζύμωση αυτή. Επιλέχθηκαν δείγματα από την μέση και το τέλος της ζύμωσης. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης από τον αέριο χρωματογράφο φαίνονται στον παρακάτω πίνακα.

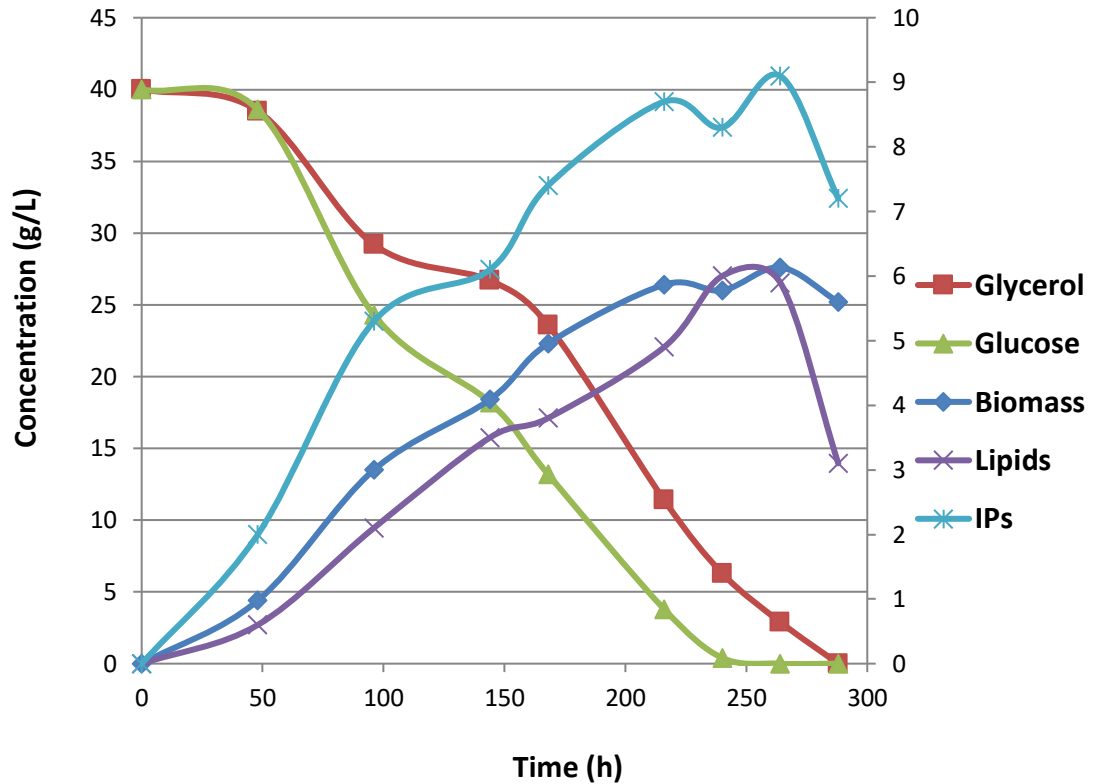
**Πίνακας 13:** Σύσταση των λιπιδίων σε λιπαρά οξέα της ζύμης *Lipomyces starkeyi* σε αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης (G1ol) 60 g/L και γλυκόζης (Glu) 20 g/L, αρχικό pH=6.0± 0.1.

| Time<br>(h) | Λιπαρά οξέα % (w/w) – Folch |       |       |                     |                        |
|-------------|-----------------------------|-------|-------|---------------------|------------------------|
|             | C16:0                       | C16:1 | C18:0 | <sup>Δ9</sup> C18:1 | <sup>Δ9,12</sup> C18:2 |
| 96          | 19,5                        | 4,8   | 4,8   | 41,7                | 11,5                   |
| 264         | 33,6                        | 6,2   | 5,7   | 43,8                | 5,8                    |

### 3.13 Καλλιέργεια της ζύμης *Lipomyces starkeyi* σε μίγμα 40 g/L ακάθαρτη γλυκερόλη – 40 g/L γλυκόζη (G1ol = 40g/L, Glu = 40 g/L)

Το τελευταίο πείραμα που μελετήθηκε διέθετε ως θρεπτικό μέσο για τη ζύμη μίγμα ακάθαρτης γλυκερόλης και γλυκόζης σε αναλογία 1:1. Αναλυτικότερα, χρησιμοποιήθηκαν 40 g/L από κάθε σάκχαρο επιτυγχάνοντας ταυτόχρονη και ικανοποιητική κατανάλωσή τους από τον *Lipomyces starkeyi* μέχρι εξελαντλήσής τους μετά από 288 h. Κατά τη διάρκεια της ζύμωσης παρουσιάστηκε αξιόλογη κυτταρική αύξηση που έφτασε μέχρι τα 27,6 g/L. Η παραγωγή των μικροβιακών λιπιδίων εμφάνισε μέγιστη τιμή τα 6,0 g/L, ενώ η αντίστοιχη για τους ενδοκυτταρικούς πολυσακχαρίτες ήταν 9,1 g/L. Τέλος, στις 240 h ζύμωσης είδαμε και το υψηλότερο ποσοστό λιποσυσσώρευσης για αυτό το πείραμα, δηλαδή το YL/X 23,1%.

Στο γράφημα που ακολουθεί (Γράφημα III.13.1) παρουσιάζεται η κινητική εξέλιξη της βιομάζας, της κατανάλωσης του υποστρώματος και της παραγωγής μεταβολικών προϊόντων από τη ζύμη *Lipomyces starkeyi* κατά την αύξηση της σε θρεπτικό μέσο με το άζωτο ως το περιοριστικό της αύξησης στοιχείο και πηγή άνθρακα μίγμα γλυκερόλης (40 g/L) – γλυκόζης (40 g/L).



**Διάγραμμα 13:** Κινητική εξέλιξη της βιομάζας, της κατανάλωσης γλυκερόλης - γλυκόζης και της παραγωγής λιπιδίων και IPS, συναρτήσε του χρόνου για το στέλεχος *Lipomyces starkeyi* σε μίγμα γλυκόζης-ξυλόζης ως πηγή άνθρακα, σε περιοριστικές σε άζωτο συνθήκες. Συνθήκες καλλιέργειας: ανάπτυξη σε ανακινούμενες φιάλες όγκου 250 mL ( $180 \pm 5$  rpm), θερμοκρασία 30 oC, αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης (GloI) 40 g/L και γλυκόζης (Glu) 40 g/L, αρχικό pH= $6.0 \pm 0.1$ .

Μετά την παραλαβή του ενδοκυτταρικού λίπους από το μικροοργανισμό ακολούθησε η ανάλυση της σύστασης των λιπιδίων σε λιπαρά οξέα με τη βοήθεια του αέριου χρωματογράφου. Η ανάλυση της σύστασης των λιπιδίων σε λιπαρά οξέα πραγματοποιήθηκε επιλεκτικά στα δείγματα που προέκυψαν από τη ζύμωση αυτή. Επιλέχθηκαν δείγματα από την μέση και το τέλος της ζύμωσης. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης από τον αέριο χρωματογράφο φαίνονται στον παρακάτω πίνακα.

**Πίνακας 14:** Σύσταση των λιπιδίων σε λιπαρά οξέα της ζύμης *Lipomyces starkeyi* σε αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης (GloI) 40 g/L και γλυκόζης (Glu) 40 g/L, αρχικό pH= $6.0 \pm 0.1$ .

| Time (h) | Λιπαρά οξέα % (w/w) – Folch |       |       |                  |                       |
|----------|-----------------------------|-------|-------|------------------|-----------------------|
|          | C16:0                       | C16:1 | C18:0 | $\Delta^9$ C18:1 | $\Delta^{9,12}$ C18:2 |
| 96       | 20,1                        | 4,9   | 5,3   | 40,2             | 13,5                  |
| 264      | 31,6                        | 5,5   | 5,8   | 42,6             | 7,1                   |

## 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η παρούσα ερευνητική εργασία είχε ως κύριο σκοπό τη διερεύνηση των δυνατοτήτων του μικροοργανισμού *Lipomyces starkeyi* προκειμένου να παράξει μεταβολικά προϊόντα προστιθέμενης αξίας χρησιμοποιώντας σαν θρεπτικό υλικό σακχαρώδη υποστρώματα. Ο μικροοργανισμός αυτός χαρακτηρίζεται ελαιογόνος και για το λόγο αυτό το άζωτο αποτελούσε το περιοριστικό στοιχείο της αύξησης, με απώτερο σκοπό την συσσώρευση μικροβιακού λίπους. Σε κάθε περίπτωση η αρχική συγκέντρωση της ακάθαρτης γλυκερόλης και των σακχαρούχων υποπροϊόντων (εμπορική γλυκόζη και ξυλόζη) ήταν 80 g/L, ενώ όλες οι ζυμώσεις έλαβαν χώρα σε υψηλούς λόγους C/N που ευνοείται η λιποσυσσώρευση. Πραγματοποιήθηκαν επιπλέον και ζυμώσεις με μίγματα των ανωτέρω σακχάρων σε διάφορες αναλογίες για να παρατηρηθεί πίο εκτεταμένα η συμπεριφορά του μικροοργανισμού σε ποικίλες συνθήκες.

Μετά το πέρας των πειραμάτων έγινε σαφές ότι η συγκεκριμένη ζύμη δύναται να μεταβολίσει με πολύ ικανοποιητικά αποτελέσματα τα σακχαρώδη υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν. Πιο συγκεκριμένα, η ακάθαρτη γλυκερόλη, η εμπορική γλυκόζη και η εμπορική ξυλόζη που αποτέλεσαν το θρεπτικό μέσο του μικροοργανισμού, αφομοιώθηκαν σε κάθε περίπτωση από αυτόν με σταθερό ρυθμό εξάντλησής τους κατά την διάρκεια των πειραμάτων.

Στις περιπτώσεις δε των διαφόρων συνζυμώσεων, τα εκάστοτε διαφορετικά σάκχαρα καταναλώνονταν ταυτόχρονα και με τον ίδιο ρυθμό από τον *Lipomyces starkeyi*. Αυτό καταδεικνύει την ικανότητα του μικροοργανισμού να μεταβολίζει πολλούς τύπους υποστρώματος και μάλιστα σε ποικίλους συνδυασμούς συνθηκών και αναλογιών κάθε φορά, κρίνοντάς τον ένα πολύτιμο έμβιο εργαλείο για τις επιστήμες της μικροβιολογίας και την βιοτεχνολογίας. Από την σχεδόν παράλληλη κατανάλωση των σακχάρων προκύπτει επιπλέον ότι η ζύμη δεν επέδειξε κάποια προτίμηση σε ένα συγκεκριμένο σάκχαρο, αντιθέτως σε κάθε περίπτωση αφομοίωσε αδιακρίτως το θρεπτικό υλικό που χρησιμοποιούνταν.

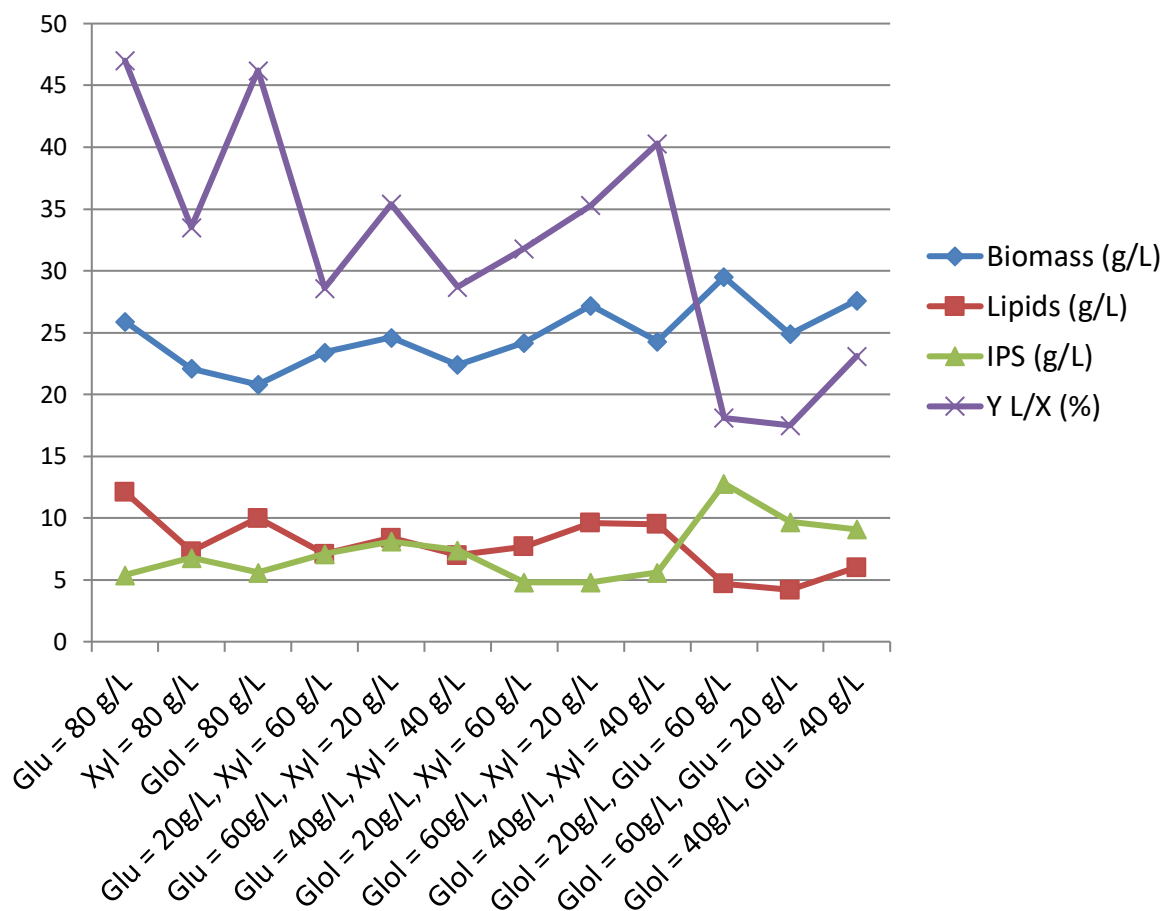
Ένα ακόμη αξιοσημείωτο στοιχείο όσον αφορά την κατανάλωση του θρεπτικού υλικού είναι ο χρόνος στον οποίο αυτή συντελούνταν. Παρατηρήθηκε πως οι μεταβολικές διαδικασίες του μικροοργανισμού ενεργοποιούνταν από τις πρώτες

κιόλας ώρες εμφανίζοντας πολύ μικρό χρόνο αδράνειας και προσαρμογής στο θρεπτικό υλικό. Αυτό είχε σαν αποτέλεσμα την πολύ γρήγορη εκκίνηση αφομοίωσης των σακχάρων και συνεπακολούθως τον σύντομο χρόνο πλήρους εξάντλησής τους, που σε καμία περίπτωση δεν ξεπέρασε τις 312 h, καθιστώντας τις ζυμώσεις βραχύβιες κι παραγωγικές. Όντως, μέσα σε αυτό το χρονικό πλαίσιο ο μικροοργανισμός παρήγαγε κυτταρική μάζα και μεταβολικά προϊόντα σε αξιοσημείωτο βαθμό, με σταθερό γενικά ρυθμό και μάλιστα από τις αρχικές ώρες των ζυμώσεων.

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, πραγματοποιήθηκαν διαφορετικά πειράματα, 12 τον αριθμό, ώστε να επιτευχθεί η όσο το δυνατόν ορθότερη μελέτη της μεταβολικής δράσης της ζύμης σε κάθε συνθήκη. Παρά τη σε γενικά πλαίσια παρόμοια συμπεριφορά του μικροοργανισμού στις προαναφερθείσες ζυμώσεις, σε κάθε περίπτωση εμφανίστηκαν διαφορές.

Οι διαφορές αυτές έγκεινται κατά κύριο λόγο στην μεταβολική δράση του μικροοργανισμού και την παραγωγή των διαφόρων μεταβολικών προϊόντων. Παρακάτω παρουσιάζονται σημαντικές παρατηρήσεις όσον αφορά την ικανότητα σύνθεσης λιπιδίων, ενδοκυτταρικών πολυσακχαριτών και μικροβιακής μάζας, καθώς και στο ποσοστό λιποσυσσώρευσης, για κάθε πείραμα.





**Διάγραμμα 14:** Στο παρόν γράφημα παρουσιάζονται οι μέγιστες τιμές παραγωγής βιομάζας (g/L), λιπιδίων (g/L), ενδοκυτταρικών πολυσακχαριτών IPS (g/L), καθώς και το % ποσοστό λιποσυσσώρευσης YL/X για καθεμία από τις 12 ζυμώσεις που πραγματοποιήθηκαν. Για κάθε ζύμωση αναγράφεται η αρχική συγκέντρωση σακχάρων (g/L).

Στο παραπάνω γράφημα παρουσιάζονται οι μέγιστες τιμές παραγωγής βιομάζας (g/L), λιπιδίων (g/L), ενδοκυτταρικών πολυσακχαριτών IPS (g/L), καθώς και το % ποσοστό λιποσυσσώρευσης για καθεμία από τις 12 ζυμώσεις που πραγματοποιήθηκαν.

Αναλυτικότερα, η μέγιστη τιμή για την κυτταρική αύξηση παρατηρήθηκε όταν χρησιμοποιήθηκε σαν θρεπτικό υλικό μίγμα που αποτελούνταν από 20 g/L γλυκερόλη και 60 g/L γλυκόζη, όπου έφτασε τα 29,5 g/L.

Η βέλτιστη παραγωγή μικροβιακού λίπους επιτεύχθηκε στο θρεπτικό μέσο που αποτελούνταν αποκλειστικά από εμπορική γλυκόζη. Πιο συγκεκριμένα, η σύνθεση

λιπιδίων έφτασε τα 12,1 g/L, με το ποστό λιποσυσσώρευσης για την περίπτωση αυτή YL/X να βρίσκεται στο 47%.

Όσον αφορά τους ενδοκυτταρικούς πολυσακχαρίτες που μελετήθηκαν, η μέγιστη τιμή σύνθεσής τους παρατηρήθηκε όταν χρησιμοποιήθηκε ως θρεπτικό μέσο μίγμα που αποτελούνταν από 20 g/L γλυκερόλη και 60 g/L γλυκόζη, φτάνοντας τα 12,8 g/L.

Κάνοντας λόγο μόνο για τις περιπτώσεις των συνζυμώσεων, όπου χρησιμοποιήθηκαν σε κάθε περίπτωση παραπάνω από ένα σάκχαρα, η μέγιστη τιμή παραγωγής λιπιδίων εμφανίστηκε στο μίγμα 60 g/L γλυκερόλη – 20 g/L ξυλόζη. Μάλιστα, η σύνθεση μικροβιακού λίπους έφτασε τα 9,6 g/L, επιτυγχάνοντας ποσοστό λιποσυσσώρευσης YL/X 40,3%.

Εξετάζοντας τα αποτελέσματα των πειραμάτων που πραγματοποιήθηκαν κι ερμηνεύοντας το Γράφημα IV.1, προκύπτει το συμπέρασμα πως ο μικροοργανισμός επέδειξε προτίμηση ως προς το μεταβολικό προϊόν που παρήγαγε σε άμεση αντήκριση με το θρεπτικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε. Πιο συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε μια πολύ ενδιαφέρουσα τάση της ζύμης να αυξάνει την παραγωγή των ενδοκυτταρικών πολυσακχαριτών σε βάρος του μικροβιακού λίπους όταν σαν θρεπτικό υλικό χρησιμοποιήθηκε μίγμα γλυκερόλης και γλυκόζης. Μάλιστα, το φαινόμενο αυτό αυξημένης σύνθεσης IPS και ταυτόχρονου περιορισμού της λιποσυσσώρευσης εμφανίστηκε σε όλα τα μίγματα γλυκερόλης – γλυκόζης, σε όλες τις αναλογίες που μελετήθηκαν. Η διάκριση αυτή ως προς την παραγωγή μεταβολικών προϊόντων πιθανώς οφείλεται σε διαφορετικό μεταβολικό μονοπάτι που επιλέγεται κατά την ταυτόχρονη κατανάλωση γλυκερόλης και γλυκόζης απο τον *Lipomyces starkeyi*. Η διαφορετική αυτή μεταβολική οδός, προφανώς, ευνοεί την παραγωγή ενδοκυτταρικών ενδοπολυσακχαριτών κι όχι μικροβιακού λίπους, με αποτέλεσμα την συνεπακόλουθη μείωση της παραγωγής του τελευταίου μεταβολικού προϊόντος.

## 5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Angerbauer, C., Siebenhofer, M., Mittelbach, M., Guebitz, G. M., (2008) Conversion of sewage sludge into lipids by *Lipomyces starkeyi* for biodiesel production. *Bioresour. Technol*, 99:3051–3056.

André, A., Diamantopoulou, P., Philippoussis, A., Sarris, D., Komaitis, M., Papanikolaou, S., (2010) Biotechnological conversions of bio-diesel derived waste glycerol into added-value compounds by higher fungi: production of biomass, single cell oil and oxalic acid. *Industrial Crops and Products*, 31:407–416.

André, A., Chatzifragkou, A., Diamantopoulou, P., Sarris, D., Philippoussis, A., Galiotou-Panayotou, M., Komaitis, M., Papanikolaou, S., (2009) Biotechnological conversions of bio-diesel-derived crude glycerol by *Yarrowia lipolytica* strains. *Eng Life Sci*, 9:468-478.

Belitz Hans Dieter, Grosch Werner and Schieberle Peter, (2009) *Food Chemistry* [Book]. - [s.l.] : S pringer-Verlag Berlin Heidelberg,. - 4th Edition. - 978-3-540-69933-0.

Boulton, C., Ratledge, C., (1981) Correlation of lipid accumulation in yeasts with possession of ATP-citrate lyase. *J. Gen. Microbiol*, 127:169–176.

Chatzifragkou, A., Makri, A., Belka ,A., Bellou, S., Mavrou, M., Mastoridou, M., Mystrioti, P., Onjaro, G., Aggelis, G., Papanikolaou, S., (2011a) Biotechnological conversions of biodiesel derived waste glycerol by yeast and fungal species. *Energy*, 36:1097-1108.

Chen, H.C., Chang, C.C., (1996) Production of g-linolenic acid by the fungus *Cunninghamella echinulata* CCRC 31840. *Biotechnol. Prog*, 12: 338–341.

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

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

Fakas, S., Papanikolaou, S., Galiotou-Panayotou, M., Komaitis, M., Aggelis, G., (2009a) Biochemistry and biotechnology of single cell oil, in: Pandey, A., Larroche, C., Soccol, C.R., Dussard, C.G. (Eds.), *New Horizons in Biotechnology*, Asia Tech Publishers Inc., New Delhi (India), pp. 38–60.

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

Folch, J., Lees, M., G., S.S., (1957) A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem*, 199, 833-841.

Galiotou-Panayotou, M., Kalatzi, O., Aggelis, G., (1998) Modelling of simultaneous production of polygalacturonase and exopolysaccharide by *Aureobasidium pullulans* ATHUM 2915. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 73:155–162.

Miller, G.L., (1959) Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Anal Chem*, 31:426-428.

Pagliario Mario and Rossi Michele *Glycerol: Properties and Production [Book Section] // The Future of Glycerol*. - Cambridge : Royal Society of Chemistry, 2010. - 2nd Edition : Vol. No8. - 978-1-84973-046-4/1757-7039.

Papanikolaou, S., Aggelis, G., (2002) Lipid production by *Yarrowia lipolytica* growing on industrial glycerol in a single-stage continuous culture. *Bioresour Technol*, 82: 43-49.

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 Technol*, 21: 83–87.

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

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

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

Papanikolaou, S., 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*, 80: 215–224.

Papanikolaou, S., Aggelis, G., (2002) Lipid production by *Yarrowia lipolytica* growing on industrial glycerol in a single-stage continuous culture. *Bioresour Technol*, 82: 43-49.

- Papanikolaou, S., Galiotou-Panayotou, M., Fakas, S., Komaitis, M., Aggelis, G., (2008a) Citric acid production by *Yarrowia lipolytica* cultivated on olive-mill wastewater-based media. *Bioresour Technol*, 99:2419-2428.
- Papanikolaou, S., Fakas, S., Fick, M., Chevalot, I., et al., (2008b) Biotechnological valorisation of raw glycerol discharged after bio-diesel (fatty acid methyl-esters) manufacturing process: Production of 1,3-propanediol, citric acid and single cell oil. *Biomass Bioenergy*, 32: 60–71.
- 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 Technol*, 21: 83–87.
- Papanikolaou, S., Aggelis G., (2011a) Lipids of oleaginous yeasts. Part I: Biochemistry of single cell oil production. *Eur J Lipid Sci Technol*, 113:1031-1051.
- Papanikolaou, S., Aggelis G., (2011b) Lipids of oleaginous yeasts. Part II: Technology and potential applications. *Eur J Lipid Sci Technol*, 113:1052-1073.
- Peters D., (2007) Raw Materials. *Advances in Biochemical Engineering/ Biotechnology* 105, 1-30.
- Ratledge, C., (2006) Microbial production of  $\gamma$ -Linolenic Acid. In: Akoh (ed) *Handbook of Functional Lipids*. CRC Press Taylor and Francis Group, pp 19-46.
- Ratledge, C., Evans, C.T., (1989) Lipids and their metabolism. In: Rose AH, Harrison JS, editors. *The Yeasts*. Ed 2. London: Academic Press, 3:368–446.
- Ratledge, C., Wynn J.P., (2002) The biochemistry and molecular biology of lipid accumulation in oleaginous microorganisms. *Adv Appl Microbiol*, 51:1-51.
- Ratledge C., Wynn J.P., (1997) The biochemistry and molecular biology of lipid accumulation in oleaginous microorganisms. *Adv Appl Microbiol*, 51:1-5.
- Sarris, D., Galiotou-Panayotou, M., Koutinas, A.A., Komaitis, M., Papanikolaou, S., (2011) Citric acid, biomass and cellular lipid production by *Yarrowia lipolytica* strains cultivated on olive mill wastewater-based media. *J Chem Technol Biotechnol*, 86:1439-1448.
- Sarris, D., Giannakis, M., Philippoussis, A., Komaitis, M., Koutinas, A.A., Papanikolaou, S., (2013) Conversions of olive mill wastewater-based media by *Saccharomyces cerevisiae* through sterile and non-sterile bioprocesses. *J Chem Technol Biotechnol*, 88:958-969.
- Sánchez C., (2009) Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi. *Biotechnology Advances* 27, 185-194.

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

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

Wu S., Hu, C., Zhao X., Zhao Z.B., (2010) Production of lipid from N-acetylglucosamine by *Cryptococcus curvatus*. *Eur J Lipid Sci Technol*, 112:727-733.

Xue F, Miao J, Zhang X, Luo H, Tan T, (2008) Studies on lipid production by *Rhodotorula glutinis* fermentation using monosodium glutamate wastewater as culture medium. *Bioresour Technol* 99:5923–5927.

Xue F, Gao B, Zhu Y, Zhang X, Feng W, Tan T, (2010) Pilot-scale production of microbial lipid using starch wastewater as raw material. *Bioresour Technol* 101:6092–6095.

[Διαδίκτυο, 1] <http://science.agrigate.gr/2015-11-19-11-28-46/>

[Διαδίκτυο, 2] [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Glycerin\\_-\\_Glycerol.svg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Glycerin_-_Glycerol.svg)

[Διαδίκτυο, 3] <http://www.biofuels.gr/biodiesel/conventional-technology-industrial-transesterification-and-esterification/>

[Διαδίκτυο, 4] [https://www.google.gr/search?q=lipomyces+starkeyi&espv=2&biw=1920&bih=911&source=lnms&tbn=isch&sa=X&ved=0ahUKEwiM8u-nhv3NAhXBoRQKHUz8AU0Q\\_AUIBigB#imgrc=g1CBfd17JtL4hM%3A](https://www.google.gr/search?q=lipomyces+starkeyi&espv=2&biw=1920&bih=911&source=lnms&tbn=isch&sa=X&ved=0ahUKEwiM8u-nhv3NAhXBoRQKHUz8AU0Q_AUIBigB#imgrc=g1CBfd17JtL4hM%3A)