



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

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΒΙΟΔΙΕΡΓΑΣΙΕΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΒΙΟΔΙΥΛΙΣΤΗΡΙΑ

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

Βιοτεχνολογική παραγωγή μεταβολικών προϊόντων
προστιθέμενης αξίας κατά την αύξηση στελεχών της ζύμης *Yarrowia*
lipolytica σε υποστρώματα με βάση τη γλυκερόλη

Βασιλική Δ. Διαμαντή

Επιβλέπων Καθηγητής:
Σεραφείμ Παπανικολάου, Καθηγητής ΓΠΑ

Αθήνα, 2022

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

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

Βιοτεχνολογική παραγωγή μεταβολικών προϊόντων προστιθέμενης αξίας κατά τηναύξηση στελεχών της ζύμης *Yarrowia lipolytica* σε υποστρώματα με βάση τη γλυκερόλη

«Biotechnological production of value-added metabolic products when growing strains of the yeast *Yarrowia lipolytica* on substrates based on glycerol»

Βασιλική Δ. Διαμαντή

Εξεταστική Επιτροπή:

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

Απόστολος Κουτίνας, Αναπληρωτής Καθηγητής Γ.Π.Α.

Νικόλαος Στοφόρος, Καθηγητής Γ.Π.Α.

Βιοτεχνολογική παραγωγή μεταβολικών προϊόντων προστιθέμενης αξίας κατά την ανάπτυξη στελεχών της ζύμης *Yarrowia lipolytica* σε υποστρώματα με βάση τη γλυκερόλη

ΠΜΣ: Επεξεργασία, Συντήρηση & Βιοτεχνολογικές Διεργασίες Τροφίμων – Ανάπτυξη Προϊόντων Βιο-Οικονομίας
Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων & Διατροφής του Ανθρώπου
Εργαστήριο: Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων

Περίληψη

Ο σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η διερεύνηση της ικανότητας ανάπτυξης στελεχών της ζύμης *Yarrowia lipolytica* να αποικοδομήσει υποστρώματα που προέρχονται από ανανεώσιμες πρώτες ύλες. Ακριβέστερα, χρησιμοποιήθηκε ακάθαρτη βιομηχανική γλυκερόλη, καθαρότητας 88% κατά βάρος που ήταν παραπροϊόν της βιομηχανικής παραγωγής βιολογικού πετρελαίου (βιοντίζελ - biodiesel). Μελετήθηκε η ικανότητα των στελεχών να μεταβολίζουν το υπόστρωμα προς παραγωγή βιομάζας, δευτερογενών ενδοκυτταρικών μεταβολιτών, καθώς και εξωκυτταρικών μεταβολικών προϊόντων. Οι καλλιέργειες έλαβον χώραν σε διαφορετικές συγκεντρώσεις υποστρώματος και χλωριούχου νατρίου σε σταθερές συνθήκες ανάδευσης και θερμοκρασίας για υψηλό και χαμηλό pH. Χρησιμοποιήθηκαν στελέχη ζυμών του γένους *Yarrowia lipolytica* ACA YC-5030 και NRRL Y-423.

Στην πειραματική διαδικασία πραγματοποιήθηκαν υγρές καλλιέργειες σε αναδευόμενες φιάλες Erlenmeyer (250mL), χρησιμοποιώντας ως πηγή άνθρακα γλυκερόλη, σε διαφορετικές συγκεντρώσεις, με ή χωρίς προσθήκη χλωριούχου νατρίου (29°C, 180rpm). Έγινε προσδιορισμός της βιομάζας με ξήρανση και στη συνέχεια εκχύλιση των λιπιδίων για ποσοτικό προσδιορισμό τους. Επίσης, η παραγωγή ενδοπολυσακχαριτών προσδιορίστηκε με εκχύλιση μέσω υδρολύσεως τους και προσδιορισμό των αναγωγικών σακχάρων με τη μέθοδο DNS. Η παραγωγή πολυολών και η κατανάλωση των σακχάρων προσδιορίστηκε μέσω υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC).

Η παρούσα μελέτη χωρίστηκε σε δυο πειραματικά στάδια. Στο πρώτο στάδιο, τα δύο στελέχη εξετάστηκαν σε συνθήκες περιορισμού σε άζωτο σε υγρές καλλιέργειες με βιομηχανική γλυκερίνη ως υπόστρωμα, συγκέντρωσης 40 g L⁻¹, 80 g L⁻¹ και 120 g L⁻¹ σε σταθερή θερμοκρασία 29°C και τιμές pH 2 & 6. Αξιολογήθηκαν ως προς την ικανότητα τους να καταναλώνουν την γλυκερόλη και να την μετατρέπουν σε βιομάζα, ενδοπολυσακχαρίτες, μικροβιακά λιπίδια και πολυόλες. Διαπιστώθηκε από τις μετρήσεις ότι και τα δυο στελέχη προσαρμόστηκαν στο υπόστρωμα της γλυκερόλης, παράγοντας ικανοποιητικές ποσότητες προϊόντων. Το στέλεχος NRRL Y-423

παρατηρήθηκε ότι παρήγαγε μεγαλύτερες ποσότητες πολυολών. Ειδικότερα, σε συγκέντρωση 120 g L⁻¹, το σύνολο των πολυολών έφτασε τα ~33 g L⁻¹, με παραγωγή μαννιτόλης ~25 g L⁻¹.

Στο δεύτερο στάδιο πραγματοποιήθηκαν ζυμώσεις με τα ίδια στελέχη, σε σταθερή συγκέντρωση γλυκερόλης 40 g L⁻¹, στις ίδιες τιμές θερμοκρασίας και δυο διαφορετικές τιμές pH (2 και 6), με μόνη διαφορά την προσθήκη χλωριούχου νατρίου διαφόρων συγκεντρώσεων (10 g L⁻¹, 30 g L⁻¹, 50 g L⁻¹ και 80 g L⁻¹). Αυτή η προσθήκη οδήγησε στο συμπέρασμα πως η αυξανόμενη συγκέντρωση της προσθήκης NaCl έφερε σαν αποτέλεσμα την μεγαλύτερη παραγωγή ερυθριτόλης αντί μαννιτόλης για το στέλεχος ACA YC -5030.

Επιστημονική περιοχή: Βιοτεχνολογικές Ζυμώσεις

Λέξεις Κλειδιά: Ζύμες, βιομηχανική γλυκερόλη, μαννιτόλη, ερυθριτόλη, αραβιτόλη, πολυόλες.

Biotechnological production of value-added metabolic products when growing strains of the yeast *Yarrowia lipolytica* on substrates based on glycerol

PSP: Food Processing, Preservation & Biotechnological Processes – Bio-Economy Product Development
Department of Food Science & Human Nutrition
Laboratory: Food Microbiology and Biotechnology

Abstract

The aim of this study was to investigate the ability of two strains of the yeast *Yarrowia lipolytica* to consume substrates deriving from renewable raw materials. More precisely, crude - industrial glycerol (purity 88% by weight) was used, which was a by-product of the industrial production of biofuel (biodiesel). The ability of strains to metabolize the substrate and to produce biomass, secondary intra-cellular metabolites, and extra-cellular metabolic products was studied. Cultures were carried out at different initial substrate and sodium chloride concentrations under constant stirring and temperature conditions for two incubation pH values, namely 2.0 and 6.0.

Yarrowia lipolytica strains ACA YC-5030 and NRRL Y-423 were used. In the experimental procedure, submerged cultures were carried out in shake flasks (250mL), using glycerol as a carbon source, at different concentrations, with or without the addition of sodium chloride (29°C, 180rpm). Biomass was determined by drying and then extraction of lipids for their quantitative determination occurred. Also, the production of endopolysaccharides was determined by the biomass digestion and subsequent quantitative determination of the liberated reducing sugars with DNS method. The production of polyols and the consumption of glycerol were determined by high performance liquid chromatography (HPLC).

The present study was divided into two experimental stages. In the first stage, the two strains were examined in nitrogen-limited conditions in liquid cultures with industrial glycerol as substrate, at initial concentration 40 g L⁻¹, 80 g L⁻¹ & 120 g L⁻¹ at a constant temperature of 29 °C and initial pH values 2 & 6. Strains were evaluated for their ability to consume glycerol and convert it into biomass, endopolysaccharides, microbial lipids and polyols. Determinations showed that both strains adapted well to glycerol, producing sufficient amounts of metabolites. NRRL Y-423 strain was observed to produce larger amounts of polyols. In particular, at a concentration of glycerol at 120 g L⁻¹, the total of the polyols reached ~33 g L⁻¹, with a production of mannitol of ~25 g L⁻¹.

In the second stage fermentations were performed with the same strains, at a constant concentration

of glycerol 40 g L^{-1} , at the same temperature and pH values (2 & 6), with the only difference being the addition of sodium chloride of different initial concentrations (10 g L^{-1} , 30 g L^{-1} , 50 g L^{-1} & 80 g L^{-1}). This addition led to the conclusion that the increasing concentration of NaCl addition resulted in higher production of erythritol instead of sum of mannitol and arabitol.

Scientific area Biotechnological Fermentations

Keywords: Doughs, industrial glycerol, mannitol, erythritol, arabitol, polyols.

Ευχαριστίες

Η παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων, του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών.

Θα ήθελα πρωτίστως να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή κύριο Παπανικολάου Σεραφείμ για την ανάθεση της συγκεκριμένης μελέτης, καθώς και για την πολύτιμη βοήθειά του σε όλη τη διάρκεια εκπόνησής της.

Επιπλέον για τον πολύτιμο χρόνο και τις παρατηρήσεις, ευχαριστώ την αξιότιμη εξεταστική επιτροπή, τον καθηγητή Στοφόρο Νικόλαο και τον αναπληρωτή καθηγητή Απόστολο Κουτίνα.

Θερμά ευχαριστώ σε όλο το προσωπικό του εργαστηρίου για τη συνεργασία, τις συμβουλές, τη στήριξη και την καθοδήγησή, όπως και την αμέριστη εμπιστοσύνη στο πρόσωπό μου και τις υπογήφειες διδάκτορες για την ανιδιοτελή τους βοήθεια, όποτε αυτή χρειαζόταν.

Τέλος, ευχαριστώ την οικογένειά μου για τη συνεχή στήριξή της σε όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.

Περιεχόμενα

I. Εισαγωγή.....	20
1. Βιογραφική Ανασκόπηση	23
1.1 Βιοντίζελ.....	24
1.2 Η γλυκερόλη ως υπόστρωμα για την παραγωγή προϊόντων	25
1.3 Ζύμες – Η ζύμη <i>Yarrowia lipolytica</i>.....	27
1.3.1 <i>Yarrowia lipolytica</i>	28
1.3.2 Παραγόμενα μεταβολικά προϊόντα από την ζύμη <i>Yarrowia lipolytica</i>	30
1.3.2.1 Πολυόλες	30
1.3.2.2 Ενδοπολυσακχαρίτες	31
1.3.2.3 Μικροβιακό λίπος.....	31
2. Σκοπός της μελέτης.....	34
3. Υλικά και Μέθοδοι.....	36
3.1 Βιολογικό υλικό	37
3.2 Παρασκευή υγρού εμβολίου	37
3.3 Παρασκευή κυρίως καλλιέργειας	38
3.4 Ανάλυση πειραματικών σταδίων	38
3.4.1 Πρώτο στάδιο (απουσία NaCl).....	39
3.4.2 Δεύτερο στάδιο (παρουσία NaCl)	39
3.5 Χημικές αναλύσεις.....	39
3.5.1 Προσδιορισμός παραγόμενης βιομάζας	40
3.5.2 Προσδιορισμός ενδοκυτταρικού λίπους.....	40
3.5.3 Προσδιορισμός ενδοπολυσακχαριτών (IPS)	40
3.5.4 Προσδιορισμός πολυολών και γλυκερόλης.....	41
4. Αποτελέσματα.....	42
5. Συζήτηση και Συμπεράσματα.....	53
6. Βιβλιογραφία	67

Ι. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Διανύοντας τον 21ο αιώνα, η ανθρωπότητα αντιμετωπίζει το πρόβλημα της διαχείρισης των περιοριζόμενων πόρων και της αύξησης των αναγκών που φέρνει η αύξηση του πληθυσμού. Η σταδιακή μείωση των αποθεμάτων των μη-ανανεώσιμων καυσίμων δημιούργησε την ανάγκη εξερεύνησης εναλλακτικών καυσίμων, ένας τρόπος για να επιτευχτεί αυτό είναι η αξιοποίηση βιομηχανικών ζυμώσεων με χρήση αποβλήτων. Η βιομηχανική ζύμωση είναι η αξιοποίηση μικροοργανισμών για την μετατροπή υγρών ή στερεών υποστρωμάτων προς διαφόρους τύπους προϊόντων. Γενικότερα, οι ζυμώσεις αξιοποιήθηκαν για πρώτη φορά από τον άνθρωπο κατά τη διάρκεια της αγροτικής επανάστασης, καθότι προσέδιδαν μεγαλύτερη ασφάλεια και διατροφική αξία στα προϊόντα του. Παρ' όλον ότι οι ζυμώσεις αποτελούσαν σημαντικό κομμάτι της επεξεργασίας των τροφίμων, το επιστημονικό υπόβαθρο που τις διέπει, αποσαφηνίστηκε πολύ αργότερα, κατά τη διάρκεια της βιομηχανικής επανάστασης, μαζί με πολλές άλλες ανακαλύψεις.

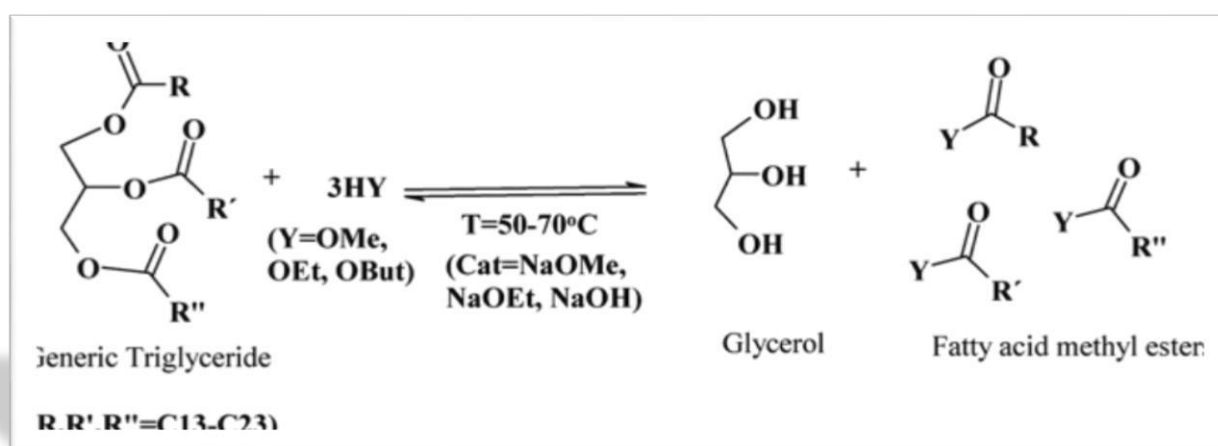
Οι ανησυχίες για την μείωση των επιπέδων των εναπομεινάντων ορυκτών καυσίμων και του περιβαλλοντικού αντίκτυπου της καταναλισκόμενης ενέργειας, κατεύθυναν το παγκόσμιο ενδιαφέρον προς την παραγωγή βιοκαυσίμων. Με τον όρο “βιοκαύσιμα” αναφερόμαστε σε πολλές κατηγορίες καυσίμων. Τα βιοκαύσιμα είναι ανανεώσιμες πηγές ενέργειας και προέρχονται από βιολογικές διεργασίες. Οι διεργασίες αυτές, ολοκληρώνονται σε σχετικά σύντομο χρονικό διάστημα συγκριτικά με τα πιο συμβατικά ορυκτά καύσιμα που χρησιμοποιούμε. Τα ορυκτά καύσιμα προέρχονται από γεωλογικές διεργασίες που έλαβαν χώρα σε προϊστορικούς χρόνους και γι' αυτό πρακτικά θεωρούνται μη ανανεώσιμες πηγές. Θεωρητικά, τα βιοκαύσιμα μπορούν να παραχθούν από οποιασδήποτε μορφής βιομάζα, αλλά κυρίως οι πρώτες ύλες που χρησιμοποιούνται είναι γεωργικά απόβλητα και διάφορες καλλιέργειες. Η παραγωγή τους επίσης μπορεί να γίνει με την χρήση βιομάζας μικροοργανισμών, όπως μύκητες, ζύμες και βακτήρια (Zinoviev *et al.*, 2010). Τέτοια είναι το βιολογικό πετρέλαιο (Biodiesel/βιοντίζελ), η βιοαιθανόλη και το βιοαέριο. Η ευρεία χρήση τους έχει προκύψει από την ανάγκη να βρεθεί κάποιο καύσιμο με στόχο την αντικατάσταση των ορυκτών καυσίμων και τον επιβαρυντικό αντίκτυπο που έχουν στο περιβάλλον. Τα βιοκαύσιμα ταξινομούνται ανάλογα με την πηγή της πρώτης ύλης, τη χρησιμοποιούμενη τεχνολογία, ή τον μικροοργανισμό που συμμετέχει και διαχωρίζονται σε πρώτη, δεύτερη και τρίτη γενιά (Aro, 2016). Τα βιοκαύσιμα είναι ενεργειακά αποδοτικά, βιοαποικοδομήσιμα και μη τοξικά, ενώ οι εκπομπές τους σε ρυπαντές όπως τα οξείδια του θείου είναι πολύ χαμηλές. Επιπλέον, η καύση τους δεν επιβαρύνει την ατμόσφαιρα με διοξείδιο του άνθρακα, αφού το παραγόμενο διοξείδιο καταναλώνεται εκ νέου από τα φυτά κατά τη φωτοσύνθεση. Σημαντικό πλεονέκτημα τέλος, αποτελεί η δυνατότητα φυσικής υποβάθμισης και απορρόφησης των βιοκαυσίμων σε περίπτωση διαρροής (Darvishi *et al.*, 2017). Χαρακτηριστική, είναι η περίπτωση της παραγωγής του βιολογικού πετρελαίου (βιοντίζελ - biodiesel). Το βιοντίζελ θεωρείται ανανεώσιμη πηγή ενέργειας λόγω της ανανεώσιμης προέλευσης των πρώτων υλών που

συμμετέχουν στην παραγωγή του. Η χρήση του παρουσιάζει σημαντικά περιβαλλοντικά και ενεργειακά οφέλη. Κύριο παραπροϊόν της διεργασίας παραγωγής του είναι η γλυκερόλη. Ο όγκος της βιομηχανικής γλυκερόλης αυξάνεται, καθώς αυξάνεται η παραγωγή του βιολογικού πετρελαίου, μειώνοντας το κόστος και μετατρέποντας την σε ένα υπόστρωμα χαμηλού κόστους. Η χρήση της ως υλικό εκκίνησης ζυμώσεων στην Βιοτεχνολογία οδηγεί στην παραγωγή μεταβολικών προϊόντων που μπορούν να αξιοποιηθούν με ποικίλους τρόπους σε φάρμακα, τρόφιμα κλπ. Στην παρούσα εργασία μελετώνται βιοτεχνολογικές διεργασίες σχετιζόμενες με την αξιοποίηση της γλυκερόλης προς παραγωγή χρήσιμων προϊόντων για τη βιομηχανία τροφίμων καθώς και τη χημική και βιοτεχνολογική βιομηχανία, όπως πολυόλες, κυτταρική «ασφαλής» βιομάζα μικροοργανισμών, λιπίδια και ενδοπολυσακχαρίτες. Τεχνολογικές και βιοχημικές προσεγγίσεις σχετικά με τις προτεινόμενες διεργασίες παρουσιάζονται και συζητώνται.

1. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ

1.1 ΒΙΟΝΤΙΖΕΛ (BIODIESEL)

Ως βιοντίζελ, σύμφωνα με την Οδηγία 2003/30/EK του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου, ορίζεται ο μεθυλεστέρας ο οποίος παράγεται από φυτικά ή ζωικά έλαια, ποιότητας ντίζελ, για χρήση ως βιοκαύσιμο (European Union, 2003). Πιο αναλυτικά, για να παραχθεί το βιοντίζελ, απαιτείται μετεστεροποίηση των τριγλυκεριδίων (TAGs) και εστεροποίηση των ελεύθερων λιπαρών οξέων (FFAs) με αλκοόλες μικρού μοριακού βάρους, συνηθέστερα μεθανόλης λόγω της χαμηλής της αξίας και των χημικών της χαρακτηριστικών. Η αντίδραση της μετεστεροποίησης βασίζεται στη χρήση βασικών ή όξινων ομογενών καταλυτών, όπως το υδροξείδιο του καλίου (KOH) και το πυκνό θεικό οξύ (H_2SO_4) αντίστοιχα ή στη χρήση ενζύμων - καταλυτών. Η εστεροποίηση των FFAs αποτελεί στάδιο προεπεξεργασίας και στοχεύει στην αξιοποίηση αυτών και στην απλούστευση της μετεστεροποίησης. Η σύνθεση του βιοντίζελ εμφανίζεται στο κατωτέρω σχήμα (Chatzifragkou *et al.*, 2012).



Σχήμα 1. Τυπική αντίδραση μετεστεροποίησης και παραγωγή βιοντίζελ, με τη γλυκερόλη να συντίθεται ως το κύριο υποπροϊόν της διεργασίας (Chatzifragkou and Papanikolaou, 2012).

Έχει σκοπό να χρησιμοποιείται σε κανονικούς κινητήρες ντίζελ, γι' αυτό διακρίνεται από φυτικά και απόβλητα έλαια που χρησιμοποιούνται ως καύσιμα μόνο σε κινητήρες ντίζελ, οι οποίοι έχουν υποστεί κατάλληλη μετατροπή. Το βιοντίζελ μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως καύσιμο ντίζελ, τόσο μόνο του, όσο και σε μίγματα με το συμβατικό πετρέλαιο κίνησης σε οποιεσδήποτε αναλογίες, καθώς και να χρησιμοποιηθεί ως πετρέλαιο θέρμανσης (Van Gerpen *et al.*, 2004).

Η δυνατότητα του βιοντίζελ να υποκαταστήσει το συμβατικό ντίζελ σε κινητήρες εσωτερικής καύσης είναι γνωστή εδώ και δύο δεκαετίες. Το βιοντίζελ προτάθηκε σαν εναλλακτική λύση ως προς τα σκέτα φυτικά έλαια τα οποία τις περισσότερες φορές παρουσιάζουν χαρακτηριστικά που τα καθιστούν ακατάλληλα για χρήση στους κινητήρες αυτούς. Τα τελευταία 10 χρόνια η παραγωγή

βιοντίζελ έχει σημειώσει ιδιαίτερη ανάπτυξη στην Ευρωπαϊκή Ένωση, που είναι και ο μεγαλύτερος παραγωγός παγκοσμίως και ιδιαίτερα στην Γερμανία.

Τα τρία βασικά απόβλητα που προκύπτουν κατά την παραγωγή βιοντίζελ είναι η γλυκερόλη ή γλυκερίνη, το νερό που παραλαμβάνεται μετά τον καθαρισμό του βιοντίζελ και η μεθανόλη. Η διαχείριση της μεθανόλης είναι απλή, αφού μπορεί εύκολα να ανακτηθεί με μεθόδους απόσταξης και να επαναχρησιμοποιηθεί (Varanda *et al.*, 2011). Το νερό που παραλαμβάνεται μετά τον καθαρισμό του βιοντίζελ ή biodiesel washing wastewater (BBW), που κυμαίνεται μεταξύ 20 και 120 L ανά 100 L βιοντίζελ ανάλογα με τη διεργασία, έχει αλκαλική τιμή pH κοντά στο 9 και υψηλή περιεκτικότητα σε λιπαντικά και λιπαρές ύλες, χαρακτηριστικά που καθιστούν αναγκαία την επεξεργασία του πριν απορριφθεί στο περιβάλλον. Η επεξεργασία αυτή, γίνεται σε δύο στάδια με πληθώρα μεθόδων, όπως βιοχημική ή χημική πήξη. Το τρίτο απόβλητο, η γλυκερόλη, παρουσιάζει και το μεγαλύτερο τεχνολογικό ενδιαφέρον. Η γλυκερόλη ή 1,2,3-προπανοτριόλη, είναι μια οργανική ένωση με 3 άτομα άνθρακα και 3 υδροξύλια, με συντακτικό τύπο HOCH₂-CHOH-CH₂OH. Πρόκειται για μια ένωση άχρωμη, άοσμη, κολλώδη και μη τοξική. Η γλυκερόλη που προκύπτει κατά την παραγωγή βιοντίζελ ονομάζεται ακατέργαστη γλυκερόλη (crude glycerol) και παράγεται από την αντίδραση της μετεστεροποίησης, όπου για 12,6 L βιοντίζελ αναλογεί 1 kg γλυκερόλης (Dobroth *et al.*, 2011). Η ακατέργαστη γλυκερόλη περιέχει υπολείμματα οργανικού διαλύτη, εστέρες ή μεθυλεστέρες λιπαρών οξέων και ελεύθερα λιπαρά οξέα. Αν και τα υπολείμματα αυτά δύνανται να απομακρυνθούν, η εξυγίανση της γλυκερόλης δεν είναι οικονομικά βιώσιμη για τη βιομηχανία (Sabourin-Provost *et al.*, 2009). Έτσι, η παραγόμενη γλυκερόλη προορίζεται για τρεις χρήσεις: την παραγωγή προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας (bioproducts), την παραγωγή ανανεώσιμων πηγών ενέργειας (βιομεθάνιο) και τέλος ως πηγή άνθρακα για καλλιέργειες μικροοργανισμών (Plácido *et al.*, 2016).

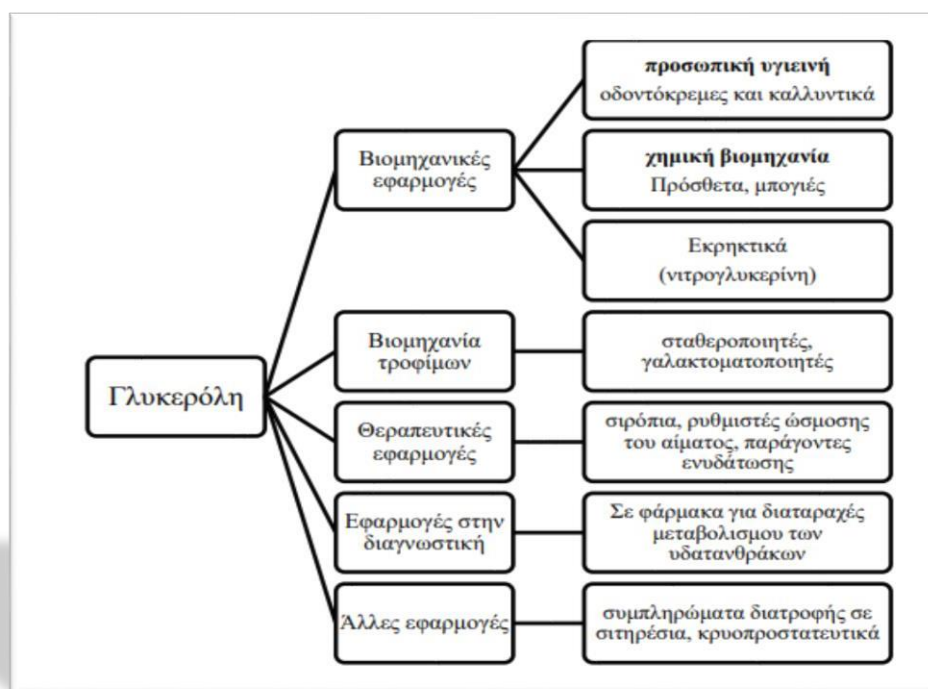
1.2 Η ΓΛΥΚΕΡΟΛΗ ΩΣ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ

Η γλυκερόλη έχει χρησιμοποιηθεί ως υπόστρωμα καλλιιεργειών διαφόρων μικροοργανισμών προς παραγωγή πληθώρας προϊόντων. Τα προϊόντα αυτά είναι βιοκαύσιμα, βιοπολυμερή, πολυόλες, διόλες, οργανικά οξέα, χρωστικές, μονοκυτταρικό λίπος, ένζυμα και γενικότερα ουσίες που έχουν υψηλή προστιθέμενη αξία. Σε υποστρώματα με πηγή άνθρακα τη γλυκερόλη, αναπτύσσονται τόσο βακτήρια, (*Klebsiella*, *Citrobacter*, *Clostridium*, *Lactobacillus* και *Escherichia coli*), όσο μύκητες και ζύμες, (*Yarrowia lipolytica* και *Aspergillus*) (Iyyappan *et al.*, 2018; Westbrook *et al.*, 2019).

Η λεπτομερής λειτουργία του μεταβολισμού της γλυκερόλης ποικίλει μεταξύ κυττάρων και ειδών. Αρχικά, η μεταφορά της γλυκερόλης από το θρεπτικό μέσο στο κύτταρο, γίνεται με παθητική και διευκολυνόμενη διάχυση, αλλά και με ενεργό μεταφορά, ανάλογα το μικροοργανισμό. Γενικά, ο

καταβολισμός της γλυκερόλης στους διάφορους μικροοργανισμούς γίνεται μέσω ποικίλων μεταβολικών μονοπατιών, αερόβια και αναερόβια, όπου η γλυκερόλη μετατρέπεται σε ενδιάμεσα μόρια της γλυκολιτικής οδού. Οι αερόβιοι μικροοργανισμοί χρησιμοποιούν την οδό της φωσφορυλίωσης, όπου η γλυκερόλη πρώτα φωσφορυλιώνεται σε 3-φωσφορική γλυκερόλη (G3P). Σε δεύτερο στάδιο, η 3-φωσφορική γλυκερόλη οξειδώνεται σε φωσφορική διυδροξυακετόνη (DHAP), η οποία με τη σειρά της μετατρέπεται σε πυροσταφυλικό οξύ. Οι μικροαερόφιλοι και αναερόβιοι μικροοργανισμοί δύνανται να ακολουθούν το οξειδωτικό μονοπάτι, όπου η οξείδωση της γλυκερόλης δίνει διυδροξυακετόνη (DHA), η οποία φωσφορυλιώνεται προς DHAP. Υπό συνθήκες χαμηλού οξυγόνου, η οξείδωση της γλυκερόλης συχνά συνδυάζεται με μια αναγωγική οδό, χρησιμοποιώντας τη γλυκερόλη ως τερματικό δέκτη ηλεκτρονίων, παράγοντας με αυτόν τον τρόπο 1,3-προπανοδιόλη ή 3-υδροξυπροπιονικό οξύ (HPA). Οι προαναφερθέντες οδοί είναι δυνατό να συναντώνται με διάφορες παραλλαγές και τροποποιήσεις μεταξύ των μικροοργανισμών. Αξιοσημείωτο είναι πως υπάρχουν μικροοργανισμοί που χρησιμοποιούν περισσότερα του ενός μονοπάτια, τα οποία παρόλα αυτά αποσκοπούν στην επαρκή αφομοίωση της γλυκερόλης (Lages *et al.*, 1997; Russmayer *et al.*, 2019).

Στη βιομηχανία η γλυκερόλη προέρχεται από τρεις κύριες επεξεργασίες: α) την υδρόλυση, β) την σαπωνοποίηση και γ) την μετεστεροποίηση των λιπαρών οξέων (Monteiro *et al.*, 2018). Ο κύριος όγκος της γλυκερόλης προκύπτει από την μετεστεροποίηση των τριγλυκερολών με σκοπό την παραγωγή βιολογικού πετρελαίου.



Σχήμα 2. Εφαρμογές της καθαρής γλυκερόλης (Monteiro *et al.*, 2018).

1.3 ΖΥΜΕΣ – Η ΖΥΜΗ *YARROWIA LIPOLYTICA*

Οι κύριες ομάδες μικροοργανισμών που αξιοποιούνται από τον άνθρωπο για τις ζυμωτικές τους ικανότητες είναι τα βακτήρια, οι μύκητες και οι ζύμες. Οι ζύμες, που ανήκουν στο βασίλειο των μυκήτων, είναι μικροοργανισμοί με υψηλή τεχνολογική αξία και μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε πληθώρα εφαρμογών. Αυτή η μεγάλη, ποικιλόμορφη ομάδα ευκαρυωτικών, ετερότροφων μικροοργανισμών προσφέρει μέσω του μεταβολισμού της πλήθος προϊόντων, που εξυπηρετούν διάφορους τομείς της ανθρώπινης δραστηριότητας. Οι ζύμες είναι υπεύθυνες για την παραγωγή πολλών τροφίμων και προϊόντων διατροφής, όπως το ψωμί, τα αλκοολούχα ποτά και αμέτρητα άλλα παραδοσιακά προϊόντα ανά τον κόσμο (η σάλτσα σόγιας, το τσάι kombucha, κλπ). Επιπλέον, οι ζύμες ευθύνονται για την παραγωγή διαφόρων βιοδραστικών ουσιών που χρησιμοποιούνται στη φαρμακοβιομηχανία, όπως ένζυμα και οργανικά οξέα, ενώ συνεχείς μελέτες πραγματοποιούνται για τον έλεγχο των παραγόμενων δευτερογενών μεταβολιτών τους, που παρουσιάζουν κολοσσιαίο τεχνολογικό ενδιαφέρον.

Το σημαντικότερό τους πλεονέκτημα είναι πως έχουν την ικανότητα να μεταβολίζουν μεγάλη ποικιλία υποστρωμάτων και να αναπτύσσονται ικανοποιητικά υπό μη ευνοϊκές συνθήκες, όπως χαμηλές τιμές pH ή υψηλή αλατότητα, παράγοντας ταυτόχρονα σημαντικές ποσότητες βιομάζας και προϊόντων. Το γεγονός ότι οι ζυμώσεις είναι άρρηκτα συνδεδεμένες με την γεωργία και την κτηνοτροφία σχετίζεται με τα οφέλη που προκύπτουν από τα ζυμωμένα προϊόντα. Σαν αποτέλεσμα, περιορίζεται η ανάπτυξη μικροοργανισμών και αυξάνεται ο χρόνος ζωής και η ασφάλεια των τροφίμων. Τέλος, με την ζύμωση, βελτιώνεται η διατροφική αξία και οι οργανοληπτικές ιδιότητες των τροφίμων. Παρόλο που οι ζυμώσεις και τα προϊόντα τους αποτελούσαν κομμάτι της καθημερινότητας για χιλιάδες χρόνια, η γνώση γύρω από τα αίτια που τις προκαλούν παρέμεναν για πολλά χρόνια σχετικά έως και εντελώς άγνωστα. Οι πρώτες ανακαλύψεις για την λειτουργία των ζυμώσεων χρονολογούνται από την εποχή της βιομηχανικής επανάστασης στην Ευρώπη. Ταυτόσημη με την βιομηχανική επανάσταση, είναι η μεγέθυνση της αστικοποίησης και η ανάγκη μαζικής παραγωγής τροφίμων (Chambers *et al.*, 2010).

Επί του παρόντος, οι ζύμες χρησιμοποιούνται σε πολλές βιομηχανικές διεργασίες. Πιο συγκεκριμένα, στην παραγωγή αλκοολούχων ποτών, βιομάζας, τροφίμων, ζωοτροφών, ενώ σε πολλές περιπτώσεις χρησιμοποιούνται ως «κυτταρικά εργοστάσια» σχετικά με την παραγωγή διαφόρων μεταβολικών προϊόντων. Στα μεταβολικά προϊόντα περιλαμβάνονται ένζυμα, βιταμίνες, πολυσακχαρίτες, καροτενοειδή, πολυόλες, λιπίδια, γλυκολιπίδια, κιτρικό οξύ, αιθανόλη, διοξείδιο του άνθρακα και ενώσεις που συντίθενται με την εισαγωγή του ανασυνδυσμένου DNA σε ζυμομύκητες. Κάποια από αυτά τα προϊόντα παράγονται εμπορικά, ενώ άλλα είναι δυνητικά πολύτιμα στον τομέα της

Βιοτεχνολογίας. Ορισμένες από τις παρούσες και πιθανές χρήσεις των ζυμών στις βιομηχανίες τροφίμων, ποτών και άλλων βιομηχανιών ζύμωσης παρατίθενται στον πίνακα 1 (Demain *et al.*, 1998).

Πίνακας 1. Ορισμένες χρήσεις ζυμών στις βιομηχανίες τροφίμων, ποτών και ζύμωσης (Demain *et al.*, 1998)

Εφαρμογή	Στέλεχος Ζύμης
Ζύμωση μπύρας τύπου “ale”	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Διόγκωση ψωμιών και ζυμών (προζύμι)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Saccharomyces exiguus</i>
D – Αραβιτόλη (γλυκαντική ουσία)	<i>Candida diddensiae</i>
Γαλακτωματοποιητές	<i>Candida lipolytica</i>
Ζύμωση αιθανόλης	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Ιχθυοτροφές και πτηνοτροφές (ασταξανθίνη)	<i>Phaffia rhodozyma</i>
Ζωοτροφές και μονοκυτταρική πρωτεΐνη	<i>Candida utilis</i>
Ζύμωση λακτόζης και γάλακτος	<i>Candida pseudotropicalis</i> , <i>Kluyveromyces fragilis</i>
Ζύμωση μπύρας τύπου “lager”	<i>Saccharomyces carlsbergensis</i>
Μαννιτόλη (ενυδατική ουσία)	<i>Torulopsis mannitofaciens</i>
Σάλτσα και πάστα σόγιας	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>
Ζύμωση κρασιού	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Ξυλιτόλη (γλυκαντική ουσία)	<i>Torulopsis candida</i> ”
Ζύμωση D – Ξυλόζης	<i>Candida shehataae</i> , <i>Pichia stiritis</i> , <i>Pichia segobiensis</i>
Παρασκευή κεφίρ	<i>Saccharomyces kefir</i>
Λαχανικά	<i>Guehomyces</i>
Ωρίμανση ροκφόρ	<i>Penicillium roqueforti</i>

1.3.1 YARROWIA LIPOLYTICA

Η ζύμη *Yarrowia lipolytica* ανήκει στο γένος *Ascomycota*, της οικογένειας *Dipodascaceae* του βασιλείου των μυκήτων. Η ζύμη αναγνωριζόταν αρχικά ως *Candida*, *Endomycopsis* ή *Saccharomycopsis lipolytica*. Η ονομασία *Yarrowia* σχετίζεται με τον David Yarrow, ο οποίος αναγνώρισε το γένος. Ο χαρακτηρισμός “*lipolytica*” προκύπτει από την ικανότητα του μικροοργανισμού να παράγει λιπάσες, που υδρολύουν τα λίπη.

Είναι μια «μη συμβατική ζύμη», λόγω της δομής του γονιδιώματός της, της φυλογενετικής της απόσταση σε σχέση με άλλες ζύμες κ.ά. Η ζύμη αυτή ανήκει στους ετεροθαλούς μύκητες και χαρακτηρίζεται μορφολογικά από το διμορφισμό, δύναται δηλαδή να υπάρχει είτε υπό μονοκύτταρη μορφή είτε υπό τη μορφή ψευδοϋφών, ιδιότητα που επηρεάζεται από τις συνθήκες ανάπτυξης και το γονότυπο (Barth *et al.*, 1996). Η ζύμη *Yarrowia lipolytica* είναι ευρέως διαδεδομένη στη φύση και

απομονώνεται συνήθως από περιβάλλοντα με υψηλή περιεκτικότητα σε λίπος, όπως γαλακτοκομικά προϊόντα.

Πρόκειται για μια ζύμη αυστηρά αερόβια, που απαιτεί καλό αερισμό για την ανάπτυξή της. Η βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης είναι 25-30°C, αναπτύσσεται όμως και σε θερμοκρασίες ψύξης, ενώ δεν δύναται να αναπτυχθεί άνω των 34°C (Fickers *et al.*, 2005). Η ζύμη *Yarrowia lipolytica* αναπτύσσεται σε ένα ευρύ φάσμα τιμών pH μεταξύ 2,5 και 7,5 (Egermeier *et al.*, 2017). Ο μικροοργανισμός μπορεί να καταβολίσει υδρόφιλα υποστρώματα, όπως γλυκόζη, φρουκτόζη, αιθανόλη, πολυόλες και υδρόφοβα υποστρώματα, όπως αλκάνια, αλκένια και λιπαρά οξέα. Σημαντική είναι η ικανότητα της ζύμης να μεταβολίζει ακατέργαστη γλυκερόλη, υπόστρωμα που όπως αναφέρθηκε προκύπτει από την παραγωγή του βιοντίζελ και έχει εξαιρετικά χαμηλό κόστος.

Τα στελέχη του γένους δεν θεωρούνται παθογόνα (Holzschu *et al.*, 1979) και έχει ταξινομηθεί ως ασφαλές από την Αμερικανική Παραγωγή Τροφίμων και Φαρμάκων (FDA) για την παραγωγή κιτρικού οξέος (Fickers *et al.*, 2005). Προκαλεί σπάνιες ευκαιριακές μολύνσεις σε σοβαρά ανοσοκατασταλμένους ή άλλους σοβαρά ασθενείς με άλλες υποκείμενες ασθένειες ή καταστάσεις. Οι μολύνσεις μπορούν να αντιμετωπιστούν αποτελεσματικά με τη χρήση τακτικών αντιμυκητιακών φαρμάκων και σε μερικές περιπτώσεις εξαφανίστηκαν χωρίς φάρμακα. Καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για έναν «ασφαλή στη χρήση» μικροοργανισμό (Groenewald *et al.*, 2014).

Αρκετές πηγές άνθρακα και ενέργειας έχουν χρησιμοποιηθεί με επιτυχία για την καλλιέργεια της ζύμης *Yarrowia lipolytica* μεταξύ των οποίων η γλυκερόλη, η γλυκόζη, διάφορα σάκχαρα, ζωικά λίπη, φυτικά έλαια, ελαιοκράμβη και τα υγρά απόβλητα ελαιοτριβείου (André *et al.*, 2009, 2010; Beopoulos *et al.*, 2009; Chatzifragkou *et al.*, 2011; Kamzolova *et al.*, 2013; Makri *et al.*, 2010; Papanikolaou & Aggelis, 2009; Papanikolaou *et al.*, 2002, 2009; Sarris *et al.*, 2011).

Επιπλέον, η ζύμη *Yarrowia lipolytica* είναι ικανή να παράγει προϊόντα υψηλής προστιθέμενης αξίας, όπως για παράδειγμα λιπαρές ύλες ειδικής δομής και σύστασης και συγκεκριμένα υποκατάστατα του λίπους του κακάο (Papanikolaou *et al.*, 2001), αλλά και οργανικά οξέα όπως το κιτρικό και το ακετογλουταρικό οξύ (Yin *et al.*, 2012), προϊόντα με ευρύτατη εφαρμογή στη βιομηχανία τροφίμων.

Θεωρείται κατάλληλη για πολλαπλές βιομηχανικές εφαρμογές όπως οι ακόλουθες:

- (i) ως πηγή πρωτεΐνης υψηλής ποιότητας για ζωοτροφή

- (ii) ως βιοτεχνολογικός παραγωγός για πολλά οργανικά οξέα (π.χ. κιτρικό οξύ, α-κετογλουταρικό οξύ, κλπ) ή υδρόφοβες ουσίες υψηλής αξίας, όπως εξωτικά λιπίδια ή καροτενοειδή
- (iii) ως παραγωγός φαρμακευτικών προϊόντων και βιομηχανικών πρωτεϊνών και ενζύμων
- (iv) για τη μαζική παραγωγή βιοκαυσίμων.

1.3.2 ΠΑΡΑΓΟΜΕΝΑ ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΑ ΠΡΟΪΟΝΤΑ ΑΠΟ ΤΗΝ ΖΥΜΗ *YARROWIA LIPOLYTICA*

1.3.2.1 ΠΟΛΥΟΛΕΣ

Οι πολυόλες είναι οργανικές ενώσεις που περιέχουν πολλαπλά υδροξύλια. Είναι προϊόντα που παράγονται με υδρογόνωση της ελεύθερης αλδεϋδο-ομάδας ή κετονομάδας των αναγωγικών σακχάρων, παράγοντας μία αλκοόλη. Ένα μόριο με περισσότερες από δύο ομάδες υδροξυλίου είναι μια πολυόλη. Οι πολυόλες φέρουν το γενικό τύπο $(\text{CHOH})_n\text{H}_2$ με $n=4-6$. Κατά σύμβαση, οι πολυόλες δεν αναφέρονται σε ενώσεις που περιέχουν άλλες λειτουργικές ομάδες. Χρησιμοποιούνται κυρίως ως γλυκαντικά σε διάφορα τρόφιμα, λόγω της χαμηλής τους θερμιδικής αξίας, ενώ συνήθως συνδυάζονται με ισχυρότερα γλυκαντικά για ενίσχυση της γλυκύτητάς τους.

Η ζύμη *Yarrowia lipolytica* παράγει 3 πολυόλες, την ερυθριτόλη, την αραβιτόλη και τη μαννιτόλη, των οποίων το βιοσυνθετικό τους μονοπάτι δεν έχει αποσαφηνιστεί ακόμα.

Η ερυθριτόλη είναι μία πολυόλη με 4 άτομα άνθρακα και 4 υδροξύλια, με μοριακό τύπο $\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}_4$, η οποία σε μεγάλο ποσοστό δεν μεταβολίζεται από το ανθρώπινο σώμα και εκκρίνεται αυτούσια στα ούρα χωρίς να αλλάζει τα επίπεδα γλυκόζης και ινσουλίνης στο αίμα.

Η μαννιτόλη είναι πολυόλη με 6 άτομα άνθρακα και 6 υδροξύλια και μοριακό τύπο $\text{C}_6\text{H}_{14}\text{O}_6$. Χρησιμοποιείται τόσο ως προσθετική γλυκαντική ύλη στα τρόφιμα, όσο και ως δραστική ουσία σε φάρμακα.

Η αραβιτόλη αποτελείται από 5 άτομα άνθρακα και 5 υδροξύλια, με μοριακό τύπο $\text{C}_5\text{H}_{12}\text{O}_5$ και συναντάται ως D-αραβιτόλη και L-αραβιτόλη, που αποτελούν εναντιομερή. Η L-αραβιτόλη έχει αποδειχθεί ότι είναι σε θέση να μειώσει σημαντικά τον λιπώδη ιστό στο σώμα και να αποτρέψει την εναπόθεση λίπους στο πεπτικό σύστημα (Jiang *et al.*, 2011). Η D-αραβιτόλη μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως υπόστρωμα για μερικά χημικά προϊόντα, π.χ. αραβινικά και ξυλονικά οξέα,

ξυλιτόλη, εναντιομερείς ενώσεις, ανοσοκατασταλτικά γλυκολιπίδια και ζιζανιοκτόνα (Koganti *et al.*, 2011; Yoshikawa *et al.*, 2014).

1.3.2.2 ΕΝΔΟΠΟΛΥΣΑΚΧΑΡΙΤΕΣ

Οι πολυσακχαρίτες είναι πολυμερή μονοσακχαριτών, που συνδέονται με γλυκοζιτικούς δεσμούς. Ο μοριακός τους τύπος είναι $(C_6H_{10}O_5)_n$, με $40 \leq n \leq 3000$ (Birch, 1997). Οι πολυσακχαρίτες χρησιμοποιούνται τόσο από τη βιομηχανία τροφίμων, συνήθως ως σταθεροποιητές ή πηκτικές ύλες, όσο και από τη βιομηχανία φαρμάκων, όπως σε σιρόπια κατά του στομαχικού πόνου. Οι ευεργετικές ιδιότητες των πολυσακχαριτών στην ιατρική βρίσκονται υπό συνεχή έρευνα. Μελέτες δείχνουν πως μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην καταπολέμηση ασθενειών, όπως ο διαβήτης και η νόσος Alzheimer, καθώς και ως συστατικά διαφόρων εμβολίων, όπως αυτό κατά του τυφοειδή πυρετού (Liu *et al.*, 2017; Ni *et al.*, 2017; Zheng *et al.*, 2019).

Οι ενδοπολυσακχαρίτες αποτελούν ενώσεις που παράγονται και παραμένουν στο εσωτερικό του κυττάρου και χρησιμοποιούνται από τους μικροοργανισμούς ως αποθησαυριστικά μόρια. Συγκεκριμένα, όταν το άζωτο στο μέσο καλλιέργειας περιορισθεί, τα μικροβιακά κύτταρα συνεχίζουν να αφομοιώνουν την πηγή άνθρακα μετατρέποντάς την σε λιπίδια αποθήκευσης ή εναλλακτικά σε πολυσακχαρίτες (Diamantopoulou *et al.*, 2012; Diamantopoulou *et al.*, 2014). Οι ρυθμιστικοί μηχανισμοί που εμπλέκονται στη ροή του άνθρακα προς τη βιοσύνθεση λιπιδίων ή πολυσακχαριτών δεν είναι πλήρως κατανοητές (Papanikolaou *et al.*, 2011).

Η σύνθεση των ενδοπολυσακχαριτών στη ζύμη *Yarrowia lipolytica* συμβαίνει παράλληλα με τη σύνθεση των λιπιδίων για χαμηλές συγκεντρώσεις των τελευταίων, ενώ όταν η συγκέντρωσή τους πλησιάζει στη μέγιστη τιμή η κατανάλωση του άνθρακα αποδίδει μόνο λιπαρά οξέα. Υπό συνθήκες στρες, η ζύμη εμφανίζει πρόθεση κατανάλωσης κυρίως ως προς το αποθηκευμένο λίπος και δευτερευόντως τους ενδοπολυσακχαρίτες (Dourou *et al.*, 2017).

1.3.2.3 ΜΙΚΡΟΒΙΟΚΟ ΛΙΠΟΣ

Ελαιογόνοι χαρακτηρίζονται οι μικροοργανισμοί που μπορούν να συσσωρεύουν ενδοκυτταρικά μεγάλες ποσότητες λιπιδίων, δηλαδή >20% w/w ξηρής βιομάζας (Papanikolaou *et al.*, 2011). Η ζύμη *Yarrowia lipolytica* είναι ικανή να συσσωρεύει ενδοκυτταρικά λιπίδια δημιουργώντας λιποσώματα, γεγονός που την κατατάσσει στους ελαιογόνους μικροοργανισμούς, και μάλιστα

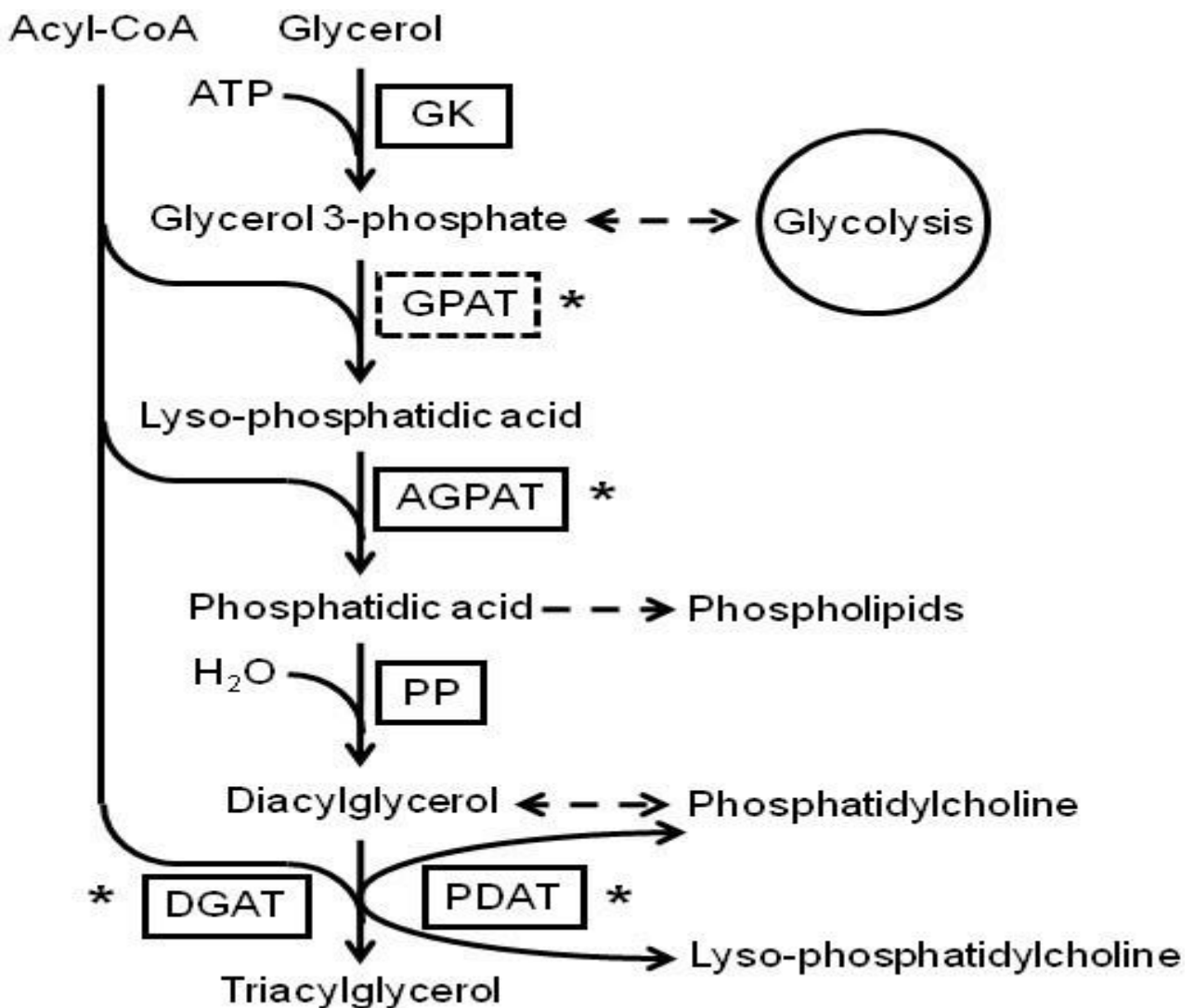
χρησιμοποιείται ως μικροοργανισμός-μοντέλο για τη μελέτη της ικανότητας αυτής (Beopoulos *et al.*, 2009).

Η σύνθεση των λιπιδίων *de novo* απαιτεί συγχρονισμό ποικίλων βιοχημικών διεργασιών, που αποσκοπούν στην παραγωγή τριγλυκεριδίων (TAGs) από την εκάστοτε πηγή άνθρακα που χρησιμοποιείται. Η παραγωγή λιπιδίων *de novo* ξεκινά όταν η ποσότητα του αζώτου στο θρεπτικό μέσο της καλλιέργειας είναι σε χαμηλά επίπεδα. Πιο συγκεκριμένα, όταν τα κύτταρα έχουν πρόσβαση σε μεγάλες ποσότητες αζώτου, αυξάνεται η ζήτηση σε ATP λόγω της πρωτεϊνοσύνθεσης και της αντιγραφής του DNA, με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του κύκλου των τρικαρβοξυλικών οξέων (TCA cycle) και την οξειδωση του περισσότερου ακετύλο-CoA. Έτσι όταν το άζωτο στην καλλιέργεια περιορισθεί, μειώνονται τα επίπεδα AMP εντός του κυττάρου λόγω της δράσης του ενζύμου AMP απαμινάση 1 (AMPD1), με αποτέλεσμα τη μείωση της δραστηριότητας του ενζύμου ισοκιτρική αφυδρογονάση (ICDH) που οδηγεί σε συσσώρευση ισοκιτρικού οξέος εντός των μιτοχονδρίων, το οποίο εξισορροπείται προς κιτρικό οξύ από τη δράση του ενζύμου ακοτινάση (Botham & Ratledge, 1979). Στη συνέχεια η περίσσεια κιτρικού οξέος μεταφέρεται εκτός των μιτοχονδρίων όπου διασπάται με τη βοήθεια του ενζύμου ATP- κιτρική λύαση (ACL) σε ακετύλο-CoA και οξαλοξικό οξύ (Lazar *et al.*, 2018). Το παραπάνω μονοπάτι είναι και αυτό που διαχωρίζει τους ελαιογόνους από τους μη ελαιογόνους μικροοργανισμούς, επιτρέποντάς τους να παράγουν σε μεγάλες ποσότητες ακετύλο-CoA, που αποτελεί τη δομική μονάδα των λιπαρών οξέων (Papanikolaou *et al.*, 2011).

Μόλις σχηματιστεί το ακετύλο-CoA στο κυτταρόπλασμα, μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως δομικός λίθος για την σύνθεση των λιπαρών οξέων (FAs). Η επιμήκυνση των FAs ξεκινά με τη δράση του ενζύμου καρβοξυλάση του ακετύλο-CoA (ACC), που καταλύει τη μετατροπή του ακετύλο-CoA σε μαλόνυλο-CoA, αντίδραση καθοριστική για τη βιοσύνθεση των FAs, αφού είναι μη αντιστρεπτή. Στη συνέχεια τα ένζυμα ακυλο-μεταφοράσες μεταφέρουν ακετυλο- και μηλονυλο- ομάδες σε μια πρωτεΐνη-φορέα ακυλίων (ACP), ενώ το σύμπλοκο της συνθετάσης των λιπαρών οξέων (FAS1 και FAS2) δρα στη μηλονυλο-ACP, μέχρι το μήκος της αλειφατικής αλυσίδας να φτάσει τα 16 άτομα άνθρακα. Ακολούθως η C16 μαλονυλο-ACP μεταφέρεται στο ενδοπλασματικό δίκτυο, όπου επιμηκύνεται και πραγματοποιείται ο αποκορεσμός της. Η αποκορεσμάση OLE1 του ενδοπλασματικού δικτύου παράγει παλμιτελαϊκό (C16:1) και ελαϊκό οξύ (C18:1), ενώ η αποκορεσμάση FAD2 παράγει λινελαϊκό οξύ (C18:2).

Για το σχηματισμό τριγλυκεριδίων (TAGs) απαιτείται η συμπύκνωση τριών FAs με ένα μόριο τριφωσφορικής γλυκερόλης (G3P) μέσω του μονοπατιού Kennedy. Το πρώτο βήμα για την

σύνθεση TAG είναι η συμπύκνωση της G3P με ένα ακυλο-CoA προς σχηματισμό λυσοφωσφατιδίου (LPA). Η αντίδραση αυτή καταλύεται από το ένζυμο G3P-φωσφορική-ακυλο-τρανσφεράση (GPAT). Στη συνέχεια το LPA υπόκειται σε περαιτέρω συμπύκνωση προς σχηματισμό φωσφατιδικού οξέος (PA). Το PA αποφωσφορυλιώνεται από την PA φωσφατάση (PAP) και σχηματίζεται διγλυκερίδιο (DAG) (Courchesne *et al.*, 2009). Τέλος τα TAGs συντίθενται είτε με τη βοήθεια της DAG ακυλο-τρανσφεράσης που χρησιμοποιεί ακυλο-CoA ως τελικό δότη ακυλο-ομάδας, είτε με τη βοήθεια της DAG φωσφολιπιδικής ακυλο-τρανσφεράσης που χρησιμοποιεί γλυκεροφωσφολιπίδια ως δότη ακυλο-ομάδας (Lazar *et al.*, 2018).



Σχήμα 3. Η βιοσύνθεση των τριγλυκεριδίων (Hamid Rismani-Yazdi *et al.*, 2011).

2. ΣΚΟΠΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Ο σκοπός της παρούσας μελέτης είναι να διερευνηθεί η ικανότητα στελεχών της ζύμης *Yarrowia lipolytica* να αναπτύσσονται σε υπόστρωμα με πηγή άνθρακα τη γλυκερόλη και να παράγουν προϊόντα βιοτεχνολογικής αξίας. Η γλυκερόλη, ένα σχεδόν μηδαμινού κόστους παραπροϊόν της βιομηχανίας βιοντίζελ, αποτελεί πολλά υποσχόμενο υπόστρωμα, αφού ο καταβολισμός της από την στελέχη της προαναφερθείσας ζύμης έχει αποδώσει σημαντικές ποσότητες μεταβολιτών.

Στα πλαίσια της εργασίας μελετήθηκε η ικανότητα στελεχών της ζύμης να αναπτύσσονται σε συνθήκες στρες, όπως χαμηλή τιμή pH και ανταγωνιστικό περιβάλλον σε συνάρτηση με την ικανότητά τους να παράγουν προϊόντα, όπως πολυόλες και άλλους μεταβολίτες, καθώς και ενδοκυτταρικό λίπος και ενδοπολυσακχαρίτες. Κατά τη μελέτη αυτή διεξήχθησαν πειράματα σε αναδευόμενες κωνικές φιάλες, εξετάζοντας την αύξηση δυο άγριων στελεχών της ζύμης *Yarrowia lipolytica* σε υπόστρωμα γλυκερόλης για διαφορετικές τιμές pH και διαφορετικές αρχικές συγκεντρώσεις υποστρώματος ώστε να μελετηθεί η παραγωγή βιομάζας, μικροβιακών λιπιδίων και ενδοπολυσακχαριτών. Πιο συγκεκριμένα μελετήθηκε η κατανάλωση του υποστρώματος, η παραγωγή «ασφαλούς» μικροβιακής μάζας, ενδοπολυσακχαριτών, λιπιδίων καθώς και εξωκυτταρικών πολυολών. Βιοχημικές, τεχνολογικές και κινητικές προσεγγίσεις σε σχέση με την πολύ ενδιαφέρουσα από οικονομικής και οικολογικής πλευράς βιοδιεργασία αξιοποίησης της γλυκερόλης προς την παραγωγή των ειρημένων προϊόντων αναπτύχθηκαν, αναλύθηκαν και συζητήθηκαν.

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Κατά την έναρξη κάθε νέου πειράματος ακολουθούνται οι εξής διαδικασίες:

- (i) Ανανέωση του μικροοργανισμού που πρόκειται να χρησιμοποιηθεί στο εκάστοτε πείραμα και διατήρησή του
- (ii) Παρασκευή προκαλλιέργειας και εμβολιασμός της
- (iii) Παρασκευή κύριας καλλιέργειας και εμβολιασμός της
- (iv) Χημικές Αναλύσεις.

3.1 ΒΙΟΛΟΓΙΚΟ ΥΛΙΚΟ

Χρησιμοποιήθηκαν 2 στελέχη της ζύμης *Yarrowia lipolytica*, τα οποία είναι τα εξής:

- (i) *Yarrowia lipolytica* ACA-YC 5030
- (ii) *Yarrowia lipolytica* NRRL Y-423

Το πρώτο στέλεχος απομονώθηκε από τυρί και ταυτοποιήθηκε από το Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών (Paramithiotis *et al.*, 2000). Ενώ αντίστοιχα το δεύτερο στέλεχος είναι από την συλλογή NRRL (Agricultural Research Service Culture Collection, Illinois).

Τα στελέχη ανανεώνονται σε δοκιμαστικούς σωλήνες (slants) με στερεό θρεπτικό υπόστρωμα με σύσταση 10 g L⁻¹ γλυκόζη, 10 g L⁻¹ πεπτόνη, 10 g L⁻¹ yeast extract και 20 g L⁻¹ άγαρ και στην συνέχεια επωάζονται στους 30°C για 3 μέρες. Έπειτα, αποθηκεύονται και συντηρούνται υπό ψύξη στους 4°C. Τα slants ανανεώνονται κάθε 3-4 εβδομάδες, για να εξασφαλισθεί η ζωτικότητα των ζυμών, ενώ πριν από κάθε χρήση τα στελέχη επιστρώνονταν σε τρυβλία Petri με στερεό θρεπτικό υπόστρωμα ίδιας σύστασης με των slants και επωάζονταν για 24h στους 30°C, ώστε πριν τον εμβολιασμό της υγρής καλλιέργειας να βρίσκονται στην εκθετική φάση ανάπτυξης.

3.2 ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΥΓΡΟΥ ΕΜΒΟΛΙΟΥ

Για την παρασκευή υγρού εμβολίου οι ζύμες επωάζονταν σε υγρές προκαλλιέργειες μέσα σε κωνικές φιάλες Erlenmeyer των 250 mL, συμπληρωμένες στο 1/5 του όγκου τους (50±1 mL). Το θρεπτικό μέσο που χρησιμοποιείται είναι σύστασης: 10 g L⁻¹ γλυκόζη, 10 g L⁻¹ πεπτόνη και 10 g L⁻¹ yeast extract. Έπειτα από αποστείρωση του μέσου στους 121°C για 20 λεπτά, οι φιάλες εμβολιάζονταν ασηπτικά με κύτταρα των στελεχών που προέρχονταν από στερεές καλλιέργειες 24h σε τρυβλία. Στη συνέχεια η προκαλλιέργεια επωάζονταν σε επωαστικό shaker New Brunswick Sc, για 24h στις 180±5

rpm στους $30 \pm 1^\circ\text{C}$. Η παραπάνω διαδικασία επαναλαμβάνονταν κάθε φορά πριν το εμβολιασμό κυρίως καλλιέργειας, για την παρασκευή υγρού εμβολίου.

3.3 ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΚΥΡΙΩΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ

Για τις κυρίως καλλιέργειες που παρασκευάστηκαν χρησιμοποιήθηκε γλυκερόλη καθαρότητας 88% ως μοναδική πηγή άνθρακα, ενώ πεπτόνη και yeast extract ήταν οι πηγές αζώτου. Τα θρεπτικά υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν παρουσιάζονται στον Πίνακα 2 που ακολουθεί.

Πίνακας 2. Σύσταση θρεπτικών υποστρωμάτων κυρίως καλλιέργειών (Papanikolaou *et al.*, 2001).

Γλυκερόλη	40-120 g L ⁻¹
Yeast extract	1 g L ⁻¹
Peptone	2 g L ⁻¹
KH ₂ PO ₄	7 g L ⁻¹
Na ₂ HPO ₄	2,5 g L ⁻¹
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1,5 g L ⁻¹
FeCl ₃ ·6H ₂ O	0,15 g L ⁻¹
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,02 g L ⁻¹
MnSO ₄ ·H ₂ O	0,06 g L ⁻¹
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,15 g L ⁻¹

Όλες οι ζυμώσεις πραγματοποιήθηκαν σε δύο τιμές pH, 2 και 6. Το pH ρυθμιζόταν με διαλύματα HCL και NaOH συγκέντρωσης 5M, τόσο στο αρχικό θρεπτικό μέσο, όσο και κατά τη διάρκεια της ζύμωσης. Οι καλλιέργειες μοιράστηκαν σε κωνικές φιάλες των 250 mL (50 mL ανά φιάλη) και εν συνεχεία αποστειρώθηκαν στους 121°C για 20 λεπτά. Σε ορισμένες από τις ζυμώσεις πραγματοποιήθηκε προσθήκη χλωριούχου νατρίου NaCl, για να προκληθεί εξωτερική οσμωτική πίεση στα κύτταρα του μικροοργανισμού στις εξής συγκεντρώσεις: 10 g L⁻¹, 30 g L⁻¹, 50 g L⁻¹ & 80 g L⁻¹. Στη συνέχεια όλες οι κωνικές φιάλες εμβολιάστηκαν ασηπτικά με 1 mL υγρού εμβολίου προερχόμενο από προκαλλιέργειες 24h.

3.4 ΑΝΑΛΥΣΗ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΩΝ ΣΤΑΔΙΩΝ

Στόχος αυτής της μελέτης ήταν να εξεταστεί η ικανότητα των στελεχών της ζύμης *Yarrowia lipolytica*, να παράγουν πολυόλες (μαννιτόλη, ερυθριτόλη και αραβιτόλη), από ακάθαρτη γλυκερόλη, τόσο παρουσία όσο και απουσία χλωριούχου νατρίου.

Για την επίτευξη του στόχου η μελέτη χωρίστηκε σε δυο πειραματικά στάδια. Και στα δυο στάδια χρησιμοποιήθηκε ως υπόστρωμα γλυκερόλη καθαρότητας 88% , σε σταθερές συνθήκες ανάδευσης (180 ± 5 rpm), θερμοκρασίας ($29\pm 1^\circ\text{C}$) και σε δυο διαφορετικές τιμές pH (2 & 6). Επίσης, σε όλα τα πειράματα μελετήθηκαν συγκριτικά τα δύο στελέχη ζυμών του γένους *Yarrowia lipolytica* ACA YC-5030 και NRRL Y-423. Όλες οι υγρές καλλιέργειες πραγματοποιήθηκαν σε περιοριστικές σε άζωτο συνθήκες (nitrogen-limited), μέσα σε κωνικές φιάλες Erlenmeyer χωρητικότητας 250 mL. Η κάθε ζύμωση διήρκησε διαφορετικές ώρες ανάλογα με τις εκάστοτε συνθήκες.

Να σημειωθεί ότι πριν από κάθε μέτρηση και κάθε εμβολιασμό προκαλλιέργειας ή κύριας καλλιέργειας, η καθαρότητα της εκάστοτε καλλιέργειας (ή slant) από μολύνσεις εξακριβώθηκε με έλεγχο του δείγματος στο μικροσκόπιο.

3.4.1 ΠΡΩΤΟ ΣΤΑΔΙΟ (ΑΠΟΥΣΙΑ NaCl)

Στο πρώτο πειραματικό στάδιο εξετάστηκαν οι μικροοργανισμοί σε υπόστρωμα βιομηχανικής γλυκερόλης, σε μεταβλητές συγκεντρώσεις 40 g L^{-1} , 80 g L^{-1} και 120 g L^{-1} , καθώς και σε δυο διαφορετικά pH 2 και 6. Οι υπόλοιπες συνθήκες διατηρούνταν σταθερές.

3.4.2 ΔΕΥΤΕΡΟ ΣΤΑΔΙΟ (ΠΑΡΟΥΣΙΑ NaCl)

Ομοίως, στο δεύτερο πειραματικό στάδιο εξετάστηκαν οι μικροοργανισμοί στις δυο διαφορετικές τιμές pH, το υπόστρωμα γλυκερόλης αυτή τη φορά ήταν σταθερής συγκέντρωση 40 g L^{-1} και ο μεταβλητός παράγοντας ήταν η προσθήκη ποικίλων συγκεντρώσεων του χλωριούχου νατρίου. Οι συγκεντρώσεις NaCl ήταν οι εξής: 10 g L^{-1} , 30 g L^{-1} , 50 g L^{-1} και 80 g L^{-1} .

3.5 ΑΝΑΛΥΣΕΙΣ

Πρώτο και βασικό βήμα πριν την οποιαδήποτε ανάλυση ήταν η διαδικασία της δειγματοληψίας που σκοπό είχε τον έλεγχο της καθαρότητας της καλλιέργειας σε οπτικό μικροσκόπιο Motic, ώστε να διασφαλισθεί πως δεν υπάρχει επιμόλυνση.

Στη συνέχεια προσδιορίζεται η τιμή pH της καλλιέργειας με πεχάμετρο (pH/mV meter HI 8014-Hanna Instruments). Εάν η τιμή είναι διαφορετική από 6 ± 0.3 και 2 ± 0.3 , ανάλογα με το επιθυμητό εύρος κάθε φορά, τότε ακολουθεί διόρθωση αυτής σε όλες τις φιάλες της καλλιέργειας με

αποστειρωμένο διάλυμα NaOH 5M εάν πρέπει η τιμή να αυξηθεί, ή HCl 5M στην αντίθετη περίπτωση.

3.5.1 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΠΑΡΑΓΟΜΕΝΗΣ ΒΙΟΜΑΖΑΣ

Η βιομάζα προσδιορίζεται με παραλαβή της ξηρής βιομάζας έπειτα από φυγοκέντρηση και ξήρανση. Πιο αναλυτικά, η καλλιέργεια φυγοκεντρείται για 10 λεπτά στους 4°C στα 9000 rpm, από όπου παραλαμβάνεται το υπερκείμενο. Ακολούθως για να ξεπλυθούν τα κύτταρα από υπολείμματα του θρεπτικού μέσου, η καλλιέργεια φυγοκεντρείται με απιονισμένο νερό για δυο ακόμα φορές στις ίδιες συνθήκες. Η βιομάζα που παραλαμβάνεται από τη τελευταία φυγοκέντρηση μεταφέρεται σε προζυγισμένα φιαλίδια McCartney και τοποθετείται για ξήρανση σε φούρνο αέρα στους 80±5°C για περίπου 24-48h έως ότου ξηρανθεί πλήρως. Τέλος τα φιαλίδια αφού παραμείνουν για 3h σε αφυγραντήρα, ζυγίζονται σε ζυγό ακριβείας Kern και τα αποτελέσματα εκφράζονται σε g L⁻¹.

3.5.2 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΝΔΟΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΛΙΠΟΥΣ

Τα ενδοκυτταρικά λιπίδια εκχυλίζονται σε μίγμα οργανικών διαλυτών και συγκεκριμένα χλωροφόρμιο:μεθανόλη (2:1 v/v) (Folch *et al.*, 1957). Το παραπάνω μίγμα προστίθεται στα φιαλίδια McCartney που περιέχουν την ξηρή βιομάζα. Τα φιαλίδια έπειτα διατηρούνται για τουλάχιστον 72h αεροστεγώς κλεισμένα σε συνθήκες σκότους, ώστε να αποφεύγεται η οξείδωση των λιπαρών υλών (Sarantou *et al.*, 2021).

Στη συνέχεια το μίγμα βιομάζας-διαλυτών διηθείται με διηθητικό χαρτί και το διήθημα εξατμίζεται σε περιστροφικό εξατμιστήρα Flash Evaporator–Rotavapor R-114 υπό κενό και σε θερμοκρασία 45-50°C, ώστε να εξατμιστούν οι οργανικοί διαλύτες και να παραληφθεί το λίπος. Το εναπομείναν μικροβιακό λίπος ζυγίζεται σε ζυγό ακριβείας Kern και εκφράζεται σε g L⁻¹ ή σε g g⁻¹ ξηρής βιομάζας.

3.5.3 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΝΔΟΠΟΛΥΣΑΚΧΑΡΙΤΩΝ (IPS)

Οι παραγόμενοι ενδοπολυσακχαρίτες προσδιορίστηκαν ποσοτικά με μία διαδικασία βασισμένη σε ένα τροποποιημένο πρωτόκολλο μεθόδου (Argyropoulos *et al.*, 2022). Αρχικά παραλαμβάνονται 0,05 g ξηρής βιομάζας και τοποθετούνται σε δοκιμαστικό σωλήνα. Γίνεται προσθήκη 10mL υδροχλωρικού οξέος (HCl) συγκέντρωσης 2M και ακολουθεί υδρόλυση του διαλύματος στους 80°C για 30 λεπτά. Στη συνέχεια, προστίθενται 10mL υδροξειδίου του νατρίου (NaOH) συγκέντρωσης 2M, προκειμένου να γίνει εξουδετέρωση του HCl και ακολουθεί διήθηση με διπλό διηθητικό χαρτί, που αποσκοπεί στην απομάκρυνση της βιομάζας, ώστε το διήθημα να είναι διαυγές.

Τέλος για τον ποσοτικό προσδιορισμό των ενδοπολυσακχαριτών εφαρμόστηκε η μέθοδος για τον προσδιορισμό των αναγόντων σακχάρων με χρήση του 3,5-δινιτροσαλικυλικού οξέος (DNS) (Miller, 1959). Σε δοκιμαστικούς σωλήνες προστίθεται 0,5 mL αντιδραστηρίου DNS και 0,5 mL δείγματος. Ακολουθεί ανάδευση σε vortex και τοποθέτηση των δοκιμαστικών σωλήνων σε νερό θερμοκρασίας 100°C για 5 λεπτά. Στη συνέχεια οι δοκιμαστικοί σωλήνες αφήνονται να κρυώσουν μέχρι να φτάσουν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και έπειτα σε αυτούς προστίθενται 5 mL απιονισμένο νερό. Μετά από ανάδευση του διαλύματος, γίνεται φωτομέτρηση σε φασματοφωτόμετρο τύπου Hitachi U-2000, όπου μετράται η απορρόφηση στα 540 nm. Η συγκέντρωση αναγόντων σακχάρων σε κάθε δείγμα υπολογίστηκε από πρότυπη καμπύλη αναφοράς και εκφράστηκε σε ισοδύναμη συγκέντρωση γλυκόζης (g L^{-1}).

3.5.4 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΠΟΛΥΟΛΩΝ ΚΑΙ ΓΛΥΚΕΡΟΛΗΣ

Ο προσδιορισμός των πολυολών και της γλυκερόλης έγινε με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC). Η στήλη με την οποία έγινε ο διαχωρισμός των ουσιών (Phenomenex®, Rezex™ ROA-Organic Acid H⁺ 8%) διαθέτει συνδυασμό ανιχνευτών UV και RI. Ως κινητή φάση (mobile phase) χρησιμοποιείται διάλυμα θεικού οξέος (H₂SO₄) συγκέντρωσης 5 mM και ρυθμός ροής (flow rate) 0,5 mL min⁻¹, σε θερμοκρασία 60°C με διάρκεια ανάλυσης 30 λεπτά.

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Ο σκοπός αυτή της εργασίας είναι να συγκριθεί η παραγωγή πολυολών μεταξύ των 2 στελεχών της ζύμης *Yarrowia lipolytica* ACA YC-5030 και NRRL Y-423, σε διαφορετικές συγκεντρώσεις πηγής άνθρακα και σε παρουσία χλωριούχου νατρίου διαφορετικών συγκεντρώσεων. Επιπλέον, μελετήθηκε η παραγωγή δευτερογενών μεταβολιτών.

Σε κάθε ζύμωση μελετήθηκε η κινητική των ακόλουθων στοιχείων: παραγωγή βιομάζας, κατανάλωση υποστρώματος, ενδοπολυσακχαρίτες, μικροβιακό λίπος και παραγωγή πολυολών. Το πείραμα εκτελέστηκε σε δυο στάδια. Αρχικά τα δυο στελέχη καλλιεργήθηκαν σε διαφορετικές αρχικές συγκεντρώσεις ακάθαρτης γλυκερόλης και εξετάστηκαν σε χαμηλό και υψηλό pH. Έπειτα, καλλιεργήθηκαν σε σταθερή αρχική συγκέντρωση υποστρώματος με την παρουσία χλωριούχου νατρίου διαφορετικών συγκεντρώσεων σε συνάρτηση πάλι με χαμηλό και υψηλό pH. Η ανάδευση και η θερμοκρασία παρέμειναν σταθερά.

Όλα τα σημεία τα οποία θα παρουσιαστούν είναι αποτέλεσμα μέσου όρου δύο επαναλήψεων.

Στο πρώτο στάδιο εξετάστηκαν τα δυο στελέχη σε υγρές καλλιέργειες ασυνεχούς τύπου με υπόστρωμα βιομηχανικής γλυκερόλης, απουσία NaCl. Πιο συγκεκριμένα, οι συγκεντρώσεις για την πηγή άνθρακα που επιλέχθηκαν σε σταθερή θερμοκρασία 29°C και αρχικές τιμές pH 2 και 6 ήταν οι εξής:

- (i) 40 g L⁻¹ γλυκερόλης
- (ii) 80 g L⁻¹ γλυκερόλης
- (iii) 120 g L⁻¹ γλυκερόλης

Αξιολογήθηκαν ως προς την ικανότητα τους να καταναλώνουν την γλυκερόλη και να την μετατρέπουν σε βιομάζα και δευτερογενείς μεταβολίτες.

Ακολουθεί πίνακας με τις μέγιστες τιμές για την κατανάλωση και την παραγωγή των μεταβολιτών που παρατηρήθηκαν και για τα δυο στελέχη.

Πίνακας 3. Σύγκριση των δυο στελεχών σε διαφορετικές αρχικές συγκεντρώσεις υποστρώματος γλυκερόλης σε δυο τιμές pH.

	Strains	pH	Max Value	Time (h)	Glol (g L ⁻¹)	Glol _{cons} (g L ⁻¹)	X (g L ⁻¹)	Ery (g L ⁻¹)	Man (g L ⁻¹)	Ara (g L ⁻¹)	L (g L ⁻¹)	IPS (% DW)
40 (g L ⁻¹)	NRRL	pH2	α,β,δ	212	4,17	39,33	17,13	1,32	3,16	2,68	1,24	12,85
	Y-423	pH6	α,δ	212	0,00	43,50	15,14	0,23	1,01	2,09	0,42	12,31
	ACA	pH2	α,β	219	0,11	41,78	8,41	3,32	11,94	2,01	0,21	8,14
	YC - 5030	pH6	α,β	93	1,54	35,31	14,68	1,54	7,15	1,44	0,41	13,16
80 (g L ⁻¹)	NRRL	pH2	α,β	261	4,97	73,17	19,73	3,79	5,98	4,47	0,49	12,03
	Y - 423	pH6	α,β	122	5,50	72,64	12,39	np	2,28	1,67	1,27	13,08
	ACA	pH2	α,β,γ	364	2,91	73,26	19,57	6,37	13,17	3,14	1,91	14,09
	YC - 5030	pH6	α,β	364	0,47	75,70	20,25	4,47	10,15	2,16	0,79	7,67
120 (g L ⁻¹)	NRRL	pH2	α	193	12,69	107,35	20,83	7,71	24,71	9,06	2,27	6,84
	Y - 423	pH6	α,δ	172	11,61	108,43	17,47	np	17,35	7,01	1,29	7,34
	ACA	pH2	α,β,γ	172	6,43	115,04	19,98	9,14	15,98	4,71	1,79	13,55
	YC- 5030	pH6	α,β	172	4,26	117,21	22,17	4,25	8,47	3,27	1,48	15,71

Όπου:

Time (h): χρόνος ζύμωσης

X (g L⁻¹): βιομάζα

Glol_{cons} (g L⁻¹): καταναλωθέν υπόστρωμα

Man (g L⁻¹): παραγωγή μαννιτόλης

Ery (g L⁻¹): παραγωγή ερυθριτόλης

Ara (g L⁻¹): παραγωγή αραβιτόλης

L (g L⁻¹): παραγωγή μικροβιακού λίπους

IPS (g L⁻¹): παραγωγή ενδοπολυσακχαριτών επί της ξηρής βιομάζας

α: μέγιστη παραγωγή βιομάζας

β: μέγιστη παραγωγή μαννιτόλης

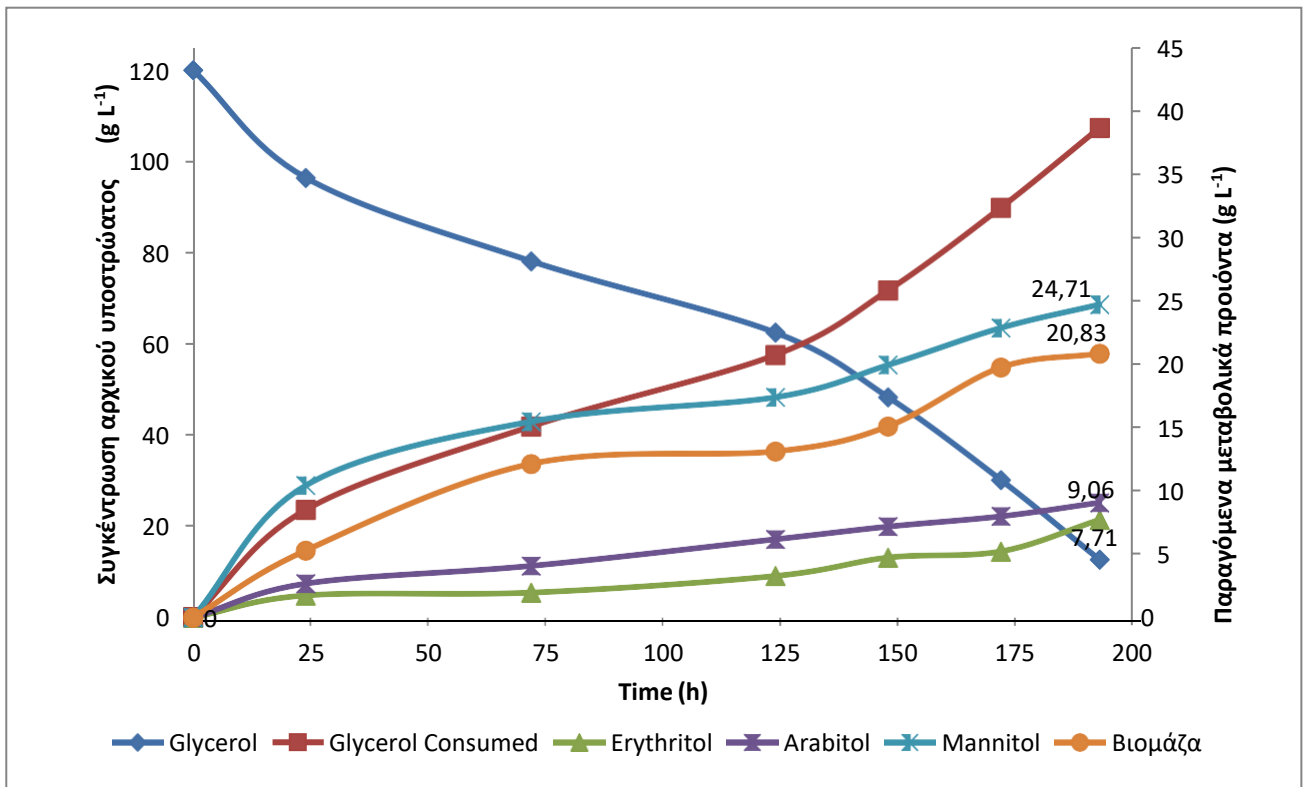
γ: μέγιστη παραγωγή ερυθριτόλης

δ: μέγιστη παραγωγή αραβιτόλης

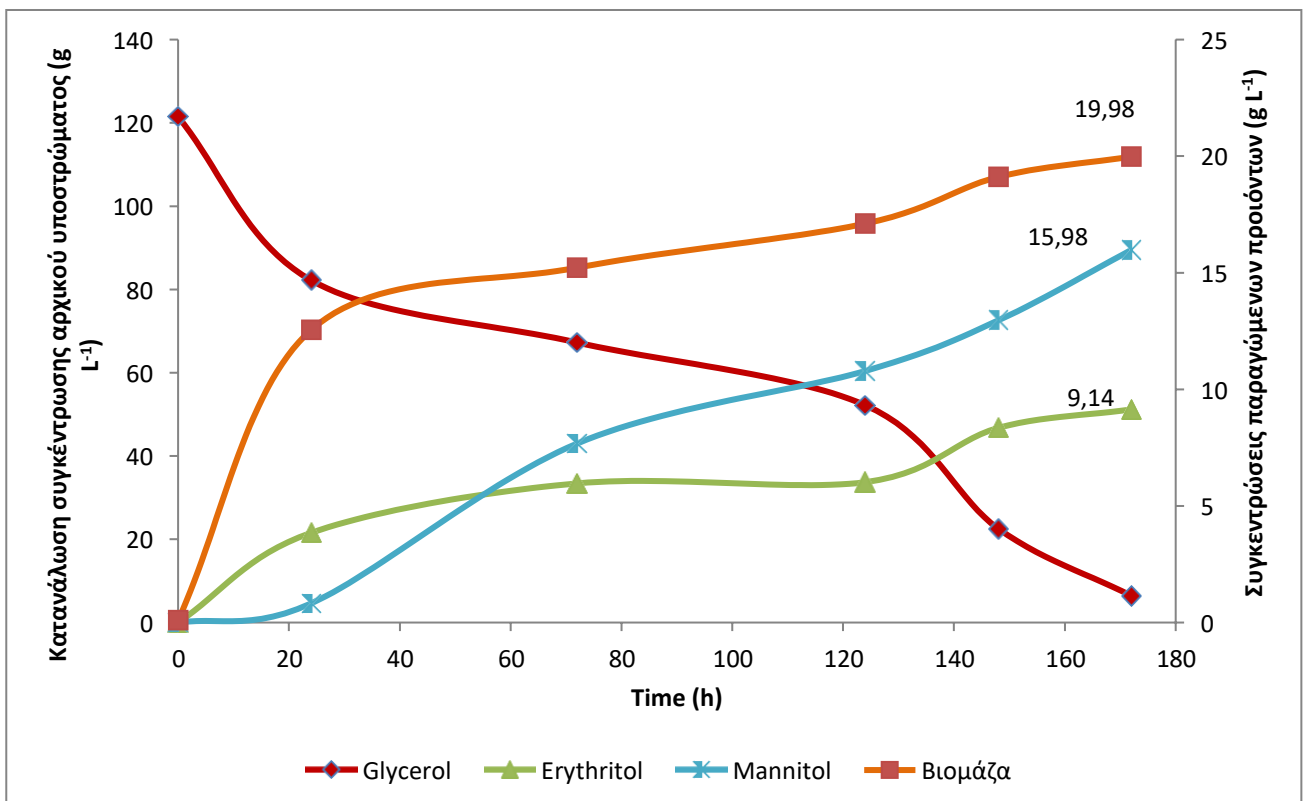
ε: μέγιστη παραγωγή λίπους

ζ: μέγιστη παραγωγή ενδοπολυσακχαριτών

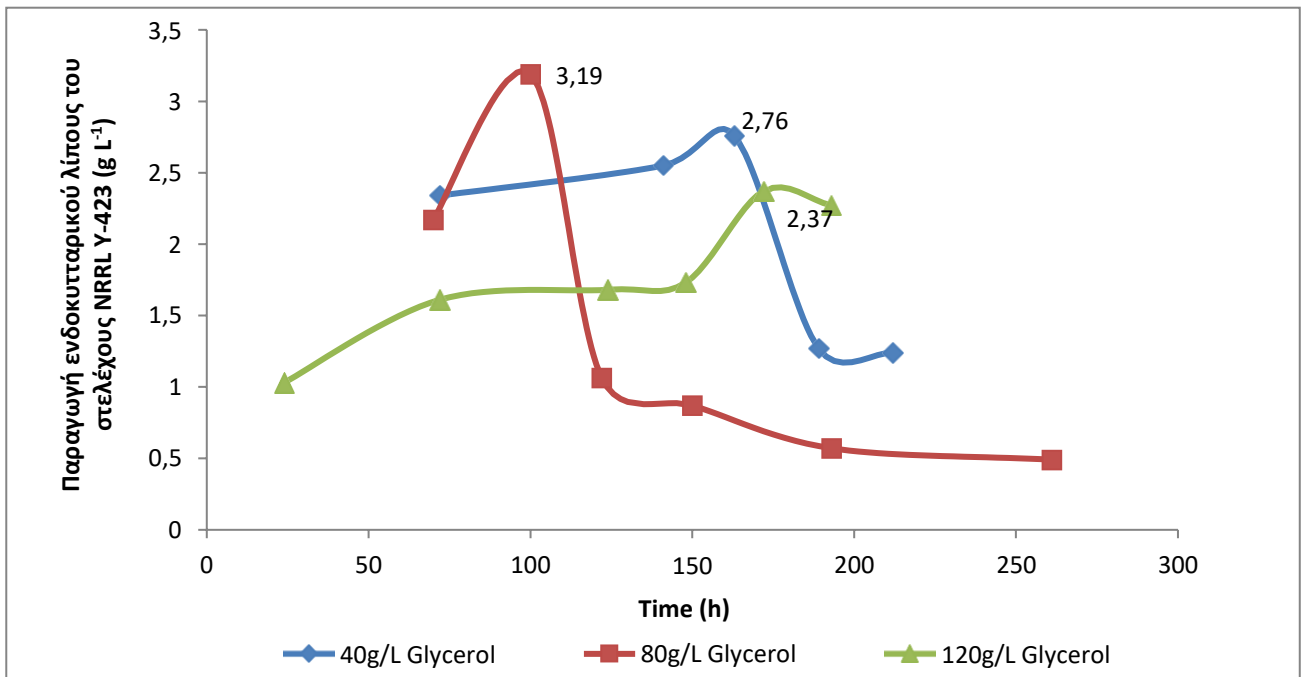
np: not produced



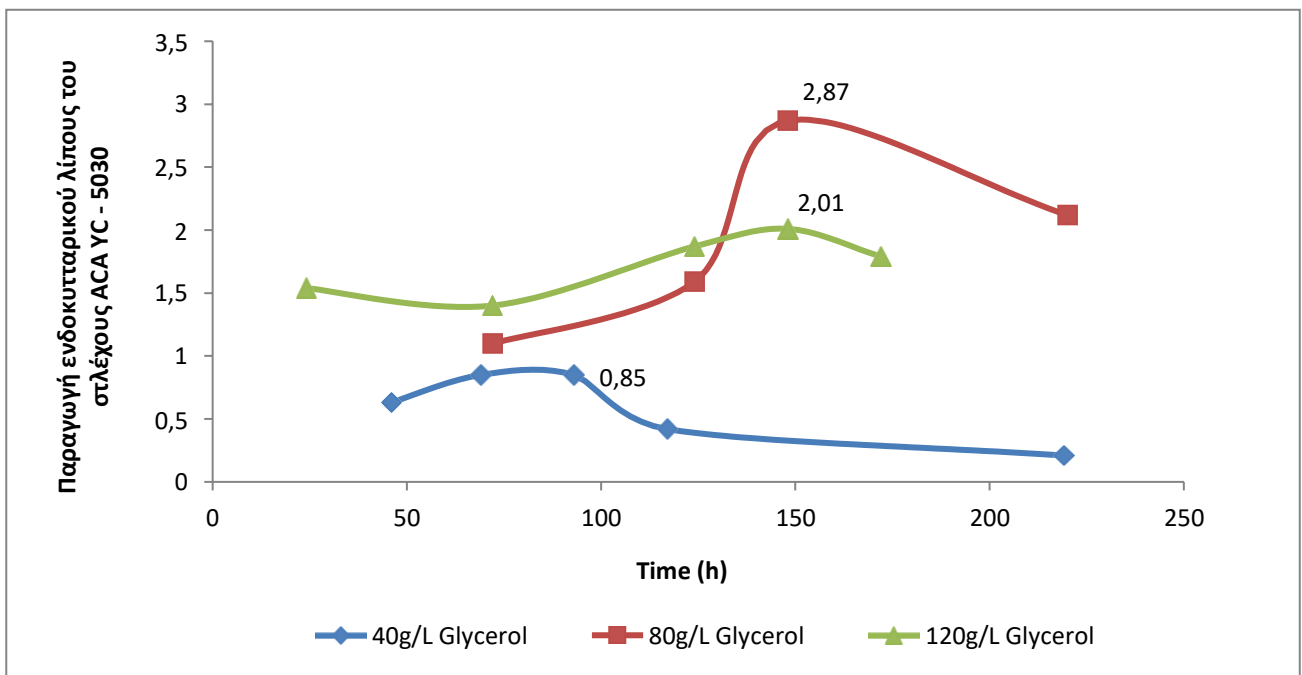
Γράφημα 1. Κινητικά δεδομένα του στελέχους NRRL Y - 423 για αρχική συγκέντρωση υποστρώματος 120g L⁻¹, σε pH 2.



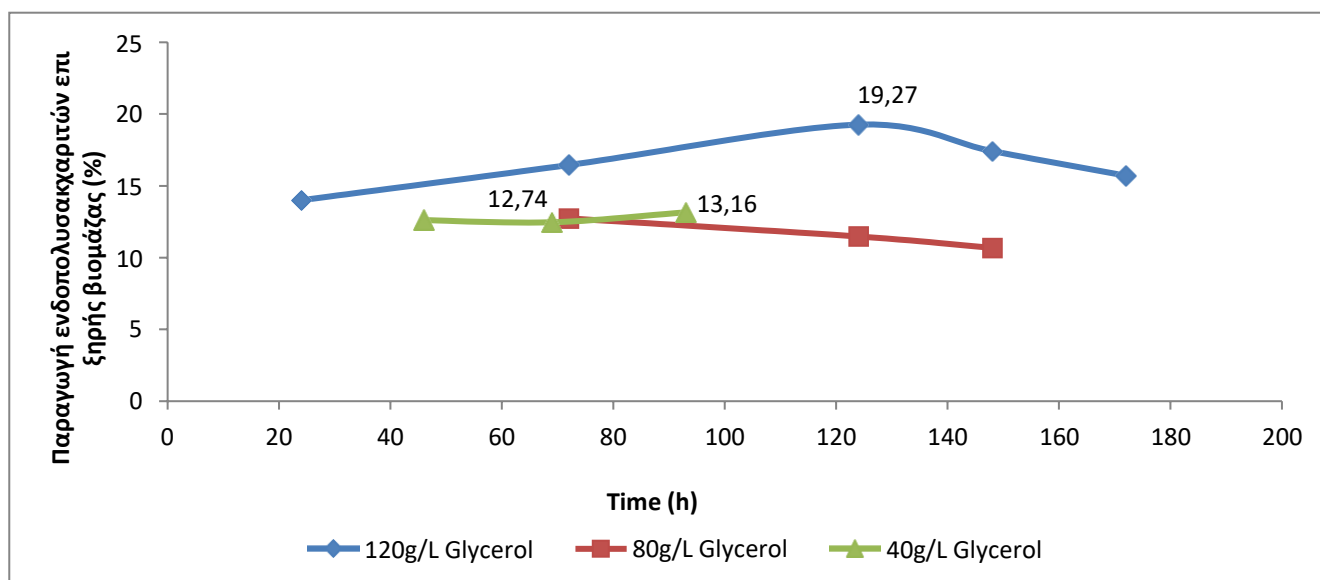
Γράφημα 2. Γραφική απεικόνιση του στελέχους ACA YC - 5030 σε 120g L⁻¹ αρχικού υποστρώματος ακάθαρτης γλυκερόλης σε συνθήκες pH 2.



Γράφημα 3. Κινητικά δεδομένα παραγωγής ενδοκυτταρικού λίπους του στελέχους NRRL Y - 423 για διαφορετικές αρχικές συγκεντρώσεις υποστρώματος, σε pH 2.



Γράφημα 4. Γραφική απεικόνιση για την παραγωγή ενδοκυτταρικού λίπους του στελέχους ACA YC - 5030 σε διαφορετικές αρχικές συγκεντρώσεις υποστρώματος ακάθαρτης γλυκερόλης σε συνθήκες χαμηλού pH 2.



Γράφημα 5. Κινητικά δεδομένα για την παραγωγή ενδοπολυσακχαριτών του στελέχους ACA YC - 5030 σε διαφορετικές αρχικές συγκεντρώσεις υποστρώματος ακάθαρτης γλυκερόλης σε συνθήκες υψηλού pH 6.

Η μέγιστη συγκέντρωση της βιομάζας που παρατηρήθηκε ήταν $24,71 \text{ g L}^{-1}$, από το στέλεχος *Yarrowia lipolytica* NRRL Y-423 σε υγρές καλλιέργειες με αρχική συγκέντρωση βιομηχανικής γλυκερόλης 120 g L^{-1} και σε pH 2 στις 193 ώρες καλλιέργειας.

Όσον αφορά την μέγιστη συγκέντρωση πολυολών το στέλεχος ACA YC-5030 παράγαγε $\sim 30 \text{ g L}^{-1}$, σε κλειστές καλλιέργειες αρχικής συγκέντρωσης υποστρώματος 120 g L^{-1} και σε pH 2 στις 172 ώρες καλλιέργειας. Με κυρίαρχη πολυόλη την μαννιτόλη με $\sim 16 \text{ g L}^{-1}$, ποσοστό που ανέρχεται στο μισό της συνολικής παραγωγής των πολυολών.

Το ενδοκυτταρικό λίπος που παράχθηκε, έφτασε μέγιστες τιμές $\sim 3,5 \text{ g L}^{-1}$ για το στέλεχος NRRL Y - 423 και $\sim 3 \text{ g L}^{-1}$ για το ACA YC - 5030. Παρατηρήθηκε επίσης, πως οι μέγιστες τιμές που παρήχθησαν ήταν και για τα δυο στελέχη στα 80 g L^{-1} αρχικής συγκέντρωσης υποστρώματος σε συνάρτηση με το χαμηλό pH. Ενώ από την άλλη μεριά, το υψηλό pH τόσο για το ένα στέλεχος όσο και για το άλλο δεν προώθησε την υψηλή παραγωγή λίπους, καθώς οι τιμές κυμάνθηκαν $\sim 0,25-1,50 \text{ g L}^{-1}$ στις διάφορες αρχικές συγκεντρώσεις και για τα δυο στελέχη της *Yarrowia lipolytica*.

Επιπροσθέτως, σχετικά με την παραγωγή ενδοπολυσακχαριτών παρατηρήθηκε ότι το στέλεχος ACA YC - 5030 σε αρχική συγκέντρωση υποστρώματος 120 g L^{-1} έδωσε τις μεγαλύτερες τιμές και στο χαμηλό ($\sim 15,94 \text{ g L}^{-1}$) και στο υψηλό ($\sim 19,27 \text{ g L}^{-1}$) pH. Και στις δυο περιπτώσεις οι μέγιστες τιμές επιτεύχθηκαν στο μέσο της ζύμωσης και στην συνέχεια ακολούθησε πτωτική τάση τιμών. Γενικά αξίζει να σημειωθεί ότι όσο αυξανόταν η αρχική συγκέντρωση υποστρώματος αυξήθηκε και η

ποσότητα των ενδοπολυσακχαριτών. Σχετικά με το στελέχος NRRL Y – 423 η μέγιστη παραγωγή έφτασε τα $\sim 14 \text{ g L}^{-1}$ στα 80 g L^{-1} υποστρώματος ακάθαρτης γλυκερόλης και για τις δυο περιπτώσεις pH.

Στο δεύτερο στάδιο εξετάστηκαν τα δυο στελέχη σε υγρές καλλιέργειες ασυνεχούς τύπου σε υπόστρωμα ακάθαρτης βιομηχανικής γλυκερόλης 40 g L^{-1} παρουσία NaCl. Πιο συγκεκριμένα οι συγκεντρώσεις χλωριούχου νατρίου που επιλέχθηκαν ήταν οι εξής:

- (i) 10 g L^{-1} NaCl
- (ii) 30 g L^{-1} NaCl
- (iii) 50 g L^{-1} NaCl
- (iv) 80 g L^{-1} NaCl

σε σταθερή θερμοκρασία $29 \text{ }^\circ\text{C}$ και τιμή pH 2 & 6.

Και τα δυο στελέχη του γένους *Yarrowia lipolytica* αξιολογήθηκαν ως προς την ικανότητα τους να καταναλώνουν το υπόστρωμα με την παρουσία χλωριούχου νατρίου σε διαφορετικές συγκεντρώσεις και να την μετατρέπουν σε βιομάζα, ενδοπολυσακχαρίτες και δευτερογενείς μεταβολίτες, με ελάχιστες περιπτώσεις να μην καταφέρει ο μικροοργανισμός να αποζυμώσει το υπόστρωμα.

Παρατίθενται πίνακες με τις μέγιστες τιμές των στοιχείων των κινητικών που παρατηρήθηκαν και για τα δυο στελέχη σε συνθήκες στρες, έπειτα από την προσθήκη διαφόρων συγκεντρώσεων χλωριούχου νατρίου.

Πίνακας 4. Σύγκριση των δυο στελεχών ύστερα από προσθήκη διαφορετικών συγκεντρώσεων χλωριούχου νατρίου σε δυο τιμές pH

NaCl (g L^{-1})	Strains	pH	Max Value	Time (h)	Glol (g L^{-1})	Glol _{cons} (g L^{-1})	X (g L^{-1})	Ery (g L^{-1})	Man (g L^{-1})	Ara (g L^{-1})	L (g L^{-1})	IPS (% DW)
10	NRRL Y - 423	pH2	α	148	19,01	16,88	12,96	0,04	0,31	0,72	0,52	7,17
		pH6	α	124	1,53	36,21	19,57	1,06	0,82	0,93	1,27	9,45
	ACA YC - 5030	pH2	α,β	284	0,01	35,88	11,67	3,95	4,58	1,57	0,85	11,38
		pH6	α,γ,ε	140	2,79	34,95	13,85	4,74	3,78	1,24	1,67	14,01
30	NRRL Y - 423	pH2	α	148	19,47	15,27	9,74	0,06	0,18	0,41	0,07	4,31
		pH6	α	124	4,30	31,28	19,14	0,11	0,39	0,88	1,06	9,68
	ACA YC - 5030	pH2	α,γ	140	0,04	37,70	13,08	6,50	2,74	1,63	0,64	11,09
		pH6	α,γ	140	0,01	35,57	18,78	6,14	1,87	1,12	1,07	14,98
50		pH2	α	148	24,53	13,56	6,37	0,11	np	np	0,29	2,17

	NRRL Y - 423	pH6	α	124	7,88	31,26	17,20	0,11	0,12	0,24	1,06	10,26
	ACA YC - 5030	pH2	α,γ	284	0,07	37,82	14,51	8,10	1,82	1,58	0,48	13,08
		pH6	α,γ	162	0,01	35,57	21,97	6,64	0,88	0,89	0,74	14,48
80	NRRL Y - 423	pH2	α	149	30,16	9,52	5,27	0,19	np	np	0,11	4,04
		pH6	α	149	0,49	38,26	16,46	0,12	0,05	0,08	0,17	10,47
	ACA YC - 5030	pH2	α,γ	284	0,47	39,31	13,85	10,72	1,31	1,02	0,17	13,08
		pH6	α,γ	284	0,19	38,56	22,17	7,04	0,67	0,63	0,27	14,43

Όπου:

Time (h): χρόνος ζύμωσης

X (g L⁻¹): βιομάζα

Glc_{cons} (g L⁻¹): καταναλωθέν υπόστρωμα

Man (g L⁻¹): παραγωγή μαννιτόλης

Ery (g L⁻¹): παραγωγή ερυθριτόλης

Ara (g L⁻¹): παραγωγή αραβιτόλης

L (g L⁻¹): παραγωγή μικροβιακού λίπους

IPS (g L⁻¹): παραγωγή ενδοπολυσακχαριτών επί της ξηρής βιομάζας

α: μέγιστη παραγωγή βιομάζας

β: μέγιστη παραγωγή μαννιτόλης

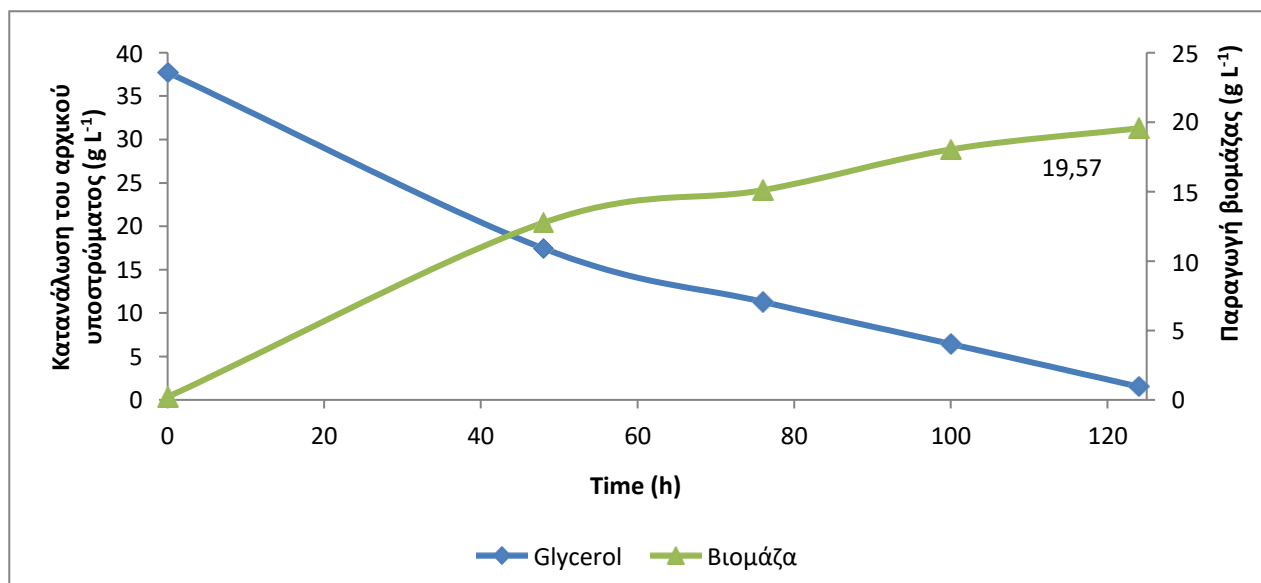
γ: μέγιστη παραγωγή ερυθριτόλης

δ: μέγιστη παραγωγή αραβιτόλης

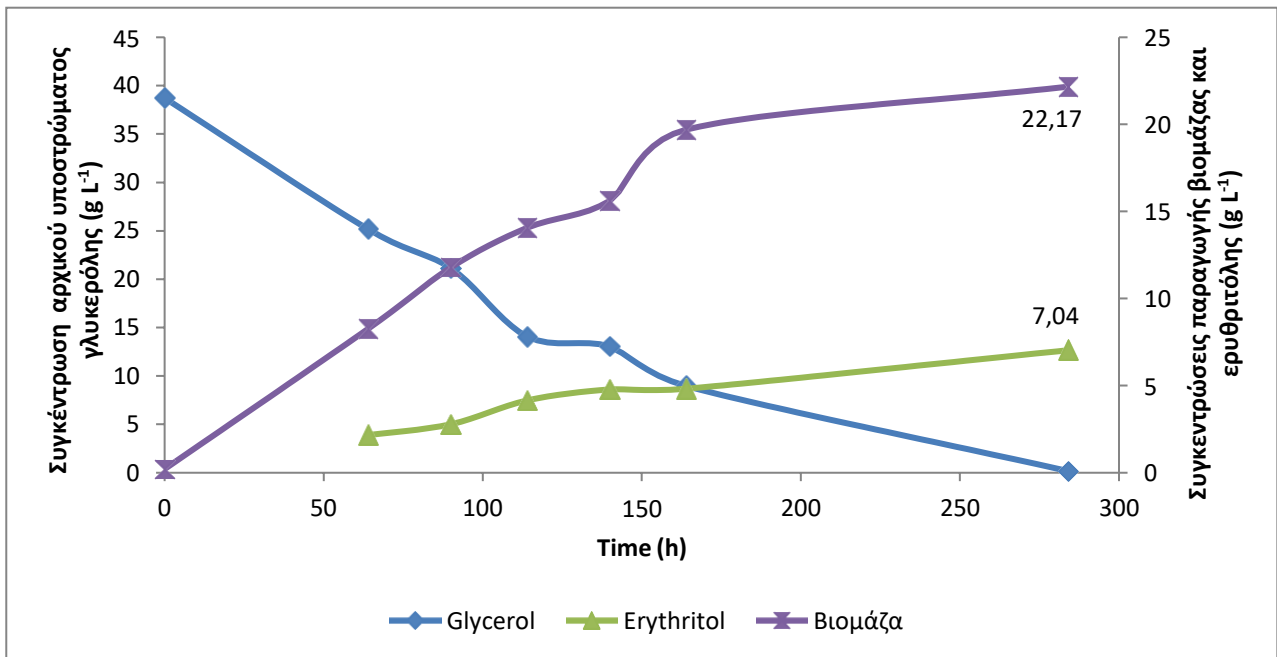
ε: μέγιστη παραγωγή λίπους

ζ: μέγιστη παραγωγή ενδοπολυσακχαριτών

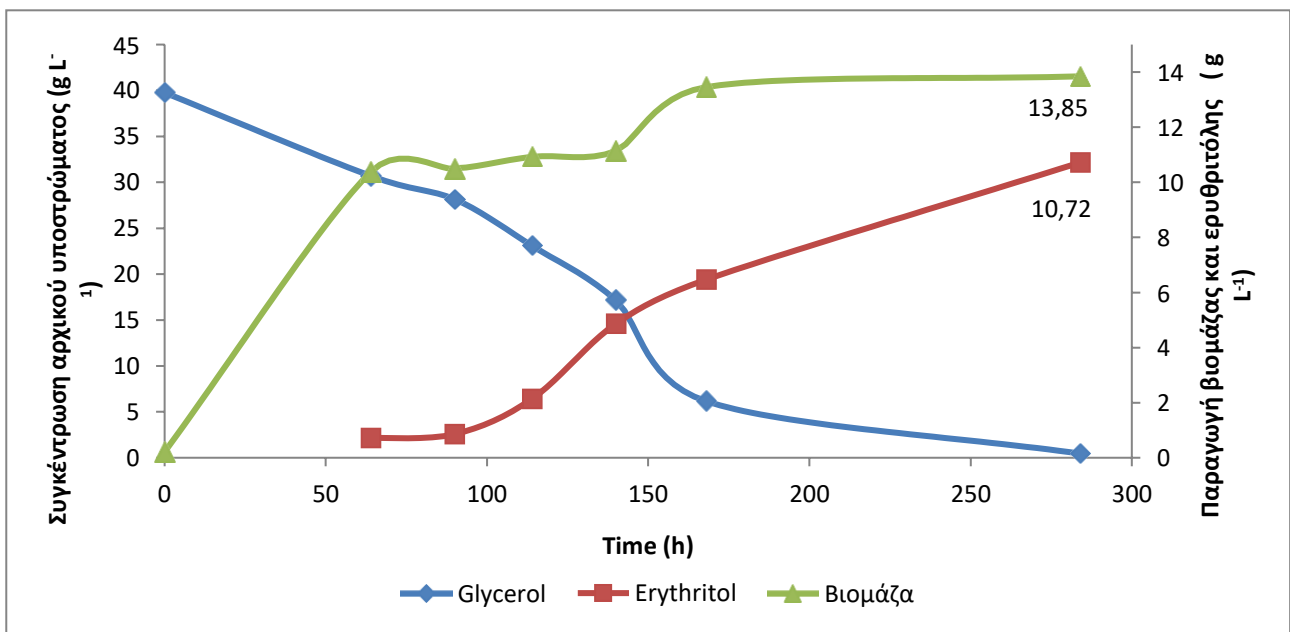
np: not produced



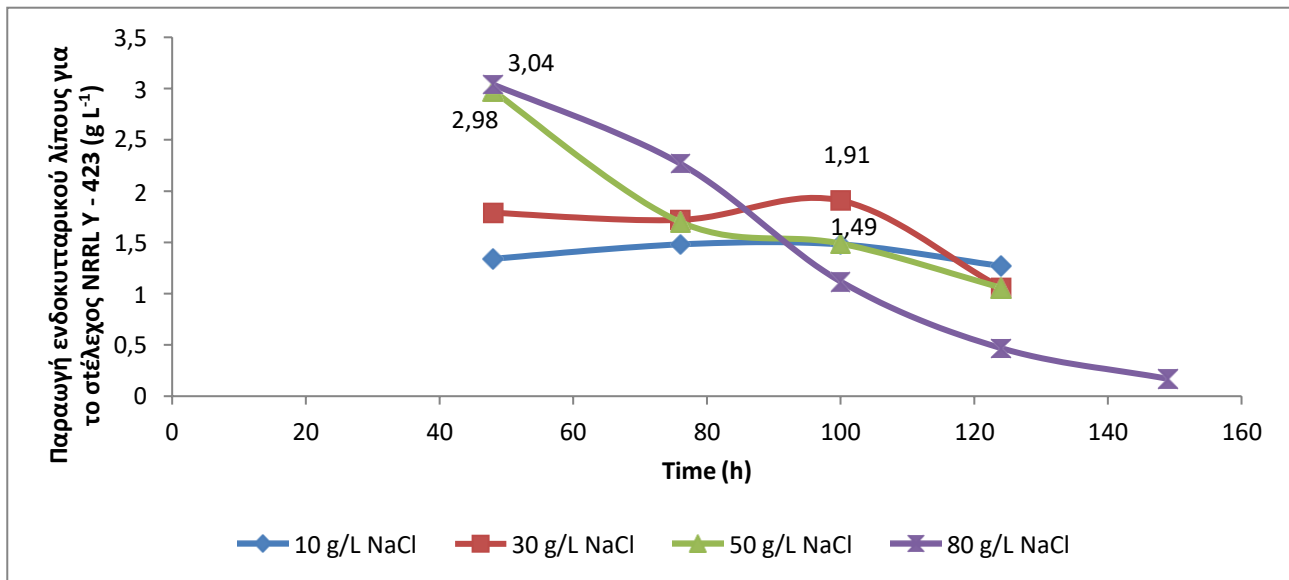
Γράφημα 6. Κινητικά δεδομένα της κατανάλωσης του υποστρώματος ακάθαρτης γλυκερόλης προς παραγωγή βιομάζας σε συνάρτηση με τον χρόνο, για συνθήκες καλλιέργειας pH 2, παρουσία συγκέντρωσης NaCl 10 g L⁻¹ του στελέχους NRRL Y - 423.



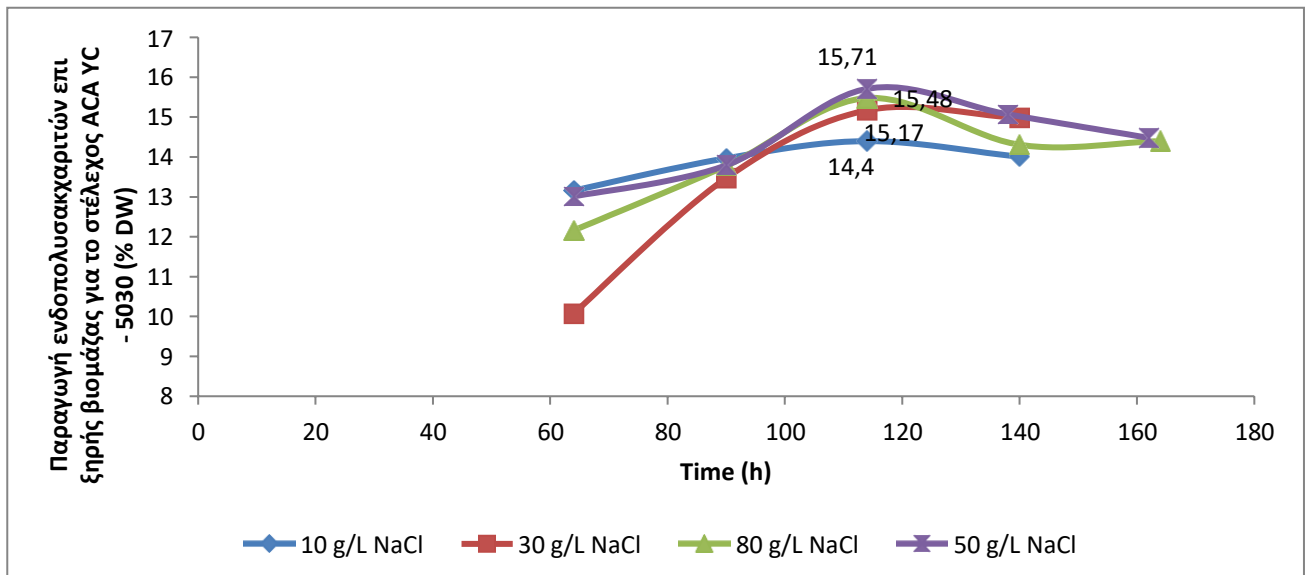
Γράφημα 7. Γραφική απεικόνιση της παραγωγής βιομάζας και ερυθριτόλης του στελέχους ACA YC – 5030, σε συνθήκες καλλιέργειας pH 6 με προσθήκη χλωριούχου νατρίου συγκέντρωσης 80 g L⁻¹.



Γράφημα 8. Κινητικά δεδομένα για το στέλεχος ACA YC-5030, ύστερα από προσθήκη χλωριούχου νατρίου συγκέντρωσης 80 g L⁻¹ σε pH 2.



Γράφημα 9. Γραφική απεικόνιση της παραγωγής μικροβιακού λίπους του στελέχους NRRL Y – 423, σε συνθήκες καλλιέργειας pH 6 με προσθήκη χλωριούχου νατρίου.



Γράφημα 10. Κινητικά δεδομένα της παραγωγής ενδοπολυσακχαριτών επί ξηράς ουσίας του στελέχους ACA YC – 5030, σε συνθήκες pH 6 με προσθήκη χλωριούχου νατρίου.

Η μέγιστη συγκέντρωση βιομάζας παρατηρήθηκε από το στέλεχος *Yarrowia lipolytica* ACA YC – 5030 με τιμή να φτάνει τα 22,17 g L⁻¹. Οι συνθήκες που υπήρχαν στο περιβάλλον της ζύμωσης ήταν υγρές καλλιέργειες με αρχική συγκέντρωση βιομηχανικής γλυκερόλης 40 g L⁻¹, 80 g L⁻¹ NaCl και σε pH 6 στις 284 ώρες καλλιέργειας.

Η συγκέντρωση ενδοπολυσακχαριτών κυμάνθηκε σε πολύ χαμηλά επίπεδα στο σύνολο των ζυμώσεων και για τα δυο στελέχη αντίστοιχα, με τις τιμές να είναι ~5,0-15,0 % DW. Γενικά παρατηρήθηκε πως το στέλεχος ACA YC – 5030 σε συνθήκες υψηλού pH, έδωσε τις υψηλότερες

τιμές στο μέσον της ζύμωσης και στην συνέχεια ακολούθησε πτώση αυτών. Επιπλέον τα μέγιστα βρέθηκε πως ήταν παρόμοια (~15% DW) για αυτό το στέλεχος. Η παραγωγή μικροβιακού λίπους για το στέλεχος NRRL Y – 423 κυμάνθηκε ~3,0 g L⁻¹ στις ζυμώσεις με τις δυο πιο υψηλές συγκεντρώσεις NaCl (50 & 80 g L⁻¹) για τιμή pH 6, ενώ για το άλλο στέλεχος παρατηρήθηκαν οι μέγιστες τιμές (~1,50 g L⁻¹) και για τα δυο pH στην χαμηλότερη προσθήκη συγκέντρωσης NaCl (10 g L⁻¹).

Σημαντική είναι η παραγωγή πολυολών που παρατηρήθηκε παρόλη την προσθήκη υψηλών συγκεντρώσεων χλωριούχου νατρίου, με μέγιστη παραγωγή σε κλειστές καλλιέργειες αρχικής συγκέντρωσης υποστρώματος 40g L⁻¹, NaCl 80 g L⁻¹ και συγκεκριμένα στο στέλεχος *Yarrowia lipolytica* ACA YC - 5030 για pH 2 στις 284 ώρες καλλιέργειας, όπου παρήχθησαν 13,05 g L⁻¹. Αξίζει να τονιστεί ότι η πολυόλη που κυριάρχησε ήταν η ερυθριτόλη με ποσοστό σχεδόν 80% επί του συνόλου των πολυολών.

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΚΑΙ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η παρούσα μεταπτυχιακή μελέτη είχε ως κύριο σκοπό την διερεύνηση των δυνατοτήτων των στελεχών NRRL Y- 423 και ACA YC - 5030 του γένους *Yarrowia lipolytica* και την ανάπτυξη τους σε υπόστρωμα ακάθαρτης γλυκερόλης, προκειμένου να παραχθούν μεταβολικά προϊόντα προστιθέμενης αξίας.

Ως γενικό συμπέρασμα, αξίζει να τονιστεί ότι τα στελέχη του μικροοργανισμού που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη, βρέθηκαν ικανά να αποικοδομήσουν την γλυκερόλη, ως πηγή άνθρακα και ενέργειας, ανεξαρτήτως των συγκεντρώσεων (40 g L^{-1} , 80 g L^{-1} & 120 g L^{-1}) με απώτερο στόχο την παραγωγή βιομάζας και πολυολών. Να σημειωθεί ότι υπήρξαν ελάχιστες εξαιρέσεις στην προσθήκη χλωριούχου νατρίου (10 g L^{-1} , 30 g L^{-1} , 50 g L^{-1} και 80 g L^{-1}) που δεν μπόρεσε να αναπτυχθεί ο ένας εκ των δυο μικροοργανισμών, οι οποίες θα αναλυθούν παρακάτω.

Τα δυο στελέχη εκτέθηκαν σε έντονες συνθήκες στρες με την προσθήκη υψηλών συγκεντρώσεων χλωριούχου νατρίου, γεγονός που επηρέασε την διάρκεια των ζυμώσεων. Στον πίνακα που ακολουθεί παραθέτονται ορισμένα αποτελέσματα από την βιβλιογραφία, καθώς και από την παρούσα μελέτη, ώστε να γίνει συσχέτιση αυτών, με σκοπό να επιβεβαιώσουν την βιβλιογραφία ή να δείξουν διαφορετική στροφή ως προς το μεταβολικό μονοπάτι.

Πίνακας 5. Συγκριτικός πίνακας αποτελεσμάτων βιβλιογραφίας και παρούσας μελέτης.

Αναφορά	Στέλεχος	Συνθήκες καλλιέργειας	X (g L^{-1})	Polyols (g L^{-1})
André et al., 2009	<i>Y. lipolytica</i> LFMB 20	Flasks, 30 g L^{-1} γλυκερόλη (crude), pH 4,5-6, 28°C , 90h	8,20	<u>Mannitol</u> : 6
Tomaszewska et al, 2012	<i>Y. lipolytica</i> CCY-29-26-3	Flasks, 100 g L^{-1} γλυκερόλη (pure), pH 2,5-2,8, $29,5^\circ\text{C}$, 240h	10,50	<u>Mannitol</u> : 2,63 <u>Arabitol</u> : 2,33 <u>Erythritol</u> : 22,97 Σ_{Polyols} : 27,93
Tomaszewska et al, 2014	<i>Y. lipolytica</i> Wratislavia K1	Two-cycle fed-batch, 150 g L^{-1} γλυκερόλη (pure), pH 3, $29,5^\circ\text{C}$, 150h	14,50	<u>Mannitol</u> : 6,10 <u>Arabitol</u> : 0,70 <u>Erythritol</u> : 89 Σ_{Polyols} : 95,8
Rakicka-Pustulka et al, 2020	<i>Y. lipolytica</i> MK1	Single fed-batch, 300 g L^{-1} γλυκερόλη (crude), pH 3, 30°C , 146h	27	<u>Mannitol</u> : 6,90 <u>Arabitol</u> : 3 <u>Erythritol</u> : 165 Σ_{Polyols} : 174,9
Παρούσα μελέτη	<i>Y. lipolytica</i> ACA YC - 5030	Flasks, 40 g L^{-1} γλυκερόλη (crude), pH 2, 30°C , 80 g L^{-1} NaCl	14,51	<u>Mannitol</u> : 1,31 <u>Arabitol</u> : 1,02 <u>Erythritol</u> : 10,72 Σ_{Polyols} : ~13

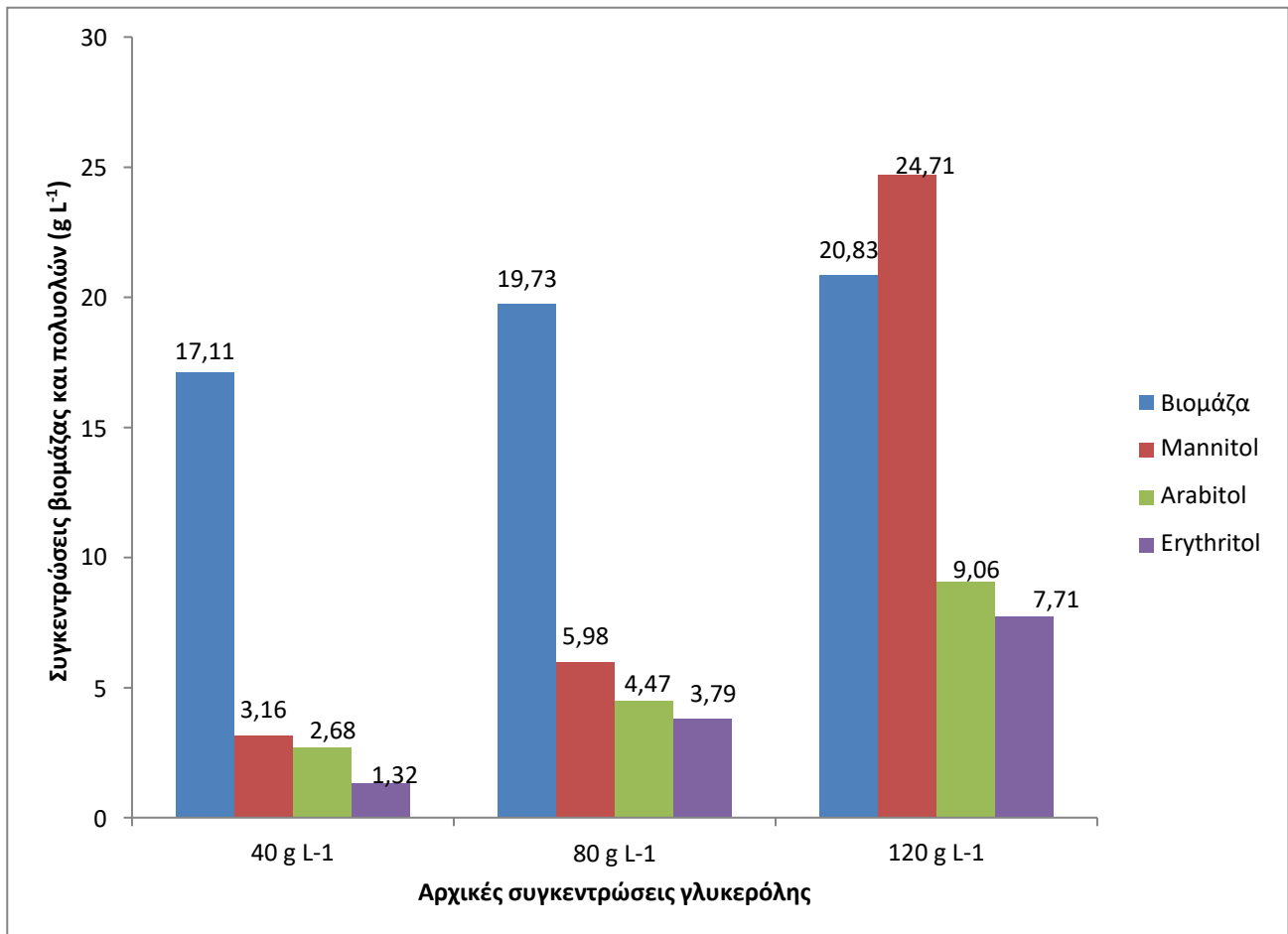
Παρούσα μελέτη	<i>Y lipolytica</i> ACA YC 5030	Flasks, 40 g L ⁻¹ γλυκερόλη (crude), pH 6, 30°C, 80 g L ⁻¹ NaCl	22,17	<u>Mannitol</u> : 0,67 <u>Arabitol</u> : 0,63 <u>Erythritol</u> : 7,04 ΣPolyols: ~9
Παρούσα μελέτη	<i>Y lipolytica</i> ACA YC 5030	Flasks, 120 g L ⁻¹ γλυκερόλη (crude), pH 2, 30°C	19,98	<u>Mannitol</u> : 15,98 <u>Arabitol</u> : 4,72 <u>Erythritol</u> : 9,14 ΣPolyols: ~30
Παρούσα μελέτη	<i>Y. lipolytica</i> NRRL Y- 423	Flasks, 120 g L ⁻¹ γλυκερόλη (crude), pH 2, 30°C	24,71	<u>Mannitol</u> : 24,71 <u>Arabitol</u> : 9,06 <u>Erythritol</u> : 7,71 ΣPolyols: ~33
Παρούσα μελέτη	<i>Y. lipolytica</i> NRRL Y - 423	Flasks, 120 g L ⁻¹ γλυκερόλη (crude), pH 6, 30°C	24,36	<u>Mannitol</u> : 17,35 <u>Arabitol</u> : 7,01 <u>Erythritol</u> : 0 ΣPolyols: ~25

Αναλυτικά, στο πρώτο πειραματικό στάδιο εξετάστηκαν τα δυο στελέχη NRRL Y- 423 και ACA YC - 5030 της ζύμης *Yarrowia lipolytica* στις εξής αρχικές συγκεντρώσεις υποστρώματος: 40 g L⁻¹, 80 g L⁻¹ και 120 g L⁻¹, για δυο τιμές τιμή pH 2 & 6. Τα δύο στελέχη συγκρίθηκαν ως προς την παραγωγή της βιομάζας τους, την παραγωγή τους σε πολυόλες (μαννιτόλη, ερυθριτόλη και αραβιτόλη), ενδοπολυσακχαρίτες και μικροβιακό λίπος. Από τα αποτελέσματα που πάρθηκαν το στέλεχος NRRL Y-423 έδωσε πιο ικανοποιητικές τιμές στα μεγέθη του συνόλου των πολυολών και ιδιαίτερος της μαννιτόλης, σε σχέση με το στέλεχος ACA YC - 5030 που έδωσε κατά ~10 g L⁻¹ χαμηλότερες τιμές στις ίδιες συνθήκες καλλιέργειας. Επιπλέον, στις μετρήσεις της βιομάζας το στέλεχος NRRL Y - 423 φάνηκε να υπερτερεί έναντι του άλλου στελέχους. Τέλος, οι μετρήσεις της ενδοπολυσακχαριτών και μικροβιακού λίπους κινούνταν σε παρόμοια χαμηλά επίπεδα και για τα δύο στελέχη.

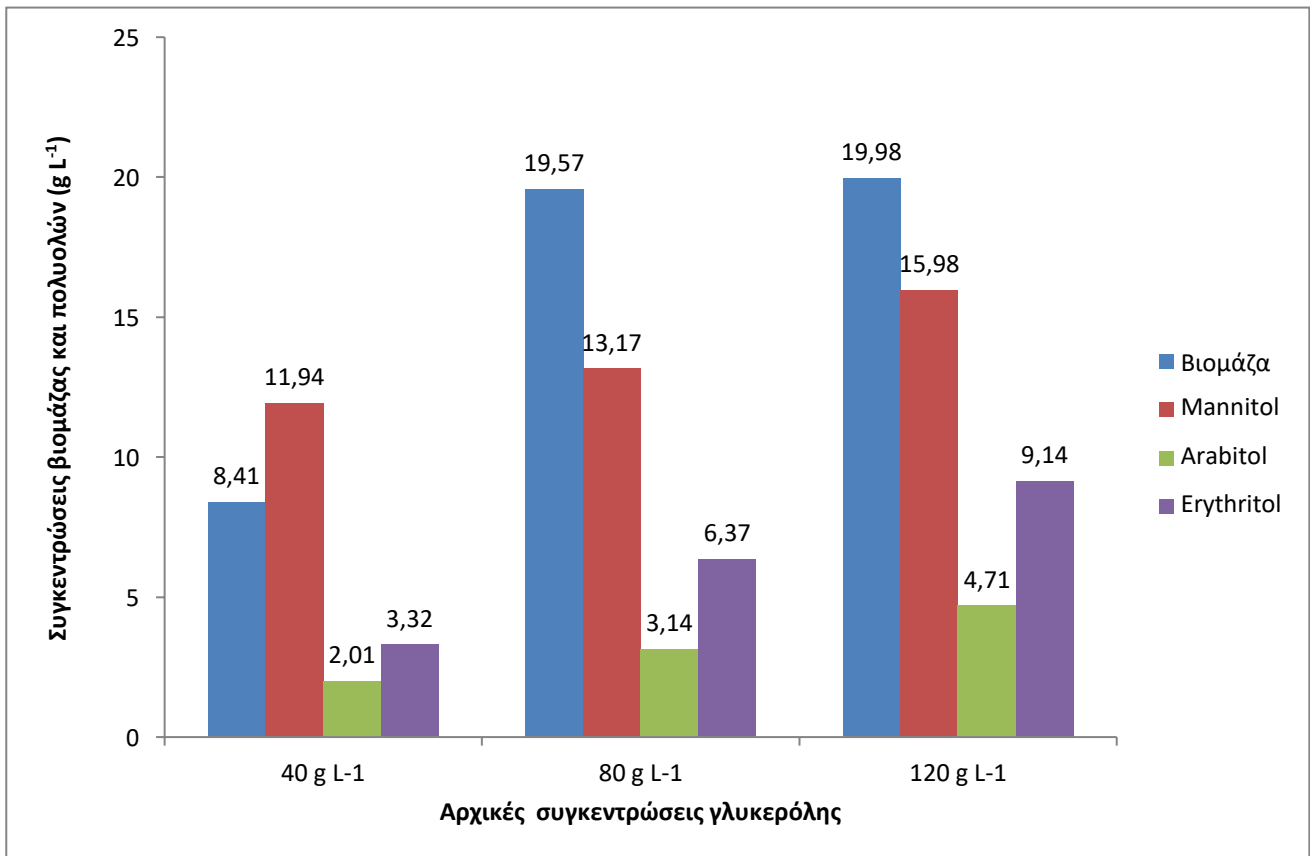
Στα πρώτα στάδια της αύξησης με τον περιορισμό του αζώτου, οι ποσότητες ενδοπολυσακχαριτών ήταν σχεδόν ~0,5 g L⁻¹, γεγονός που συνάδει προς τις θεωρήσεις της βιβλιογραφίας (Ratledge, 1988; Papanikolaou *et al.*, 2011a; 2011b), εφόσον θεωρείται ότι οι πολυσακχαρίτες συσσωρεύονται κατά τη στάσιμη φάση της αύξησης και η συγκέντρωση του αζώτου έχει κατέλθει ενός κρίσιμου ορίου. Ομοίως, στην εξέλιξη των λιπιδίων, παρατηρήθηκε η τάση σύνθεσης κάποιας ποσότητας λιπιδίων στη στάσιμη φάση της αύξησης, όπως ακριβώς αναφέρεται στη βιβλιογραφία, που πάραυτα δεν θεωρείται άξια σχολιασμού.

Αξιοσημείωτη είναι η παραγωγή πολυολών και ιδίως της μαννιτόλης που έφτασε τα $24,71 \text{ g L}^{-1}$ σε pH 2 και σε αρχική συγκέντρωση υποστρώματος 120 g L^{-1} για το στέλεχος NRRL Y-423 μέσα στις 193 ώρες της ζύμωσης, με το σύνολο των πολυολών να φτάνει τα $\sim 33 \text{ g L}^{-1}$. Αντίστοιχα, το στέλεχος ACA YC - 5030 στις 172 ώρες ζύμωσης είχε παράγει $15,98 \text{ g L}^{-1}$ μαννιτόλης και το σύνολο των πολυολών άγγιξε σχεδόν τα $\sim 30 \text{ g L}^{-1}$. Και για τα δύο στελέχη κυρίαρχη πολυόλη ήταν η μαννιτόλη, ενώ ανάλογα το στέλεχος άλλαζε η αύξουσα σειρά για τις επόμενες δυο πολυόλες. Αναλυτικά, αμέσως επόμενη πολυόλη ήταν η ερυθριτόλη με αξιοσημείωτες ποσότητες για το στέλεχος ACA YC - 5030, ενώ για το στέλεχος NRRL Y - 423 ήταν η αραβιτόλη. Μεγάλη στροφή προς την παραγωγή βιομάζας είχαν και τα δυο στελέχη σε συνθήκες υψηλής αρχικής συγκέντρωσης υποστρώματος. Η υψηλότερη τιμή δόθηκε από το στέλεχος ACA YC -5030 με τιμή $\sim 23 \text{ g L}^{-1}$ για τιμή pH 6, ενώ για την ίδια αρχική συγκέντρωση αλλά για διαφορετική τιμή pH 2, έδωσε την μέγιστη ποσότητα βιομάζας το στέλεχος NRRL Y-423 ($\sim 21 \text{ g L}^{-1}$).

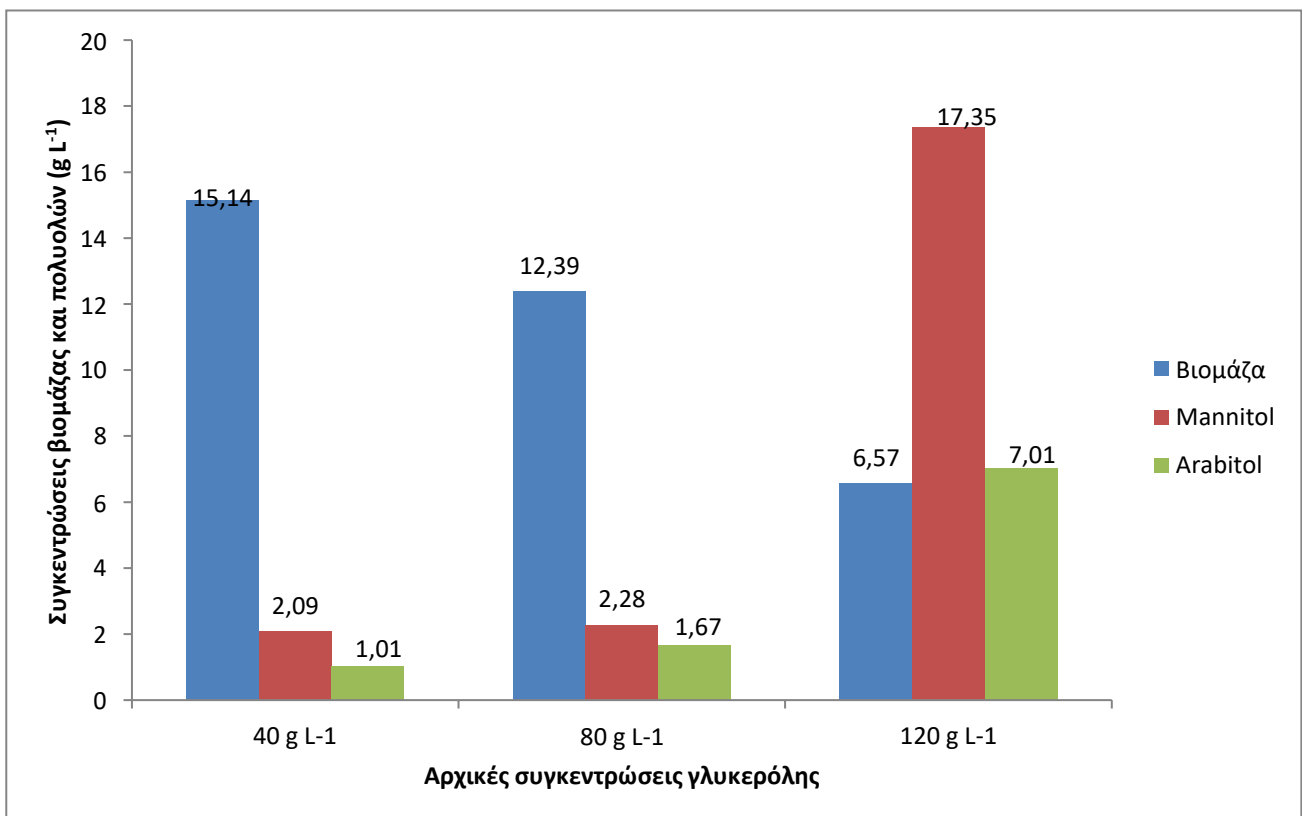
Ακολουθούν ενδεικτικά γραφήματα απεικόνισης της συμπεριφοράς των στελεχών για τα παραγόμενα προϊόντα στις αυξανόμενες συγκεντρώσεις αρχικού υποστρώματος σε συνδυασμό με τις διαφορετικές τιμές pH.



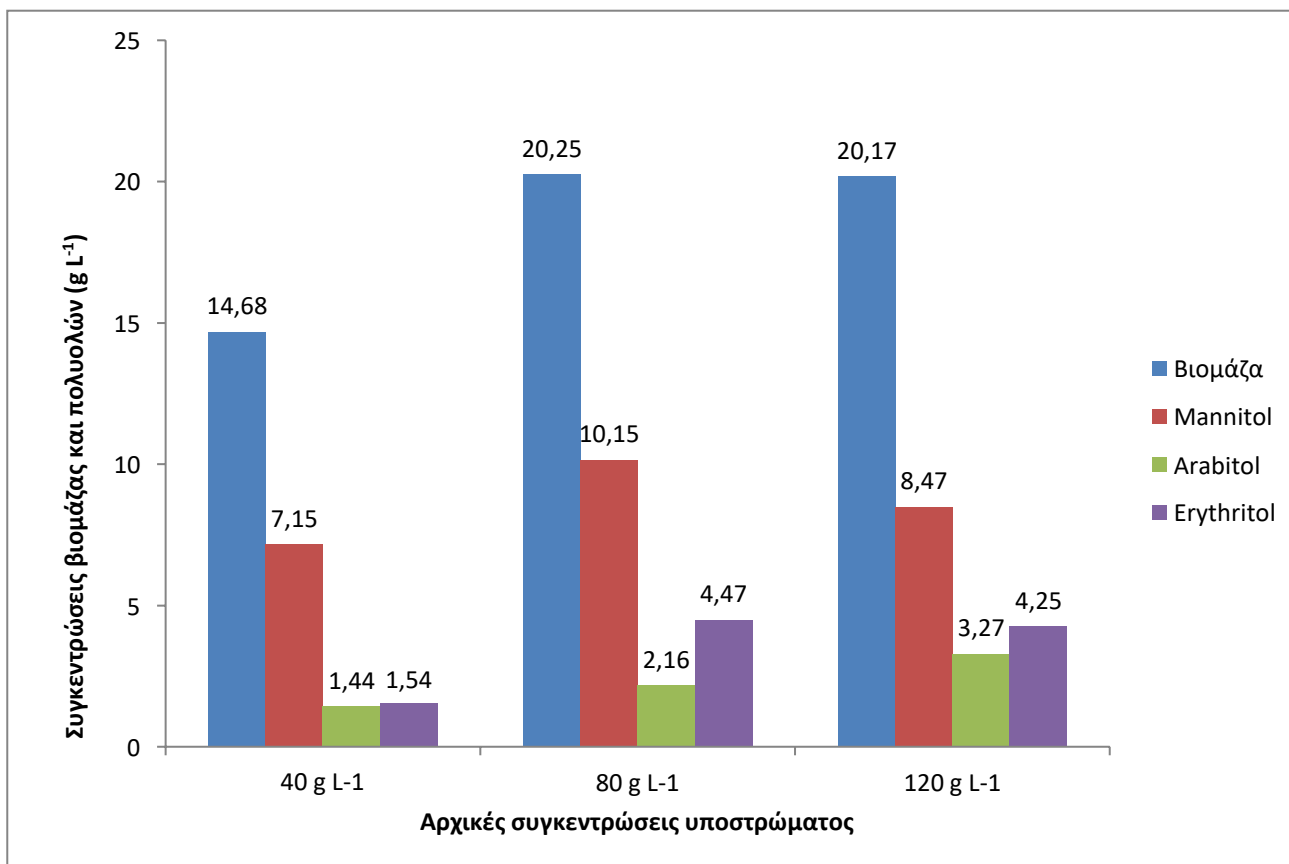
Γράφημα 11. Ποσότητες παραγόμενων μεταβολικών προϊόντων, σε διαφορετικές αρχικές συγκεντρώσεις ακάθαρτης γλυκερόλης για το στέλεχος NRRL Y - 423 σε χαμηλό pH 2.



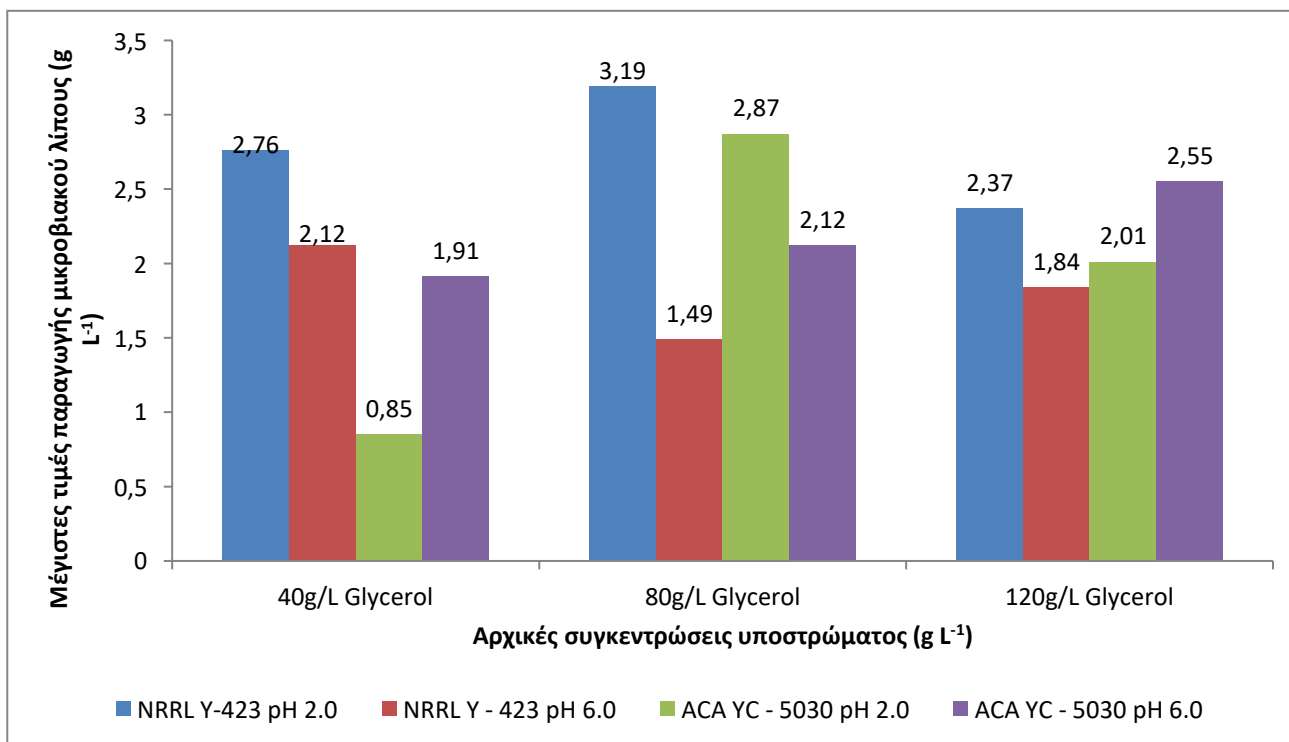
Γράφημα 12. Ποσότητες παραγόμενων μεταβολικών προϊόντων, σε διαφορετικές αρχικές συγκεντρώσεις ακάθαρτης γλυκερόλης για το στέλεχος ACA YC - 5030 σε χαμηλό pH 2.



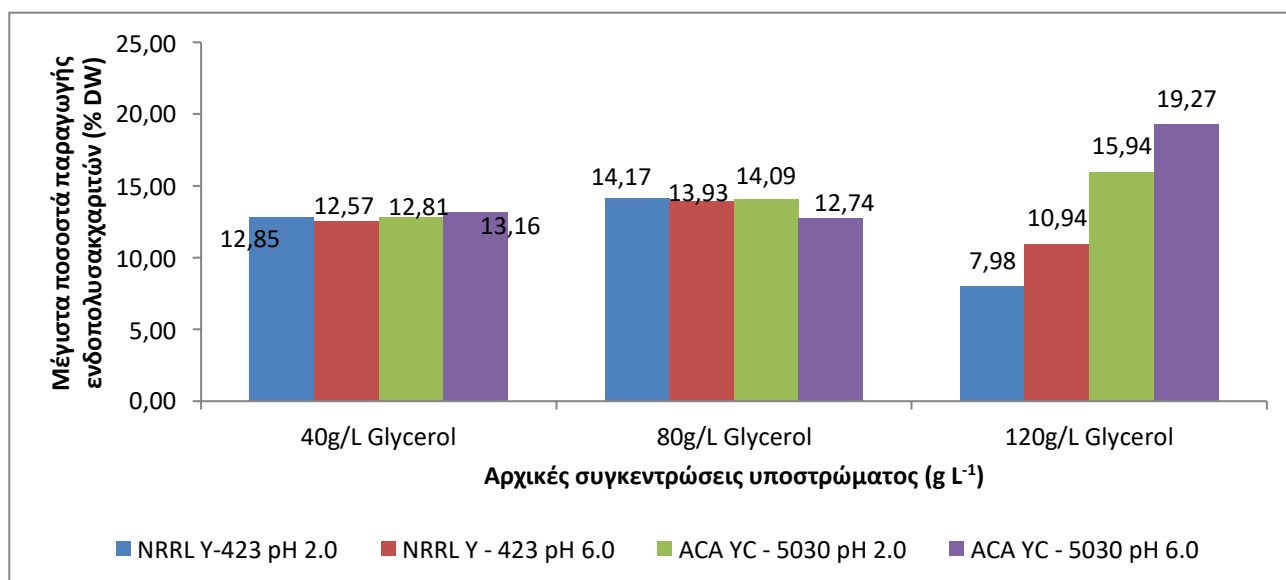
Γράφημα 13. Ποσότητες παραγόμενων μεταβολικών προϊόντων, σε διαφορετικές αρχικές συγκεντρώσεις ακάθαρτης γλυκερόλης για το στέλεχος NRRL Y - 423 σε pH 6.



Γράφημα 14. Ποσότητες παραγόμενων μεταβολικών προϊόντων, σε διαφορετικές αρχικές συγκεντρώσεις ακάθαρτης γλυκερόλης για το στέλεχος ACA YC - 5030 σε χαμηλό pH 6.



Γράφημα 15. Μέγιστες τιμές μικροβιακού λίπους των δυο στελεχών σε διαφορετικές συγκεντρώσεις αρχικού υποστρώματος γλυκερόλης σε συνθήκες χαμηλού και υψηλού pH.



Γράφημα 16. Μέγιστες τιμές ενδοπολυσακχαριτών των δυο στελεχών σε διαφορετικές συγκεντρώσεις αρχικού υποστρώματος γλυκερόλης σε συνθήκες χαμηλού και υψηλού pH.

Συμπεραίνεται από το πρώτο πείραμα πως και τα δυο στελέχη:

- ✓ Αντέδρασαν ικανοποιητικά ως προς την κατανάλωση του βιομηχανικού υποστρώματος ακάθαρτης γλυκερόλης.
- ✓ Δεν στάθηκαν ικανά ώστε να παραχθούν ικανοποιητικές ποσότητες μικροβιακού λίπους ούτε και επαρκής ποσότητες ενδοπολυσακχαριτών.
- ✓ Παρήχθησαν ικανοποιητικές και με το παραπάνω ποσότητες ξηρής βιομάζας.
- ✓ Καταναλώθηκε πλήρως το υπόστρωμα και παρήχθησαν πολυόλες σε υψηλές συγκεντρώσεις (κυρίως μαννιτόλη).

Πιο αναλυτικά, για την συμπεριφορά του κάθε στελέχους ξεχωριστά κάτω από συνθήκες αύξησης της συγκέντρωσης της αρχικής ποσότητας γλυκερόλης προέκυψαν τα ακόλουθα συμπεράσματα.

Για το στέλεχος NRRL Y – 423:

- ✓ Όσο μεγαλύτερη η αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης, τόσο αυξάνεται η συγκέντρωση της βιομάζας.
- ✓ Αύξηση του συνόλου των πολυολών όσο και μεμονωμένη αύξηση κάθε πολυόλης ξεχωριστά επιτεύχθηκε με την αύξηση της αρχικής συγκέντρωσης υποστρώματος.
- ✓ Με την αύξηση του pH στο 6 και συγχρόνως με την αύξηση του υποστρώματος παρατηρήθηκε μείωση της ποσότητας της παραγόμενης ερυθριτόλης έως και να μην παραχθεί καθόλου σε

συγκεντρώσεις αρχικού υποστρώματος άνω 40 g L^{-1} , σε αντίθεση με τις άλλες δυο πολυόλες που αυξανόταν η ποσότητα τους με την αύξηση του υποστρώματος, αλλά όχι περισσότερο από τις τιμές που έφτασαν στο pH 2.

- ✓ Στις ίδιες συνθήκες καλλιέργειας, αυξανόμενης συγκέντρωσης γλυκερόλης, αλλά σε χαμηλό pH η παραγωγή βιομάζας είναι μεγαλύτερη.

Για το στέλεχος ACA YC – 5030:

- ✓ Όσο μεγαλύτερη η αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης, τόσο αυξάνεται η συγκέντρωση της βιομάζας.
- ✓ Αύξηση του συνόλου των πολυολών όσο και μεμονωμένη αύξηση κάθε πολυόλης ξεχωριστά επιτεύχθηκε με την αύξηση της αρχικής συγκέντρωσης υποστρώματος.
- ✓ Αυξάνοντας την αρχική συγκέντρωση παρατηρήθηκαν υψηλότερες ποσότητες ερυθριτόλης και μαννιτόλης όταν το pH ήταν 2, σε αντίθεση με την αραβιτόλη που παρουσίασε τις υψηλότερες ποσότητες της σε pH 6.
- ✓ Η ερυθριτόλη και η μαννιτόλη παρουσίασαν μείωση στην ταυτόχρονη αύξηση pH και συγκέντρωσης αρχικού υποστρώματος, σε αντίθεση με την αραβιτόλη που αυξανόταν όσο υπήρχε συγχρόνως αύξηση pH και αρχικού υποστρώματος.
- ✓ Στις δυο υψηλότερες συγκεντρώσεις υποστρώματος και παρόλη την αυξομείωση της κάθε πολυόλης χωριστά, το συνολικό ποσό των πολυολών έμεινε σχεδόν σταθερό ($\sim 17 \text{ g L}^{-1}$) για pH 6.

Στο δεύτερο στάδιο πειραμάτων πραγματοποιήθηκαν ζυμώσεις αρχικής συγκέντρωσης υποστρώματος 40 g L^{-1} σε pH 2 & 6. Σε υγρές κλειστές καλλιέργειες, μελετήθηκε η συμπεριφορά των στελεχών της ζύμης παρουσία χλωριούχου νατρίου NaCl σε συγκεντρώσεις 10 g L^{-1} , 30 g L^{-1} , 50 g L^{-1} και 80 g L^{-1} .

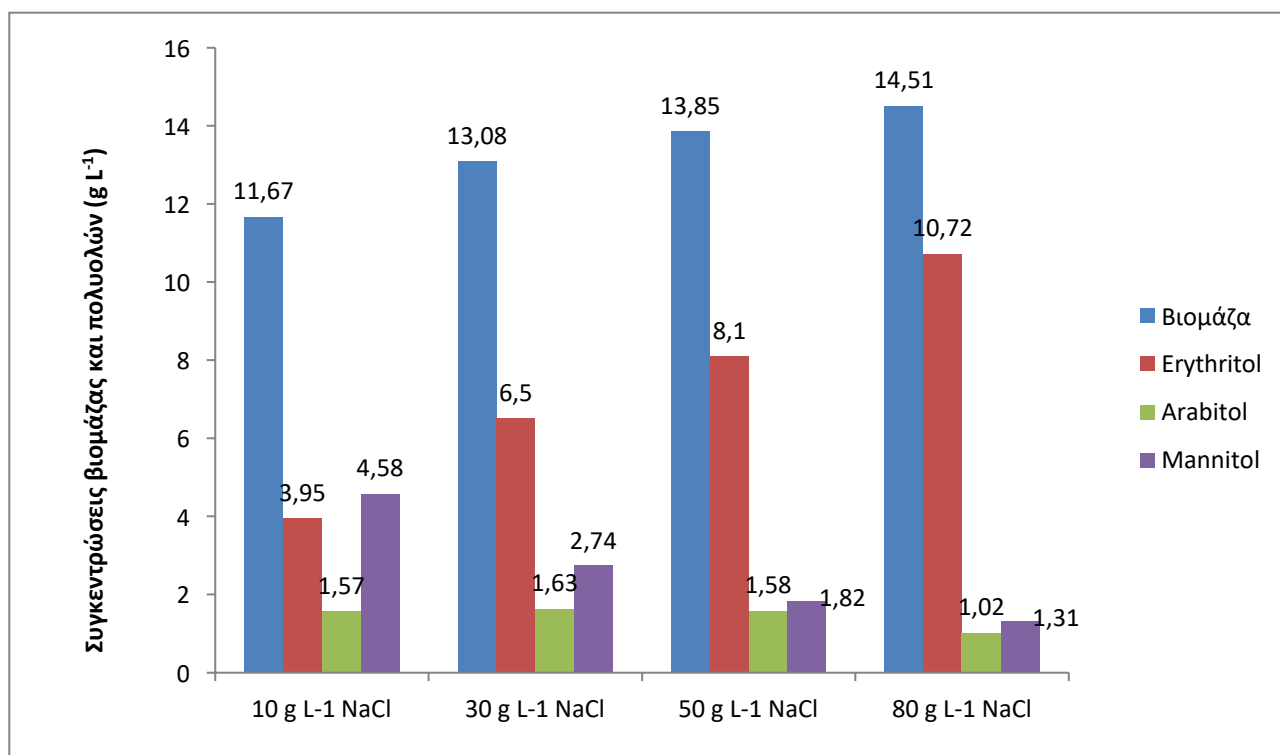
Τα δύο στελέχη συγκρίθηκαν ως προς την παραγωγή της βιομάζας τους, την παραγωγή τους σε πολυόλες (μαννιτόλη, ερυθριτόλη και αραβιτόλη), ενδοπολυσακχαρίτες και μικροβιακό λίπος.

Σε γενικές γραμμές και για τα δυο στελέχη, συμπεραίνεται από την δεύτερη πειραματική προσέγγιση με την προσθήκη χλωριούχου νατρίου πως:

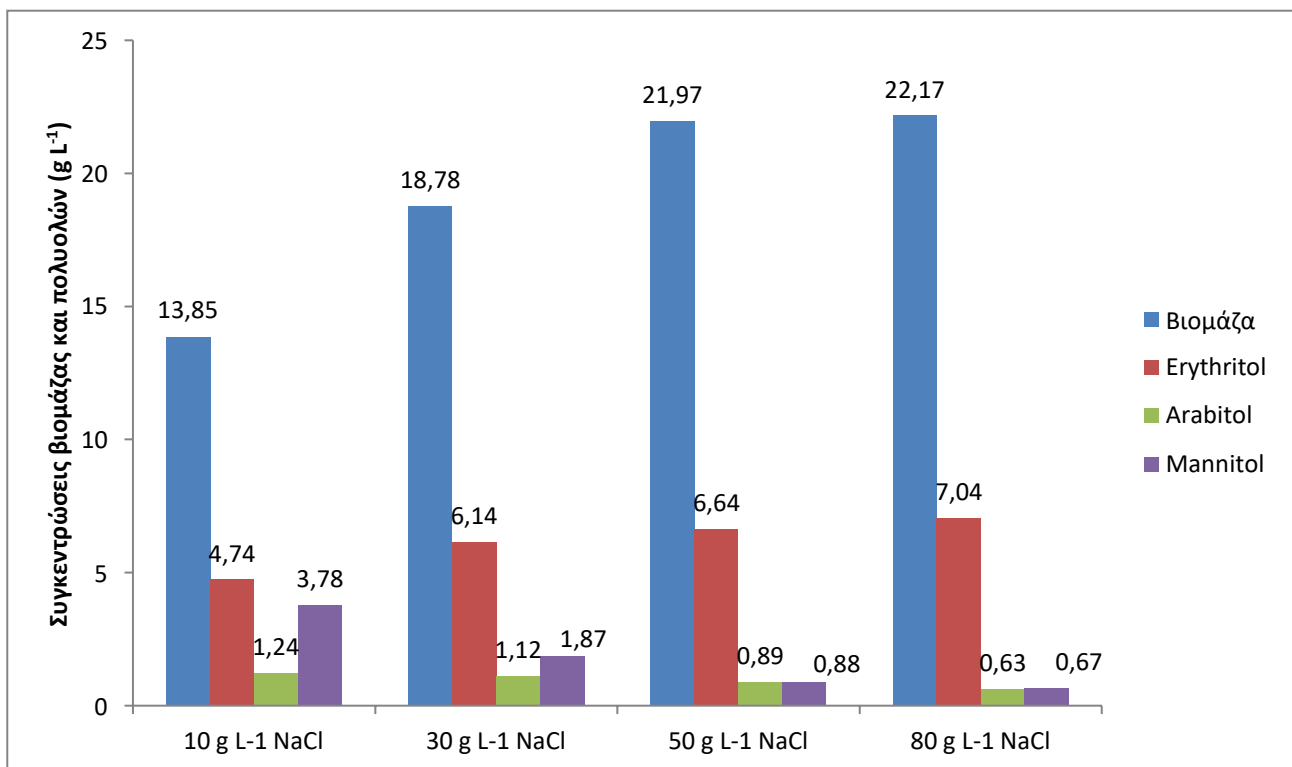
- ✓ Δεν κατάφεραν και τα δυο στελέχη να αναπτυχθούν πλήρως στην παρουσία χλωριούχου νατρίου και στις δυο τιμές pH.

- ✓ Αντέδρασαν με επιβράδυνση στον χρόνο καταναλώσεως της γλυκερόλης, με την αύξηση της συγκέντρωσης του χλωριούχου νατρίου NaCl (10 g L⁻¹, 30 g L⁻¹, 50 g L⁻¹ και 80 g L⁻¹), όσο μεγαλύτερη η συγκέντρωση χλωριούχου νατρίου, τόσο μεγαλύτερη ήταν η επιβράδυνση καταναλώσεως του υποστρώματος.
- ✓ Οι ποσότητες ενδοπολυσακχαριτών και μικροβιακού λίπους παραμένουν σταθερές και ελάχιστες με την αύξηση της συγκέντρωσης του χλωριούχου νατρίου NaCl στο υγρό μέσο των ζυμώσεων.
- ✓ Αξιοσημείωτη παραγωγή ερυθριτόλης παρατηρήθηκε με την αύξηση της συγκέντρωσης του χλωριούχου νατρίου NaCl. Φτάνοντας τη μέγιστη τιμή των 10,72 g L⁻¹ σε αρχική συγκέντρωση υποστρώματος 40 g L⁻¹ και παρουσία NaCl 80 g L⁻¹ για το στέλεχος ACA YC – 5030.

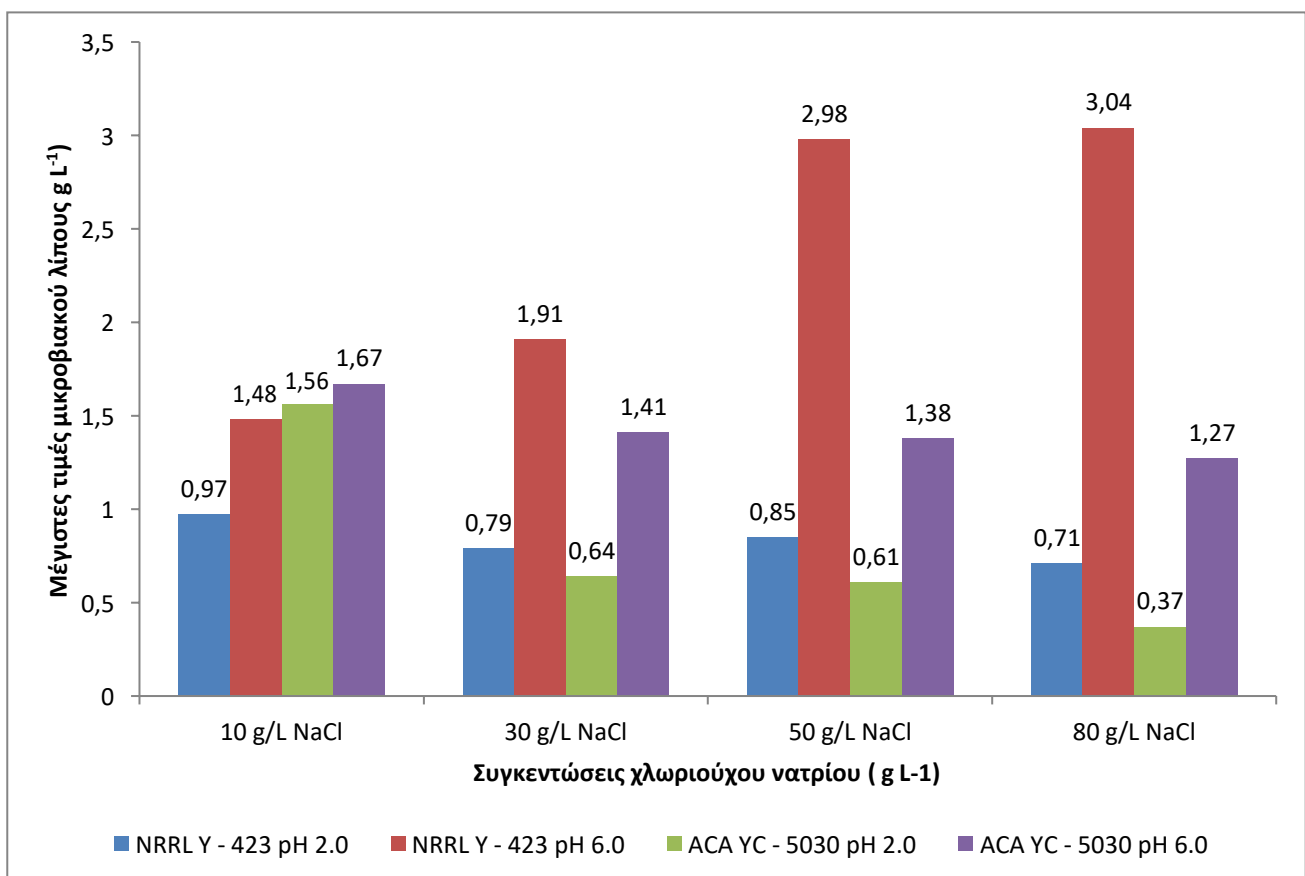
Ακολουθούν ενδεικτικά γραφήματα απεικόνισης της συμπεριφοράς του στελέχους ACA YC - 5030 ύστερα από την προσθήκη αυξανόμενων συγκεντρώσεων χλωριούχου νατρίου σε συνδυασμό με τις διαφορετικές τιμές pH.



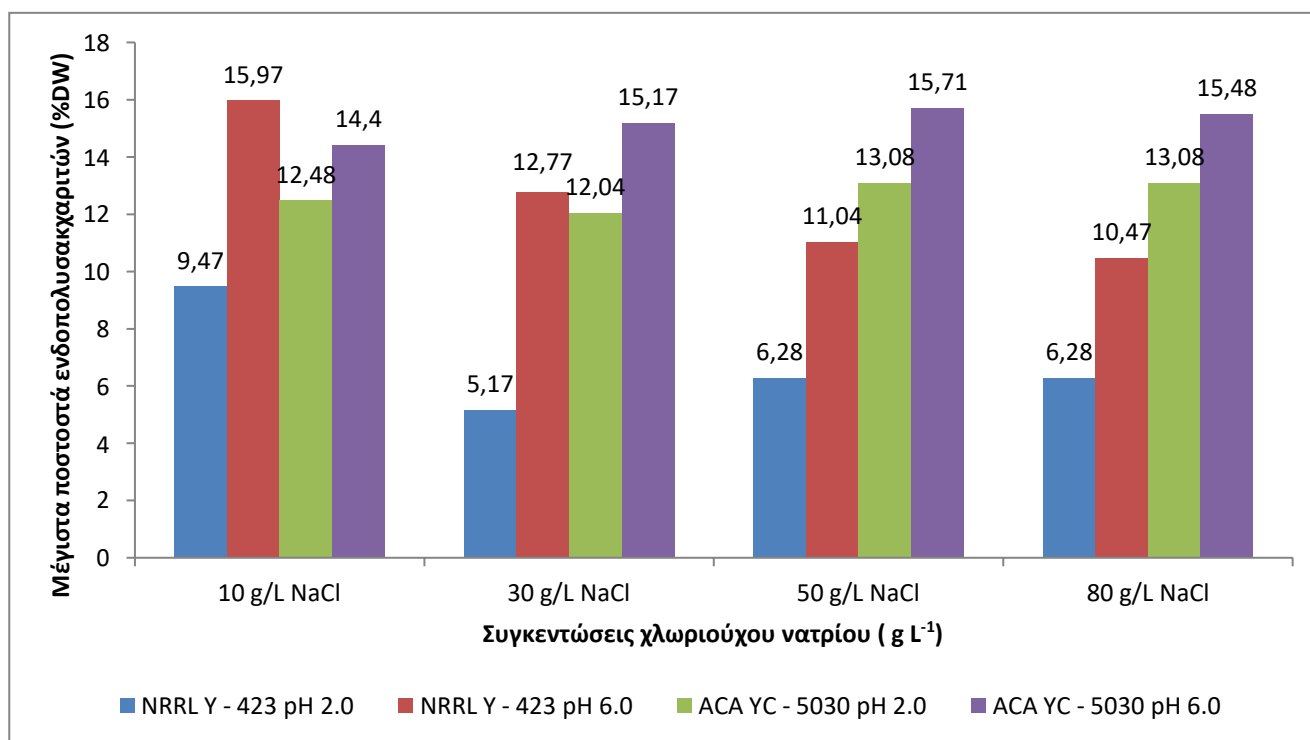
Γράφημα 17. Ποσότητες παραγόμενων μεταβολικών προϊόντων, σε διαφορετικές συγκεντρώσεις χλωριούχου νατρίου για το στέλεχος ACA YC - 5030 σε χαμηλό pH 2 με αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης 40 g L⁻¹.



Γράφημα 18. Ποσότητες παραγόμενων μεταβολικών προϊόντων, σε διαφορετικές συγκεντρώσεις χλωριούχου νατρίου για το στέλεχος ACA YC - 5030 σε υψηλό pH 6 με αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης 40 g L⁻¹.



Γράφημα 19. Μέγιστες ποσότητες μικροβιακού λίπους που παρήχθησαν και από τα δυο στελέχη σε διαφορετικές συγκεντρώσεις χλωριούχου νατρίου για υψηλές και χαμηλές τιμές pH.



Γράφημα 20. Μέγιστα ποσοστά ενδοπολυσακχαριτών των δυο στελεχών σε διαφορετικές συγκεντρώσεις χλωριούχου νατρίου σε συνθήκες χαμηλού και υψηλού pH.

Αναλυτικά προέκυψαν τα ακόλουθα συμπεράσματα για την συμπεριφορά του κάθε στελέχους στην προσθήκη αυξανόμενων συγκεντρώσεων χλωριούχου νατρίου.

Για το στέλεχος NRRL Y – 423:

- ✓ Όσο μεγαλύτερη η συγκέντρωση NaCl, τόσο μειώνεται η συγκέντρωση της βιομάζας.
- ✓ Μεγαλύτερο pH, υψηλότερη τιμή βιομάζας για χαμηλή συγκέντρωση χλωριούχου νατρίου.
- ✓ Σε χαμηλό pH και όσο μεγαλύτερη είναι η προσθήκη χλωριούχου νατρίου, δεν καταναλώνεται πλήρως το υπόστρωμα της γλυκερόλης, σε ποσοστό που δεν ξεπερνά ούτε το 50% αρχικού υποστρώματος.
- ✓ Αξιοσημείωτη παραγωγή ερυθριτόλης δεν επηρεάζεται από χαμηλό pH και τις υψηλές συγκεντρώσεις NaCl.
- ✓ Υψηλό pH και αύξηση ποσότητας χλωριούχου νατρίου κρατά σταθερή την ποσότητα παραγόμενης ερυθριτόλης (~7 g L⁻¹).
- ✓ Μείωση ποσοτήτων αραβιτόλης και μαννιτόλης με την προσθήκη μεγαλύτερων συγκεντρώσεων χλωριούχου νατρίου σε χαμηλό pH.
- ✓ Ανύπαρκτες ποσότητες αραβιτόλης και μαννιτόλης σε συγκεντρώσεις 50 g L⁻¹ & 80 g L⁻¹ για τιμή pH 6.

Για το στέλεχος ACA YC – 5030:

- ✓ Καταναλώνεται πλήρως η γλυκερόλη σε όλες τις συνθήκες στρες που εκτέθηκε το στέλεχος με την προσθήκη διαφορετικών συγκεντρώσεων χλωριούχου νατρίου σε συνδυασμό χαμηλού και υψηλού pH.
- ✓ Όσο μεγαλύτερη η αρχική συγκέντρωση NaCl, τόσο αυξάνεται η συγκέντρωση της βιομάζας.
- ✓ Σε συνθήκες χαμηλού pH και συγχρόνως υψηλής ποσότητας NaCl, αυξάνεται αισθητά η παραγωγή της ερυθριτόλης.
- ✓ Αντιθέτως, σε χαμηλό pH η παραγωγή μαννιτόλης μειώνεται όσο προστίθενται μεγάλες συγκεντρώσεις χλωριούχου νατρίου στο μέσο της καλλιέργειας.
- ✓ Η αραβιτόλη σε χαμηλό pH δεν μεταβάλλει ιδιαίτερος την παραγωγικότητα της με την προσθήκη υψηλών συγκεντρώσεων χλωριούχου νατρίου, εν αντιθέσει με τις συνθήκες υψηλού pH που ακολουθεί πτωτική πορεία ως προς την παραγωγικότητας της, σε συνάρτηση με τις υψηλές συγκεντρώσεις χλωριούχου νατρίου.

Σαν γενικό συμπέρασμα για την σύγκριση των αποτελεσμάτων των πειραμάτων του πρώτου σταδίου (αρχικού υποστρώματος S_0 40, 80 & 120 g L⁻¹, pH 2 & 6, απουσίας NaCl) και του δεύτερου σταδίου (αρχικού υποστρώματος S_0 40 g L⁻¹, pH 2 & 6, παρουσίας NaCl σε συγκεντρώσεις 10 g L⁻¹, 30 g L⁻¹, 50 g L⁻¹ και 80 g L⁻¹), δεικνύεται ότι:

- Παρουσιάστηκε αύξηση στη παραγωγή ξηρής βιομάζας με την προσθήκη χλωριούχου νατρίου για το στέλεχος ACA YC -5030 με αρχικό υπόστρωμα 40 g L⁻¹, παρουσίας 80 g L⁻¹ NaCl. Να σημειωθεί ότι στο αντίστοιχο πείραμα του πρώτου σετ πειραμάτων, όμοιων επικρατουσών συνθηκών αλλά απουσίας NaCl η υψηλότερη τιμή παραγόμενης βιομάζας ήταν 20,17 g L⁻¹ για το ίδιο στέλεχος.
- Στη παραγωγή πολυολών (μαννιτόλη, ερυθριτόλη και αραβιτόλη) παρατηρήθηκε μια εύνοια στο συνολικό άθροισμά τους, όταν δεν υπήρχε στο υγρό μέσο των ζυμώσεων χλωριούχο νάτριο NaCl. Σε αντίθεση με την ερυθριτόλη που η παρουσία χλωριούχου νατρίου βοήθησε την παραγωγικότητας της. Να σημειωθεί ότι ήταν αξιοσημείωτη η αύξηση της ερυθριτόλης και η μείωση της μαννιτόλης και αραβιτόλης με την προσθήκη χλωριούχου νατρίου.
- Η παραγωγή των μεταβολικών προϊόντων αυξάνεται, όσο αυξάνεται και η αρχική συγκέντρωση του υποστρώματος.

- Το pH επηρεάζει την παραγωγικότητα των πολυολών, καθώς όσο χαμηλότερη η τιμή του, τόσο μεγαλύτερες οι συγκεντρώσεις των συνολικά παραγόμενων πολυολών. Γεγονός που συμπίπτει με την βιβλιογραφία. Αντιθέτως, η παραγωγή της βιομάζας αυξάνεται κατακόρυφα στις περιπτώσεις που το pH είναι υψηλό, στοιχείο που υποδηλώνει ότι ο μεταβολισμός κάνει στροφή από την παραγωγή των πολυολών.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Aggelis G., Sourdis J., Prediction of lipid accumulation-degradation in oleaginous micro-organisms growing on vegetable oils. *Antonie van Leeuwenhoek*, 72:159–165 (1997).
- André A., Chatzifragkou A., Diamantopoulou P., Sarris D., Philippoussis A., Galiotou-Panayotou M., Papanikolaou S., Biotechnological conversions of bio-diesel derived crude glycerol by *Yarrowia lipolytica* strains. *Engineering in Life Sciences*, 9:468-478 (2009).
- Aro E.M., From first generation biofuels to advanced solar biofuels. *Ambio*, 45:24-31 (2016).
- Argyropoulos D., Psallida C., Sitareniou P., Flemetakis E., Diamantopoulou P., Biochemical evaluation of *Agaricus* and *Pleurotus* strains in batch cultures for production optimization of valuable metabolites. *Microorganisms*, 10:964, (2022).
- Barth G., Gaillardin C., *Yarrowia lipolytica* in nonconventional yeasts in biotechnology. *Advances in bioscience and biotechnology*, 1:313-388 (1996).
- Barth G., Claude G., Physiology and genetics of the dimorphic fungus *Yarrowia lipolytica*. *FEMS microbiology*, 19:219-37 (1997).
- Beopoulos A., Julien C., Ramdane H., Jean L., Carole M., Nicaud J., *Yarrowia lipolytica* as a model for bio-Oil production. *Progress in lipid research*, 48:375-387, (2009).
- Beopoulos A., Chardot T., Nicaud J. M., *Yarrowia lipolytica* a model and a tool to understand the mechanisms implicated in lipid accumulation. *Biochimie*, 91:692-696 (2009).
- Beopoulos A., Ramdane H., Identification and characterization of DGA2, an acyltransferase of the DGAT1 acyl-CoA : diacylglycerol acyltransferase family in the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica*. *New Insights into the storage lipid metabolism of oleaginous yeasts*, 93:1523-1537 (2012).
- Birch G., Carbohydrate chemistry for food scientists. In *Food Chemistry*, 3441-3447 (1997).
- Botham P. A., Ratledge C., A biochemical explanation for lipid accumulation in *Candida* 107 and other oleaginous micro-organisms. *Journal of general microbiology*, 114:4 (1979).
- Chambers J, Isak S., Fermenting knowledge: the history of winemaking, science and yeast research. *EMBO*, 11:914-920 (2010).
- Chatzifragkou A., Makri A., Belka A., Bellou S., Mavrou M., Mastoridou M., Mystrioti P., Onjaro G., Aggelis G., Papanikolaou. S., Biotechnological conversions of biodiesel derived waste glycerol by yeast and fungal species. *Elsevier*, 36:1097-1108 (2011).
- Chatzifragkou A., Papanikolaou S., Effects of impurities in biodiesel derived waste glycerol on the performance and feasibility of biotechnological processes. *Applied microbiology and biotechnology*, 95:13-27 (2012).

- Courchesne N. M. D., Parisien A., Wang B., Lan C. Q., Enhancement of lipid production using biochemical, genetic and transcription factor engineering approaches. *Journal of biotechnology*, 141:31-41 (2009).
- Darvishi F., Fathi Z., Ariana M., Moradi H., *Yarrowia lipolytica* as a workhorse for biofuel production. *Biochemical engineering journal*, 127:87-96 (2017).
- Diamantopoulou P., Papanikolaou S., Kapoti M., Komaitis M., Aggelis G., Philippoussis A., Mushroom polysaccharides and lipids synthesized in liquid agitated and static cultures. Part I: Screening various mushroom species. *Applied biochemistry and biotechnology*, 167:536-51 (2012a).
- Diamantopoulou P., Papanikolaou S., Katsarou E., Komaitis M., Aggelis G., Philippoussis A., Mushroom polysaccharides and lipids synthesized in liquid agitated and static cultures. Part II: Study of *Volvariella volvacea*. *Applied biochemistry and biotechnology*, 167:1890-906 (2012b).
- Diamantopoulou P., Papanikolaou S., Komaitis M., Aggelis G., Philippoussis A., Patterns of major metabolites biosynthesis by different mushroom fungi grown on glucose-based submerged cultures. *Bioprocess and biosystems engineering*, 37:1385-400 (2014).
- Dobroth Z. T., Hu S., Coats E. R., McDonald A. G., Polyhydroxybutyrate synthesis on biodiesel wastewater using mixed microbial consortia. *Bioresource technology*, 102:3352-9 (2011).
- Dourou M., Mizerakis P., Papanikolaou S., Aggelis G., Storage lipid and polysaccharide metabolism in *Yarrowia lipolytica* and *Umbelopsis isabellina*. *Applied microbiology and biotechnology*, 101:7213-7226 (2017).
- Fickers P., Benetti P.H., Wache Y., Marty A., Mauersberger S., Smit M, Nicaud J-M., Hydrophobic substrate utilization by the yeast *Yarrowia lipolytica*, and its potential applications. *FEMS yeast research*, 5:527-43 (2005).
- Folch J., Lees M., Stanley G. H. S., A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journal of biological chemistry*, 226:497-509 (1957).
- Gern R.M.M., Wisbeck E., Rampinelli J.R., Ninow J.L., Furlan S.A., Alternative medium for production of *Pleurotus ostreatus* biomass and potential antitumor polysaccharides. *Bioresource technology*, 99:76-82 (2008).
- Groenewald M., Teun B., Cécile N., Claude G., Piet W.M. Van D., Markus W., *Yarrowia lipolytica*: Safety assessment of an oleaginous yeast with a great industrial potential. *Critical reviews in microbiology*, 40:187-206 (2014).
- Holzschu D.L., Chandler F.W., Ajello L. & Ahearn, D.G., Evaluation of industrial yeasts for pathogenicity. *Sabouraudia*, 17:71-8 (1979).
- Jiang M., Wang B., Yang L., Lin S., Cheng H., Microbiological purification of L-arabitol from xylitol mother liquor. *Journal of microbiology and biotechnology*, 21:43-9 (2011).

- Kamzolova S.V., Finogenova T.V., Morgunov I.G., Chernyvskaia O.G., Organic acid production by the yeast *Yarrowia lipolytica*: A review of prospects, 41:418-425 (2005).
- Kamzolova S.V., Finogenova T.V., Lunina Yu. N., Characteristics of the growth on rapeseed oil and synthesis of citric and isocitric acids by *Yarrowia lipolytica* yeasts. Microbiology, 76:26-31 (2007).
- Kamzolova S. V., Lunina J. N., & Morgunov I. G., Biochemistry of citric acid production from rapeseed oil by *Yarrowia lipolytica* yeast. Journal of the American oil chemists' society, 97:9133-44 (2011).
- Koganti S., Kuo T. M., Kurtzman C. P., Smith N., Ju L. K., Production of arabitol from glycerol: Strain screening and study of factors affecting production yield. Applied microbiology and biotechnology, 90:257-67 (2011).
- Lages, F., & Lucas, C., Contribution to the physiological characterization of glycerol active uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. Biochimica et biophysica acta – bioenergetics, 1322:8-18 (1997).
- Lazar Z., Thierry D., Cécile N., Crutz-Le C., Nicaud N., Hexokinase - a limiting factor in lipid production from fructose in *Yarrowia lipolytica*. Metabolic engineering, 26:89-99 (2014).
- Lazar Z., Nian L., Stephanopoulos G., Holistic approaches in lipid production by *Yarrowia lipolytica*. Trends in biotechnology, 37:51-630 (2018).
- Liang Y., Sarkany N., Cui Y.: Biomass and lipid productivities of *Chlorella vulgaris* under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic growth conditions. Biotechnology Letters, 31:1043-9 (2009).
- Liu H., Xiao-jun J., Huang H., Biotechnological applications of *Yarrowia Lipolytica*. Past, present and future. biotechnology advances, 33:1522-46 (2015).
- Liu N., Kangjian Q., Stephanopoulos G., Metabolic flux analysis of acetate conversion to lipids by *Yarrowia lipolytica*. Metabolic engineering, 38:86-97 (2016).
- Liu Q., Wang S. C., Ding K., Research advances in the treatment of alzheimer's disease with polysaccharides from traditional Chinese medicine. Chinese journal of natural medicines, 15:641-652 (2017).
- Makri A., Fakas S., Aggelis G., Metabolic activities of biotechnological interest in *Yarrowia lipolytica* grown on glycerol in repeated batch cultures. Bioresource technology, 101:2351-8 (2010).
- Miao X., Wu Q., Wu G., Zhao N., Sucrose accumulation in salt-stressed cells of agp gene deletion-mutant in cyanobacterium *Synechocystis sp.* FEMS microbiology letters, 218:71-77 (2003).
- Miller G. L., Use of Dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Analytical chemistry, 31:426-428 (1959).

- Mirończuk M, Biegalska A., Dobrowolski D., Biotechnology for biofuels functional overexpression of genes involved in erythritol synthesis in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Biotechnology for biofuels*, 10:77 (2017).
- Monteiro M., Kugelmeier C., Pinheiro R., Otávio M., Silva C., Glycerol from biodiesel production: technological paths for sustainability. *Renewable and sustainable energy reviews*, 88:109-122 (2018).
- Ni Y., Springer M. J., Guo J., Finger-Baker I., Wilson J. P., Cobb R. R., Tizard I., Development of a synthetic Vi polysaccharide vaccine for typhoid fever. *Vaccine*, 3:7121-7126 (2017).
- Nicaud J., *Yarrowia lipolytica*. *Yeast*, 10:409-418 (2012).
- Pagliari M., Ciriminna R., Kimura H., Rossi M., Della Pina C., From glycerol to value-added products. *Angewandte chemie international edition*, 46:4434-4440 (2007).
- Pagliari M., Rossi M., New usages for a versatile raw material. *The future of glycerol*, 1:653-653 (2008).
- Pagliari M., Rossi M.: *Glycerol: properties and production. The future of glycerol*, 111:788-799 (2010).
- Papanikolaou S., Fakas S., Fick M., Chevalot I., Galiotou-Panayotou M., Komaitis M., Marc I., Aggelis, G., Biotechnological valorisation of raw glycerol discharged after bio-diesel (fatty acid methyl-esters) manufacturing process: production of 1,3-propanediol, citric acid and single cell oil. *Biomass and bioenergy*, 14:04 (2008).
- Papanikolaou S., Microbial conversion of glycerol into 1,3-propanediol: glycerol assimilation, biochemical events related with 1,3-propanediol biosynthesis and biochemical engineering of the process. *Nova science publishers Inc*, 137-168(2009).
- Papanikolaou S., Aggelis G., Biotechnological valorization of biodiesel derived glycerol waste through production of single cell oil and citric acid by *Yarrowia lipolytica*. *Lipid Technology*, 21:83-87 (2009).
- Papanikolaou S., Aggelis G., *Yarrowia lipolytica*: A model microorganism used for the production of tailor-made lipids. *European journal of lipid science and technology*, 112:639-654 (2010).
- Papanikolaou S., Aggelis G., Lipids of oleaginous yeasts. Part I: Biochemistry of single cell oil production. *European journal of lipid science and technology*, 113:1031-1051 (2011a).
- Papanikolaou S., Aggelis G., Lipids of oleaginous yeasts. Part II: Technology and potential applications. *European journal of lipid science and technology*, 113:1052-1073 (2011b).
- Papanikolaou S., Aggelis G., Sources of microbial oils with emphasis to *Mortierella (Umbelopsis) isabellina* fungus. *World journal of microbiology and biotechnology*, 35:1-19 (2019).

Paramithiotis S., Müller M.A., Ehrmann M., Tsakalidou E., Seiler H., Vogel T., Kalantzopoulos G., Polyphasic identification of wild yeast strains isolated from Greek sourdoughs. *System Applied Microbiology*, 23:156-64 (2000).

Plácido J., Capareda S., Conversion of residues and by-products from the biodiesel industry into value-added products. *Bioresources and bioprocessing*, 3:23 (2016).

Filippousi R., Tsouko E., Mordini K., Ladakis D., Koutinas A., Aggelis G., Papanikolaou S., Sustainable arabitol production by a newly isolated *Debaryomyces prosopidis* strain cultivated on biodiesel-derived glycerol. *Carbon resources conversion*, 5:92-99 (2022).

Rakicka-Pustułka M., Mirończuk A. M., Celińska E., Białas W., Rymowicz W., Scale-up of the erythritol production technology – Process simulation and techno-economic analysis. *Journal of cleaner production*, 257:120533 (2020).

Rane K. D., Sims K. A., Production of citric acid by *Candida lipolytica* Y1095. Effect of glucose concentration on yield and productivity. *Enzyme and microbial technology*, 0229:90063-8 (1993).

Ratledge C., Fatty acid biosynthesis in microorganisms being used for single cell oil production. *Biochimie*, 86:807-15 (2004).

Rismani-Yardi H., Christy A., Carver S., Yu Z., Dehority B., Tuovinen O., Effect of external resistance on bacterial diversity and metabolism in cellulose-fed microbial fuel cells. *Bioresource technology*, 102:278-83 (2011).

Romano A. H., Microbial sugar transport systems and their importance in biotechnology. *Trends in biotechnology*, 4:207-213 (1986).

Russmayer H., Egermeier M., Kalemasi D., Sauer M., Spotlight on biodiversity of microbial cell factories for glycerol conversion. *Biotechnology advances*, 37:107395 (2019).

Rywińska A., Juszczak P., Wojtatowicz M., Robak M., Lazar Z., Tomaszewska L., Rymowicz W., Glycerol as a promising substrate for *Yarrowia lipolytica* biotechnological applications. *Biomass and bioenergy*, 48:148-166 (2013).

Sabourin-Provost G., Hallenbec, P. C., High yield conversion of a crude glycerol fraction from biodiesel production to hydrogen by photofermentation. *Bioresource technology*, 100:3513-7 (2009).

Sarantou S., Stoforos N. G., Kalantzi O., and Papanikolaou S., Biotechnological valorization of biodiesel-derived glycerol: Trials with the non-conventional yeasts *Yarrowia lipolytica* and *Rhodospiridium sp.* *Carbon resources conversion*. 4:61-75, (2022).

Sarris D., Galiotou – Panayotou M., Koutinas A.A., Komaitis M., Papanikolaou S., Citric acid, biomass and cellular lipid production by *Yarrowia lipolytica* strains cultivated on olive mill wastewater-based media. *Journal of chemical technology & biotechnology*, 86:1439-1448 (2011).

- Sarris D., Papanikolaou S., Biotechnological production of ethanol. *Biochemistry, processes and technologies*, 16:307-329 (2016).
- Tomaszewska L., Rywińska A., & Gładkowski W., Production of erythritol and mannitol by *Yarrowia lipolytica* yeast in media containing glycerol. *Journal of Industrial microbiology and biotechnology*, 39:1333-1343 (2012).
- Tomaszewska L., Rywińska A., Rymowicz W., High selectivity of erythritol production from glycerol by *Yarrowia lipolytica*. *Biomass and bioenergy*, 64:309-320 (2014).
- Van Gerpen J., Shanks B, Pruszko R., Clements D., Knothe G., Biodiesel production technology. *National renewable energy laboratory*, 510-36244 (2004).
- Varanda M. G., Pinto G., Martins F., Life cycle analysis of biodiesel production. *Fuel processing technology*, 251:249-258 (2011).
- Wickerham LJ., Kurtzman CP., & Herman AI., Sexual reproduction in *Candida lipolytica*. *Science*, 167:1141 (1970).
- Yin X., Enhanced alpha-ketoglutaric acid production in *Yarrowia lipolytica* WSH-Z06 by regulation of the pyruvate carboxylation pathway, 96:1527-37 (2012).
- Yoshikawa J., Habe H., Morita T., Fukuoka T., Imura T., Iwabuchi H., Kitamoto D., Production of d-arabitol from raw glycerol by *Candida quercitrusa*. *Applied microbiology and biotechnology*, 119:303-14 (2014).
- Zheng Y., Bai L., Zhou Y., Tong R., Zeng M., Li X., Shi J., Polysaccharides from Chinese herbal medicine for anti-diabetes recent advances. *International journal of biological macromolecules*, 121:1240-1253 (2019).
- Zinoviev S., Franziska M., Piyali D., Bertero N., Next-generation biofuels : Survey of emerging technologies and sustainability issues, 3:1106-33 (2010).