



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

Διδακτορική διατριβή

**Παραγωγή μικροβιακών ελαίων, ενδοπολυσακχαριτών και πολυολών
κατά την αύξηση ζυμών σε υποστρώματα με βάση την ακάθαρτη γλυκερόλη,
υποπροϊόν της διεργασίας παραγωγής καυσίμου τύπου βιοντίζελ**

Ροζανίνα Α. Φιλιπούση

Επιβλέπων καθηγητής

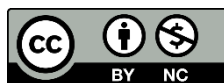
Σεραφείμ Παπανικολάου, Καθηγητής, Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

Σεραφείμ Παπανικολάου, Καθηγητής, Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών

Γεώργιος Αγγελής, Καθηγητής, Πανεπιστημίου Πατρών

Απόστολος Κουτίνας, Καθηγητής Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών



Αθήνα
2024

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

Διδακτορική διατριβή

**Παραγωγή μικροβιακών ελαίων, ενδοπολυσακχαριτών και πολυολών
κατά την αύξηση ζυμών σε υποστρώματα με βάση την ακάθαρτη γλυκερόλη,
υποπροϊόν της διεργασίας παραγωγής καυσίμου τύπου βιοντίζελ**

**"Production of microbial oils, endopolysaccharides and polyols during yeast growth on
substrates based on impure glycerol, a by-product of the biodiesel fuel production process"**

Ροζανίνα Α. Φιλιπούση

Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή

Σεραφείμ Παπανικολάου, Καθηγητής, Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών (Επιβλέπων)

Γεώργιος Αγγελής, Καθηγητής, Πανεπιστημίου Πατρών

Απόστολος Κουτίνας, Αναπληρωτής Καθηγητής Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών

Νικόλαος Στοφόρος, Καθηγητής, Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών

Παναγιώτα Διαμαντοπούλου, Κύρια Ερευνήτρια ΕΛΓΟ «Δήμητρα»

Δημήτριος Σαρρής, Επίκουρος Καθηγητής Πανεπιστημίου Αιγαίου

Δημήτριος Μακρής, Αναπληρωτής Καθηγητής, Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Παραγωγή μικροβιακών ελαίων, ενδοπολυσακχαριτών και πολυολών κατά την αύξηση ζυμών σε υποστρώματα με βάση την ακάθαρτη γλυκερόλη, υποπροϊόν της διεργασίας παραγωγής καυσίμου τύπου βιοντίζελ

Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων & Διατροφής του Ανθρώπου
Εργαστήριο Μικροβιολογίας & Βιοτεχνολογίας Τροφίμων

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η πειραματική διαδικασία για την πραγματοποίηση της παρούσας Διδακτορικής Διατριβής έλαβε χώρα στο Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών. Σκοπός της μελέτης ήταν η διερεύνηση της ικανότητας δύο στελεχών ζυμών, των *Rhodosporidium toruloides* NRRL Y-27012 και *Debaryomyces* sp. FMCC Y₆₉, να μεταβολίζουν τη βιομηχανική γλυκερόλη κατά τη διάρκεια ζυμώσεων κάτω από διαφορετικές συνθήκες υπό περιορισμό σε άζωτο, προς παραγωγή χρήσιμων βιοτεχνολογικών προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας τα οποία παράγονταν όταν το άζωτο αποτελούσε το περιοριστικό στοιχείο στο μέσο της αύξησης. Όλες οι καλλιέργειες έλαβαν χώρα σε αναδεδυόμενες φιάλες των 250 mL, εκτός από λίγες περιπτώσεις όπου εμφανίστηκαν ικανοποιητικά αποτελέσματα σε σχέση με την παραγωγή των επιζητούμενων προϊόντων (λιπίδια για το μικροοργανισμό *R. toruloides* NRRL Y-27012 και αραβιτόλη για το μικροοργανισμό *Debaryomyces* sp. FMCC Y₆₉) και όπου έλαβαν χώρα ζυμώσεις και σε κλειστού τύπου αναδεδυόμενους και αεριζόμενους εργαστηριακής κλίμακας βιοαντιδραστήρες. Για το σκοπό αυτό, η πειραματική μελέτη χωρίστηκε σε δυο βασικά μέρη με βάση το μικροοργανισμό που χρησιμοποιήθηκε κάθε φορά.

Στο πρώτο μέρος της Διδακτορικής Διατριβής παρουσιάζονται οι μικροβιακές ζυμώσεις που πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας την ελαιογόνο ζύμη *Rhodosporidium toruloides* NRRL Y-27012 σε υπόστρωμα γλυκερόλης (G101) σε διαφορετικές συγκεντρώσεις και συνθήκες. Στόχος της συγκεκριμένης σειράς πειραμάτων ήταν η μελέτη της ικανότητας της συγκεκριμένης ζύμης να μεταβολίζει την παραπάνω πηγή άνθρακα προς παραγωγή βιομάζας, ενδοπολυσακχαριτών και λιπιδίων. Αρχικά μελετήθηκαν δύο διαφορετικοί τρόποι εκχύλισης για την ανάκτηση των λιπιδίων. Συγκεκριμένα εφαρμόστηκε η μέθοδος μίγματος διαλυτών χλωροφορμίου (CHCl₃)–μεθανόλης (CH₃OH), ενώ στη δεύτερη περίπτωση έγινε αρχικά όξινη υδρόλυση με HCl και στη συνέχεια εκχύλιση με μίγμα διαλυτών CHCl₃–CH₃OH. Στη συνέχεια, μελετήθηκε η επίδραση της τιμής του pH στην αύξηση και παραγωγή των μεταβολικών προϊόντων σε τρεις διαφορετικές τιμές, 3,5, 5,5 και 6,5. Από τα αποτελέσματα προέκυψε ότι το pH επηρεάζει την παραγωγή βιομάζας και λιπιδίων χωρίς να μεταβάλλει στη σύσταση των λιπαρών οξέων. Το pH 5,5 αποδείχτηκε το βέλτιστο για την παραγωγή λιπιδίων και βιομάζας. Στη συνέχεια μελετήθηκε η επίδραση της πηγής άνθρακα στη φυσιολογική λειτουργία του μικροοργανισμού. Προκειμένου να ερευνηθεί ο μεταβολισμός σε μικτό υπόστρωμα γλυκόζης-γλυκερόλης, πραγματοποιήθηκαν καλλιέργειες κλειστού τύπου σε κωνικές φιάλες χρησιμοποιώντας διαφορετικές συγκεντρώσεις της πηγής άνθρακα μεμονωμένα ή σε κοινή ζύμωση. Πιο συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκε μια ζύμωση κλειστού τύπου σε γλυκόζη (Glc) με αρχική συγκέντρωση 80 g/L (μάρτυρας) και ζυμώσεις με μικτό υπόστρωμα γλυκόζης και γλυκερόλης σε αναλογίες Glc: G101=1: 3 w/w, 3: 1 w/w, 1: 1 w/w, αντίστοιχα. Από τα αποτελέσματα που ελήφθησαν φαίνεται ότι η παρουσία γλυκόζης και γλυκερόλης στο θρεπτικό μέσο είχε ως απόρροια για τη συγκεκριμένη ζύμη την εμφάνιση της καταβολικής καταστολής για την κατανάλωση της γλυκερόλης δεδομένου ότι ο μικροοργανισμός επέλεξε να καταναλώσει αποκλειστικά τη γλυκόζη στα αρχικά στάδια

της ζύμωσης, και η κατανάλωση γλυκερόλης εκκίνησε στα μεταγενέστερα στάδια της καλλιέργειας και όταν η συγκέντρωση της γλυκόζης ήταν πολύ χαμηλή στο μέσο της αύξησης. Εντούτοις το υπόστρωμα που απέδωσε τη μέγιστη παραγωγή λίπους ήταν εκείνο που περιείχε αποκλειστικά γλυκερόλη με αρχική συγκέντρωση 80 g/L.

Ο επόμενος παράγοντας που μελετήθηκε ήταν η επίδραση της συγκέντρωσης του χλωριούχου νατρίου (NaCl) στο υπόστρωμα, στην αύξηση της ζύμης καθώς επίσης και στην παραγωγή των μεταβολικών προϊόντων. Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκαν έξι ζυμώσεις σε πηγή άνθρακα τη γλυκερόλη χρησιμοποιώντας αυξανόμενη συγκέντρωση NaCl στο υπόστρωμα της καλλιέργειας (0,2; 0,5; 0,8; 1,0; 2,0; 3,0%, w/v). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η προσθήκη NaCl σε χαμηλές συγκεντρώσεις από 0,2-0,8%, w/v επέδρασε θετικά στη σύνθεση λιπιδίων καθώς η απόλυτη τιμή του λίπους αυξήθηκε έως και ~5 g/L σε σχέση με το μάρτυρα. Έτσι στην καλλιέργεια του μάρτυρα (χωρίς NaCl) η συγκέντρωση λιπιδίων ήταν 8,9 g/L ενώ όταν προστέθηκαν 0,2%, w/v NaCl, η συγκέντρωση λιπιδίων ήταν 13,3 g/L. Αντίθετα η παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων άλατος (>1%, w/v NaCl) είχε σαν αποτέλεσμα τη μείωση τόσο της παραγόμενης βιομάζας όσο και των λιπιδίων, προφανώς λόγω παρεμπόδισης η οποία προκλήθηκε λόγω των υψηλών συγκεντρώσεων του άλατος. Άξιο αναφοράς είναι το γεγονός ότι η υπαγωγή της καλλιέργειας σε υψηλή συγκέντρωση άλατος (30 g/L) ευνόησε τη σύνθεση του ενδο-κυτταρικού α-λινολενικού οξέος ($\Delta^9,12,15\text{C18}$: 3), το ποσοστό του οποίου ήταν ίσο σε ~8,5%, w/w. Στις λοιπές καλλιέργειες, η σύσταση των λιπιδίων σε λιπαρά οξέα αποτελούνταν κυρίως από ελαϊκό ($\Delta^9\text{C18}$: 1) με ποσοστά ~45-50%, w/w και παλμιτικό (C16: 0) ~28-35%, w/w. Αναφορικά με τα υπόλοιπα λιπαρά οξέα, το στεατικό (C18: 0), το λινελαϊκό οξύ ($\Delta^9,12\text{C18}$: 2) και το α-λινολενικό οξύ ($\Delta^9,12,15\text{C18}$: 3) κατείχαν συνολικά σχετικά μικρό ποσοστό της τάξεως του ~3-12%, w/w.

Προκειμένου να μειωθεί το κόστος της διεργασίας στο μέσο της καλλιέργειας προστέθηκε ως ανασταλτικός παράγοντας ένα υδρογλυκερινικό εκχύλισμα από στερεά απόβλητα κρεμμυδιού (Onion Solid Wastes, OSWs). Ο απώτερος σκοπός του συγκεκριμένου πειράματος ήταν η μελέτη της προσθήκης του αποβλήτου στη φυσιολογική συμπεριφορά του μικροοργανισμού, η πιθανή αύξηση (ή μείωση) της συγκέντρωσης της βιομάζας και των λιπιδίων λόγω της παρουσίας των OSWs στο θρεπτικό μέσο, και τελικώς η πιθανή διενέργεια ζύμωσης υπό μη-ασηπτικές συνθήκες με την προσθήκη OSWs σε μέσο με πηγή άνθρακα τη γλυκερόλη, εφόσον ένα σημαντικό κόστος της βιοδιεργασίας για παραγωγή των μικροβιακών λιπιδίων αποτελεί η αποστείρωση. Ωστόσο η παρουσία φαινολικών ουσιών στο εκχύλισμα οδήγησε στη μείωση της τελικής συγκέντρωσης των ολικών λιπιδίων (6,2 g/L) κατά ~2,5 g/L σε σχέση με το μάρτυρα. Στη συνέχεια ακολούθησαν πειράματα με διαφορετική αναλογία του λόγου C/N (50; 100; 160; 240 moles/moles) σε υπόστρωμα με αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης 90 g/L. Ο λόγος με αναλογία C/N=50 moles/moles ήταν ο βέλτιστος για την παραγωγή βιομάζας με τη μέγιστη τιμή της να είναι ίση με 30,2 g/L (ταυτόχρονη συγκέντρωση μικροβιακού λίπους L=10,1 g/L). Αντίθετα στη ζύμωση με λόγο C/N=100 moles/moles σημειώθηκε το μέγιστο ποσοστό λίπους επί ξηράς ουσία, περίπου ~50% με ταυτόχρονη συγκέντρωση λιπιδίων L=12,0 g/L. Καλλιέργεια σε μεγαλύτερο αρχικό λόγο C/N είχε ως απόρροια μείωση της λιποπεριεκτικότητας τόσο σε απόλυτες (g/L) όσο και σε σχετικές (% λίπους επί ξηρού) τιμές, υποδηλώνοντας την ύπαρξη ενός βέλτιστου αρχικού λόγου C/N για τη διεργασία.

Τέλος για τη βελτιστοποίηση της διαδικασίας και την παραγωγή μεταβολικών προϊόντων σε υψηλότερη συγκέντρωση πραγματοποιήθηκε κλειστή ζύμωση σε βιοαντιδραστήρα σε αρχική συγκέντρωση 90 g/L. Οι μέγιστες τιμές παραγόμενης βιομάζας και λιπιδίων σημείωσαν αύξηση σε σχέση

με τις κωνικές φιάλες στο τέλος της ζύμωσης φτάνοντας τα 26,8 g/L και 13,5 g/L αντίστοιχα ενώ οι μέγιστες αποδόσεις βιομάζας και λιπιδίων ήταν 0,56 g/g και 0,16 g/g αντίστοιχα, οι οποίες δεν έδειξαν να επηρεάζονται σημαντικά σε σύγκριση με το πείραμα που διεξήχθη σε κωνικές φιάλες. Από την άλλη πλευρά, τόσο η κατανάλωση της γλυκερόλης όσο και η παραγωγή της βιομάζας και των λιπιδίων έλαβε χώρα αρκετά πιο γρήγορα (περίπου στο μισό διάστημα) σε σχέση με τη διεργασία στις αναδεδυόμενες φιάλες.

Στο δεύτερο μέρος της Διδακτορικής Διατριβής παρουσιάζονται οι μικροβιακές ζυμώσεις που πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας τη ζύμη *Debaryomyces* sp. FMCC Y₆₉ για τη παραγωγή αραβιτόλης. Αρχικώς, πραγματοποιήθηκε ζύμωση σε υπόστρωμα γλυκόζης με πολύ υψηλή συγκέντρωση της τελευταίας (50%, w/v), δεδομένου ότι με βάση τη βιβλιογραφία, αύξηση του στελέχους σε υπόστρωμα αρχικής συγκέντρωσης σακχάρου >50%, w/v θα κατεδείκνυε ότι το εν λόγω στέλεχος ανήκει στο είδος *Debaryomyces prosopidis*. Εν συνεχεία, πραγματοποιήθηκαν κλειστού τύπου καλλιέργειες τόσο σε κωνικές φιάλες όσο και σε βιοαντιδραστήρα χρησιμοποιώντας ως πηγή άνθρακα τη γλυκερόλη σε αρχικές συγκεντρώσεις 80 g/L και 125 g/L. Στην περίπτωση που χρησιμοποιήθηκε γλυκερόλη σε αρχική συγκέντρωση 80 g/L, παρήχθησαν περίπου 30 g/L αραβιτόλης (Ara) με απόδοση ~0,40 g/g, σε κωνικές φιάλες αλλά και στο βιοαντιδραστήρα. Ωστόσο αύξηση στη συγκέντρωση και την απόδοση του τελικού προϊόντος παρατηρήθηκε στην υψηλότερη συγκέντρωση γλυκερόλης τόσο στις ζυμώσεις σε κωνικές φιάλες (Ara=70,9 g/L) αλλά και σε βιοαντιδραστήρα (Ara=65,5 g/L). Αξίζει να τονιστεί ότι, η απόδοση προϊόντος ως προς το αναλωθέν υπόστρωμα σημείωσε μία από τις μέγιστες τιμές που έχει αναφερθεί βιβλιογραφικά μέχρι στιγμής ($Y_{Ara/Glcl}=0,57$ g/g). Συγκριτικά με το πείραμα το οποίο έλαβε χώρα στις φιάλες, η καλλιέργεια στο βιοαντιδραστήρα είχε ως απόρροια πολύ ταχύτερη κατανάλωση της γλυκερόλης, όπως επίσης και πολύ υψηλότερη παραγωγή βιομάζας και η παραγωγή ενδοπολυσακχαριτών (IPS) προσδιορίστηκε μεταξύ ~20-40%, w/w επί της ξηρής μάζας στη συγκέντρωση Glcl~80 g/L και 20-32%, w/w στη συγκέντρωση Glcl~125 g/L.

Στη συνέχεια, μελετήθηκε η επίδραση του pH στο συγκεκριμένο στέλεχος κατά τη διάρκεια ζυμώσεων κλειστού τύπου σε γλυκερόλη. Το πολύ όξινο pH επηρέασε δυσμενώς την ανάπτυξη του στελέχους και τη σύνθεση δευτερογενών μεταβολιτών. Ωστόσο, η βέλτιστη απόδοση του παραγόμενου προϊόντος σημειώθηκε στη τιμή pH 5,5. Παράλληλα, πραγματοποιήθηκαν ζυμώσεις κλειστού τύπου σε κωνικές φιάλες σε διαφορετικά μίγματα γλυκόζης και γλυκερόλης με τελική συγκέντρωση 125 g/L. Η παρουσία γλυκόζης προκάλεσε καταβολική καταστολή στην κατανάλωση της γλυκερόλης και μείωση στη τελική συγκέντρωση προϊόντος. Συμπερασματικά, το στέλεχος έδειξε να αποδίδει καλύτερα σε υπόστρωμα που περιείχε αμιγώς γλυκερόλη. Συγκεκριμένα, στην αναλογία Glc: Glcl=1: 1 w/w η τελική συγκέντρωση αραβιτόλης ήταν 67,7 g/L με απόδοση παραγόμενης αραβιτόλης προς αναλωθέν υπόστρωμα (γλυκόζη + γλυκερόλη) ($Y_{Ara/S}=0,55$ g/g). Ο επόμενος παράγοντας που μελετήθηκε ήταν η επίδραση της προσθήκης του χλωριούχου νατρίου στην αύξηση και την παραγωγή αραβιτόλης από το μικροοργανισμό *D. prosopidis*, πραγματοποιώντας ζυμώσεις σε αυξανόμενη συγκέντρωση NaCl (2,0; 5,0; 8,0; 12,0; 16,0%, w/v). Η ζύμη έδειξε εξαιρετική ωσμωανθεκτική ικανότητα ωστόσο η παραγωγή αραβιτόλης παρεμποδίστηκε σε συγκέντρωση NaCl \geq 5%, w/v. Σε αυτή τη σειρά πειραμάτων πραγματοποιήθηκε και μια κλειστή καλλιέργεια με 5%, w/v NaCl και μη θερμικά επεξεργασμένο θρεπτικό μέσο. Η παρουσία του άλατος περιόρισε τη βακτηριακή επιμόλυνση και βοήθησε την επικράτηση της ζύμης και την παραγωγή πολυόλης (Ara=43,6 g/L).

Στη συνέχεια ακολούθησαν τρία πειράματα με διαφορετική αρχική αναλογία του λόγου C/N (ήτοι C/N=79 moles/moles, 158 moles/moles, 246 moles/moles) σε αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης 135 g/L με την υψηλότερη απόδοση για την αραβιτόλη να σημειώνεται στην τιμή C/N=158 moles/moles και ήταν ίση με 70,0 g/L και συντελεστή απόδοσης παραχθείσας αραβιτόλης προς αναλωθείσα γλυκερόλη ($Y_{Ara/Glc}$) $\sim 0,52$ g/g. Σύμφωνα λοιπόν με τα παραπάνω πειράματα, προέκυψε ότι οι βέλτιστες συνθήκες για παραγωγή αραβιτόλης είναι η χρήση της γλυκερόλης ως πηγή άνθρακα με pH=5,5 και λόγο C/N=158 moles/moles. Τέλος, για την αύξηση στην παραγόμενη ποσότητα αραβιτόλης αλλά και στην τελική απόδοση, πραγματοποιήθηκε ημι-συνεχής τροφοδοτούμενη καλλιέργεια σε κωνικές φιάλες των 250 mL χρησιμοποιώντας ως πηγή άνθρακα τη γλυκερόλη. Η παραγωγή αραβιτόλης ήταν ~ 91 g/L με απόδοση $Y_{Ara/Glc} \sim 0,53$ g/g. Η ανωτέρω επιτευχθείσα τιμή της αραβιτόλης, ήταν από τις υψηλότερες που έχουν αναφερθεί ποτέ στη διεθνή βιβλιογραφία για άγρια (μη γενετικώς τροποποιημένα) στελέχη ζυμών κατά την αύξησή τους σε οποιαδήποτε πηγή άνθρακα η οποία να χρησιμοποιείται ως υλικό εκκίνησης της διεργασίας.

Από τα παραπάνω αποτελέσματα προκύπτει ότι τα στελέχη των ζυμών *Rhodosporidium toruloides* και *Debaryomyces prosopidis* μπορούν να μεταβολίζουν την ακάθαρτη γλυκερόλη προς παραγωγή μεταβολικών προϊόντων προστιθέμενης αξίας όπως λιπίδια και αραβιτόλη συμβάλλοντας στην άρση ποικίλων προβλημάτων που σχετίζονται με την επισιτιστική και ενεργειακή κρίση και προωθώντας την πράσινη ανάπτυξη, την αειφορία και την κυκλική οικονομία.

Επιστημονική περιοχή: Μικροβιακή βιοτεχνολογία

Λέξεις κλειδιά: Παραγωγή λιπιδίων, αραβιτόλη, ενδοπολυσακχαρίτες, ακάθαρτη γλυκερόλη

Production of microbial oils, endopolysaccharides and polyols during yeast growth on substrates based on impure glycerol, a by-product of the biodiesel fuel production process

Department of Food Science & Human Nutrition
Laboratory of Food Microbiology and Biotechnology

ABSTRACT

The experimental procedure for the realization of this PhD thesis took place at the Laboratory of Food Microbiology and Biotechnology of the Agricultural University of Athens. The present study aimed to assess the potential of two yeast strains, *Rhodosporidium toruloides* NRRL Y-27012 and *Debaryomyces* sp. FMCC Y₆₉, upon lipid and arabitol production during growth on biodiesel-derived glycerol, which is the main side-product of biodiesel production process, called also “crude glycerol” (crude glycerin). The synthesis of 10 kg of biodiesel deriving from the trans-esterification of various types of oils generates *c.* 1 kg of glycerol (purity ~90%, w/w) as a side-product, while besides biodiesel, significant quantities of glycerol-containing water can also be generated through bioethanol and alcoholic beverages’ production plants and through various oleochemical (i.e. soap production) facilities. With the significant rise in the production of biodiesel that has occurred the last (several) years, the valorization of glycerol has become a very “hot” topic in Industrial Biotechnology. The experimental study was divided into two main parts based on the yeast strain used each time.

The first part of the PhD thesis presents the microbial fermentations conducted using the oleaginous yeast *Rhodosporidium toruloides* NRRL Y-27012 on crude glycerol at different concentrations and culture conditions. Initially, the impact of medium pH on the formation of several metabolites was evaluated and trials on different pH values (3.5, 5.5 and 6.5) were conducted. In the medium in which pH=5.5 was applied, the strain demonstrated the best results concerning biomass and lipid synthesis. Furthermore, to investigate the effect of carbon source on yeast metabolism, trials on mixtures of glucose and glycerol, were carried out in shake flasks using different ratios (Glc: Glol=1: 3 w/w, 3: 1 w/w, 1: 1 w/w) of the carbon source in which the global concentration was ~80 g/L. The obtained results demonstrated that the presence of glucose in the medium was associated with the catabolic repression of the consumption of glycerol, since the yeast strain preferred to consume exclusively glucose in the initial stages of fermentation, whereas glycerol consumption started after the depletion of glucose from the culture medium. It is noted that when glycerol at an initial concentration of 80 g/L was applied in the medium lipid synthesis was higher compared to the trials in which the same initial quantity of glucose was applied.

Moreover, the impact of sodium chloride (NaCl) addition on cell growth and lipid synthesis was investigated. For this purpose, batch trials in shake flasks were carried out on a medium containing glycerol and six different initial NaCl concentrations (0.2; 0.5; 0.8; 1.0; 2.0; 3.0%, w/v) were imposed. A promising finding was that the addition of NaCl at low concentrations of 0.2-0.8%, w/v had increased lipid synthesis

up to ~5 g/L compared to the control. Thus, in the control culture (absence of NaCl) the lipid concentration was =8.9 g/L whereas, at 0.2%, w/v NaCl a lipid concentration of 13.3 g/L was achieved, demonstrating an interesting stimulatory effect of lipid synthesis at relatively low initial concentrations of NaCl added into the medium. On the contrary, the presence of high salt concentrations (>1%, w/v NaCl) progressively inhibited both biomass and lipid production. A further remarkable finding is that a high salt concentration of 30 g/L favored the synthesis of α -linolenic acid ($\Delta^9,12,15$ C18: 3).

In order to reduce the cost of processing in the culture medium, experiments were also conducted in media with a hydroglycerolic extract of onion peels (Onion Solid wastes; OSWs) added, while a blank experiment (no extract) was also realized. This was performed since it was desirable to evaluate the effect of the addition of OSWs upon microbial growth, and considering the bacteriostatic effects of these very OSWs, to potentially perform the trials under previously non-sterilized media. Indeed, the trial with the added extract was performed under both aseptic (previous sterilization) and non-aseptic (previous thermal treatment at T=100 °C; 5 min) conditions. The aseptic experiment with the added extract resulted in a relative decrease in lipid production in relation to the control (L=8.6 g/L in the control vs L=6.2 g/L with the extract). Under non-aseptic conditions, lipid production was slightly lower (L=5.2 g/L), but, in any case, the production of microbial lipids under non-previously sterilized media was demonstrated.

For further investigation of its physiological behavior, *R. toruloides* NRRL Y-27012 was tested in trials under nitrogen limitation in different C/N molar ratios of 50, 100, 160 and 240 moles/moles. The initial glycerol (G₀) concentration for all experiments was ~90 g/L. The yeast demonstrated significant dry cell weight production irrespective of the C/N ratio employed, ranging between ~20-30 g/L. The optimum C/N ratio medium was that of 100 moles/moles, where biomass (X)=24.5 g/L containing 50%, w/w of lipids was recorded. Endopolysaccharides in dry cell weight values (IPS/X) presented indeed impressive values ($\geq 50\%$, w/w) even at the very early growth steps, while IPS/X values decreased as the fermentation proceeded, with a simultaneous increase of lipid in dry cell weight (L/X) values. Finally, the optimum trial in shake flasks was scaled-up in a batch laboratory-scale bioreactor, and higher glycerol assimilation rate, biomass and lipid production occurred compared to the flask trial (final X and lipid values ~27.0 g/L, =13.5 g/L respectively).

The second part of the thesis presents the microbial fermentations carried out using the yeast *Debaryomyces* sp. FMCC Y₆₉ for arabitol production when crude glycerol, residue from the biodiesel production process, was employed as substrate. The newly isolated yeast strain was initially cultivated on a fermentation medium that contained 50%, w/v glucose. According to the literature, potential growth on such a medium would indicate that the employed strain belongs to the species *D. prosopidis*. Subsequently, batch cultures were carried out in both shake flasks and laboratory-scale bioreactors using glycerol as a carbon source at initial concentrations of 80 g/L and 125 g/L under nitrogen-limited conditions. A batch culture on glycerol at an initial concentration of 80 g/L, resulted in arabitol synthesis of 30 g/L with a yield

of arabitol produced on glycerol consumed ($Y_{Ara/Glcl}$) ~ 0.40 g/g, both in shake flasks and bioreactor. However, when 125 g/L of glycerol was applied, arabitol production was increased both in shake flasks (Ara=70.9 g/L) and bioreactor (Ara=65.5 g/L) combined with the highest yield reported in the literature so far ($Y_{Ara/Glcl}=0.57$ g/g). Compared with the shake-flask experiment, the bioreactor experiment although presented lower final arabitol production, presented significantly higher biomass production and glycerol uptake. Moreover, the effect of pH on the strain during batch fermentation on glycerol substrate was then studied in flask experiments. The extreme acidic pH negatively affected biomass and product synthesis. However, when pH 5.5 was applied the strain demonstrated the highest polyol production. At the same time, batch fermentations were carried out in shake flasks containing glucose and glycerol mixtures with a final concentration of 125 g/L. The presence of glucose caused catabolite repression of glycerol consumption and a decrease in the final product concentration. In conclusion, the strain performed better on a substrate containing only glycerol as substrate, where the maximum arabitol concentration recorded was 70.9 g/L. For instance, at the ratio Glc: Glol=1: 1 w/w the final concentration of arabitol was 67.7 g/L with a yield of arabitol $Y_{Ara/S}=0.55$ g/g, produced on a total substrate (glucose + glycerol) consumed.

In the next stages, trials with glycerol employed as substrate and several initial NaCl concentrations (2.0; 5.0; 8.0; 12.0; 16.0%, w/v) were employed. The yeast demonstrated excellent osmotolerant capacity however the production of arabitol was inhibited at a concentration of NaCl $\geq 5\%$, w/v. Moreover, in this experimental stage, a batch culture containing 5%, w/v NaCl under non-aseptic conditions was carried out. The presence of salt limited bacterial contamination and allowed yeast growth and polyol synthesis (Ara=43.6 g/L). Arabitol production was further evaluated under different C/N ratios (=79, 158, 246 moles/moles) at an initial glycerol (Glol₀) concentration of ~ 135 g/L. Polyol production was maximized (70.0 g/L) when the C/N ratio was equal to 158 moles/moles. Yield and productivity were also enhanced with respective values of 0.52 g/g and 0.12 g/L/h.

In the last part of our research, a fed-batch culture in 250-mL shake flasks using glycerol as a carbon source was performed. The obtained data demonstrated a tremendous arabitol production of ~ 91 g/L with a yield on glycerol consumed of ~ 0.53 g/g. It must be stressed that this concentration is amongst the highest ones that have ever been reported in the international literature that deals with renewable resources, or commercial sugars (i.e. C6 or C5 sugars) employed for arabitol production, when wild-type microorganisms are implicated in the process.

Based on the aforementioned results, it was concluded that the yeast strains *R. toruloides* and *D. prosopidis* can be used as efficient microbial cell factories to convert the abundant streams of biodiesel-derived glycerol into value-added extra- and intra-cellular metabolites of potentially very high production cost and remarkable importance of the food, chemical and biofuel industries. The current study, therefore, provided alternative and interesting “green” and eco-friendly ways of valorization of biodiesel-derived glycerol, by using it as substrate by natural yeast species. It can be concluded thus, that, solutions referring

to the ecological and environmentally friendly valorization of biodiesel-derived glycerol with the use of microbial technology can greatly contribute to the resolution of the important and constantly increasing problem of the management of glycerol. The findings of the current thesis, therefore, can constitute an important basis for future studies on this very important topic, with long-range impact. contributing to the development of biobased economy aspects.

Scientific area: Industrial glycerol

Keywords: Microbial oils, endopolysaccharides, arabitol

«Παραγωγή μικροβιακών ελαίων, ενδοπολυσακχαριτών και πολυολών κατά την αύξηση ζυμών σε υπόστρωμα με βάση την ακάθαρτη γλυκερόλη, υποπροϊόν της διεργασίας παραγωγής καυσίμου τύπου βιοντίζελ»

Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών δεν υποδηλώνει αποδοχή των απόψεων του συγγραφέα (ν. 5343/1932, αρ. 202, παρ. 2).

Η πνευματική ιδιοκτησία αποκτάται χωρίς καμία διατύπωση και χωρίς την ανάγκη ρήτρας απαγορευτικής των προσβολών της. Πάντως κατά το ν. 2121/1993, όπως μεταγενέστερα τροποποιήθηκε ιδίως με το αρ. 81, ν. 3057/2002 καθώς και με τα αρ. 1, 2 και 4, ω. 3524/2007 και την διεθνή σύμβαση της Βέρνης (που έχει κυρωθεί με το ν. 100/1975), απαγορεύεται η αναδημοσίευση και γενικά η αναπαραγωγή του παρόντος έργου, με οποιονδήποτε τρόπο (ηλεκτρονικό, μηχανικό, φωτοτυπικό, ηχογράφηση ή άλλο) τμηματικά ή περιληπτικά, στο πρωτότυπο ή σε μετάφραση ή άλλη διασκευή, χωρίς γραπτή άδεια του συγγραφέα.

Το μη αποκλειστικό δικαίωμα αναπαραγωγής αντιγραφής (για λόγους ασφάλειας και συντήρησης) και διάθεση της παρούσας διδακτορικής διατριβής υπό ηλεκτρονική μορφή, για εκπαιδευτική, ερευνητική και ιδιωτική χρήση και όχι για χρήση που αποσκοπεί σε εμπορική εκμετάλλευση, παραχωρείται στη Βιβλιοθήκη και Κέντρο Πληροφόρησης του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών.

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

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΥΜΕΝΟ ΕΡΓΟ ΤΗΣ ΣΥΓΓΡΑΦΕΩΣ

Δημοσιεύσεις σε συνέδρια

Αντωνίου, Δ., **Φιλιπούση, Ρ.**, Κουτίνας, Α., Τρυφίνοπούλου, Π., Νυχάς, Γ.Ι., Παναϊκόλαου, Σ. (2015).

Μετατροπή της βιομηχανικής γλυκερόλης σε γλυκαντικές αλκοόλες και κιτρικό οξύ από στελέχη *Yarrowia lipolytica* και *Debaryomyces hansenii*, 6th Greek lipid forum, Athens, Greece

Φιλιπούση, Ρ., Αγγελής, Γ., Κουτίνας, Α., Παπανικολάου, Σ. (2015) Αξιοποίηση βιομηχανικής

γλυκερόλης και συνυποστρωμάτων γλυκερόλης-γλυκόζης από τη ζύμη *Rhodosporidium toruloides* προς παραγωγή βιομάζας, μικροβιακών λιπιδίων και δευτερογενών μεταβολιτών, 6th Conference MBK, Athens, Greece

Filippousi, R., Philippi, K., Koutinas, A., Papanikolaou, S. (2017). Exploitation of industrial glycerol and glucose for arabitol production by yeast *Debaryomyces hansenii*, 13th International Conference RRB, Wroclaw, Poland

Philipi, K., **Filippousi, R.**, Tsouko, E., Ladakis, D., Koutina, A., Papanikolaou, S. (2017) High production of arabitol by *Debaryomyces hansenii* EMBT Y-41 cultivated on low-cost hydrophilic carbon sources, 12th SDEWES Conference, Drubrovnik, Kroatia

Filippousi, R., Michou, S., Vastaroucha, E., Mordini, K., Papanikolaou, S. (2019), Effect of C/N ratio on arabitol and lipid production by the yeasts *Debaryomyces hansenii* and *Rhodosporidium toruloides*, 15th International Conference RRB, Toulouse, France

Filippousi, R., Aleiferi, G., Flouri, F., Sarris, D., Diamantopoulou, P., Papanikolaou, S. (2019).

Production of yeast biomass during growth of selected yeast strains on blends of crude glycerol and olive-mill wastewaters, 8th Greek lipid forum, Athens, Greece

Filippousi, R., Aleiferi, G., Flouri, F., Sarris, D., Diamantopoulou, P., Papanikolaou, S. (2019).

Production of yeast biomass during growth of selected yeast strains on blends of crude glycerol and olive-mill wastewaters, *8th Greek lipid forum*, Athens, Greece

Lidaki, G., **Filippousi, R.**, Koutinas, A., Papanikolaou, S. (2019). Optimization of lipid production by *Rhodosporidium toruloides* cultivated on biodiesel-derived glycerol employed as substrate, *8th Greek lipid forum*, Athens, Greece

Filippousi, R., Ronga C., Tzirita M., Sarris D., Diamantopoulou P., Papanikolaou S. (2019). Biotechnological production of citric acid and polyols during growth of *Yarrowia lipolytica* on media composed of biodiesel-derived glycerol and olive-mill wastewaters, *8th Greek lipid forum*, Athens, Greece

Δημοσιεύσεις σε επιστημονικά περιοδικά

Filippousi, R., Antoniou, D., Tryfinopoulou, P., Nisiotou, A. A., Nychas, G. J., Koutinas, A. A., & Papanikolaou, S. (2019). Isolation, identification and screening of yeasts towards their ability to assimilate biodiesel-derived crude glycerol: microbial production of polyols, endopolysaccharides and lipid. *Journal of applied microbiology*, *127*(4), 1080-1100.

Diamantopoulou, P., **Filippousi, R.**, Antoniou, D., Varfi, E., Xenopoulos, E., Sarris, D., & Papanikolaou, S. (2020). Production of added-value microbial metabolites during growth of yeast strains on media composed of biodiesel-derived crude glycerol and glycerol/xylose blends. *FEMS Microbiology Letters*, *367*(10), fnaa063.

Filippousi, R., Tsouko, E., Mordini, K., Ladakis, D., Koutinas, A. A., Aggelis, G., & Papanikolaou, S. (2022). Sustainable arabitol production by a newly isolated *Debaryomyces prosopidis* strain cultivated on biodiesel-derived glycerol. *Carbon Resources Conversion*, *5*(1), 92-99.

Filippousi, R., Diamantopoulou, P., Stavropoulou, M., Makris, D. P., & Papanikolaou, S. (2022). Lipid production by *Rhodosporidium toruloides* from biodiesel-derived glycerol in shake flasks and bioreactor: Impact of initial C/N molar ratio and added onion-peel extract. *Process Biochemistry*, *123*, 52-62.

Ευχαριστίες

Η παρούσα διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων, του Τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών.

Έχοντας φτάσει στην ολοκλήρωση αυτού του κύκλου, θα ήθελα να μνημονεύσω όλους όσους συντέλεσαν με τον δικό τους τρόπο στην πραγματοποίηση της παρούσας διατριβής. Πρωτίστως, θα ήθελα εκφράσω τις θερμότερες ευχαριστίες μου στον καθηγητή και επιβλέποντα μου, Καθηγητή Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών κ. Σεραφείμ Παπανικολάου. Η παρουσία του κ. Παπανικολάου υπήρξε πολύ σημαντική, πολύτιμη και καταλυτική τόσο σε ερευνητικό όσο και σε προσωπικό επίπεδο. Η αποτελεσματική καθοδήγηση και η βοήθεια του, στάθηκαν οι ουσιαστικοί παράγοντες που συνέβαλαν στην διεκπεραίωση αυτού του έργου. Νιώθω ειλικρινά ευγνώμων για την ευκαιρία που μου προσέφερε να εμπλουτίσω τις γνώσεις μου και να αποκτήσω εμπειρία σε ερευνητικό και επιστημονικό επίπεδο. Επίσης, θα ήθελα να εκφράσω την αναγνώριση και τη συγκίνηση μου για την αμέριστη στήριξη του σε δύσκολες καταστάσεις οι οποίες προέκυψαν κατά την διάρκεια της συγκεκριμένης διατριβής. Ευχαριστώ θερμά τον Καθηγητή Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών κ. Απόστολο Κουτίνα για την εξαιρετική συνεργασία και καθοδήγηση και τον Καθηγητή Πανεπιστημίου Πατρών κ. Γεώργιο Αγγελή μέλη της συμβουλευτικής επιτροπής, για την ουσιαστική βοήθεια που μου προσέφεραν κατά την επιτέλεση της διδακτορικής μου διατριβής. Επιπροσθέτως, θα ήθελα να ευχαριστήσω μέσα από την καρδιά μου την Δρ. Παναγιώτα Διαμαντοπούλου, Κύρια Ερευνήτρια του ΕΛΓΟ «Δήμητρα», μέλος της εξεταστικής επιτροπής, για την αμέριστη συμπαράσταση και βοήθεια της, για τις συμβουλές της, καθώς για την τόσο σημαντική και ουσιαστική στήριξη της σε πολύ κρίσιμες στιγμές τόσο σε επιστημονικό όσο και σε προσωπικό επίπεδο. Επίσης ευχαριστώ θερμά τον Δημήτριο Σαρρή, Επίκουρο Καθηγητή Πανεπιστημίου Αιγαίου και μέλος της εξεταστικής επιτροπής για την πολύτιμη βοήθεια και μετάδοση γνώσης και την άριστη συνεργασία στο ξεκίνημα αυτής της διατριβής. Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα υπόλοιπα μέλη της εξεταστικής επιτροπής, Νικόλαο Στοφόρο, Καθηγητή, Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, Δημήτριο Μακρή, Αναπληρωτή Καθηγητή, Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, για την τιμή που μου έκαναν να μετάσχουν στην αξιολόγηση της διδακτορικής μου διατριβής.

Ακόμη θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά όλα τα μέλη του Εργαστηρίου Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων, ανθρώπους που γνώρισα στο εργαστήριο και θεωρώ φίλους μου την Δρ. Αναστασία Μαρίνα Παλαιογεώργου για τη φιλία της και τους υποψήφιους διδάκτορες Ευάγγελο Ξερόπουλο, Ελένη-Σταυρούλα Βασταρούχα και Σαββούλα Μίχου για την πολύτιμη φιλία τους και τις υπέροχες στιγμές που περάσαμε μαζί, που ομόρφυναν ακόμη περισσότερο αυτήν την διαδρομή. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω την Δρ. Ερμίντα Τσούκο, τον Δρ. Δημήτριο Λαδάκη και τα άλλα μέλη του εργαστηρίου της Μηχανικής Τροφίμων για τη βοήθεια τους σε ερευνητικό επίπεδο. Επιπλέον, ευχαριστώ

θερμά την κα. Ουρανία Καλαντζή για τη στήριξη, την προθυμία και τη βοήθεια που μου προσέφερε όλο αυτό το διάστημα.

Μέσα από την ψυχή μου θα ήθελα να ευχαριστήσω τον πολυαγαπημένο μου πατέρα Δρ. Αντώνιο Φιλιπούση, που διετέλεσε Διευθυντής Ερευνών στο Εργαστήριο Εδώδιμων Μυκήτων του ΕΛΓΟ Δήμητρα και δεν βρίσκεται πια στη ζωή. Το μεράκι του, η αφοσίωση του και η αγάπη του στην επιστήμη, μου ενέπνευσαν από τα παιδικά μου χρόνια το θαυμασμό προς την έρευνα και την επιθυμία κάποτε να αποτελέσω κι εγώ μέρος αυτού του χώρου. Η αδιάλειπτη υποστήριξη του σε όλα τα σπουδαία και νέα ξεκινήματα στη ζωή μου και η προτροπή του αποτέλεσαν το έναυσμα να ξεκινήσω τη συγκεκριμένη διατριβή. Αυτή η διατριβή είναι αφιερωμένη σε εκείνον.

Τέλος, επιθυμώ να ευχαριστήσω τη μητέρα μου για τη στήριξη και όλα όσα μου προσέφερε και τους κοντινούς μου ανθρώπους για την υπομονή, την κατανόηση και την ηθική υποστήριξη τους σε αυτή μου την προσπάθεια.

Ροζανίνα Α. Φιλιπούση

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	XXII
ABSTRACT	XXV
I. ΓΕΝΙΚΗ ΕΙΣΑΓΩΓΗ-ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ	XXIX
1. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΕΠΙΣΚΟΠΗΣΗ	33
1.1. Σύγχρονες τάσεις στην παραγωγή βιοκαυσίμων	34
1.2. Η γλυκερόλη	34
1.3. Η χρήση των μικροοργανισμών για την παραγωγή προϊόντων βιοτεχνολογικού ενδιαφέροντος	37
1.4. Οι ελαιογόνες ζύμες	39
1.4.1. Η ελαιογόνος ζύμη <i>Rhodosporidium toruloides</i>	40
1.4.2. Ο μικροοργανισμός <i>Debaryomyces</i> στην παραγωγή αραβιτόλης	42
1.5. Βιοσύνθεση κυτταρικών λιπιδίων	42
1.6. Το φαινόμενο της καταστολής του καταβολίτη στους μικροοργανισμούς	45
1.7. Οι ενδοπολυσακχαρίτες (Intracellular Polysaccharides, IPS) και η βιοσυσσώρευση τους	47
1.8. Οι πολυόλες και η βιομηχανική τους χρήση	50
1.8.1. Γενικά χαρακτηριστικά της αραβιτόλης	54
1.8.2. Βιοσύνθεση της αραβιτόλης	54
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	56
2.1. Βιολογικό υλικό	57
2.2. Θρεπτικά υποστρώματα	59
2.2.1. Παρασκευή προκαλλιέργειας	59
2.2.2. Θρεπτικό μέσο κύριας καλλιέργειας	59
2.3. Τύποι καλλιέργειας και συνθήκες	60
2.3.1 Ζυμώσεις χρησιμοποιώντας το στέλεχος <i>Rhodosporidium toruloides</i> NRRL Y-27012	61

2.3.2 Ζυμώσεις χρησιμοποιώντας το στέλεχος <i>Debaryomyces</i> sp. FMCC Y ₆₉	63
2.4. Αναλύσεις	66
2.4.1. Προσδιορισμός βιομάζας	66
2.4.2. Προσδιορισμός pH	68
2.4.3. Προσδιορισμός και μέτρηση του οξυγόνου	68
2.4.4. Προσδιορισμός κατανάλωσης υποστρώματος και παραγωγής μεταβολικών προϊόντων	69
2.4.5. Ποσοτικός προσδιορισμός ενδοκυτταρικού λίπους	71
2.4.6. Μεθυλεστεροποίηση	72
2.4.7. Ανάλυση στον αέριο χρωματογράφο (GC)	73
2.4.8. Κλασμάτωση λιπιδίων	73
2.4.9. Προσδιορισμός ενδοπολυσακχαριτών (IPS)	76
2.4.10. Προσδιορισμός Αζώτου των Ελεύθερων Αμινομάδων (FAN analysis)	77
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	78
3.1. Αποτελέσματα ζυμώσεων του μικροοργανισμού <i>Rhodospiridium toruloides</i> NRRL Y-27012	79
3.1.1. Ασυνεχείς ζυμώσεις σε υπόστρωμα γλυκερόλης σε κωνικές φιάλες– Επαναληψιμότητα αποτελεσμάτων–Αξιολόγηση μεθόδων εκχύλισης λίπους	79
3.1.2. Αξιολόγηση της επίδρασης του pH σε ασυνεχείς ζυμώσεις σε υπόστρωμα γλυκερόλης σε κωνικές φιάλες	85
3.1.3. Ασυνεχείς ζυμώσεις σε μικτό υπόστρωμα γλυκόζης-γλυκερόλης σε κωνικές φιάλες	86
3.1.4. Αξιολόγηση της επίδρασης της συγκέντρωσης του NaCl σε ασυνεχείς ζυμώσεις	91
3.1.5. Αξιολόγηση του υδρογλυκερικού εκχυλίσματος φλοιού κρεμμυδιού (Onion Solid Wastes-OSWs) στην παραγωγή των λιπιδίων-μη ασηπτική διεργασία	98
3.1.6. Αξιολόγηση της συγκέντρωσης της γλυκερόλης και του λόγου C/N σε ασυνεχείς ζυμώσεις σε υπόστρωμα γλυκερόλης σε κωνικές φιάλες	99
3.1.7. Ασυνεχείς ζυμώσεις σε υπόστρωμα γλυκερόλης σε βιοαντιδραστήρα	106
3.2. Αποτελέσματα ζυμώσεων του στελέχους <i>Debaryomyces</i> sp FMCC Y₆₉	111

3.2.1. Ασυνεχείς ζυμώσεις σε σύστημα αναδεδυμένων κωνικών φιαλών-επαναληψιμότητα αποτελεσμάτων	111
3.2.2. Ταυτοποίηση στελέχους	113
3.2.3. Ασυνεχείς ζυμώσεις σε υπόστρωμα γλυκερόλης σε κωνικές φιάλες	114
3.2.4. Ασυνεχείς ζυμώσεις σε υπόστρωμα γλυκερόλης σε βιοαντιδραστήρα	116
3.2.5. Αξιολόγηση της επίδρασης του pH σε ασυνεχείς ζυμώσεις	119
3.2.6. Ασυνεχείς ζυμώσεις σε μικτό υπόστρωμα γλυκόζης-γλυκερόλης σε κωνικές φιάλες	121
3.2.7. Αξιολόγηση της επίδρασης της συγκέντρωσης του NaCl σε ασυνεχείς ζυμώσεις	125
3.2.8. Ασυνεχείς ζυμώσεις σε μη θερμικά επεξεργασμένο υπόστρωμα γλυκερόλης σε κωνικές φιάλες	127
3.2.9. Αξιολόγηση της επίδρασης του λόγου C/N σε ασυνεχείς ζυμώσεις σε υπόστρωμα γλυκερόλης σε κωνικές φιάλες	129
3.2.10. Ημι-συνεχείς καλλιέργειες σε υπόστρωμα γλυκερόλης σε κωνικές φιάλες	133
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	135
4.1. Καλλιέργειες του μικροοργανισμού <i>Rhodosporidium toruloides</i>	136
4.2. Καλλιέργειες του μικροοργανισμού <i>Debaryomyces prosopidis</i>	147
5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	154
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	159

Λίστα των πινάκων

Πίνακας 1.1. Φυσικοχημικές ιδιότητες της γλυκερόλης (Μετσοβίτη, 2013).	36
Πίνακας 1.2. Σύνθεση των ενδοκυτταρικών σακχάρων της ζύμης <i>Cryptococcus curvatus</i> NRRL Y-1511 σε συνθήκες περιοριστικές σε άζωτο και σε άνθρακα σε υπόστρωμα λακτόζης σε διάφορες συγκεντρώσεις (Tchakouteu <i>et al.</i> , 2015).	50
Πίνακας 1.3. Θερμιδική αξία, γλυκύτητα και γλυκαιμικός δείκτης γλυκαντικών αλκοολών (Grembecka, 2015).	51
Πίνακας 1.4. Παραγωγή πολυολών από διάφορα είδη ζυμών του γένους <i>Yarrowia lipolytica</i> που καλλιεργήθηκαν σε υπόστρωμα γλυκερόλης σε διαφορετικούς τύπους καλλιέργειας (Vastaroucha <i>et al.</i> , 2021).	52
Πίνακας 2.1. Επιστημονική ταξινόμηση του είδους <i>Rhodospiridium toruloides</i> .	57
Πίνακας 2.2. Επιστημονική ταξινόμηση του είδους <i>Debaryomyces</i> sp. FMCC Y ₆₉ .	57
Πίνακας 2.3. Σύσταση μεταλλικών αλάτων (Papanikolaou <i>et al.</i> , 2001).	60
Πίνακας 2.4. Συγκεντρώσεις πηγής άνθρακα και αζώτου σε g/L σε ασυνεχείς ζυμώσεις του μικροοργανισμού <i>Rhodospiridium toruloides</i> NRRL Y-27012 σε μικτό υπόστρωμα γλυκόζης-γλυκερόλης.	61
Πίνακας 2.5. Συγκεντρώσεις NaCl και αζώτου σε g/L σε ασυνεχείς ζυμώσεις του μικροοργανισμού <i>Rhodospiridium toruloides</i> NRRL Y-27012 σε υπόστρωμα γλυκερόλης 80 g/L.	62
Πίνακας 2.6. Συγκεντρώσεις OSWs σε g/L σε ασυνεχείς ζυμώσεις υπό ασηπτικές και μη- ασηπτικές συνθήκες του μικροοργανισμού <i>Rhodospiridium toruloides</i> NRRL Y-27012 σε υπόστρωμα γλυκερόλης 80 g/L.	63
Πίνακας 2.7. Συγκεντρώσεις πηγής άνθρακα και αζώτου σε g/L σε ασυνεχείς ζυμώσεις του μικροοργανισμού <i>Rhodospiridium toruloides</i> NRRL Y-27012 σε υπόστρωμα γλυκερόλης 90 g/L.	63
Πίνακας 2.8. Συγκεντρώσεις πηγής άνθρακα και αζώτου σε g/L σε ασυνεχείς ζυμώσεις του μικροοργανισμού <i>Rhodospiridium toruloides</i> NRRL Y-27012 σε υπόστρωμα γλυκερόλης 90 g/L.	63
Πίνακας 2.9. Συγκεντρώσεις πηγής άνθρακα και αζώτου σε g/L σε ασυνεχείς ζυμώσεις του μικροοργανισμού <i>Debaryomyces</i> sp. FMCC Y ₆₉ σε υπόστρωμα γλυκόζης-γλυκερόλης.	64
Πίνακας 2.10. Συγκεντρώσεις NaCl και αζώτου σε g/L σε ασυνεχείς ζυμώσεις του μικροοργανισμού <i>Debaryomyces</i> sp. FMCC Y ₆₉ σε υπόστρωμα γλυκερόλης 125 g/L.	65
Πίνακας 2.11. Συγκεντρώσεις πηγής άνθρακα και αζώτου σε g/L σε ασυνεχείς ζυμώσεις του μικροοργανισμού <i>Debaryomyces</i> sp. FMCC Y ₆₉ σε υπόστρωμα γλυκερόλης 125 g/L.	65
Πίνακας 2.12. Συγκεντρώσεις πηγής άνθρακα και αζώτου σε g/L σε ασυνεχείς ζυμώσεις του μικροοργανισμού <i>Debaryomyces</i> sp. FMCC Y ₆₉ σε υπόστρωμα γλυκερόλης 135 g/L.	66

- Πίνακας 3.1.** Συγκεντρωτικά αποτελέσματα της κατανάλωσης υποστρώματος (G_{tot}, g/L), της παραγωγής βιομάζας (X, g/L), 84
λιπιδίων (L, g/L), ενδοπολυσακχαριτών ανά παραγόμενη βιομάζα (IPS/X%, w/w), συντελεστή απόδοσης λίπους ανά μονάδα
καταναλωθέντος υποστρώματος (Y_{L/G_{tot}}, g/g), και ποσοστού λίπους επί ξηράς ουσίας (L/X%, w/w) του μικροοργανισμού
Rhodosporidium toruloides NRRL Y-27012 σε ζύμωση κλειστού τύπου σε κωνικές φιάλες σε αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης 80
g/L. Συνθήκες καλλιέργειας: ανάδευση 180±5 rpm, θερμοκρασία 28±1 °C, pH 5,5. Κάθε σημείο αποτελεί μέσο όρο 2 ανεξάρτητων
επαναλήψεων και το τυπικό σφάλμα για τα περισσότερα σημεία της ζύμωσης προσδιορίστηκε σε ≤18%.
- Πίνακας 3.2.** Σύνθεση λιπαρών οξέων των ενδοκυτταρικών λιπιδίων του μικροοργανισμού *Rhodosporidium toruloides* NRRL Y- 85
27012 κατά τη διάρκεια καλλιέργειας σε ζύμωση κλειστού τύπου σε κωνικές φιάλες σε υπόστρωμα με αρχική συγκέντρωση
γλυκερόλης 80 g/L σε διαφορετικά pH. Συνθήκες καλλιέργειας: ανάδευση 180±5 rpm, θερμοκρασία 28±1 °C. Κάθε σημείο αποτελεί
μέσο όρο 2 ανεξάρτητων επαναλήψεων και το σχετικό τυπικό σφάλμα για τα περισσότερα από τα σημεία της ζύμωσης
προσδιορίστηκε σε ≤18%.
- Πίνακας 3.3.** Συγκεντρωτικά αποτελέσματα της κατανάλωσης υποστρώματος (S_{cons}, g/L), της παραγωγής βιομάζας (X, g/L), 88
λιπιδίων (L, g/L), ενδοπολυσακχαριτών ανά παραγόμενη βιομάζα (IPS/X %, w/w), συντελεστή απόδοσης λίπους ανά μονάδα
καταναλωθέντος υποστρώματος (Y_{L/S}, g/g), και ποσοστού λίπους επί ξηράς ουσίας (L/X %, w/w) του μικροοργανισμού
Rhodosporidium toruloides NRRL Y-27012 σε ζύμωση κλειστού τύπου σε κωνικές φιάλες σε αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης 80
g/L. Συνθήκες καλλιέργειας: ανάδευση 180±5 rpm, θερμοκρασία 28±1 °C, pH 5,5. Κάθε σημείο αποτελεί μέσο όρο 2 ανεξάρτητων
επαναλήψεων και το σχετικό τυπικό σφάλμα για τα περισσότερα από τα σημεία της ζύμωσης προσδιορίστηκε σε ≤18%.
- Πίνακας 3.4.** Σύνθεση λιπαρών οξέων των ενδοκυτταρικών λιπιδίων του μικροοργανισμού *Rhodosporidium toruloides* NRRL Y- 90
27012 κατά τη διάρκεια καλλιέργειας σε ζύμωση κλειστού τύπου σε κωνικές φιάλες σε υπόστρωμα γλυκόζης, γλυκερόλης και
μίγματα αυτών. Συνθήκες καλλιέργειας: ανάδευση 180±5 rpm, θερμοκρασία 28±1 °C, pH 5,5. Κάθε σημείο αποτελεί μέσο όρο 2
ανεξάρτητων επαναλήψεων και το σχετικό τυπικό σφάλμα για τα περισσότερα από τα σημεία της ζύμωσης προσδιορίστηκε σε
≤18%.
- Πίνακας 3.5.** Συγκεντρωτικός πίνακας αποτελεσμάτων των ζυμώσεων σε υπόστρωμα γλυκερόλης αρχικής συγκέντρωσης 80 g/L 95
για διαφορετικές συγκεντρώσεις άλατος 0,2%, w/v, 0,5%, w/v, 0,8%, w/v, 1,0%, w/v, 2,0%, w/v και 3,0%, w/v. Παρουσιάζονται οι
τιμές της κατανάλωσης υποστρώματος (G_{tot}, g/L), της παραγωγής βιομάζας (X, g/L), λιπιδίων (L, g/L), ενδοπολυσακχαριτών ανά
παραγόμενη βιομάζα (IPS/X%, w/w), συντελεστή απόδοσης βιομάζας ανά μονάδα καταναλωθέντος υποστρώματος (Y_{X/G_{tot}}, g/g),
και ποσοστού λίπους επί ξηράς ουσίας (L/X%, w/w) του μικροοργανισμού *Rhodosporidium toruloides* NRRL Y-27012. Κάθε
σημείο αποτελεί μέσο όρο 2 ανεξάρτητων επαναλήψεων και το σχετικό τυπικό σφάλμα για τα περισσότερα από τα σημεία της
ζύμωσης προσδιορίστηκε σε ≤18%.
- Πίνακας 3.6.** Σύνθεση λιπαρών οξέων των ενδοκυτταρικών λιπιδίων, για τα ολικά λιπίδια του μικροοργανισμού *Rhodosporidium* 96
toruloides NRRL Y-27012 σε υπόστρωμα γλυκερόλης αρχικής συγκέντρωσης 80 g/L για διαφορετικές συγκεντρώσεις άλατος 1,0%,
w/v, 2,0%, w/v και 3,0%, w/v. Κάθε σημείο αποτελεί μέσο όρο 2 ανεξάρτητων επαναλήψεων και το σχετικό τυπικό σφάλμα για τα
περισσότερα από τα σημεία της ζύμωσης προσδιορίστηκε σε ≤18%.
- Πίνακας 3.7.** Σύνθεση λιπαρών οξέων των ενδοκυτταρικών λιπιδίων και τα κλάσματα αυτών, Ουδέτερα (NL), Σφιγγολιπίδια και 97
γλυκολιπίδια (G+S) και Φωσφολιπίδια (P), του μικροοργανισμού *Rhodosporidium toruloides* NRRL Y-27012 σε υπόστρωμα
γλυκερόλης αρχικής συγκέντρωσης 80 g/L για διαφορετικές συγκεντρώσεις άλατος 0,2%, w/v, 0,5%, w/v και 0,8%, w/v. Κάθε
σημείο αποτελεί μέσο όρο 2 ανεξάρτητων επαναλήψεων και το σχετικό τυπικό σφάλμα για τα περισσότερα από τα σημεία της
ζύμωσης προσδιορίστηκε σε ≤18%.
- Πίνακας 3.8.** Ποσοτικά δεδομένα του μικροοργανισμού *R. toruloides* σε υπόστρωμα γλυκερόλης σε πείραμα σε κωνικές φιάλες. Η 99
αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης ήταν 80 g/L. Στο μάρτυρα προστέθηκε γλυκερόλη 80 g/L, ενώ στα λοιπά πειράματα προστέθηκε

γλυκερόλη και υδρογλυκερικό εκχύλισμα OSWs. Παρουσιάζονται οι τιμές της κατανάλωσης υποστρώματος (G_{Iol} , g/L), της παραγωγής βιομάζας (X , g/L), λιπιδίων (L , g/L), ενδοπολυσακχαριτών ανά παραγόμενη βιομάζα ($IPS/X\%$, w/w), συντελεστή απόδοσης λίπους ανά μονάδα καταναλωθέντος υποστρώματος ($Y_{L/G_{Iol}}$, g/g), και ποσοστού λίπους επί ξηράς ουσίας ($L/X\%$, w/w). Κάθε σημείο αποτελεί μέσο όρο 2 ανεξάρτητων επαναλήψεων και το σχετικό τυπικό σφάλμα για τα περισσότερα από τα σημεία της ζύμωσης προσδιορίστηκε σε $\leq 18\%$.

Πίνακας 3.9. Συγκεντρωτικός πίνακας αποτελεσμάτων, ζυμώσεων του μικροοργανισμού *Rhodosporidium toruloides* NRRL Y-27012 σε υπόστρωμα γλυκερόλης με ποικίλες αρχικές συγκεντρώσεις γλυκερόλης και ίδια αρχική συγκέντρωση αζώτου. Παρουσιάζονται οι τιμές της κατανάλωσης υποστρώματος (G_{Iol} , g/L), της παραγωγής βιομάζας (X , g/L), λιπιδίων (L , g/L), ενδοπολυσακχαριτών ανά παραγόμενη βιομάζα ($IPS/X\%$, w/w), συντελεστή απόδοσης λίπους ανά μονάδα καταναλωθέντος υποστρώματος ($Y_{L/G_{Iol}}$, g/g), και ποσοστού λίπους επί ξηράς ουσίας ($L/X\%$, w/w). Κάθε σημείο αποτελεί μέσο όρο 2 ανεξάρτητων επαναλήψεων και το σχετικό τυπικό σφάλμα για τα περισσότερα από τα σημεία της ζύμωσης προσδιορίστηκε σε $\leq 18\%$.

Πίνακας 3.10. Συγκεντρωτικός πίνακας αποτελεσμάτων, ζυμώσεων του μικροοργανισμού *Rhodosporidium toruloides* NRRL Y-27012 σε υπόστρωμα γλυκερόλης αρχικής συγκέντρωσης 90 g/L για τους τέσσερις λόγους C/N=50 moles/moles, C/N=100 moles/moles, C/N=160 moles/moles και C/N=240 moles/moles. Παρουσιάζονται οι τιμές της κατανάλωσης υποστρώματος (G_{Iol} , g/L), της παραγωγής βιομάζας (X , g/L), λιπιδίων (L , g/L), ενδοπολυσακχαριτών ανά παραγόμενη βιομάζα ($IPS/X\%$, w/w), ενδοπολυσακχαριτών (IPS , g/L) και λίπους επί ξηράς ουσίας ($L/X\%$, w/w). Κάθε σημείο αποτελεί μέσο όρο 2 ανεξάρτητων επαναλήψεων και το σχετικό τυπικό σφάλμα για τα περισσότερα από τα σημεία της ζύμωσης προσδιορίστηκε σε $\leq 18\%$.

Πίνακας 3.11. Σύνθεση των λιπαρών οξέων των ολικών λιπιδίων (% w/w) κατά τη διάρκεια καλλιέργειας του μικροοργανισμού *Rhodosporidium toruloides* NRRL Y-27012 σε ζυμώσεις κλειστού τύπου σε κωνικές φιάλες σε αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης 90 g/L για τους τέσσερις λόγους C/N=50 moles/moles, C/N=100 moles/moles, C/N=160 moles/moles και C/N=240 moles/moles. Συνθήκες καλλιέργειας: ανάδευση 180 ± 5 rpm, θερμοκρασία 28 ± 1 °C. Κάθε σημείο αποτελεί μέσο όρο 2 ανεξάρτητων επαναλήψεων και το σχετικό τυπικό σφάλμα για τα περισσότερα από τα σημεία της ζύμωσης προσδιορίστηκε σε $\leq 18\%$.

Πίνακας 3.12. Σύνθεση λιπαρών οξέων των ενδοκυτταρικών λιπιδίων, για τα ολικά λιπίδια και τα κλάσματα αυτών, ουδέτερα (NL), Σφιγγολιπίδια και γλυκολιπίδια (G+S) και Φωσφολιπίδια (P) του μικροοργανισμού *Rhodosporidium toruloides* NRRL Y-27012 σε υπόστρωμα γλυκερόλης αρχικής συγκέντρωσης 90 g/L για τους τέσσερις λόγους C/N=50 moles/moles, C/N=100 moles/moles, C/N=160 moles/moles και C/N=240 moles/moles. Κάθε σημείο αποτελεί μέσο όρο 2 ανεξάρτητων επαναλήψεων και το σχετικό τυπικό σφάλμα για τα περισσότερα από τα σημεία της ζύμωσης προσδιορίστηκε σε $\leq 18\%$.

Πίνακας 3.13. Συγκεντρωτικά αποτελέσματα της κατανάλωσης υποστρώματος ($G_{Iol_{cons}}$, g/L), της παραγωγής βιομάζας (X , g/L), αραβιτόλης (Ara, g/L), λίπους (L , g/L), λίπους επί ξηράς ουσίας ($L/X\%$, w/w) και ενδοπολυσακχαριτών ανά παραγόμενη βιομάζα ($IPS/X\%$, w/w), κατά τη διάρκεια ζυμώσεων του *Debaryomyces prosopidis* σε ασυνεχή ζύμωση σε κωνικές φιάλες σε αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης 80 g/L και 125 g/L. Συνθήκες καλλιέργειας: ανάδευση 180 ± 5 rpm, θερμοκρασία 30 ± 1 °C, pH 5,5. Κάθε σημείο αποτελεί μέσο όρο 2 ανεξάρτητων επαναλήψεων και το σχετικό τυπικό σφάλμα για τα περισσότερα από τα σημεία της ζύμωσης προσδιορίστηκε σε $\leq 18\%$.

Πίνακας 3.14. Συγκεντρωτικά αποτελέσματα της κατανάλωσης υποστρώματος ($G_{Iol_{cons}}$, g/L), της παραγωγής βιομάζας (X , g/L), αραβιτόλης (Ara, g/L), λίπους (L , g/L), συντελεστή απόδοσης αραβιτόλης προς καταναλωθέν υπόστρωμα ($Y_{Ara/G_{Iol}}$, g/g) και ενδοπολυσακχαριτών ανά παραγόμενη βιομάζα ($IPS/X\%$, w/w), κατά τη διάρκεια ζυμώσεων του *Debaryomyces prosopidis* σε ασυνεχή ζύμωση σε βιοαντιδραστήρα σε αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης 80 g/L και 125 g/L. Συνθήκες καλλιέργειας: ανάδευση 180 ± 5 rpm, θερμοκρασία 30 ± 1 °C, pH 5,5. Κάθε σημείο αποτελεί μέσο όρο 2 ανεξάρτητων επαναλήψεων και το σχετικό τυπικό σφάλμα για τα περισσότερα από τα σημεία της ζύμωσης προσδιορίστηκε σε $\leq 18\%$.

Πίνακας 3.15. Συγκενρωτικά αποτελέσματα της κατανάλωσης υποστρώματος ($G_{Iol_{cons}}$, g/L), της παραγωγής βιομάζας (X , g/L), 120
αραβιτόλης (Ara , g/L), συντελεστή απόδοσης αραβιτόλης ανά μονάδα καταναλωθέντος υποστρώματος ($Y_{Ara/GIol}$, g/g),
παραγωγικότητας αραβιτόλης ανά ώρα (Q_p , g/L/h) και ενδοπολυσακχαριτών ανά παραγόμενη βιομάζα (IPS/X %, w/w), κατά τη
διάρκεια ζυμώσεων του *Debaryomyces prosopidis* σε ασυνεχή ζύμωση σε κωνικές φιάλες σε αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης
125g/L. Συνθήκες καλλιέργειας: ανάδευση 180±5 rpm, θερμοκρασία 30±1 °C, pH 5,5. Κάθε σημείο αποτελεί μέσο όρο 2
ανεξάρτητων επαναλήψεων και το σχετικό τυπικό σφάλμα για τα περισσότερα από τα σημεία της ζύμωσης προσδιορίστηκε σε
≤18%.

Πίνακας 3.16. Συγκενρωτικά αποτελέσματα της κατανάλωσης υποστρώματος (TS_{cons} , g/L), της παραγωγής βιομάζας (X , g/L), 122
αραβιτόλης (Ara , g/L), ενδοπολυσακχαριτών ανά παραγόμενη βιομάζα (IPS/X %, w/w), συντελεστή απόδοσης αραβιτόλης ανά
μονάδα καταναλωθέντος υποστρώματος ($Y_{Ara/S}$, g/g), και παραγωγικότητας αραβιτόλης ανά ώρα (Q_p , g/L/h) κατά τη διάρκεια
ζυμώσεων σε διαφορετικά υποστρώματα. Κάθε σημείο αποτελεί μέσο όρο 2 ανεξάρτητων επαναλήψεων και το σχετικό τυπικό
σφάλμα για τα περισσότερα από τα σημεία της ζύμωσης προσδιορίστηκε σε ≤18%.

Πίνακας 3.17. Συγκενρωτικά αποτελέσματα της κατανάλωσης υποστρώματος ($G_{Iol_{cons}}$, g/L), της παραγωγής βιομάζας (X , g/L), 126
αραβιτόλης (Ara , g/L), ενδοπολυσακχαριτών ανά παραγόμενη βιομάζα (IPS/X %, w/w), συντελεστή απόδοσης αραβιτόλης ανά
μονάδα καταναλωθέντος υποστρώματος ($Y_{Ara/GIol}$, g/g), και παραγωγικότητας αραβιτόλης ανά ώρα (Q_p , g/L/h) κατά τη διάρκεια
ζυμώσεων σε διαφορετικές συγκεντρώσεις NaCl. Κάθε σημείο αποτελεί μέσο όρο 2 ανεξάρτητων επαναλήψεων και το σχετικό
τυπικό σφάλμα για τα περισσότερα από τα σημεία της ζύμωσης προσδιορίστηκε σε ≤18%.

Πίνακας 3.18. Συγκενρωτικά αποτελέσματα της κατανάλωσης υποστρώματος ($G_{Iol_{cons}}$, g/L), της παραγωγής βιομάζας (X , g/L), 128
αραβιτόλης (Ara , g/L), συντελεστή απόδοσης αραβιτόλης ανά μονάδα καταναλωθέντος υποστρώματος ($Y_{Ara/GIol}$, g/g) και
παραγωγικότητας αραβιτόλης ανά ώρα (Q_p , g/L/h), κατά τη διάρκεια ζυμώσεων σε μη θερμικά επεξεργασμένο θρεπτικό μέσο.
Συνθήκες καλλιέργειας: ανάδευση 180±5 rpm, θερμοκρασία 30±1 °C, pH 5,5. Κάθε σημείο αποτελεί μέσο όρο 2 ανεξάρτητων
επαναλήψεων και το σχετικό τυπικό σφάλμα για τα περισσότερα από τα σημεία της ζύμωσης προσδιορίστηκε σε ≤18%.

Πίνακας 3.19. Συγκενρωτικά αποτελέσματα της κατανάλωσης υποστρώματος ($G_{Iol_{cons}}$, g/L) της μέγιστης τιμής παραγωγής 131
βιομάζας (X , g/L), της μέγιστης συγκέντρωσης αραβιτόλης (Ara , g/L), συντελεστή απόδοσης αραβιτόλης ανά μονάδα
καταναλωθέντος υποστρώματος ($Y_{Ara/GIol}$, g/g) και ενδοπολυσακχαριτών ανά ξηρά ουσία (IPS/X %, w/w), κατά τη διάρκεια
καλλιέργειας του μικροοργανισμού *Debaryomyces prosopidis* σε ζυμώσεις κλειστού τύπου σε κωνικές φιάλες σε αρχική
συγκέντρωση γλυκερόλης 135 g/L και λόγους C/N=79 moles/moles, C/N=158 moles/moles, C/N=246 moles/moles. Συνθήκες
καλλιέργειας: ανάδευση 180±5 rpm, θερμοκρασία 30±1 °C, pH 5,5. Κάθε σημείο αποτελεί μέσο όρο 2 ανεξάρτητων επαναλήψεων
και το σχετικό τυπικό σφάλμα για τα περισσότερα από τα σημεία της ζύμωσης προσδιορίστηκε σε ≤18%.

Πίνακας 4.1. Συγκριτικά αποτελέσματα της διεθνούς βιβλιογραφίας, ζυμώσεων του μικροοργανισμού *Rhodospiridium toruloides* 145
σε διάφορα υποστρώματα. Παρουσιάζονται η παραγωγή βιομάζας (X , g/L) και το λίπος επί ξηράς ουσίας (L/X %, w/w).

Πίνακας 4.2. Συγκριτικά αποτελέσματα της διεθνούς βιβλιογραφίας, ζυμώσεων μικροοργανισμών σε διάφορα υποστρώματα. 151
Παρουσιάζονται οι παραγόμενες πολυόλες και η συγκέντρωση αυτών (g/L).

Λίστα των εικόνων

Εικόνα 1.1. Τριδιάστατη μορφή του μορίου της γλυκερόλης (Μετσοβίτη, 2013).	35
Εικόνα 1.2. Η παγκόσμια παραγωγή βιοντίζελ από το 2010 έως το 2027 (πηγή: OECD Agriculture Statistics Database).	37
Εικόνα 1.3. Προϊόντα που δύναται να παραχθούν από μικροβιακές ζυμώσεις (προσαρμοσμένο από Vijayan <i>et al.</i> , 1994).	39
Εικόνα 1.4. Ελαιογόνος ζύμη κατά την παρατήρηση σε οπτικό μικροσκόπιο μεγέθυνση x 100.	40
Εικόνα 1.5. Αποικίες του είδους <i>Rhodospiridium toruloides</i> σε στερεή καλλιέργεια (προσαρμοσμένο από Wikimedia).	41
Εικόνα 1.6. Βιοτεχνολογικές εφαρμογές του είδους <i>Rhodospiridium toruloides</i> .	42
Εικόνα 1.7. Μεταβολικό μονοπάτι βιοσύνθεσης λίπους σε ελαιογόνους μικροοργανισμούς (προσαρμοσμένο από Ratledge, 2004).	43
Εικόνα 1.8. Σχηματισμός ενδοκυτταρικών τρι-ακυλο-γλυκερολών μέσω ακυλίωσης της α-φωσφορο-γλυκερόλης (προσαρμοσμένο από Papanikolaou and Aggelis, 2011).	44
Εικόνα 1.9. Μεταβολικό μονοπάτι του μικροοργανισμού <i>Rhodospiridium toruloides</i> σε μικτό υπόστρωμα γλυκόζης-γλυκερόλης (προσαρμοσμένο από Bommareddy <i>et al.</i> , 2015).	47
Εικόνα 1.10. Υποθετικό σενάριο διάμεσου μεταβολισμού στα μυκήλια (προσαρμοσμένο από τους Zhong and Tang, 2004; Papanikolaou and Aggelis, 2011a).	49
Εικόνα 1.11. Κρυσταλλική μορφή της αραβιτόλης (προσαρμοσμένο από Wikipedia).	51
Εικόνα 1.12. Συντακτικός τύπος της αραβιτόλης (προσαρμοσμένο από Wikipedia).	54
Εικόνα 1.13. Πιθανά μεταβολικά μονοπάτια για τη μετατροπή των διαφόρων υποστρωμάτων σε αραβιτόλη. (προσαρμοσμένο από Koganti <i>et al.</i> , 2011).	55
Εικόνα 2.1. Κεκλιμένοι σωλήνες (slants) πληρωμένοι με θρεπτικό μέσο YPD και καλλιέργεια του μικροοργανισμού <i>Rhodospiridium toruloides</i> NRRL Y-27012.	58
Εικόνα 2.2. Κύτταρα του μικροοργανισμού <i>Rhodospiridium toruloides</i> NRRL Y-27012 (μεγέθυνση x 100) (Προσωπικό αρχείο)	58
Εικόνα 2.3. Κωνικές φιάλες μετά από 120 h επώασης του μικροοργανισμού <i>Rhodospiridium toruloides</i> στον ανακινούμενο επωαστικό θάλαμο (New Brunswick Sc, USA) σε συνθήκες ανάδευσης 180 rpm και σε θερμοκρασία 28±1 °C (αριστερά), συλλογή νωπής βιομάζας, πριν τοποθετηθεί στον ξηραντήρα (δεξιά).	66
Εικόνα 2.4. Συλλογή δείγματος για ανάλυση του μικροοργανισμού <i>Rhodospiridium toruloides</i> .	67
Εικόνα 2.5. Διαχωρισμός βιομάζας και υπερκειμένου έπειτα από τη φυγοκέντρηση από καλλιέργεια του μικροοργανισμού <i>Rhodospiridium toruloides</i> σε κωνικές φιάλες.	68

Εικόνα 2.6. Διαχωρισμός βιομάζας και υπερκειμένου έπειτα από τη φυγοκέντρωση από καλλιέργεια του μικροοργανισμού <i>Rhodospiridium toruloides</i> σε βιοαντιδραστήρα.	69
Εικόνα 2.7. Πρότυπη καμπύλη αναφοράς γλυκερόλης.	70
Εικόνα 2.8. Πρότυπη καμπύλη αναφοράς αραβιτόλης.	70
Εικόνα 2.9. Λίπος διαλυμένο σε Folch του μικροοργανισμού <i>Rhodospiridium toruloides</i> .	71
Εικόνα 2.10. Ενδοκυτταρικό λίπος έπειτα από εξάτμιση του μικροοργανισμού <i>Rhodospiridium toruloides</i> .	72
Εικόνα 2.11. Η αντίδραση μεθυλεστεροποίησης που τελείται σε δύο διακριτά στάδια, το πρώτο σε αλκαλικό περιβάλλον και το δεύτερο σε όξινο (Μακρή, 2011).	73
Εικόνα 2.12. Βρασμός με MeO-Na^+ προς μετατροπή των ελεύθερων λιπαρών οξέων στους αντίστοιχους σάπωνες κατά τη μεθυλεστεροποίηση του λίπους του μικροοργανισμού <i>Rhodospiridium toruloides</i> .	73
Εικόνα 2.13. Διαχωρισμός δύο φάσεων μετά την προσθήκη εξανίου κατά τη μεθυλεστεροποίηση του μικροοργανισμού <i>Rhodospiridium toruloides</i> .	74
Εικόνα 2.14. Στήλη κλασμάτωσης λιπιδίων.	75
Εικόνα 2.15. Καθαρό λίπος σε διαχωριστική χοάνη.	75
Εικόνα 2.16. Χρωματισμός διαλυμάτων κατά την εφαρμογή της μεθόδου DNS.	77
Εικόνα 3.1. Κινητική της κατανάλωσης γλυκερόλης (Glc, g/L) (α), παραγωγή βιομάζας (X, g/L) (β), της παραγωγής λίπους (L, g/L) (γ), λίπους επί ξηράς ουσίας (L/X%, w/w) (δ), ενδοπολυσακχαριτών ανά παραγόμενη βιομάζα (IPS/X%, w/w) (ε) κατά τη διάρκεια καλλιέργειας του μικροοργανισμού <i>Rhodospiridium toruloides</i> NRRL Y-27012 σε ζύμωση κλειστού τύπου σε κωνικές φιάλες σε αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης 80 g/L με εκχύλιση με χρήση του αντιδραστήριου Folch σε σύγκριση με όξινη υδρόλυση με HCl. Συνθήκες καλλιέργειας: ανάδευση 180±5 rpm, θερμοκρασία 28±1 °C, pH 5,5. Κάθε σημείο αποτελεί μέσο όρο 2 ανεξάρτητων επαναλήψεων και το σχετικό τυπικό σφάλμα για τα περισσότερα από τα σημεία της ζύμωσης προσδιορίστηκε σε ≤18%.	82
Εικόνα 3.2. Σύγκριση της μέγιστης τελικής συγκέντρωσης λιπιδίων (g/L) κατά τη διάρκεια καλλιέργειας του μικροοργανισμού <i>Rhodospiridium toruloides</i> NRRL Y-27012 σε ζύμωση κλειστού τύπου σε κωνικές φιάλες σε αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης 80g/L. Συνθήκες καλλιέργειας: ανάδευση 180±5 rpm, θερμοκρασία 28±1 °C και διαφορετικές τιμές pH. Κάθε σημείο αποτελεί μέσο όρο 2 ανεξάρτητων επαναλήψεων και το σχετικό τυπικό σφάλμα για τα περισσότερα από τα σημεία της ζύμωσης προσδιορίστηκε σε ≤18%.	85
Εικόνα 3.3. Κινητική της κατανάλωσης γλυκόζης (Glc, g/L), της παραγωγής βιομάζας (X, g/L), λίπους (L, g/L) (α) του ποσοστού ενδοπολυσακχαριτών ανά παραγόμενη βιομάζα (IPS/X %, w/w) και λίπους επί ξηράς ουσίας (L/X %, w/w) (β) κατά τη διάρκεια καλλιέργειας του μικροοργανισμού <i>Rhodospiridium toruloides</i> NRRL Y-27012 σε ζύμωση κλειστού τύπου σε κωνικές φιάλες σε αρχική συγκέντρωση γλυκόζης 80 g/L. Συνθήκες καλλιέργειας: ανάδευση 180±5 rpm, θερμοκρασία 28±1 °C, pH 5,5. Κάθε σημείο αποτελεί μέσο όρο 2 ανεξάρτητων επαναλήψεων και το σχετικό τυπικό σφάλμα για τα περισσότερα από τα σημεία της ζύμωσης προσδιορίστηκε σε ≤18%.	87

- Εικόνα 3.4.** Κινητική της κατανάλωσης γλυκόζης (Glc, g/L) και της κατανάλωσης γλυκερόλης (GloI, g/L), κατά τη διάρκεια 89
καλλιέργειας του μικροοργανισμού *Rhodospiridium toruloides* NRRL Y-27012 σε ζύμωση κλειστού τύπου σε κωνικές φιάλες σε
συνζύμωση γλυκόζης-γλυκερόλης με τελική συγκέντρωση 80 g/L σε αναλογία 1: 1, w/w. Συνθήκες καλλιέργειας: ανάδευση 180±5
rpm, θερμοκρασία 28±1 °C, pH 5,5. Κάθε σημείο αποτελεί μέσο όρο 2 ανεξάρτητων επαναλήψεων και το σχετικό τυπικό σφάλμα
για τα περισσότερα από τα σημεία της ζύμωσης προσδιορίστηκε σε ≤18%.
- Εικόνα 3.5.** Σύγκριση της μέγιστης συγκέντρωσης λιπιδίων (L_{max} , g/L) κατά τη διάρκεια καλλιέργειας του μικροοργανισμού 94
Rhodospiridium toruloides NRRL Y-27012 σε ζυμώσεις κλειστού τύπου σε κωνικές φιάλες σε αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης
80 g/L και διαφορετικές συγκεντρώσεις NaCl. Συνθήκες καλλιέργειας: ανάδευση 180±5 rpm, θερμοκρασία 28±1 °C. Κάθε σημείο
αποτελεί μέσο όρο 2 ανεξάρτητων επαναλήψεων και το σχετικό τυπικό σφάλμα για τα περισσότερα από τα σημεία της ζύμωσης
προσδιορίστηκε σε ≤18%.
- Εικόνα 3.6.** Σύγκριση του μέγιστου ποσοστού λίπους επί ξηράς ουσίας (L/X_{max} , %, w/w) κατά τη διάρκεια καλλιέργειας του 94
μικροοργανισμού *Rhodospiridium toruloides* NRRL Y-27012 σε ζυμώσεις κλειστού τύπου σε κωνικές φιάλες σε αρχική
συγκέντρωση γλυκερόλης 80 g/L και διαφορετικές συγκεντρώσεις NaCl. Συνθήκες καλλιέργειας: ανάδευση 180±5 rpm,
θερμοκρασία 28±1 °C. Κάθε σημείο αποτελεί μέσο όρο 2 ανεξάρτητων επαναλήψεων και το σχετικό τυπικό σφάλμα για τα
περισσότερα από τα σημεία της ζύμωσης προσδιορίστηκε σε ≤18%.
- Εικόνα 3.7.** Γραφική απεικόνιση του συνολικού συντελεστή μετατροπής της γλυκερόλης (GloI, g/L) σε λίπος (L, g/L) κατά τη 102
διάρκεια καλλιέργειας του μικροοργανισμού *Rhodospiridium toruloides* NRRL Y-27012 σε ζύμωση κλειστού τύπου σε κωνικές
φιάλες σε ζύμωση σε υπόστρωμα γλυκερόλης με τελική συγκέντρωση 90 g/L. Συνθήκες καλλιέργειας: C/N=100 moles/moles,
ανάδευση 180±5 rpm, θερμοκρασία 28±1 °C, pH 5,5. Κάθε σημείο αποτελεί μέσο όρο 2 ανεξάρτητων επαναλήψεων και το σχετικό
τυπικό σφάλμα για τα περισσότερα από τα σημεία της ζύμωσης προσδιορίστηκε σε ≤18%.
- Εικόνα 3.8.** Κινητική της κατανάλωσης γλυκερόλης (GloI, g/L), της παραγωγής βιομάζας (X, g/L), λίπους (L, g/L) και 107
ενδοπολυσακχαριτών (IPS %, w/w) κατά τη διάρκεια καλλιέργειας του μικροοργανισμού *Rhodospiridium toruloides* NRRL Y-
27012 σε ζύμωση κλειστού τύπου σε βιοαντιδραστήρα σε αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης 90 g/L. Συνθήκες καλλιέργειας:
ανάδευση 180±5 rpm, θερμοκρασία 28±1 °C, pH 5,5. Κάθε σημείο αποτελεί μέσο όρο 2 ανεξάρτητων επαναλήψεων και το σχετικό
τυπικό σφάλμα για τα περισσότερα από τα σημεία της ζύμωσης προσδιορίστηκε σε ≤18%.
- Εικόνα 3.9.** Σύγκριση της τελικής συγκέντρωσης παραγόμενης βιομάζας και παραγόμενων λιπιδίων του μικροοργανισμού 107
Rhodospiridium toruloides NRRL Y-27012 σε ασυνεχείς ζυμώσεις σε κωνικές φιάλες και βιοαντιδραστήρα σε αρχική
συγκέντρωση γλυκερόλης 90 g/L. Συνθήκες καλλιέργειας: ανάδευση 180±5 rpm, θερμοκρασία 28±1 °C, pH 5,5. Κάθε σημείο
αποτελεί μέσο όρο 2 ανεξάρτητων επαναλήψεων και το σχετικό τυπικό σφάλμα για τα περισσότερα από τα σημεία της ζύμωσης
προσδιορίστηκε σε ≤18%.
- Εικόνα 3.10.** Κινητική της παραγωγής βιομάζας (X, g/L) (α), της κατανάλωσης γλυκερόλης (GloI, g/L) (β), της παραγωγής λίπους 110
(L, g/L) (γ) ενδοπολυσακχαριτών ανά παραγόμενη βιομάζα (IPS/X, %, w/w) (δ) και ποσοστού λίπους επί ξηράς ουσίας (L/X, %, w/w) (ε) κατά τη διάρκεια καλλιέργειας του μικροοργανισμού *Rhodospiridium toruloides* NRRL Y-27012 σε ζύμωση κλειστού
τύπου σε βιοαντιδραστήρα και κωνικές φιάλες σε αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης 90 g/L. Συνθήκες καλλιέργειας: ανάδευση
180±5 rpm, θερμοκρασία 28±1 °C, pH 5,5. Κάθε σημείο αποτελεί μέσο όρο 2 ανεξάρτητων επαναλήψεων και το σχετικό τυπικό
σφάλμα για τα περισσότερα από τα σημεία της ζύμωσης προσδιορίστηκε σε ≤18%.
- Εικόνα 3.11.** Κινητική της κατανάλωσης γλυκερόλης (GloI, g/L) (α), της παραγωγής βιομάζας (X, g/L) (β), αραβιτόλης (Ara, g/L) 113
(γ), λίπους (L, g/L) (δ) και ενδοπολυσακχαριτών (IPS, g/L) (ε) κατά τη διάρκεια καλλιέργειας του μικροοργανισμού *Debaryomyces*

prosopidis σε ασυνεχή ζύμωση σε κωνικές φιάλες σε αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης 80 g/L σε τρεις επαναλήψεις. Συνθήκες καλλιέργειας: ανάδευση 180±5 rpm, θερμοκρασία 30±1 °C, pH 5,5.

Εικόνα 3.12. Γραφική απεικόνιση του συντελεστή απόδοσης της παραγόμενης αραβιτόλης ($Y_{Ara/Glc}$, g/g) ανά καταναλωθείσα γλυκερόλη κατά τη διάρκεια καλλιέργειας του μικροοργανισμού *Debaryomyces prosopidis* σε ασυνεχή ζύμωση σε κωνικές φιάλες σε αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης 125 g/L. Συνθήκες καλλιέργειας: ανάδευση 180±5 rpm, θερμοκρασία 30±1 °C, pH 5,5. Κάθε σημείο αποτελεί μέσο όρο 2 ανεξάρτητων επαναλήψεων και το σχετικό τυπικό σφάλμα για τα περισσότερα από τα σημεία της ζύμωσης προσδιορίστηκε σε ≤18%. 115

Εικόνα 3.13. Κινητική της κατανάλωσης γλυκερόλης (Glc, g/L), της παραγωγής βιομάζας (X, g/L) και αραβιτόλης (Ara, g/L) κατά τη διάρκεια καλλιέργειας του μικροοργανισμού *Debaryomyces prosopidis* σε ασυνεχή ζύμωση σε βιοαντιδραστήρα σε αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης 125 g/L. Συνθήκες καλλιέργειας: ανάδευση 150 έως 450 rpm, θερμοκρασία 30±1 °C, pH=5,5. Κάθε σημείο αποτελεί μέσο όρο 2 ανεξάρτητων επαναλήψεων και το σχετικό τυπικό σφάλμα για τα περισσότερα από τα σημεία της ζύμωσης προσδιορίστηκε σε ≤18%. 118

Εικόνα 3.14. Σύγκριση της κατανάλωσης της γλυκερόλης και της μέγιστης τελικής συγκέντρωσης αραβιτόλης του μικροοργανισμού *Debaryomyces prosopidis* σε ασυνεχείς ζυμώσεις σε κωνικές φιάλες και βιοαντιδραστήρα σε διαφορετικές αρχικές συγκεντρώσεις γλυκερόλης. Συνθήκες καλλιέργειας: ανάδευση 180±5 rpm και 150 έως 450 rpm αντίστοιχα, θερμοκρασία 30±1 °C, pH 5,5. Κάθε σημείο αποτελεί μέσο όρο 2 ανεξάρτητων επαναλήψεων και το σχετικό τυπικό σφάλμα για τα περισσότερα από τα σημεία της ζύμωσης προσδιορίστηκε σε ≤18%. 118

Εικόνα 3.15. Κινητική της κατανάλωσης γλυκερόλης (Glc, g/L), της παραγωγής βιομάζας (X, g/L), αραβιτόλης (Ara, g/L) και ενδοπολυσακχαριτών ανά παραγόμενη βιομάζα (IPS/X %, w/w) κατά τη διάρκεια καλλιέργειας του μικροοργανισμού *Debaryomyces prosopidis* σε ασυνεχή ζύμωση σε κωνικές φιάλες σε αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης 125 g/L. Συνθήκες καλλιέργειας: ανάδευση 180 rpm, θερμοκρασία 30±1 °C, pH 5,5. Κάθε σημείο αποτελεί μέσο όρο 2 ανεξάρτητων επαναλήψεων και το σχετικό τυπικό σφάλμα για τα περισσότερα από τα σημεία της ζύμωσης προσδιορίστηκε σε ≤18%. 120

Εικόνα 3.16. Σύγκριση της μέγιστης τελικής συγκέντρωσης αραβιτόλης κατά τη διάρκεια καλλιέργειας του μικροοργανισμού *Debaryomyces prosopidis* σε ασυνεχείς ζυμώσεις σε κωνικές φιάλες σε αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης 125 g/L και διαφορετικές τιμές pH. Συνθήκες καλλιέργειας: ανάδευση 180±5 rpm, θερμοκρασία 30±1 °C. Κάθε σημείο αποτελεί μέσο όρο 2 ανεξάρτητων επαναλήψεων και το σχετικό τυπικό σφάλμα για τα περισσότερα από τα σημεία της ζύμωσης προσδιορίστηκε σε ≤18%. 121

Εικόνα 3.17. Κινητική της κατανάλωσης γλυκόζης (Glc, g/L) και της κατανάλωσης γλυκερόλης (Glc, g/L), κατά τη διάρκεια καλλιέργειας του μικροοργανισμού *Debaryomyces prosopidis* σε ζύμωση κλειστού τύπου σε κωνικές φιάλες σε συνζύμωση γλυκόζης-γλυκερόλης με τελική συγκέντρωση 125 g/L σε αναλογία 1: 1, w/w. Συνθήκες καλλιέργειας: ανάδευση 180±5 rpm, θερμοκρασία 30±1 °C, pH 5,5. Κάθε σημείο αποτελεί μέσο όρο 2 ανεξάρτητων επαναλήψεων και το σχετικό τυπικό σφάλμα για τα περισσότερα από τα σημεία της ζύμωσης προσδιορίστηκε σε ≤18%. 124

Εικόνα 3.18. Σύγκριση της τελικής συγκέντρωσης αραβιτόλης κατά τη διάρκεια καλλιέργειας του μικροοργανισμού *Debaryomyces prosopidis* σε ζυμώσεις κλειστού τύπου σε κωνικές φιάλες σε αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης 125 g/L με αυξανόμενη συγκέντρωση NaCl. Μάρτυρας, NaCl=2,0%, w/v, NaCl=5,0%, w/v, NaCl=8,0%, w/v, NaCl=12,0%, w/v. Συνθήκες καλλιέργειας: ανάδευση 180±5 rpm, θερμοκρασία 30±1 °C. Κάθε σημείο αποτελεί μέσο όρο 2 ανεξάρτητων επαναλήψεων και το σχετικό τυπικό σφάλμα για τα περισσότερα από τα σημεία της ζύμωσης προσδιορίστηκε σε ≤18%. 127

Εικόνα 3.19. Κινητική της κατανάλωσης γλυκερόλης κατά τη διάρκεια καλλιέργειας του μικροοργανισμού *Debaryomyces prosopidis* σε ασυνεχή ζύμωση σε κωνικές φιάλες σε αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης 135 g/L και λόγους C/N=79 moles/moles, C/N=158 moles/moles, C/N=246 moles/moles Συνθήκες καλλιέργειας: ανάδευση 180±5 rpm, θερμοκρασία 30±1 °C, pH 5,5. Κάθε 129

σημείο αποτελεί μέσο όρο 2 ανεξάρτητων επαναλήψεων και το σχετικό τυπικό σφάλμα για τα περισσότερα από τα σημεία της ζύμωσης προσδιορίστηκε σε $\leq 18\%$.

Εικόνα 3.20. Σύγκριση της μέγιστης παραγωγής βιομάζας (X_{max} , g/L), της μέγιστης τελικής συγκέντρωσης αραβιτόλης (Ara_{max} , g/L), και της απόδοσης αραβιτόλης ανά μονάδα καταναλωθέντος υποστρώματος ($Y_{Ara/Glcl}$, g/g) κατά τη διάρκεια καλλιέργειας του μικροοργανισμού *Debaryomyces prosopidis* σε ζυμώσεις κλειστού τύπου σε κωνικές φιάλες σε αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης 135 g/L και διαφορετικούς λόγους C/N. Συνθήκες καλλιέργειας: ανάδευση 180 ± 5 rpm, θερμοκρασία 30 ± 1 °C. Κάθε σημείο αποτελεί μέσο όρο 2 ανεξάρτητων επαναλήψεων και το σχετικό τυπικό σφάλμα για τα περισσότερα από τα σημεία της ζύμωσης προσδιορίστηκε σε $\leq 18\%$. 130

Εικόνα 3.21. Γραφική απεικόνιση του συντελεστή απόδοσης της παραγόμενης αραβιτόλης ($Y_{Ara/Glcl}$, g/g) ανά καταναλωθείσα γλυκερόλη κατά τη διάρκεια καλλιέργειας του μικροοργανισμού *Debaryomyces prosopidis* σε ασυνεχή ζύμωση σε κωνικές φιάλες σε αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης 135 g/L και λόγο C/N=158 moles/moles. Συνθήκες καλλιέργειας: ανάδευση 180 ± 5 rpm, θερμοκρασία 30 ± 1 °C, pH 5,5. Κάθε σημείο αποτελεί μέσο όρο 2 ανεξάρτητων επαναλήψεων και το σχετικό τυπικό σφάλμα για τα περισσότερα από τα σημεία της ζύμωσης προσδιορίστηκε σε $\leq 18\%$. 132

Εικόνα 3.22. Κινητική ειδικού ρυθμού κατανάλωσης οξυγόνου κατά τη διάρκεια καλλιέργειας του μικροοργανισμού *Debaryomyces prosopidis* σε ασυνεχή ζύμωση σε κωνικές φιάλες σε αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης 135 g/L σε διάφορους λόγους C/N. Συνθήκες καλλιέργειας: ανάδευση 180 ± 5 rpm, θερμοκρασία 30 ± 1 °C, pH 5,5. Κάθε σημείο αποτελεί μέσο όρο 2 ανεξάρτητων επαναλήψεων και το σχετικό τυπικό σφάλμα για τα περισσότερα από τα σημεία της ζύμωσης προσδιορίστηκε σε $\leq 18\%$. 133

Εικόνα 3.23. Κινητική της κατανάλωσης γλυκερόλης (Glcl, g/L), της παραγωγής βιομάζας (X, g/L), αραβιτόλης (Ara, g/L) και ενδοπολυσακχαριτών ανά παραγόμενη βιομάζα (IPS/X %, w/w) κατά τη διάρκεια καλλιέργειας του μικροοργανισμού *Debaryomyces prosopidis* σε ημι-συνεχή ζύμωση σε κωνικές φιάλες σε αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης 125 g/L Συνθήκες καλλιέργειας: ανάδευση 180 ± 5 rpm, θερμοκρασία 30 ± 1 °C, pH 5,5. Η προσθήκη στείρου θρεπτικού υποστρώματος έγινε στις 457 h. Κάθε σημείο αποτελεί μέσο όρο 2 ανεξάρτητων επαναλήψεων και το σχετικό τυπικό σφάλμα για τα περισσότερα από τα σημεία της ζύμωσης προσδιορίστηκε σε $\leq 18\%$. 134

Ι. ΓΕΝΙΚΗ ΕΙΣΑΓΩΓΗ-ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Σύμφωνα με την πρόσφατη ανακοίνωση του Οργανισμού Τροφίμων και Γεωργίας του ΟΗΕ (FAO) η τιμή της ζάχαρης αυξήθηκε ραγδαία το Σεπτέμβριο του 2023, εξαιτίας των επιπτώσεων του φαινομένου El Niño που έπληξαν τις σοδειές στην Ταϊλάνδη και την Ινδία. Ακόμη, σύμφωνα με πρόσφατες μελέτες η καλλιέργεια ζαχαρότευτλων στη Βραζιλία οδήγησε σε αποψίλωση δασών και καταστροφή σπουδαίων οικοσυστημάτων. Συνεπώς, μια οικολογική και συνάμα αναγκαία λύση αποτελεί η εξεύρεση εναλλακτικών γλυκαντικών ουσιών των οποίων η παραγωγή δεν θα απαιτεί την δέσμευση εκτάσεων γης και δεν θα επηρεάζεται από τα εκάστοτε καιρικά φαινόμενα. Παράδειγμα εναλλακτικών γλυκαντικών ουσιών αποτελούν οι πολυόλες που τα τελευταία χρόνια χρησιμοποιούνται ευρύτατα στη βιομηχανία τροφίμων ως υποκατάστατα ζάχαρης. Στην ομάδα των πολυολών ανήκει και η αραβιτόλη που αποτέλεσε αντικείμενο μελέτης της συγκεκριμένης διατριβής.

Η ενεργειακή κρίση που αντιμετωπίζει ο πλανήτης τις τελευταίες δεκαετίες εντείνει ολοένα και περισσότερο την ανάγκη παραγωγής εναλλακτικών καυσίμων που θα υποκαθιστούν το πετρέλαιο. Μία εναλλακτική πηγή καυσίμου αποτελεί το βιολογικό πετρέλαιο (βιοντίζελ) 2^{ης} γενιάς που προέρχεται από τους ελαιογόνους ετερότροφους μικροοργανισμούς. Στην πραγματικότητα, η παραγωγή του εν λόγω καυσίμου, δεν συνδέεται καθόλου με την εκμετάλλευση γεωργικών εκτάσεων, που απαιτεί η καλλιέργεια ενεργειακών φυτών σε βάρος άλλων εδώδιμων καλλιεργειών, συμβάλλοντας έτσι με θετικό τρόπο στην επισιτιστική κρίση, ενώ προκειμένου να παραχθεί 2^{ης} γενιάς βιοντίζελ από ελαιογόνους μικροοργανισμούς, προαπαιτούμενη είναι η χρήση υποπροϊόντων ή αποβλήτων ως υλικών εκκίνησης της διεργασίας, συνεπώς πέρα από τη μη-εμπλοκή τροφίμων στην παραγωγή βιοκαυσίμων, θα υπάρχει ταυτόχρονη αξιοποίηση αποβλήτων και υποπροϊόντων με προφανές πολύ θετικό οικονομικό περιβαλλοντικό αποτύπωμα στη διεργασία.

Η ακατέργαστη γλυκερόλη αποτελεί το κύριο παραπροϊόν των διαφόρων βιομηχανιών παραγωγής σαπώνων, βιολογικού πετρελαίου (βιοντίζελ), οινοπνευματωδών ποτών και βιοαιθανόλης, και μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως μια ανανεώσιμη πηγή άνθρακα για την παραγωγή χρήσιμων βιοτεχνολογικών προϊόντων. Ήδη η αλματώδης αύξηση της χρήσης των βιοκαυσίμων (του βιοντίζελ και της βιοαιθανόλης) έχει ως απόρροια την πολύ σημαντική αύξηση της παρουσίας της γλυκερόλης ως ενός παραπροϊόντος για το οποίο είναι αδήριτη η ανάγκη για περαιτέρω επεξεργασία και αξιοποίηση. Συνεπώς, τα ανωτέρω καθιστούν αναγκαία την εύρεση πολλών βιοτεχνολογικών εφαρμογών της γλυκερόλης ως υλικού χρησιμοποιούμενου στη Βιομηχανική Μικροβιολογία.

Σκοπός της συγκεκριμένης διατριβής ήταν η αξιοποίηση της βιομηχανικής γλυκερόλης παραπροϊόντος της διεργασίας παραγωγής βιοντίζελ προς μετατροπή της σε χρήσιμα μεταβολικά προϊόντα. Ανάμεσα στα μεταβολικά προϊόντα που μπορούν να παραχθούν χρησιμοποιώντας τη γλυκερόλη ως πηγή άνθρακα είναι το ενδοκυτταρικό λίπος και η αραβιτόλη. Η παραγωγή των δύο αυτών ουσιών μπορεί να επιτευχθεί με τη χρήση ζυμών σε διάφορες πηγές άνθρακα. Στην παρούσα διδακτορική διατριβή

χρησιμοποιήθηκαν τα στελέχη των ζυμών *Rhodospiridium toruloides* NRRL Y-27012 και *Debaryomyces* sp. FMCC Y₆₉ για τη παραγωγή ενδοκυτταρικού λίπους και αραβιτόλης αντίστοιχα χρησιμοποιώντας ως κύρια πηγή άνθρακα τη γλυκερόλη η οποία προέρχεται από τις βιομηχανικές διεργασίες παραγωγής βιοντίζελ.

Για το λόγο αυτό στο πρώτο μέρος της παρούσας διατριβής πραγματοποιήθηκαν καλλιέργειες χρησιμοποιώντας τη ζύμη *Rhodospiridium toruloides* NRRL Y-27012 με στόχο τη μελέτη και αξιολόγηση διαφορετικών παραμέτρων στην αύξηση του μικροοργανισμού και στην παραγωγή μικροβιακών λιπιδίων (κυρίως) καθώς και λοιπών μεταβολικών προϊόντων (ενδο-κυτταρικών πολυσακχαριτών). Για το σκοπό αυτό, πραγματοποιήθηκαν ζυμώσεις κλειστού τύπου σε κωνικές φιάλες όπου αρχικά μελετήθηκε η βέλτιστη μέθοδος ανάκτησης ενδοκυτταρικών λιπιδίων ενώ στη συνέχεια πραγματοποιήθηκαν δοκιμές σε διαφορετικό εύρος pH και μίγματα γλυκόζης-γλυκερόλης. Με στόχο την διενέργεια ζυμώσεων υπό μη ασηπτικές συνθήκες έγιναν επιπλέον δοκιμές σε διαφορετικές συγκεντρώσεις NaCl κατά τη διάρκεια έξι διαφορετικών ασυνεχών ζυμώσεων σε κωνικές φιάλες. Για τον ίδιο σκοπό μελετήθηκε επίσης η επίδραση της προσθήκης εκχυλίσματος από φλοιό κρεμμυδιού (Onion Solid Wastes – OSWs) στη φυσιολογία του εν λόγω μικροοργανισμού υπό μη ασηπτικές συνθήκες με τελικό στόχο τη μείωση του κόστους της διεργασίας. Ακόμη μελετήθηκε η βέλτιστη αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης και η ιδανική αναλογία του λόγου C/N σε ζυμώσεις κλειστού τύπου. Τέλος πραγματοποιήθηκε ασυνεχής ζύμωση σε εργαστηριακής κλίμακας βιοαντιδραστήρα. Η αξιοσημείωτη παραγωγή μικροβιακών λιπιδίων καθώς και η σύσταση των παραγομένων ελαίων που προσιδιάζει αυτής των φυτών τα έλαια των οποίων χρησιμοποιούνται για την παραγωγή βιοντίζελ, έχει ως απόρροια τη δυνατότητα σύνθεσης 2^{ns} γενιάς βιοντίζελ μέσω της ζύμης *R. toruloides* NRRL Y-27012, χρησιμοποιώντας ως υλικό εκκίνησης το «απόβλητο» της διεργασίας παραγωγής βιοντίζελ, σε ένα «κλειστό» σύστημα όπου η διεργασία παραγωγής βιοντίζελ δεν θα παράγει απόβλητα.

Στο δεύτερο μέρος της πειραματικής διαδικασίας πραγματοποιήθηκαν καλλιέργειες χρησιμοποιώντας τη ζύμη *Debaryomyces* sp. FMCC Y₆₉ με στόχο τη μελέτη και αξιολόγηση της επίδρασης των διαφορετικών παραμέτρων στην αύξηση του μικροοργανισμού και στην παραγωγή της αραβιτόλης. Περαιτέρω, μελετήθηκε και αξιολογήθηκε και η παραγωγή και λοιπών προϊόντων, όπως ενδο-κυτταρικών λιπιδίων και πολυσακχαριτών. Για το σκοπό αυτό, αρχικά πραγματοποιήθηκαν ασυνεχείς ζυμώσεις σε κωνικές φιάλες και σε εργαστηριακής κλίμακας βιοαντιδραστήρα χρησιμοποιώντας αυξανόμενες συγκεντρώσεις γλυκερόλης με στόχο της μελέτη της επίδρασης της αρχικής συγκέντρωσης του υποστρώματος στην αύξηση του μικροοργανισμού. Ακολούθως πραγματοποιήθηκαν δοκιμές σε διαφορετικό pH και ασυνεχείς ζυμώσεις σε μικό υπόστρωμα γλυκόζης-γλυκερόλης, σε διαφορετικές αναλογίες. Οι επόμενοι παράγοντες που μελετήθηκαν ήταν η ωσμωανθεκτική ικανότητα της ζύμης πραγματοποιώντας ασυνεχείς ζυμώσεις σε κωνικές φιάλες σε υπόστρωμα γλυκερόλης και μεταβαλλόμενες συγκεντρώσεις NaCl. Η καλή ωσμωανθεκτικότητα της ζύμης επέτρεψε τη διενέργεια πειράματος σε μέσο

με υψηλή αλατότητα υπό μη ασηπτικές συνθήκες. Εν συνεχεία η ζύμη αναπτύχθηκε σε υπόστρωμα γλυκερόλης σε διαφορετικούς λόγους C/N ενώ η πειραματική πορεία ολοκληρώθηκε με την πραγματοποίηση ημι-συνεχούς ζύμωσης σε κωνικές φιάλες.

Από τα αποτελέσματα των παραπάνω ζυμώνσεων προέκυψε ότι οι δύο ζύμες έχουν τη δυνατότητα να χρησιμοποιηθούν με μεγάλη επιτυχία στη βιοτεχνολογική παραγωγή χρήσιμων προϊόντων ενίοτε πολύ υψηλής προστιθέμενης αξίας με μεγάλες εφαρμογές στη χημική βιομηχανία, τη βιομηχανία των τροφίμων και τη βιομηχανία των βιοκαυσίμων.

1. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΕΠΙΣΚΟΠΗΣΗ

1.1. Σύγχρονες τάσεις στην παραγωγή βιοκαυσίμων

Η διεθνής ερευνητική κοινότητα έχει στραφεί στην αναζήτηση εναλλακτικών τύπων καυσίμων, φιλικότερων προς το περιβάλλον ως απόρροια της αλόγιστης χρήσης των αποθεμάτων πετρελαίου που παρατηρείται τις τελευταίες δεκαετίες. Κατά συνέπεια, αυτή η ανάγκη οδήγησε στην άνθηση και την ανάπτυξη της βιομηχανίας παραγωγής βιολογικών καυσίμων, των βιοκαυσίμων, τα οποία αποτελούν μια σημαντική πρόταση για την αντιμετώπιση της κλιματικής αλλαγής, την επισιτιστική ασφάλεια, τη δημιουργία βιώσιμων πρώτων υλών και τη διαφοροποίηση των ενεργειακών πόρων.

Βιοκαύσιμα ονομάζονται τα καύσιμα εκείνα στερεά, υγρά ή αέρια τα οποία προέρχονται από τη βιομάζα, το βιοδιασπώμενο δηλαδή κλάσμα προϊόντων ή αποβλήτων διαφόρων ανθρώπινων δραστηριοτήτων, συνεπώς, προέρχονται από οργανικά προϊόντα. Ως ανανεώσιμα καύσιμα έχουν το χαρακτηριστικό των χαμηλότερων εκπομπών CO₂ στο συνολικό κύκλο ζωής τους σε σχέση με τα συμβατικά ορυκτά καύσιμα, στοιχείο που εξαρτάται άμεσα από την προέλευση τους, τη χρήση τους αλλά και τον τρόπο παραγωγής και διανομής τους.

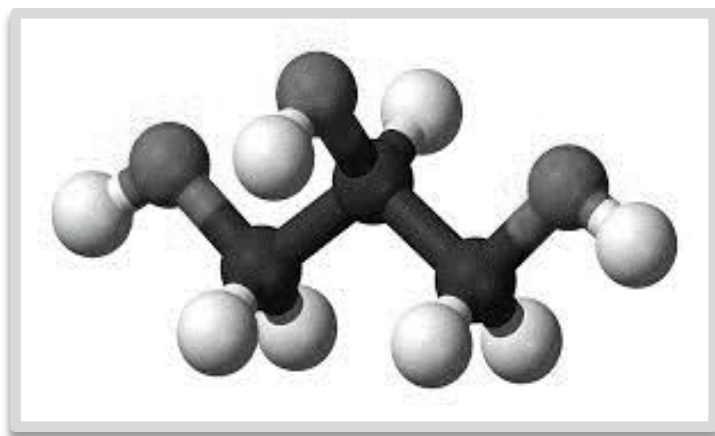
Ανάλογα με την προέλευση των πρώτων υλών από τις οποίες προέρχονται, τα βιοκαύσιμα διακρίνονται σε επιμέρους κατηγορίες. Όσον αφορά τα βιοκαύσιμα πρώτης γενιάς αυτά παράγονται από φυτικές καλλιέργειες πλούσιες σε σάκχαρα, με υψηλή περιεκτικότητα σε λίπος. Από το σύνολο των βιολογικών καυσίμων πρώτης γενιάς, ευρείας χρήσεως και εφαρμογής τυγχάνουν το βιολογικό πετρέλαιο και η βιοαιθανόλη. Τα βιοκαύσιμα δεύτερης γενιάς προέρχονται από την αξιοποίηση πρώτων υλών που δε χρησιμοποιούνται για τροφές, όπως απόβλητη βιομάζα και απόβλητα φυτικά έλαια και ζωικά λίπη. Για παράδειγμα τα φυτά *Brassica carinata* και *Jatropha curcas*, με σύσταση πλούσια σε φυτικό λίπος, των οποίων η καλλιέργεια δύναται να λάβει χώρα σε μη αρόσιμες εκτάσεις, μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την παραγωγή βιολογικών καυσίμων δεύτερης γενιάς (Dorado *et al.*, 2004; Achten *et al.*, 2007; Tiwari *et al.*, 2007). Τα βιολογικά καύσιμα πρώτης και δεύτερης γενιάς, λόγω των παραπάνω ιδιοτήτων τους αναμένεται να αυξηθούν ως προς τη παραγωγή τους τις επόμενες δεκαετίες.

Τα βιοκαύσιμα τρίτης γενιάς προέρχονται από άλγη-μικροφύκη. Ορισμένα πλεονεκτήματα των μικροφυκών είναι η μεγάλη ικανότητα προσρόφησης ανόργανου άνθρακα ο οποίος σχετίζεται με τη δημιουργία του φαινομένου του θερμοκηπίου (CO₂), η υψηλή περιεκτικότητα σε λιπίδια, το απλό περιβάλλον ανάπτυξης και ο σύντομος χρόνος αύξησης. Πρόσφατα το ενδιαφέρον έχει στραφεί στην ανάπτυξη βιομάζας με αυξημένη δέσμευση CO₂ με στόχο την παραγωγή βιουδρογόνου και βιομεθανίου.

1.2. Η γλυκερόλη

Η χημική οργανική ένωση γλυκερόλη, γνωστή και ως προπανο-1,2,3-τριόλη, είναι μία τρισθενής αλκοόλη. Περιέχει στο μόριο της τρεις υδροξυλομάδες, στις οποίες οφείλει την υδατοδιαλυτή της ικανότητα και την υδρόφιλη φύση της (Rahmat *et al.*, 2010). Είναι ένα άχρωμο, άοσμο, παχύρρευστο υγρό με

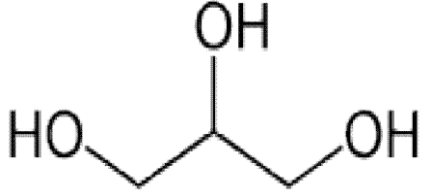
γλυκιά γεύση, το οποίο προέρχεται τόσο από φυσικές όσο και από πετροχημικές πρώτες ύλες. Η ακατέργαστη γλυκερόλη είναι 70-80% καθαρή και συχνά συμπυκνώνεται και καθαρίζεται πριν από την εμπορική της διάθεση σε καθαρότητα 95,5-99,0%. Αποτελεί ένα βιομηχανικό προϊόν με ένα ευρύ φάσμα χρήσεων καθώς χρησιμοποιείται ως διαλύτης, μέσο διαβροχής, πλαστικοποιητής, καθώς επίσης και ως πρώτη ύλη στην παραγωγή φαρμάκων, καλλυντικών, βερνικιών, σαπώνων και εκρηκτικών υλών (όπως η νιτρογλυκερίνη) (Wang *et al.*, 2001). Επιπλέον, μπορεί να χρησιμοποιηθεί και ως υποκατάστατο της ζάχαρης σε διαβητικούς ή ως καθαρτικό (Wang *et al.*, 2001; da Silva *et al.*, 2009). Στην εικόνα που ακολουθεί παρουσιάζεται η τρισδιάστατη μορφή του μορίου της γλυκερόλης.



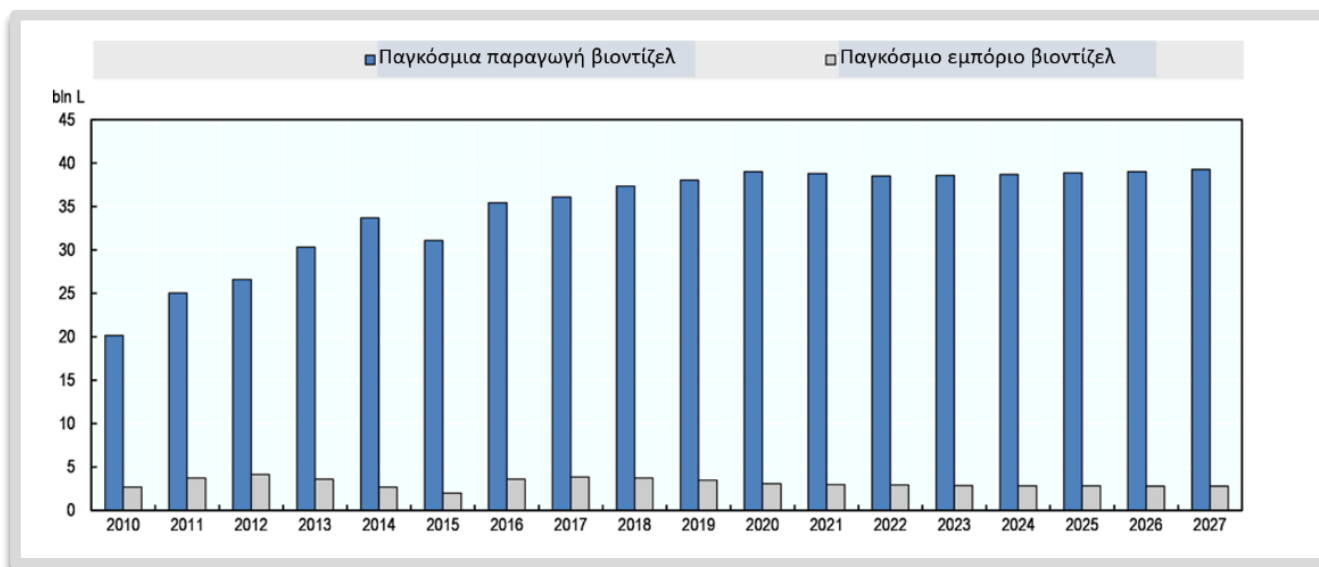
Εικόνα 1.1. Τρισδιάστατη μορφή του μορίου της γλυκερόλης (Μετσοβίτη, 2013).

Όσον αφορά στις φυσικοχημικές ιδιότητες της γλυκερόλης, αυτές συνοψίζονται στον Πίνακα 1.1.. Σε χαμηλές θερμοκρασίες, η γλυκερόλη μπορεί να σχηματίσει κρυστάλλους οι οποίοι τήκονται σε θερμοκρασία $T=17,9\text{ }^{\circ}\text{C}$. Συνολικά, διαθέτει ένα μοναδικό συνδυασμό φυσικών και χημικών ιδιοτήτων γι' αυτό και χρησιμοποιείται σε πολλά εμπορικά προϊόντα.

Πίνακας 1.1. Φυσικοχημικές ιδιότητες της γλυκερόλης (Μετσοβίτη, 2013).

Φυσικοχημικές ιδιότητες γλυκερόλης στους 20 °C	Συντακτικός Τύπος
Μοριακός τύπος: C ₃ H ₅ (OH) ₃	
Μοριακή μάζα: 92,09 g/mol	
Πυκνότητα: 1,261 g m/L	
Ιξώδες: 1,5 Pa·s	
Σημείο τήξης: 18,2 °C	
Σημείο βρασμού: 290 °C	
Σημείο ανάφλεξης: 160 °C	
Δείκτης διάθλασης: 1,4746	
Διατροφική ενέργεια: 4,32 kcal/g	
Επιφανειακή τάση: 64,00 Mn/m	

Η παραγωγή της γλυκερόλης επιτυγχάνεται είτε μέσω των μικροβιακών ζυμώσεων, με πιο γνωστή την περίπτωση της ζύμης *Saccharomyces cerevisiae* κατά την αλκοολική ζύμωση και συγκεκριμένα κατά το σχηματισμό των δευτερογενών μεταβολικών προϊόντων της αλκοολικής ζύμωσης μέσω της γλυκεροπυροσταφυλικής ζύμωσης, είτε χημικά από την επεξεργασία πρώτων υλών πετροχημικής φύσεως, με τη μέθοδο της επιχλωρυδίνης (Pagliaro *et al.*, 2007). Η γλυκερόλη παράγεται επίσης μέσω της υδρόλυσης των λιπών κατά τη διαδικασία παρασκευής σαπώνων. Ωστόσο, η αντικατάσταση των σαπώνων με μη σαπωνοειδούς φύσεως απορρυπαντικά, έχει μειώσει σημαντικά την παραγωγή της γλυκερόλης από τη βιομηχανία σαπώνων σε παγκόσμιο επίπεδο. Να σημειωθεί ότι η γλυκερόλη είναι διαθέσιμη σε μεγάλες ποσότητες στις μονάδες παραγωγής βιοντίζελ. Αυτή η βιομηχανία παράγει τεράστιες ποσότητες γλυκερόλης ως υποπροϊόν κατά τη διάρκεια της διαδικασίας μετεστεροποίησης του ελαίου με μεθανόλη ή αιθανόλη. Ως εκ τούτου, η γλυκερόλη μετατρέπεται σε μια ελκυστική πρώτη ύλη. Σε γενικές γραμμές, εκτιμάται για κάθε 100 kg βιοντίζελ που παράγονται, δημιουργούνται περίπου 10 kg ακατέργαστης γλυκερόλης (καθαρότητας περίπου 90% w/w). Μάλιστα, η ραγδαία ανάπτυξη της βιομηχανίας παραγωγής βιολογικού πετρελαίου τις τελευταίες δεκαετίες, όπως παρουσιάζεται και στην Εικόνα 1.2., οδήγησε στην εναπόθεση τεράστιων αποθεμάτων βιομηχανικής γλυκερόλης, με άμεσο επακόλουθο τη μείωση της τιμής της γλυκερόλης. Για το λόγο αυτό, η βιομηχανική γλυκερόλη δύναται να αποτελέσει μια φτηνή πρώτη ύλη για την παραγωγή προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας, μέσω της αξιοποίησής της με χημικές και βιοτεχνολογικές μεθόδους.



Εικόνα 1.2. Η παγκόσμια παραγωγή βιοντίζελ από το 2010 έως το 2027 (πηγή: OECD Agriculture Statistics Database).

Γενικά, η γλυκερόλη αποτελεί υλικό εκκινήσεως για μια πληθώρα χημικών μετατροπών, μέσω δύο διακριτών οδών. Η πρώτη οδός περιλαμβάνει την οξείδωση ή την αναγωγή της γλυκερόλης σε προϊόντα με τρία άτομα άνθρακα, ενώ η δεύτερη οδός περιλαμβάνει την αντίδραση της γλυκερόλης με άλλα μόρια για τη δημιουργία νέων προϊόντων (Pagliaro *et al.*, 2007). Στα προϊόντα αυτά περιλαμβάνονται η δι-υδροξυακετόνη, το γαλακτικό οξύ, το πυροσταφυλικό οξύ, η προπανόλη, η ισοπροπανόλη, η ακετόνη, η ακρολεΐνη, η προπιοναλδεΐδη, αλλά και το υδροξυ- πυροσταφυλικό οξύ (Claude, 1999; da Silva *et al.*, 2009; Rahmat *et al.*, 2010). Ενδιαφέρον παρουσιάζει, εξάλλου, η παραγωγή της ανθρακικής γλυκερόλης η οποία επιτυγχάνεται μέσω της κατεργασίας της γλυκερόλης παρουσία διοξειδίου του άνθρακα (Pagliaro *et al.*, 2007; Rahmat *et al.*, 2010). Περαιτέρω, πέρα από τις χημικές διεργασίες, η γλυκερόλη μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως υλικό εκκίνησης σε πληθώρα μικροβιακών μετατροπών. Κατά αυτό τον τρόπο, στη βιβλιογραφία υπάρχει πληθώρα μελετών που αναφέρονται στη χρήση της γλυκερόλης ως υπόστρωμα για τη διεξαγωγή μικροβιακών ζυμώσεων ιδιαίτερου βιοτεχνολογικού ενδιαφέροντος (Papanikolaou and Aggelis, 2002; Lee *et al.*, 2004; Ito *et al.*, 2005; Koller *et al.*, 2005; Yazdani and González, 2007; Papanikolaou *et al.*, 2008; 2020; Pyle *et al.*, 2008; Amaral *et al.*, 2009; da Silva *et al.*, 2009; André *et al.*, 2010; Fan *et al.*, 2010; Chatzifragkou *et al.*, 2011; Diamantopoulou *et al.*, 2020a; Diamantopoulou *et al.*, 2023).

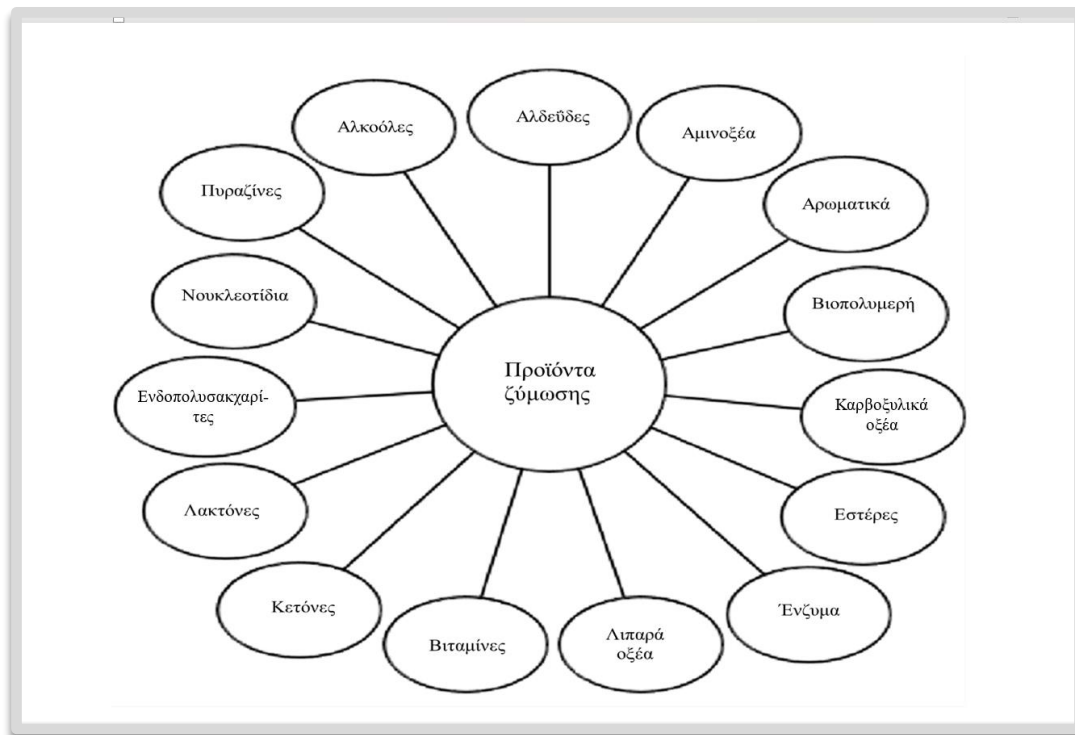
1.3. Η χρήση των μικροοργανισμών για την παραγωγή προϊόντων βιοτεχνολογικού ενδιαφέροντος

Οι μικροοργανισμοί χρησιμοποιούνται από την αρχαιότητα για την παραγωγή χρήσιμων προϊόντων για τον άνθρωπο. Σε αυτά συμπεριλαμβάνεται το ψωμί, το γιαούρτι, το κρασί κλπ.. Στις μέρες μας τα βιοτεχνολογικά αυτά προϊόντα καθώς και πλήθος άλλων ενώσεων παράγονται σε ποικίλες διεργασίες καθώς και σε βιοδυλιστήρια κατά τη διάρκεια ζυμώσεων. Οι ζυμώσεις που πραγματοποιούνται στις διάφορες διεργασίες παραγωγής τροφίμων ή βιοϋλικών είναι η αλκοολική, η οξική, η γαλακτική, η βουτυρική και η

προπιονική που γίνονται σε υδατικά διαλύματα ή σε στερεά κατάσταση. Επομένως πέρα από τις βιομηχανίες τροφίμων και ποτών, η χρήση μικροοργανισμών βρίσκει επίσης εφαρμογή στις βιομηχανίες παραγωγής ενζύμων, αιθυλικής αλκοόλης και άλλων διαλυτών, κιτρικού οξέος, βιταμινών, μονοκυτταρικής πρωτεΐνης για ζωοτροφές, αντιβιοτικών και άλλων φαρμάκων. Ακόμη, χρησιμοποιούνται στις βιομηχανίες παραγωγής ενέργειας από ανακυκλώσιμες ύλες (παραγωγή αιθανόλης ή και βιοαερίου από χαμηλού κόστους ή απόβλητες πρώτες ύλες) αλλά και σε βιολογικούς καθαρισμούς υγρών και στερεών αποβλήτων.

Μετά από την επιλογή του κατάλληλου μικροοργανισμού που πρόκειται να χρησιμοποιηθεί σε μία ζύμωση, μελετώνται οι συνθήκες που είναι καταλληλότερες για την ανάπτυξη του ενώ μπορεί να ακολουθήσει και βελτίωση του στελέχους για την αύξηση της παραγωγικότητας και της απόδοσης.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η χρήση των μικροοργανισμών σε ζυμώσεις χρησιμοποιώντας απόβλητα από βιομηχανίες τροφίμων και ποτών αλλά και γεωργοβιομηχανικά ή αστικά απόβλητα, που είναι πλούσια σε σάκχαρα και πηγή αζώτου. Μάλιστα, το ενδιαφέρον εντοπίζεται κυρίως στο γεγονός ότι σε πολλές περιπτώσεις τα απόβλητα αυτά μπορούν να μετατραπούν σε προϊόντα προστιθέμενης αξίας, επιφέροντας έτσι σημαντικό οικονομικό όφελος στη βιομηχανία. Για παράδειγμα, στελέχη προκαρυωτικών μικροοργανισμών του γένους *Enterobacter* ή *Klebsiella* δύναται να χρησιμοποιήσουν ως πηγή άνθρακα απόβλητη γλυκερόλη ή μελάσα προς παραγωγή 1,3-προπανοδιόλης ή 2,3-βουτανοδιόλης (Liakou *et al.*, 2018; Palaiogeorgou *et al.*, 2019; Karayannis *et al.*, 2023). Ακόμη, στελέχη του είδους *Escherichia coli* μπορούν να παράγουν ηλεκτρικό ή φουμαρικό οξύ (Yang *et al.*, 2014). Τέλος, διάφορα στελέχη ζυμών ή μυκήτων έχουν δείξει αξιόλογη ικανότητα να παράγουν κιτρικό οξύ, πυροσταφυλικό οξύ, ενδοπολυσακχαρίτες, μικροβιακά λιπίδια, φουμαρικό οξύ, κλπ. (Diamantopoulou and Papanikolaou, 2023) χρησιμοποιώντας τέτοιου είδους υποστρώματα. Τα διάφορα προϊόντα τα οποία δύνανται να παραχθούν μέσω των μικροβιακών βιομετατροπών εμφανίζονται πιο κάτω:

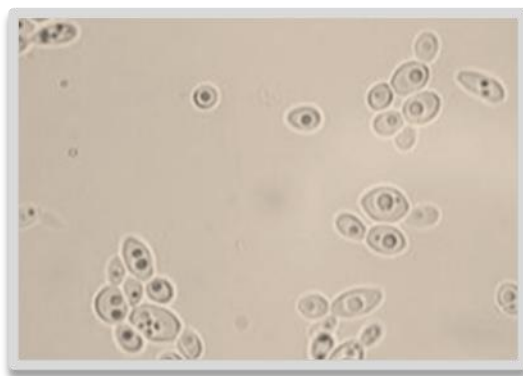


Εικόνα 1.3. Προϊόντα που δύναται να παραχθούν από μικροβιακές ζυμώσεις (προσαρμοσμένο από Vijayan *et al.*, 1994).

1.4. Οι ελαιογόνες ζύμες

Οι ζύμες είναι ευκαρυωτικοί μονοκύτταροι μικροοργανισμοί που ανήκουν στο βασίλειο των μυκήτων. Συχνά στη βιβλιογραφία αναφέρονται επίσης με τον όρο ζυμομύκητες. Μέχρι σήμερα έχουν αναγνωριστεί περίπου 1500 είδη (Kurtzman and Fell, 2006; Hoffman *et al.*, 2015). Υπολογίζεται ότι αποτελούν περίπου το 1% όλων των ειδών μυκήτων. Το μέγεθος των ζυμομυκήτων ποικίλει και εξαρτάται τόσο από το είδος όσο και από το περιβάλλον. Συνήθως έχουν διάμετρο 3-4 μm , αν και κάποια είδη μπορούν να φτάσουν τα 40 μm . Τα αποτελέσματα της χρήσης των ζυμομυκήτων είναι γνωστά εδώ και χιλιάδες χρόνια (χωρίς προφανώς να είναι γνωστή η παρουσία των ζυμομυκήτων και εν γένει των μικροοργανισμών, η οποία έγινε γνωστή τα τελευταία περίπου 150 χρόνια) καθώς τα προϊόντα ζύμωσης τους έχουν σπουδαίο βιοτεχνολογικό ενδιαφέρον λόγω της χρησιμότητάς τους για τον άνθρωπο. Για παράδειγμα, η ζύμη *Saccharomyces cerevisiae*, γνωστή και ως μαγιά, χρησιμοποιείται στην αρτοποιία και στην παραγωγή οινοπνευματωδών ποτών εδώ και χιλιάδες χρόνια. Άλλες χρήσεις των ζυμών προς όφελος του ανθρώπου αφορούν στη δυνατότητα παραγωγής μέσω ζύμωσης μεταβολικών προϊόντων όπως καροτενοειδή, πολυόλες, λιπίδια, γλυκολιπίδια, κιτρικό οξύ και αιθανόλη. Μάλιστα, με την ανάπτυξη της τεχνολογίας του ανασυνδυασμένου DNA η εισαγωγή επιθυμητών ιδιοτήτων στους ζυμομύκητες τους καθιστά χρήσιμα εργαλεία στη βιοτεχνολογία (Papanikolaou and Aggelis, 2011; Athenaki *et al.*, 2018; Diamantopoulou and Papanikolaou, 2023).

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον ωστόσο παρουσιάζουν οι ελαιογόνες ζύμες. Γενικά, 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). Σύμφωνα με πειραματικές μελέτες, ορισμένοι μικροοργανισμοί είναι ικανοί να συσσωρεύσουν λίπος έως 70-83%, w/w επί της ξηράς ουσίας (Ratledge, 2002, Ageitos *et al.*, 2011, Papanikolaou *et al.*, 2017). Ωστόσο, από τα 600 είδη των ελαιογόνων ζυμών, μόνο 30 έχουν χαρακτηριστεί ικανά να συσσωρεύουν πάνω από 25%, w/w λίπος επί της ξηρής μάζας (Beopoulos *et al.*, 2009). Συγκεκριμένα, σε αυτή την ομάδα των ελαιογόνων ζυμών ανήκουν είδη, τα κυριότερα από τα οποία είναι τα εξής: *Cryptococcus albidus*, *Cryptococcus curvatus*, *Lipomyces lipofer*, *Lipomyces starkeyi*, *Rhodosporidium toruloides*, *Rhodotorula glutinis*, *Trichosporon pullulans*, και *Yarrowia lipolytica* (Li *et al.*, 2008; Papanikolaou and Aggelis, 2011).



Εικόνα 1.4. Ελαιογόνος ζύμη κατά την παρατήρηση σε οπτικό μικροσκόπιο μεγέθυνση x 100 (Karamanou *et al.*, 2016).

Η λεπτομερής μελέτη των ελαιογόνων μικροοργανισμών έχει πραγματοποιηθεί τα τελευταία χρόνια με πληθώρα αναφορών στη βιβλιογραφία (Aggelis *et al.*, 1988, 1990; Ratledge, 1994, 2002, 2004; Ratledge and Cohen, 2008; Certik and Shimizu, 1999; Papanikolaou *et al.*, 2007; Papanikolaou and Aggelis, 2011; Ageitos *et al.*, 2011). Έτσι φαίνεται πως οι ελαιογόνες ζύμες παρουσιάζουν αρκετά πλεονεκτήματα για την παραγωγή μικροβιακών λιπιδίων συγκριτικά με άλλες πηγές παραγωγής λιπιδίων. Συγκεκριμένα, ο χρόνος διπλασιασμού τους είναι μικρότερος από μία ώρα, επηρεάζονται πολύ λιγότερο από τον καιρό και τις κλιματικές αλλαγές σε σχέση με τα φυτά. Επίσης, οι καλλιέργειες τους είναι πιο εύκολα προσαρμόσιμες σε όγκους βιομηχανικής κλίμακας σε σχέση με αυτή των μικρο-φυκών (Li *et al.*, 2008), ενώ αυτές έχουν τη δυνατότητα της αύξησης σε πληθώρα υποστρωμάτων όπως είναι ποικίλα γεωργο-βιομηχανικά υποπροϊόντα και απόβλητα (Papanikolaou and Aggelis, 2011; 2019; Athenaki *et al.*, 2018).

1.4.1. Η ελαιογόνος ζύμη *Rhodosporidium toruloides*

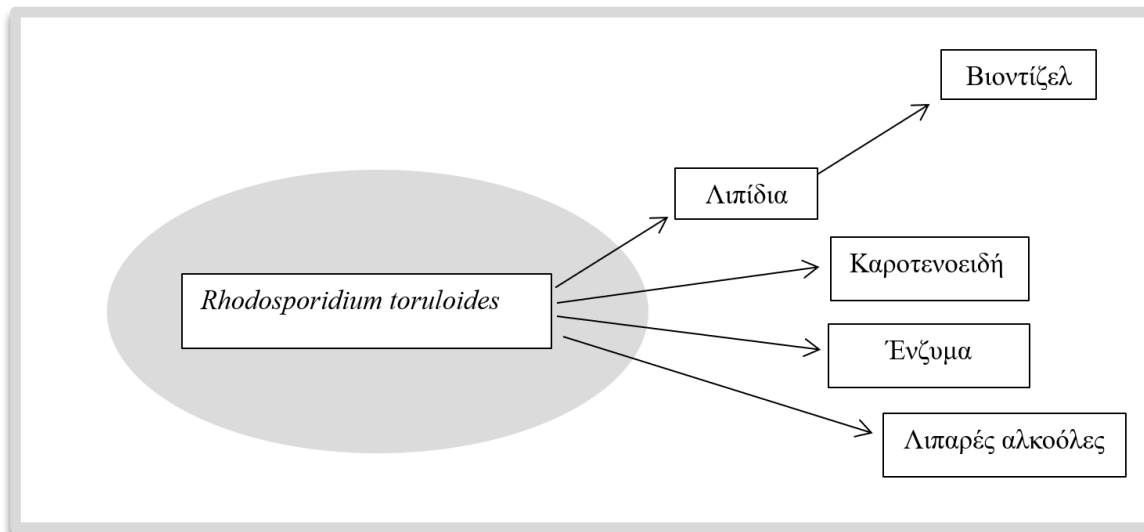
Το είδος *Rhodosporidium toruloides* (παλαιότερα γνωστό ως *Rhodotorula toruloides*), είναι ένας μη παθογόνος μικροοργανισμός, που είναι ικανός να συσσωρεύει λιπίδια σε ποσοστό πάνω από 70% επί της ξηράς ουσίας (Ratledge and Wynn, 2002; Li *et al.*, 2007). Παρουσιάζει χαρακτηριστικό κόκκινο

χρώμα, όπως φαίνεται στην Εικόνα 1.5. λόγω της μεγάλης παραγωγής καροτενοειδών (Buzzini *et al.*, 2007; Saenge *et al.*, 2011). Επίσης, ανήκει στην οικογένεια των Βασιδιομυκήτων (Akada *et al.*, 1989; Zhu *et al.*, 2012). Στην ταυτοποίησή της συνέβαλε η απομόνωση της από τον ξυλοπολτό κωνοφόρων δέντρων. Η μέχρι τώρα μελέτη της συγκεκριμένης ζύμης έχει δείξει ότι μπορεί να αναπτύσσεται σε ένα μεγάλο εύρος υποστρωμάτων. Μερικά από αυτά τα υποστρώματα είναι η γλυκερόλη, η γλυκόζη, η ξυλόζη, λιγνοκυτταρινούχα υδρολύματα και υδρολύματα με περίσσεια λάσπης (excess sludge hydrolysates) (Li *et al.*, 2006, 2007; Xu *et al.*, 2011; Huang *et al.*, 2013; Diamantis *et al.*, 2023).



Εικόνα 1.5. Αποικίες του είδους *Rhodosporidium toruloides* σε στερεή καλλιέργεια (προσαρμοσμένο από Wikimedia).

Οι μικροοργανισμοί του γένους *Rhodosporidium*, και πιο συγκεκριμένα οι ζύμες *Rhodosporidium toruloides* παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον τόσο γιατί μπορούν να λιποσυσσωρεύσουν πάνω από το 50%, w/w της ξηρής μάζας όσο και για την ικανότητά τους να χρησιμοποιούν ως υπόστρωμα προϊόντα υδρόλυσης φυτικής βιομάζας με 5 και 6 άτομα άνθρακα (Wiebe *et al.*, 2012). Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, η παραγωγή ενδοκυτταρικών μικροβιακών λιπιδίων από το ζυμομύκητα *Rhodosporidium toruloides* ίσως να συνδέεται με το περιορισμό διάφορων θρεπτικών στοιχείων στο υπόστρωμα της καλλιέργειας όπως του αζώτου, του φωσφόρου ή και του θείου (Li *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2010; Wu *et al.*, 2011). Επομένως, η συγκεκριμένη ζύμη έχει μελετηθεί από το 1950 σε πληθώρα βιοτεχνολογικών εφαρμογών και παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον για την παραγωγή διάφορων μεταβολικών προϊόντων οικονομικού ενδιαφέροντος, όπως αυτά παρουσιάζονται στην Εικόνα 1.6..



Εικόνα 1.6. Βιοτεχνολογικές εφαρμογές του είδους *Rhodosporidium toruloides*.

1.4.2. Ο μικροοργανισμός *Debaryomyces* στην παραγωγή αραβιτόλης

Το γένος *Debaryomyces* sp., και το σημαντικότερο είδος του, *Debaryomyces hansenii*, ανήκει στην οικογένεια *Saccharomycetaceae*. Σύμφωνα με πρόσφατες μελέτες που πραγματοποιήθηκαν σε ψάρια, το συγκεκριμένο είδος παρουσιάζει ανοσορυθμιστικές ιδιότητες που δύναται να επηρεάζουν το εντερικό μικροβίωμα και επομένως μπορεί να χρησιμοποιηθεί δυνητικά ως προβιοτικό (Sanahuja *et al.*, 2023). Η εν λόγω ζύμη, είναι ένα ωσμόφιλο είδος που μαζί με άλλα είδη ζυμών, όπως *Zygosaccharomyces*, *Saccharomyces*, *Metschnikowia*, *Candida* κλπ. (Kumdam *et al.*, 2014; Koganti *et al.*, 2011), έχει την ικανότητα να παράγει αραβιτόλη από διάφορες πηγές άνθρακα. Σύμφωνα με βιβλιογραφικές αναφορές, το στέλεχος το *Debaryomyces hansenii* NRRL Y-7483 έχει τη ικανότητα να παράγει αραβιτόλη, σε υπόστρωμα γλυκερόλης, με απόδοση 0,55 g/g και σε συγκέντρωση 40 g/L (Koganti *et al.*, 2011). Άλλο ένα στέλεχος, το *Debaryomyces nepalensis* NCYC 3413 είναι ικανό να χρησιμοποιεί ως θρεπτικά υποστρώματα τόσο εξόζες όσο και πεντόζες με αποτέλεσμα την παραγωγή εμπορικά πολύτιμων προϊόντων όπως η αραβιτόλη και η ζυλιτόλη (Kumdam *et al.*, 2013).

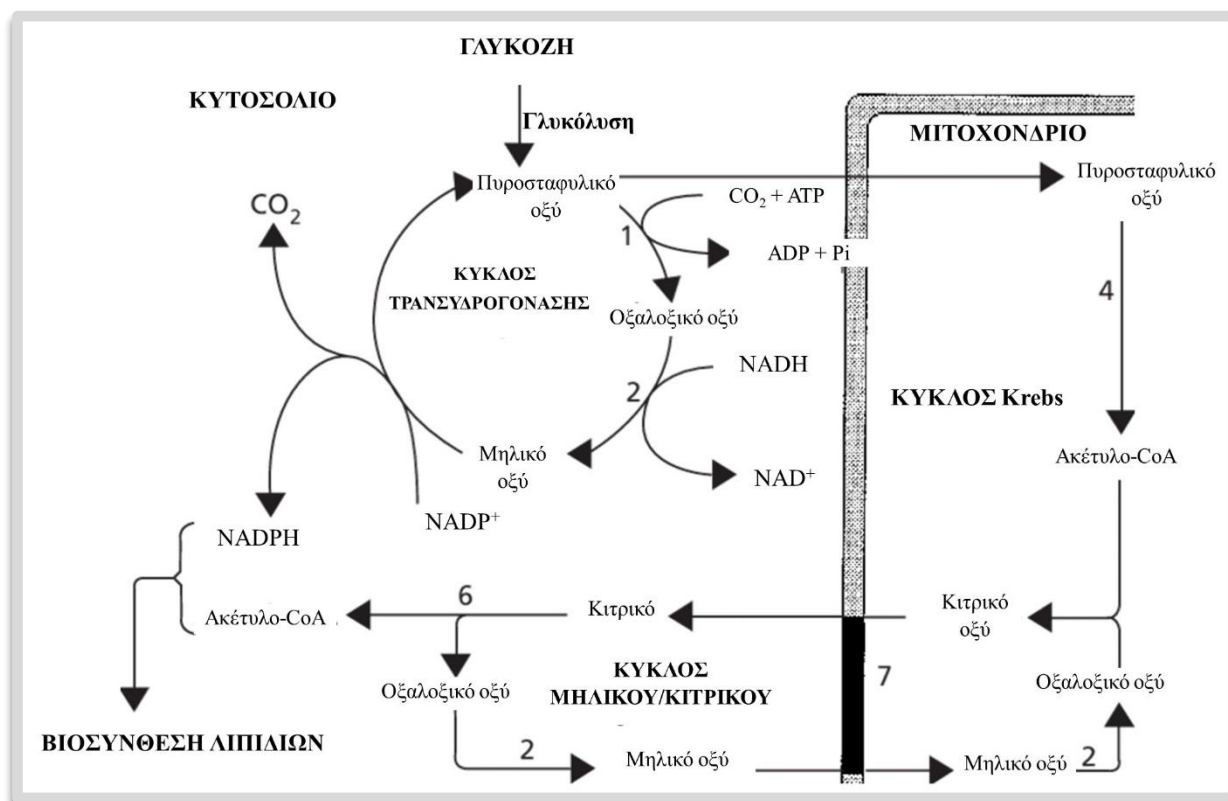
Το γεγονός ότι το συγκεκριμένο είδος χαρακτηρίζεται από υψηλή ωσμωανθεκτικότητα του δίνει ένα επιπλέον πλεονέκτημα κατά τη χρήση του στη παραγωγή βιοτεχνολογικών προϊόντων. Αυτό γιατί του δίνει τη δυνατότητα να αναπτύσσεται εύκολα σε μη αποστειρωμένα θρεπτικά μέσα και να παραμένει σε αύξηση όταν στο θρεπτικό μέσο έχουν συσσωρευτεί υψηλές ποσότητες από τα μεταβολικά προϊόντα. Έτσι μπορεί να μειωθεί το κόστος της βιοδιεργασίας.

1.5. Βιοσύνθεση κυτταρικών λιπιδίων

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 τότε οι ελαιογόνοι μικροοργανισμοί

συνεχίζουν να αφομοιώνουν την πηγή άνθρακα, μετατρέποντας τη σε τριγλυκερίδια, τα οποία και συσσωρεύονται εντός των κυττάρων (Ratledge, 2004; Papanikolaou and Aggelis, 2011).

Ο χαρακτηρισμός ενός μικροοργανισμού ως ελαιογόνου οφείλεται σε δύο κυρίως παραμέτρους. Η πρώτη αφορά τη δυνατότητα συνεχόμενης παραγωγής ακέτυλο συνένζυμου Α (Acetyl-CoA) απευθείας στο κυτταρόπλασμα του κυττάρου που είναι προαπαιτούμενο για τη 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 and Aggelis, 2011).



Εικόνα 1.7. Μεταβολικό μονοπάτι βιοσύνθεσης λίπους σε ελαιογόνους μικροοργανισμούς (προσαρμοσμένο από Ratledge, 2004).

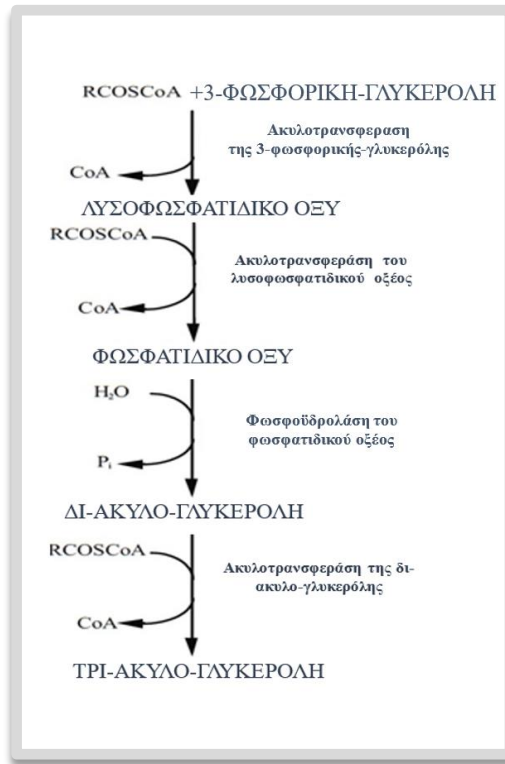
Το πυροσταφυλικό οξύ που προκύπτει από τη γλυκόλυση εισέρχεται στο μιτοχόνδριο. Εκεί το πυροσταφυλικό οξύ καταλύεται από το ένζυμο αποκαρβοξυλάση του πυροσταφυλικού οξέος σε ακέτυλο συνένζυμο Α (acetyl-CoA). Στη συνέχεια, το ακέτυλο συνένζυμο Α εισέρχεται στο κύκλο του Krebs ενώ σε ορισμένες περιπτώσεις δύναται να μεταφέρεται στο κυτταρόπλασμα προς εμπλουτισμό της βιοσύνθεσης των κυτταρικών λιπαρών οξέων (Papanikolaou and Aggelis, 2011).

Όταν η πηγή αζώτου στο μέσο της καλλιέργειας εξαντληθεί, ο κύκλος του Krebs διακόπτεται. Το φαινόμενο αυτό οφείλεται στην ενεργοποίηση του ενζύμου AMP-απαμινάση, η οποία καταλύει τη διάσπαση του AMP σε IMP (Inosine Mono-phosphate) και ιόντα NH_4^+ . Έτσι επιτυγχάνεται ταχύτατη πτώση της συγκέντρωσης AMP και μείωση ενεργότητας του ενζύμου ισοκιτρική αφυδρογονάση (Ratledge, 1994,

Papanikolaou and Aggelis, 2011). Αυτό συμβαίνει καθώς η ισοκιτρική αφυδρογονάση ενεργοποιείται αλλοστερικά από τα ενδοκυτταρικά AMP (και ADP). Το ένζυμο ισοκιτρική αφυδρογονάση είναι υπεύθυνο για τη μετατροπή του ισοκιτρικού οξέος σε α -κετογλουταρικό οξύ και κατά συνέπεια το ισοκιτρικό οξύ συσσωρεύεται εντός του μιτοχονδρίου. Το ισοκιτρικό οξύ βρίσκεται σε ισορροπία με το κιτρικό οξύ (αντίδραση η οποία καταλύεται από την ισοκιτρική ακοτινάση (Ratledge, 2004; Papanikolaou and Aggelis, 2011; 2019). Όταν το κιτρικό οξύ συσσωρευτεί στο εσωτερικό του μιτοχονδρίου, τότε εξέρχεται από το μιτοχόνδριο στο κυτταρόπλασμα μέσω του συστήματος μεταφοράς κιτρικού/μηλικού οξέος, σε ισορροπία με το μηλικό. Ο σχηματισμός του ακετύλου-συνενζύμου A (acetyl-CoA) στους ελαιογόνους μικροοργανισμούς αποδίδεται από αρκετούς ερευνητές στην παρουσία του ενζύμου ATP-κιτρική λυάση (ACL), η οποία κατά κανόνα δεν εντοπίζεται στους μη ελαιογόνους μικροοργανισμούς (Ratledge, 2004; Αγγελής, 2007; Papanikolaou and Aggelis, 2011). Έτσι το κιτρικό οξύ μέσω του ενζύμου ACL διασπάται σε ακέτυλο συνένζυμο A και οξαλοξικό οξύ. Το NADPH που είναι απαραίτητο για τη βιοσύνθεση των λιπαρών οξέων, παρέχεται από τον ενδιάμεσο κυτταρικό μεταβολισμό.

Η πρώτη αντίδραση για τη βιοσύνθεση των λιπαρών οξέων, αμέσως μετά τη δημιουργία του ακετύλου συνενζύμου A, καταλύεται από το ένζυμο καρβοξυλάση του ακετύλου συνενζύμου A, ώστε να επιτευχθεί η παραγωγή του μηλονύλο συνενζύμου A, η βιοσύνθεση των λιπαρών οξέων συνεχίζεται με τη συμβολή πολλαπλού ενζυμικού συμπλέγματος (συνθετάση των λιπαρών οξέων-Fatty Acids Synthase, FAS) (Papanikolaou and Aggelis, 2011). Μετά τη βιοσύνθεση των εστέρων λιπαρού συνενζύμου A (Acyl-CoA esters), διεξάγεται εστεροποίηση με γλυκερόλη με σκοπό την αποθήκευση λιπιδίων με τη μορφή τριγλυκεριδίων (TAGs). Η σύνθεση διεξάγεται κυρίως από ένα μεταβολικό μονοπάτι το οποίο ονομάζεται ακυλίωση της α -φωσφορικής γλυκερόλης (α -glycerol phosphate acylation) (ή μονοπάτι Kennedy) (Papanikolaou and Aggelis, 2011; Αγγελής 2017).

Στο πρώτο βήμα σύνθεσης των τριγλυκεριδίων, η 3-φωσφορική γλυκερόλη (G-3-P) ακυλιώνεται με το ένζυμο ακυλοτρανφεράση (acyltransferase, GAT) στην θέση sn-1 προς σχηματισμό της 1-ακυλο-3-φωσφορικής γλυκερόλης (λυσοφωσφατιδικό οξύ, lysophosphatidic acid-LPA). Κατόπιν, το λυσοφωσφατιδικό οξύ με τη συμβολή του ενζύμου ακυλοτρανφεράση του λυσοφωσφατιδικού οξέος (1-acyl-G-3-P acyltransferase, AGAT) ακυλιώνεται στην θέση sn-2 προς παραγωγή φωσφατιδικού οξέος (phosphatidic acid, PA). Ακολουθεί η αποφωσφορυλίωση (dephosphorylation) του φωσφατιδικού οξέος με το ένζυμο φωσφοροϋδρολάση του φωσφατιδικού οξέος (phosphatidic acid phosphohydrolase, PAP) προς απελευθέρωση της δι-ακυλο-γλυκερόλης (DAG). Στο τελικό βήμα, η δι-ακυλο-γλυκερόλη ακυλιώνεται είτε μέσω του ενζύμου ακυλοτρανφεράση της δι-ακυλο-γλυκερόλης είτε μέσω του ενζύμου ακυλοτρανφεράση της φωσφολιπιδιακής δι-ακυλο-γλυκερόλης προς παραγωγή τριγλυκεριδίων (TAGs) (Papanikolaou and Aggelis, 2011). Οι παραπάνω αντιδράσεις αναπαρίστανται στην Εικόνα 1.8..



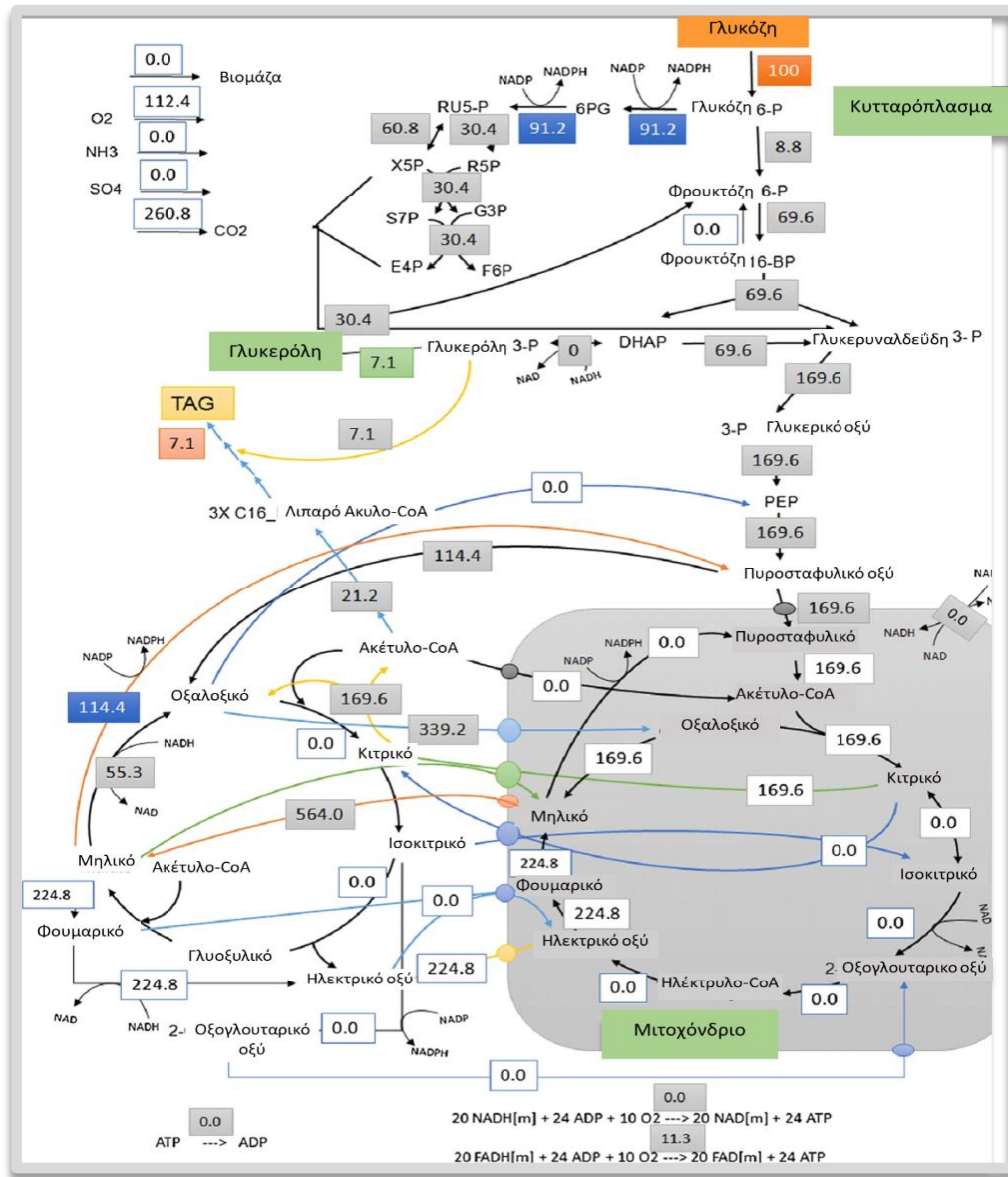
Εικόνα 1.8. Σχηματισμός ενδοκυτταρικών τρι-ακυλο-γλυκερολών μέσω ακυλίωσης της α-φωσφορο-γλυκερόλης (προσαρμοσμένο από Panikolaou and Aggelis, 2011).

1.6. Το φαινόμενο της καταστολής του καταβολίτη στους μικροοργανισμούς

Οι μικροοργανισμοί διαθέτουν κυτταρικούς μηχανισμούς που τους επιτρέπουν τη βέλτιστη αξιοποίηση των διαθέσιμων πόρων με σκοπό τη μέγιστη ανάπτυξη και την επιβίωση τους σε συνάρτηση με τους διάφορους περιβαλλοντικούς παράγοντες. Η καταστολή του καταβολίτη αποτελεί έναν μηχανισμό που χρησιμοποιείται από διάφορα είδη βακτηρίων και μυκήτων για την προσαρμογή τους σε αλλαγές στο περιβάλλον αύξησης, όπως η εξάντληση θρεπτικών πόρων ή η αφθονία λιγότερο προτιμητέων πηγών θρεπτικών συστατικών στο υπόστρωμα. Η καταβολική καταστολή έχει ως αποτέλεσμα την ταχύτερη κατανάλωση ορισμένων υποστρωμάτων όπως η γλυκόζη έναντι άλλων πηγών άνθρακα (Nair and Sarma, 2021). Μία γνωστή περίπτωση καταστολής καταβολίτη αποτελεί το παράδειγμα του μικροοργανισμού *Escherichia coli* (Bettenbrock *et al.*, 2006). Ο μικροοργανισμός *E. coli* καταναλώνει κατά προτίμηση τη γλυκόζη πριν από άλλες πηγές άνθρακα, ανεξάρτητα από τη διαθεσιμότητά τους στο υπόστρωμα (Prieto *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2010; Valderrama *et al.*, 2014; Bren *et al.*, 2016). Ενώ πολλά είδη βακτηρίων εμφανίζουν προτίμηση στην κατανάλωση γλυκόζης παρουσία άλλων υποστρωμάτων, ο μηχανισμός λειτουργίας της καταστολής του καταβολίτη ενδέχεται να διαφέρει μεταξύ των ειδών μυκήτων και βακτηρίων εφόσον έχει παρατηρηθεί ότι ορισμένα βακτήρια δείχνουν προτίμηση σε άλλες πηγές άνθρακα έναντι της γλυκόζης (Moreno *et al.*, 2012). Έχει διαπιστωθεί ότι ακόμη και μεταξύ βακτηριακών ειδών, όπως το *E. coli* και το *Bacillus subtilis*, που προτιμούν ως υπόστρωμα τη γλυκόζη, οι μοριακοί μηχανισμοί που οδηγούν στην

εκδήλωση του φαινομένου της καταστολής καταβολίτη δύναται να διαφέρουν (Deutscher, 2008). Το φαινόμενο της καταβολικής καταστολής δύναται να ρυθμίσει τη γονιδιακή έκφραση κυρίως μέσω δύο οδών: είτε μέσω ενός καθολικού ρυθμιστικού μηχανισμού είτε με ρυθμιστικούς μηχανισμούς που αφορούν συγκεκριμένα οπερόνια. (Gorke and Stülke, 2008).

Στο μικροοργανισμό *E. coli*, η επιλεκτικότητα εκφράζεται με παρεμπόδιση της πρόσληψης μη προτιμητέων πηγών άνθρακα από το κύτταρο παρουσία γλυκόζης σε μια διαδικασία που αναφέρεται ως αποκλεισμός του επαγωγέα. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η λακτόζη όπου σε παρουσία γλυκόζης γίνεται αναστολή της περμεάσης της λακτόζης (Homburg *et al.*, 2017). Από την άλλη πλευρά, το βακτήριο *B. subtilis* διαθέτει μια πρωτεΐνη μεταγραφής που καταστέλλει τους υποκινητές των γονιδίων που καταβολίζουν μη προτιμητέες πηγές άνθρακα σε παρουσία γλυκόζης (Ohtsubo *et al.*, 2006). Όταν στο μέσο ανάπτυξης ενός οργανισμού η προτιμητέα πηγή άνθρακα εξαντληθεί, τότε ενεργοποιούνται γονίδια που καταβολίζουν τη λιγότερο προτιμητέα πηγή άνθρακα (Singh *et al.*, 2008). Η αλληλεπίδραση μεταβολικών μονοπατιών για τη χρήση διαφορετικών πηγών άνθρακα σε διαφορετικές χρονικές στιγμές κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες επιτρέπει σε οργανισμούς όπως τα βακτήρια να μεγιστοποιούν την ανάπτυξη τους με σκοπό την επιβίωση (Singh *et al.*, 2008; Reuß *et al.*, 2018). Για τον έλεγχο ενός τέτοιου ρυθμιστικού μηχανισμού, οι μικροοργανισμοί χρησιμοποιούν τη διαθεσιμότητα της προτιμώμενης πηγής τους για την καταστολή γονιδίων που καταβολίζουν μη προτιμώμενες πηγές άνθρακα (Liu *et al.*, 2020). Η Εικόνα 1.9. απεικονίζει το μεταβολικό μονοπάτι της ζύμης *Rhodosporidium toruloides* σε μικτό θρεπτικό μέσο το οποίο περιείχε γλυκόζη και γλυκερόλη όπου παρατηρείται το φαινόμενο της καταστολής του καταβολισμού της γλυκερόλης καθώς η γλυκόζη αποτέλεσε την προτιμητέα πηγή άνθρακα και καταναλώθηκε πρώτη στα αρχικά στάδια της ζύμωσης (Bommareddy *et al.*, 2015).



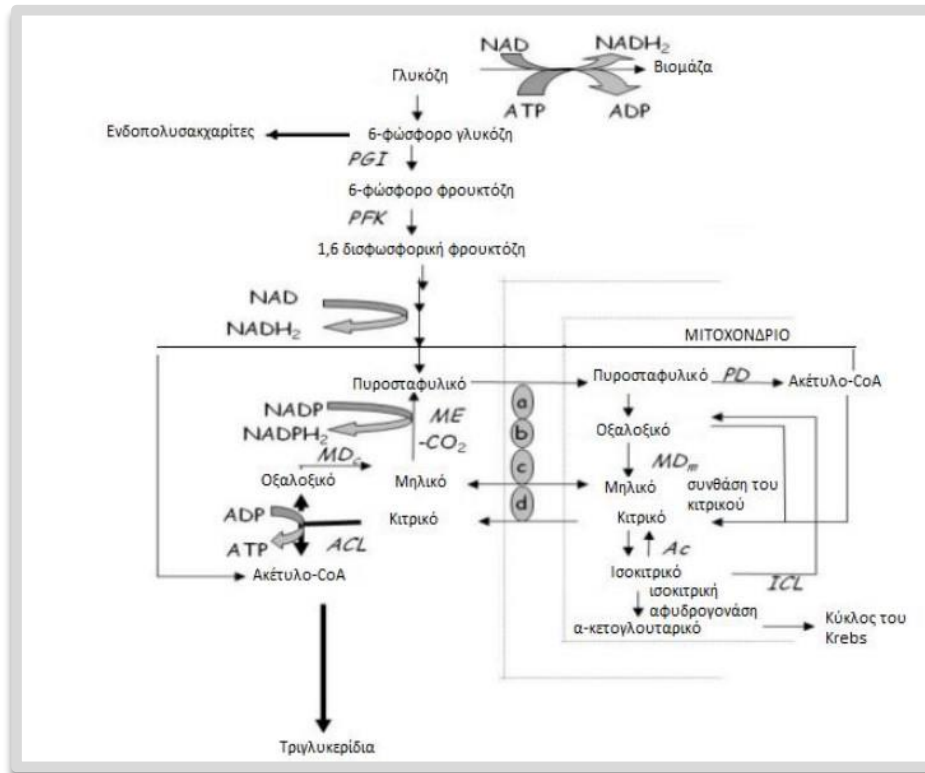
Εικόνα 1.9. Μεταβολικό μονοπάτι του μικροοργανισμού *Rhodosporidium toruloides* σε μικτό υπόστρωμα γλυκόζης-γλυκερόλης (προσαρμοσμένο από Bommarreddy *et al.*, 2015).

1.7. Οι ενδοπολυσακχαρίτες (Intracellular Polysaccharides, IPS) και η βιοσυσσώρευση τους

Οι πολυσακχαρίτες, που επιστημονικά καλούνται και γλυκάνες (BeMiller *et al.*, 1996; Belitz *et al.*, 2009), είναι πολυμερή αποτελούμενα από την ένωση πολλών μονοσακχαριτών με γλυκοζιτικό δεσμό. Ο γενικός χημικός τους τύπος είναι $(C_6H_{10}O_5)_n$, συνήθως με $n > 100$. Οι μονάδες γλυκοζυλίου μπορεί να είναι ενωμένες σε γραμμική ή διακλαδισμένη διάταξη. 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. Διακρίνονται σε διάφορες κατηγορίες ανάλογα με το είδος των σακχάρων από τα οποία αποτελούνται. Έτσι, πολυσακχαρίτες, όπως το άμυλο και η κυτταρίνη, καλούνται ομοπολυσακχαρίτες, ενώ οι πηκτίνες καλούνται ετεροπολυσακχαρίτες.

Εκτιμάται ότι περισσότερο από το 90% των υδατανθράκων στη φύση είναι στη μορφή των πολυσακχαριτών και χρησιμεύουν κυρίως ως αποταμιευτικές και δομικές ύλες σε ζωικούς και φυτικούς οργανισμούς. Όσον αφορά τη βιοσύνθεση τους, η βιβλιογραφία αναφέρει ότι αυτή ευνοείται από πηγές άνθρακα, όπως η γλυκόζη και από οργανικές πηγές αζώτου (πεπτόνη, εκχύλισμα ζύμης) (Gern *et al.*, 2008; Fang and Zhong, 2002). Επίσης, παράγοντες, όπως η αρχική τιμή του pH, η θερμοκρασία της ζύμωσης και ο αερισμός, παίζουν σημαντικό ρόλο στη βιοσύνθεση των πολυσακχαριδίων. Να σημειωθεί ότι οι συνθήκες καλλιέργειας που ευνοούν την παραγωγή βιομάζας μπορεί να μην ευνοούν τη συσσώρευση των πολυσακχαριτών (κυρίως των έξωπολυσακχαριτών) και αντιστρόφως (Tang and Zhong, 2002; Diamantopoulou *et al.*, 2012a, 2012b, 2014; Diamantopoulou and Papanikolaou, 2023).

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία φαίνεται πως η εξάντληση του αζώτου στο μέσο της καλλιέργειας, ευνοεί τη βιοσυσσώρευση των συγκεκριμένων ενώσεων λόγω της υποχρεωτικής διάσπασης της AMP, ώστε να εξασφαλιστούν από τα κύτταρα οι απαιτήσεις τους σε άζωτο. Το ένζυμο 6-φωσφορο φρουκτοκινάση (6 PFK) ενεργοποιείται αλλοστερικά από το κυτταρικό AMP και έτσι λόγω της ελάττωσης της συγκέντρωσης της AMP αναστέλλεται η δράση της 6 PFK (Galiotou-Panayotou *et al.*, 1998; Ratledge and Wynn, 2002; Papanikolaou and Aggelis, 2011). Έτσι το κύτταρο οδηγείται στη συσσώρευση των ενδοπολυσακχαριτών. Το υποθετικό σενάριο της συσσώρευσης των ενδοκυτταρικών πολυσακχαριτών και λιπιδίων απεικονίζεται στην Εικόνα 1.10.. Παρόλα αυτά έχει δειχθεί σε τελευταίες εργασίες ότι σύνθεση ενδοπολυσακχαριτών δύναται να πραγματοποιηθεί και κατά την ισόρροπη φάση αυξήσεως των ελαιογόνων ζυμών και μυκήτων και ενώ υπάρχει αφομοιώσιμο άζωτο στο μέσο της καλλιέργειας (Tchakouteu *et al.*, 2015; Gardeli *et al.*, 2017; Diamantopoulou *et al.*, 2020a; b; Sarantou *et al.*, 2021; Karayannis *et al.*, 2023). Έχει δειχτεί χαρακτηριστικά, ότι σε ορισμένα στελέχη ελαιογόνων ζυμών και μυκήτων (π.χ. *Cryptococcus curvatus*, *Mortierella isabellina*, *Rhodosporidium toruloides*) και κατά τα πρώτα στάδια της αύξησης, το ποσοστό των ενδοπολυσακχαριτών επί ξηράς μικροβιακής μάζας να είναι παρά την παρουσία του αζώτου πολύ υψηλό (έως και 60% w/w), ενώ αντιστοίχως το ποσοστό των λιπιδίων να είναι (φυσιολογικά) πολύ χαμηλό, και όσο προχωρεί η ζύμωση το ποσοστό των ενδοπολυσακχαριτών επί ξηράς ουσίας να μειώνεται ενώ των λιπιδίων να αυξάνεται.



Εικόνα 1.10. Υποθετικό σενάριο διάμεσου μεταβολισμού στα μυκήλια (προσαρμοσμένο από τους Zhong and Tang, 2004; Papanikolaou and Aggelis, 2011a).

Οι ενδοπολυσακχαρίτες μπορούν να παραχθούν από ανώτερους μύκητες και αποτελούνται τόσο από απλά σάκχαρα (π.χ. η γλυκόζη), δισακχαρίτες και πολυόλες (π.χ. η μαννιτόλη). Το μεγαλύτερο όμως μέρος αποτελούν οι πολυσακχαρίτες, όπως γλυκογόνο και β-γλυκάνες (Fang and Zhong, 2002; Tang and Zhong, 2002; Galiotou-Panayotou *et al.*, 1998; Seviour *et al.*, 1992). Έρευνες έχουν δείξει ότι οι ενδοπολυσακχαρίτες μπορούν να εμφανίσουν αντικαρκινικές, αντιοξειδωτικές και ανοσορρυθμιστικές ιδιότητες. Συγκεκριμένα, μελέτες που πραγματοποιήθηκαν σε μυκήλια βασιδιομυκήτων έδειξαν ότι οι προαναφερθείσες ιδιότητες οφείλονται στην ικανότητα των ενδοπολυσακχαριτών να ρυθμίζουν την παραγωγή κυτοκίνης (Fazenda *et al.*, 2008, Jeong *et al.*, 2013). Μερικά από τα είδη που είναι γνωστό πως παράγουν ενδοπολυσακχαρίτες, είναι τα εξής: *Agaricus bisporus*, *Pleurotus ostreatus*, *Ganoderma lucidum* και *Tuber sinense*. Η περεταίρω αξιολόγηση αυτής της ιδιότητας που παρουσιάζουν οι μύκητες βρίσκεται στο επίκεντρο της έρευνας. Στον Πίνακα 1.2. παρουσιάζεται η σύνθεση των ενδοκυτταρικών σακχάρων της ζύμης *Cryptococcus curvatus* NRRL Y-1511 σε συνθήκες περιοριστικές σε άζωτο και σε άνθρακα σε υπόστρωμα λακτόζης σε διάφορες συγκεντρώσεις (Tchakouteu *et al.*, 2015).

Πίνακας 1.2. Σύνθεση των ενδοκυτταρικών σακχάρων της ζύμης *Cryptococcus curvatus* NRRL Y-1511 σε συνθήκες περιοριστικές σε άζωτο και σε άνθρακα σε υπόστρωμα λακτόζης σε διάφορες συγκεντρώσεις (Tchakouteu *et al.*, 2015).

Λακτόζη (g/L)	Χρόνος ζύμωσης (h)	Γλυκόζη (%, w/w)	Φρουκτόζη (%, w/w)	Γαλακτόζη (%, w/w)
Μέσο με περιορισμό αζώτου				
~40	24	100	-	-
	120	57,8	-	42,2
	168	56,5	-	43,35
~60	20	64,8	-	35,2
	269	36,4	-	63,6
	384	33,3	-	66,7
~80	120	54,4	-	45,6
	264	35,9	-	64,2
	528	35,5	-	64,2
Μέσο με περίσσεια αζώτου				
~40	24	52,9	-	47,1
	72	50,9	-	49,1
	96	52,0	-	48,0
~80	48	48,4	6,6	45,0
	144	50,0	4,4	46,6
	216	58,8	4,3	36,9
	336	60,4	-	39,6

1.7. Οι πολυόλες και η βιομηχανική τους χρήση

Ποικίλες διατροφικές μελέτες που πραγματοποιήθηκαν τα τελευταία 50-60 χρόνια έχουν αναδείξει τις αρνητικές επιπτώσεις της κατανάλωσης σακχαρόζης στην ανθρώπινη υγεία (δηλαδή την αύξηση των προβλημάτων που σχετίζονται με την επιδημική παχυσαρκία, τα αυτοάνοσα νοσήματα και τους διάφορους τύπους διαβήτη). Η εν λόγω διαπίστωση ενθάρρυνε τη στροφή των καταναλωτών σε έναν πιο υγιεινό τρόπο διατροφής, με αποτέλεσμα τη χρήση των γλυκαντικών αλκοολών ως υποκατάστατα ζάχαρης στη βιομηχανία τροφίμων (Diamantopoulou and Papanikolaou, 2023). Οι γλυκαντικές αλκοόλες είναι μια ομάδα ενώσεων χαμηλού μοριακού βάρους που παρέχουν γλυκιά γεύση και αίσθηση φρεσκάδας. Οι πολυόλες, όπως επίσης ονομάζονται, περιέχουν πολλαπλές υδροξυλομάδες και μπορεί να ανήκουν στις αλδόζες ή κετόζες, οι οποίες με αναγωγικά μέσα, ανάγονται στο σημείο της καρβονυλικής ομάδας σε πολυσθενείς αλκοόλες (ή πολυόλες ή πολυαλκοόλες), τις αλδιτόλες (Belitz *et al.*, 2009; Bohn and BeMiller, 1995).

Από διατροφικής πλευράς οι πολυόλες (ή σακχαροαλκοόλες) είναι μια ομάδα υδατανθράκων χαμηλής απορρόφησης από τον ανθρώπινο οργανισμό, με συνέπεια αφενός να μην επηρεάζουν τα επίπεδα του σακχάρου όπως τα γνωστά σάκχαρα των τροφών και αφετέρου να κατέχουν χαμηλότερη θερμιδική

απόδοση από αυτά (2,4 θερμίδες έναντι 4 θερμίδων ανά γραμμάριο, αντίστοιχα). Οι πολυόλες είναι ευρέως διαδεδομένες καθώς υπάρχουν σε φυσικά ή και τεχνητά γλυκαντικά. Μπορούν δηλαδή να παραχθούν εμπορικά σε σκευάσματα ενώ βρίσκονται και με τη φυσική τους μορφή (Εικόνα 1.11.) στα τρόφιμα σε φρούτα και λαχανικά. Στην οικογένεια των πολυολών ανήκουν η αραβιτόλη, η μαλτιτόλη, η σορβιτόλη, η ισομαλτιτόλη, η μαννιτόλη, η ξυλιτόλη και η ερυθριτόλη. Στη βιομηχανία τροφίμων οι πολυόλες χρησιμοποιούνται ως:

- υποκατάστατα ζάχαρης, γλυκαντικές ύλες
- γαλακτωματοποιητές
- διογκωτικοί παράγοντες
- γυαλιστικοί παράγοντες και
- συγκολλητικοί παράγοντες



Εικόνα 1.11. Κρυσταλλική μορφή της αραβιτόλης (προσαρμοσμένο από Wikipedia).

Η αρτοποιεία είναι ένας από τους τομείς που χρησιμοποιούνται ευρέως τα τεχνητά γλυκαντικά για τη διαμόρφωση της γεύσης. Ουσιαστικά οι πολυόλες χρησιμοποιούνται ως διογκωτικοί παράγοντες και αποτελούν ρυθμιστικό παράγοντα της υγρασίας, της γεύσης και της γλυκύτητας στην αρτοποιία. Οι πολυόλες χρησιμοποιούνται επίσης σε προϊόντα κατάλληλα για διαβητικούς (μπισκότα, σοκολάτα, τσίγλες), κρατώντας σε σταθερά επίπεδα τη γλυκόζη του αίματος. Στον Πίνακα 1.3. παρουσιάζονται ο δείκτης γλυκύτητας, η θερμιδική αξία και ο γλυκαιμικός δείκτης διάφορων πολυολών.

Πίνακας 1.3. Θερμιδική αξία, γλυκύτητα και γλυκαιμικός δείκτης γλυκαντικών αλκοολών (Grembecka, 2015).

Πολυόλες	Θερμιδική αξία (kcal/g)	Γλυκαιμικός δείκτης
Ερυθριτόλη	0,2	0
Ισομαλιτόλη	2,0	9
Λακτιτόλη	1,9	6
Μαλιτιτόλη	2,1	35
Μαννιτόλη	1,6	0
Σορβιτόλη	2,7	9
Ξυλιτόλη	2,4	13

Ακόμη, οι πολυόλες δεν μετατρέπονται σε οξέα από βακτήρια στο στόμα με αποτέλεσμα να μην προκαλούν την εμφάνιση τερηδόνας στα δόντια. Οι πιθανότητες να σχηματιστεί πλάκα από τις πολυόλες είναι πολύ χαμηλή, καθώς οι πολυόλες δεν παρέχουν υπόστρωμα για την παραγωγή εξωκυτταρικών πολυσακχαριτών. Η ποσότητα της παραγωγής του οξέος είναι πολύ μικρότερη σε σχέση με τη σακχαρόζη και άλλων υδατανθράκων με αποτέλεσμα να μην προκαλούν τη διάβρωση του σμάλτου των δοντιών. Έτσι, παρασκευάζονται προϊόντα με πολυόλες φιλικά προς τα δόντια όπως τσίχλες ή παστίλιες (Erickson *et al.*, 2012). Τέλος, έχουν χρησιμοποιηθεί ως πρώτες ύλες για τη χημική σύνθεση εναντιομερών ενώσεων, ανοσοκατασταλτικών, γλυκολιπιδίων, ζιζανιοκτόνων καθώς και αντιπαθογόνων φαρμάκων (Levin, 2002).

Αν και το ερευνητικό ενδιαφέρον για τη παραγωγή πολυολών μέσω μικροβιακών ζυμώσεων είναι σχετικά πρόσφατο, υπάρχουν αρκετές αναφορές, ειδικά τα τελευταία χρόνια, πως στελέχη της ζύμης *Yarrowia lipolytica* που αναπτύχθηκαν κυρίως σε υποστρώματα αποτελούμενα από ακάθαρτη (κυρίως προερχόμενη από βιοντίζελ) ή καθαρή γλυκερόλη (André *et al.*, 2009; Rymowicz *et al.*, 2009; Tomaszewska *et al.*, 2012; Diamantopoulou and Papanikolaou, 2023) μπορούν να παράξουν πολυόλες σε ικανοποιητική απόδοση. Μάλιστα φαίνεται ότι η φυσιολογία της σύνθεσης πολυολών σχετίζεται με το στέλεχος ζύμης, την πηγή άνθρακα τη συγκέντρωση του αζώτου και τη διαθεσιμότητα οξυγόνου (Ligthelm *et al.*, 1988). Στον Πίνακα 1.5. απεικονίζεται η παραγωγή πολυολών από διάφορα είδη ζυμών του γένους *Yarrowia lipolytica* που καλλιεργήθηκαν σε υπόστρωμα γλυκερόλης σε διαφορετικούς τύπους καλλιέργειας (Vastaroucha *et al.*, 2021).

Πίνακας 1.4. Παραγωγή πολυολών από διάφορα είδη ζυμών του γένους *Yarrowia lipolytica* που καλλιιεργήθηκαν σε υπόστρωμα γλυκερόλης σε διαφορετικούς τύπους καλλιέργειας (Vastaroucha *et al.*, 2021).

Στέλεχος	Ερυθριτόλη (g/L)	Μαννιτόλη (g/L)	Αραβιτόλη (g/L)	Πολυόλες (g/L)	Y _{Pol/Glcol} (g/g)	Τύπος καλλιέργειας	Αναφορά
Wratistavia 1.31 †	132,0	23,0	-	155,0	0,52	Ημι-συνεχής B	Rymowicz <i>et al.</i> (2009)
Wratistavia K1 †	170,0	12,0	-	182,0	0,60	Ημι-συνεχής B	Rymowicz <i>et al.</i> (2009)
A-15 &	71,0	8,0	1,8	80,8	0,50	Κλειστή B	Tomaszewska <i>et al.</i> (2012)
A UV'1 †	63,0	8,8	9,2	81,0	0,50	Κλειστή B	Tomaszewska <i>et al.</i> (2012)
Wratistavia K1 †	80,0	2,6	0,3	82,9	0,51	Κλειστή B	Tomaszewska <i>et al.</i> (2012)
Wratistavia K1 †	135,5	3,9	0,1	139,5	0,58	Κλειστή B	Mirończuk <i>et al.</i> (2014)
Wratistavia 1.31 †	26,2	16,8	3,7	46,7	0,36	Κλειστή B	Tomaszewska <i>et al.</i> (2014)
Wratistavia K1 †	40,7	15,1	2,9	58,7	0,40	Κλειστή B	Tomaszewska <i>et al.</i> (2014)
MK1 †	79,5	2,7	0,4	82,6	0,55	Κλειστή B	Mirończuk <i>et al.</i> (2015)
MK1 †	177,3	2,2	-	179,5	0,67	Κλειστή B	Mirończuk <i>et al.</i> (2015)
FCY 218 †	80,6	n,i,	n,i,	80,6	0,53	Κλειστή B	Carly <i>et al.</i> (2017)
ACA YC 5030 &¶	35,5	32,1	-	67,6	0,49	Κλειστή K Φ	Papanikolaou <i>et al.</i> (2017)
AIB &	56,7	12,6	6,0	75,3	0,49	Ημι-συνεχής B	Rakicka <i>et al.</i> (2017)
ACA-DC 5033 &¶	25,9	17,5	4,2	47,6	0,58	Κλειστή K Φ	Sarantou <i>et al.</i> (2021)
FMCC Y-74	2,41	36,8	3,0	42,3	0,59	Ημι-συνεχής K Φ	Vastaroucha <i>et al.</i> (2021)
FMCC Y-74	24,59	21,7	10,3	56,6	0,54	Κλειστή K Φ	Vastaroucha <i>et al.</i> (2021)
FMCC Y-74	14,59	19,1	6,9	40,6	0,53	Κλειστή K Φ	Vastaroucha <i>et al.</i> (2021)

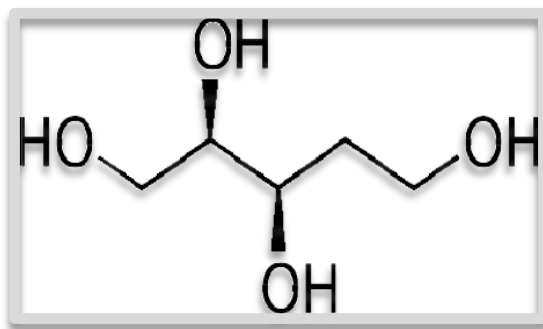
†: Μεταλλαγμένο ή γενετικά τροποποιημένο στέλεχος *Yarrowia lipolytica* &: Άγριος τύπος *Yarrowia lipolytica*- : Ζυμώσεις στις οποίες το pH του μέσου κυμάνθηκε μεταξύ 4,5 και 6,0 καθ' όλη τη διάρκεια της καλλιέργειας (σε όλες τις άλλες δοκιμές, το pH του μέσου ήταν=3,0-3,5).

B: Βιοαντιδραστήρας

K Φ: Κωνικές φιάλες

1.8.1. Γενικά χαρακτηριστικά της αραβιτόλης

Η αραβιτόλη έχει προσδιοριστεί ως μια από τις κορυφαίες δώδεκα χημικές δομικές ουσίες που προέρχονται από τη βιομάζα. Άλλες ονομασίες με τις οποίες μπορεί να αναφερθεί είναι αραβιτιτόλη ή λυξιτόλη. Είναι εναντιομερές της ξυλιτόλης και μπορεί να μετατραπεί σε διάφορες ομάδες χημικών ουσιών (π.χ. προπυλενογλυκόλη, αιθυλενογλυκόλη). Έχει σημείο τήξης 103 °C, είναι εξαιρετικά διαλυτή στο νερό και σχηματίζει λευκούς κρυστάλλους σε καθαρή μορφή. Ο καταβολισμός της αραβιτόλης από το βακτήριο *Escherichia coli* περιλαμβάνει το σχηματισμό φωσφορικής αραβιτόλης που επάγει τη σύνθεση ενώσεων που αναστέλλουν το βακτηριακό μεταβολισμό. Αυτή η ιδιότητα καθιστά δυνατή τη χρήση της αραβιτόλης ως γλυκαντικό που δεν συμβάλλει στην τερηδόνα. Επίσης, η θερμιδική αξία της αραβιτόλης είναι 0,2 kcal/g, ενώ της ξυλιτόλης είναι 2,4 kcal/g και της σακχαρόζης 4,0 kcal/g. Για το λόγο αυτό η αραβιτόλη μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε πολλές από τις γνωστές εφαρμογές της ξυλιτόλης (Koganti *et al.*, 2011; Le Tourneau, 1966; Werpy *et al.*, 2004; Scangos *et al.*, 1979; McCormick *et al.*, 1961; Huck *et al.*, 2004; Crick, 1961; Mitchell, 2008). Στην εικόνα που ακολουθεί παρουσιάζεται ο συντακτικός τύπος της αραβιτόλης.

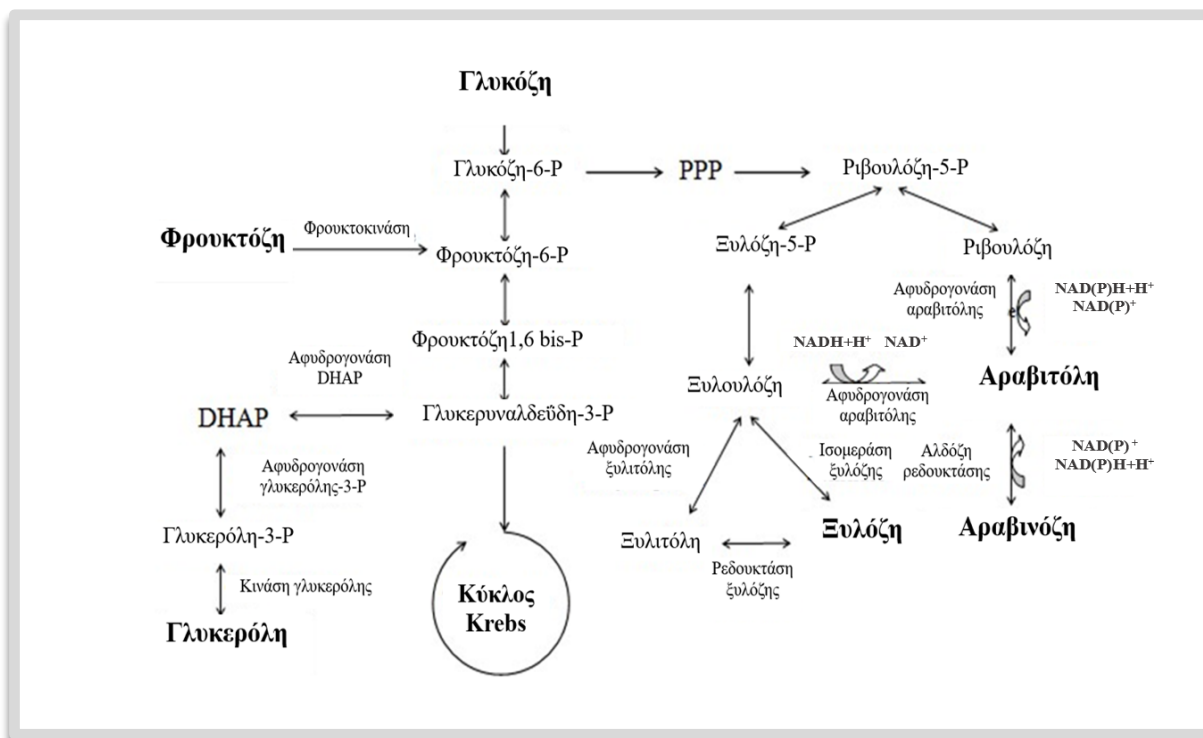


Εικόνα 1.12. Συντακτικός τύπος της αραβιτόλης (προσαρμοσμένο από Wikipedia).

1.8.2. Βιοσύνθεση της αραβιτόλης

Οι ωσμόφιλες ζύμες όταν καλλιεργούνται σε φυσικά υποστρώματα όπως τα λιγνοκυτταρινούχα υλικά, ημικυτταρίνες κλπ συχνά συσσωρεύουν πολυόλες όταν υπόκεινται σε συνθήκες στρες και η αραβιτόλη αποτελεί μια εκ των πολυολών που παράγονται (Kumdam *et al.*, 2014). Τα κύρια υποστρώματα για την παραγωγή L-αραβιτόλης είναι οι ημικυτταρίνες που λαμβάνονται από ανανεώσιμες λιγνοκυτταρινούχες πρώτες ύλες. Από την άλλη πλευρά, υπάρχουν ορισμένες ζύμες ικανές να μετατρέψουν τη γλυκόζη σε D-αραβιτόλη (Saha *et al.* 2007, Zhu *et al.*, 2010). Ένα άλλο υπόστρωμα χαμηλού κόστους που έχει προταθεί για την παραγωγή αραβιτόλης είναι η γλυκερόλη. Υπάρχουν μερικές αναφορές για τη βιομετατροπή της γλυκερόλης σε D-αραβιτόλη από επιλεγμένες ζύμες (Koganti and Ju 2013, Yoshikawa *et al.*, 2014). Τέλος, μελέτες έδειξαν ότι η υδρόλυση υδατανθράκων σόγιας από αλεύρι σόγιας μπορεί να αποτελέσει καλή πηγή εναλλακτικής/συμπληρωματικής πηγής άνθρακα. Η χρήση γλυκερόλης ή/και υδατανθράκων σόγιας για την παραγωγή αραβιτόλης μπορεί να αποφέρει οικονομικά οφέλη στη βιομηχανία σόγιας και βιοντίζελ (Loman and Ju, 2013; 2015).

Η βιοσύνθεση της αραβιτόλης δεν έχει μελετηθεί εκτενώς γι' αυτό και μόνο πιθανά υποθετικά μεταβολικά μονοπάτια συναντώνται στη βιβλιογραφία. Πολλές απόψεις σχετικά με τα ένζυμα που εμπλέκονται στο μεταβολικό μονοπάτι για τη βιοσύνθεση αυτή εξακολουθούν να είναι ασαφείς ενώ απαιτείται διεξοδική έρευνα ως προς αυτό. Η αραβιτόλη φαίνεται να συντίθεται μέσω της οδού των φωσφορικών πεντοζών (Saha *et al.*, 2007). Οι πιθανές οδοί σύνθεσής της συνοψίζονται στην Εικόνα 1.13.. Όπως φαίνεται, η γλυκόζη μετατρέπεται σε 6-φωσφορική γλυκόζη, η οποία στη συνέχεια μέσω του μονοπατιού των φωσφορικών πεντοζών μετατρέπεται σε 5-φωσφορική ριβουλόζη. Στη συνέχεια ακολουθεί η αναγωγή της 5-φωσφορικής ριβουλόζης σε 5-φωσφορική αραβιτόλη μέσω της αναγωγής και μετέπειτα ακολουθεί η αποφωσφορυλίωση της 5-φωσφορικής αραβιτόλης. Εναλλακτικά, η 5-φωσφορική ριβουλόζη μπορεί να μετατραπεί σε 5-φωσφορική ξυλουλόζη η οποία με τη δράση της αφυδρογονάσης τελικά μετατρέπεται σε αραβιτόλη.



Εικόνα 1.13. Πιθανά μεταβολικά μονοπάτια για τη μετατροπή των διαφόρων υποστρωμάτων σε αραβιτόλη (προσαρμοσμένο από Koganti *et al.*, 2011).

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. Βιολογικό υλικό

Για την πραγματοποίηση της παρούσας διδακτορικής διατριβής χρησιμοποιήθηκαν δύο διαφορετικά στελέχη ζυμών. Το πρώτο στέλεχος που καλλιεργήθηκε σε ζυμώσεις προς παραγωγή λιπιδίων ήταν το *Rhodospiridium toruloides* NRRL Y-27012 της συλλογής NRRL (Peoria, USA). Η επιστημονική φυλογενετική ταξινόμηση του συγκεκριμένου είδους παρουσιάζεται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 2.1. Επιστημονική ταξινόμηση του είδους *Rhodospiridium toruloides*.

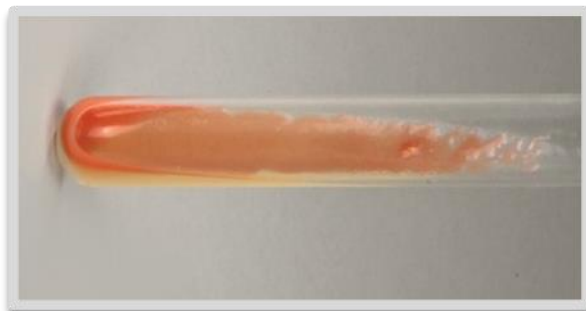
Βασίλειο:	Fungi
Κλάση:	Basidiomycota
Τάξη:	Sporidiales
Οικογένεια:	<i>Sporidiobolaceae</i>
Γένος:	<i>Rhodospiridium</i>
Είδος:	<i>Rhodospiridium toruloides</i>

Το δεύτερο στέλεχος που χρησιμοποιήθηκε για την παραγωγή αραβιτόλης ήταν το *Debaryomyces* sp. FMCC Y₆₉. Ο μικροοργανισμός έχει απομονωθεί από ψάρι και έχει χαρακτηριστεί από το Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών στη τράπεζα του οποίου και φυλάσσεται. Η επιστημονική φυλογενετική ταξινόμηση του συγκεκριμένου είδους παρουσιάζεται στον Πίνακα 2.2..

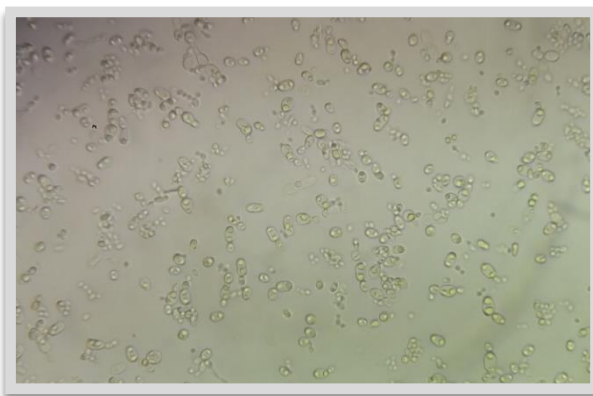
Πίνακας 2.2. Επιστημονική ταξινόμηση του είδους *Debaryomyces* sp. FMCC Y₆₉.

Βασίλειο:	Fungi
Κλάση:	Ascomycota
Τάξη:	Saccharomycetales
Οικογένεια:	Saccharomycetaceae
Γένος:	<i>Debaryomyces</i>
Είδος:	<i>Debaryomyces</i> sp. FMCC Y ₆₉

Οι μικροοργανισμοί διατηρούνταν σε δοκιμαστικούς σωλήνες πληρωμένους με στερεό θρεπτικό μέσο YPD σε θερμοκρασία 4 °C και η ανανέωσή τους γίνονταν ανά τακτά χρονικά διαστήματα (περίπου κάθε 30 ημέρες). Η σύσταση του YPD ήταν: Εκχύλισμα ζύμης 10 g/L, Peptone 10 g/L και Dextrose Agar 10 g/L.



Εικόνα 2.1. Κεκλιμένοι σωλήνες (slants) πληρωμένοι με θρεπτικό μέσο YPD και καλλιέργεια του μικροοργανισμού *Rhodosporidium toruloides* NRRL Y-27012.



Εικόνα 2.2. Κύτταρα του μικροοργανισμού *Rhodosporidium toruloides* NRRL Y-27012 (μεγέθυνση x 100).

2.2. Θρεπτικά υποστρώματα

2.2.1. Παρασκευή προκαλλιέργειας

Για τη διεξαγωγή κάθε πειράματος ήταν απαραίτητη η παρασκευή υγρής προκαλλιέργειας που αποτελούσε το υλικό εκκίνησης της κύριας καλλιέργειας. Το θρεπτικό υπόστρωμα της υγρής προκαλλιέργειας ήταν το YPD, το οποίο προστίθετο σε κωνικές φιάλες των 250 mL πληρωμένες κατά το 1/5 του όγκου τους (50 ± 1 mL), με ογκομετρικό κύλινδρο. Η αποστείρωση του θρεπτικού της προκαλλιέργειας πραγματοποιούνταν σε θερμοκρασία $T=121$ °C για 20 λεπτά. Οι κωνικές εμβολιάζονταν υπό ασηπτικές συνθήκες με τα κύτταρα της ζύμης, προερχόμενα από τη στερεή καλλιέργεια ηλικίας 2 ημερών. Η επώαση του εμβολίου πραγματοποιούνταν σε ανακινούμενο επωαστικό θάλαμο σε σταθερές συνθήκες ανάδευσης 180 rpm και θερμοκρασία στους $T=29 \pm 1$ °C, για 48 ώρες. Πριν από τον εμβολιασμό της κύριας καλλιέργειας με την προκαλλιέργεια, λάμβανε χώρα ο έλεγχος της καθαρότητας του εμβολίου χρησιμοποιώντας οπτικό μικροσκόπιο.

2.2.2. Θρεπτικό μέσο κύριας καλλιέργειας

Όλες οι ζυμώσεις πραγματοποιήθηκαν υπό περιοριστικές σε άζωτο συνθήκες και χρησιμοποιήθηκαν δύο πηγές άνθρακα, η γλυκόζη και η γλυκερόλη. Η γλυκόζη που χρησιμοποιήθηκε ήταν εμπορικής προελεύσεως. Όσον αφορά τη γλυκερόλη, ήταν βιομηχανική, καθαρότητας περίπου 90%, w/w, προερχόμενη από την Ελληνική εταιρία Agroinvest AEBE (Αχλάδι, Φθιώτιδας). Οι κυριότερες ακαθαρσίες που περιείχε ήταν άλατα καλίου και νατρίου (4%, w/w), ελευθέρα λιπαρά οξέα (1%, w/w) και νερό (5%). Για τον καθαρισμό της γλυκερόλης έγινε χρήση χοάνης διαχωρισμού ενώ στη συνέχεια βρέθηκε η ακριβής καθαρότητα αυτής, ίση με 88,5%, με τη χρήση HPLC. Ανάλογα με τις ανάγκες του εκάστοτε πειράματος, ως πηγή άνθρακα χρησιμοποιήθηκαν είτε μόνο γλυκόζη είτε μόνο γλυκερόλη αλλά πραγματοποιήθηκαν και ζυμώσεις σε μικτά υποστρώματα χρησιμοποιώντας ταυτόχρονα και τις δυο πηγές άνθρακα.

Ως πηγές αζώτου χρησιμοποιήθηκαν πεπτόνη 2 g/L και εκχύλισμα ζύμης σε συγκέντρωση 1 g/L. Εξαιρέση αποτελούν τα πειράματα με διαφορετικούς λόγους C/N όπου χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικές συγκεντρώσεις αζώτου οι οποίες αναφέρονται στη συνέχεια. Τέλος, στο απιονισμένο νερό εκτός των παραπάνω προστέθηκαν και τα εξής άλατα:

Πίνακας 2.3. Σύσταση μεταλλικών αλάτων (Papanikolaou *et al.*, 2001).

Ένωση	Συγκέντρωση (g/L)
MnSO ₄ : H ₂ O	0,06
MgSO ₄ : 7H ₂ O	1,50
ZnSO ₄ : 7H ₂ O	0,02
CaCl ₂ : 2H ₂ O	0,15
FeCl ₃ : 6H ₂ O	0,15
KH ₂ PO ₄	7,00
Na ₂ HPO ₄	2,50

Μετά την αποστείρωση του θρεπτικού μέσου το pH είχε τιμή 5,5±0,2. Να σημειωθεί ότι ανάλογα με τις ανάγκες της έρευνας πραγματοποιήθηκαν ζυμώσεις όπου στο θρεπτικό προστέθηκαν διαφορετικές συγκεντρώσεις άλατος NaCl. Επίσης πραγματοποιήθηκαν ζυμώσεις με διαφορετικούς λόγους C/N.

2.3. Τύποι καλλιέργειας και συνθήκες

Κατά τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας πραγματοποιήθηκαν κλειστές καλλιέργειες σε κωνικές φιάλες και βιοαντιδραστήρα. Όσον αφορά τις ζυμώσεις σε κωνικές φιάλες των 250 mL, αυτές ήταν πληρωμένες κατά το 1/5 του όγκου τους (50±1 mL) με το θρεπτικό υπόστρωμα που περιγράφηκε παραπάνω. Οι κωνικές φιάλες εμβολιάστηκαν με 1 mL εμβολίου (1 x 10⁶ CFU/mL) από τη προκαλλιέργεια υπό ασηπτικές συνθήκες. Όσον αφορά τις ζυμώσεις σε βιοαντιδραστήρα των 3 L (New Brunswick Scientific Co; USA), ο ενεργός όγκος της ζύμωσης ήταν 1,9 L και ο εμβολιασμός πραγματοποιήθηκε με 100 mL εμβολίου. Οι ζυμώσεις αυτές πραγματοποιήθηκαν σε ανάδευση κυμαινόμενη από 150 έως 450 rev/min, με σταθερή παροχή αερισμού 2 vvm, οπότε καθόλη τη διάρκεια της καλλιέργειας η τιμή του διαλυμένου οξυγόνου στο θρεπτικό μέσο ήταν DOT≥10 %, v/v. Για το στέλεχος *Rhodospiridium toruloides* NRRL Y-27012 η θερμοκρασία ανάπτυξης ήταν T=28±1 °C. Η επώαση πραγματοποιήθηκε σε ανακινούμενο επωαστικό θάλαμο (Zhicheng ZHWY 211C; Κίνα), σε σταθερές συνθήκες ανάδευσης 180±5 rpm. Το στέλεχος

Debaryomyces sp. FMCC Y₆₉ καλλιιεργήθηκε σε θερμοκρασία T=30±1 °C σε ανακινούμενο επωαστικό θάλαμο (Zhicheng ZHWY 211C; Κίνα), σε σταθερές συνθήκες ανάδευσης 180±5 rpm.

2.3.1 Ζυμώσεις χρησιμοποιώντας το στέλεχος *Rhodospiridium toruloides* NRRL Y-27012

Το στέλεχος *Rhodospiridium toruloides* NRRL Y-27012 αρχικά καλλιιεργήθηκε σε ζύμωση κλειστού τύπου σε κωνικές φιάλες χρησιμοποιώντας τη γλυκερόλη ως τη μοναδική πηγή άνθρακα σε αρχική συγκέντρωση 80 g/L και pH 5,5 και ως πηγή αζώτου χρησιμοποιήθηκε πεπτόνη (2 g/L) και εκχύλισμα ζύμης (1 g/L). Επαναλήφθηκαν δύο ζυμώσεις με τις ίδιες συνθήκες ενώ διαφοροποιήθηκε η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για την εκχύλιση των λιπιδίων. Σε κάθε ζύμωση, το εκάστοτε σημείο αποτελούσε το μέσο όρο δύο ανεξαρτήτων μετρήσεων, σε πειράματα που είχαν λάβει χώρα με διαφορετικά εμβόλια. Στην πρώτη ζύμωση χρησιμοποιήθηκε η εκχύλιση με τη μέθοδο μίγματος διαλυτών χλωροφορμίου (CHCl₃)–μεθανόλης (CH₃OH), ενώ στη δεύτερη έγινε αρχικά όξινη υδρόλυση με HCl και στη συνέχεια εκχύλιση με μίγμα διαλυτών χλωροφορμίου (CHCl₃)–μεθανόλης (CH₃OH).

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκαν ζυμώσεις κλειστού τύπου σε κωνικές φιάλες ρυθμίζοντας την τιμή του pH στις τιμές 3,5, 5,5 και 6,5 με στόχο τη μελέτη της επίδρασης αυτής στην αύξηση και την παραγωγή μεταβολικών προϊόντων. Επίσης πραγματοποιήθηκαν ζυμώσεις κλειστού τύπου σε κωνικές φιάλες σε μικτό υπόστρωμα γλυκόζης-γλυκερόλης σε συγκεντρώσεις Glc: Glol, 1: 0 w/w, 1: 3 w/w, 3: 1 w/w, 1: 1 w/w (Πίνακας 2.4.).

Πίνακας 2.4. Συγκεντρώσεις πηγής άνθρακα και αζώτου σε g/L σε ασυνεχείς ζυμώσεις του μικροοργανισμού *Rhodospiridium toruloides* NRRL Y-27012 σε μικτό υπόστρωμα γλυκόζης-γλυκερόλης.

Πείραμα	Συγκέντρωση γλυκερόλης (g/L)	Συγκέντρωση γλυκόζης (g/L)	Πεπτόνη (g/L)	Εκχύλισμα ζύμης (g/L)
1	80	0	2	1
2	0	80	2	1
3	40	40	2	1
4	20	60	2	1
5	60	20	2	1

Για τον ίδιο σκοπό πραγματοποιήθηκε μια σειρά πειραμάτων με αυξανόμενη συγκέντρωση NaCl στο θρεπτικό μέσο σε συγκεντρώσεις 0,2; 0,5; 0,8; 1,0; 2,0; 3,0 %, w/v στις παρακάτω συνθήκες και ένα πείραμα με απουσία NaCl στο μέσο καλλιέργειας ορίστηκε ως μάρτυρας (Πίνακας 2.5.).

Πίνακας 2.5. Συγκεντρώσεις NaCl και αζώτου σε g/L σε ασυνεχείς ζυμώσεις του μικροοργανισμού *Rhodosporidium toruloides* NRRL Y-27012 σε υπόστρωμα γλυκερόλης 80 g/L.

Πείραμα	Συγκέντρωση NaCl (%, w/v)	Συγκέντρωση γλυκερόλης (g/L)	Πεπτόνη (g/L)	Εκχύλισμα ζύμης (g/L)
1	0,2	80	2	1
2	0,5	80	2	1
3	0,8	80	2	1
4	1	80	2	1
5	2	80	2	1
6	3	80	2	1

Προκειμένου να μειωθεί το κόστος της διεργασίας στο μέσο της καλλιέργειας προστέθηκε ως ανασταλτικός παράγοντας ένα υδρογλυκερικό εκχύλισμα από στερεά απόβλητα κρεμμυδιού (Onion Solid Wastes-OSWs).

Τα βιοδραστικά συστατικά του OSWs ανακτήθηκαν σύμφωνα με τους Katsamba *et al.* (2015). Πιο συγκεκριμένα ένα πυκνό διάλυμα καθαρής γλυκερόλης (90%, w/v) χρησιμοποιήθηκε ως μέσο εκχύλισης σε αναλογία 90 mL διαλύματος ανά γραμμάριο ξηρής μάζας αποξηραμένου-πολτοποιημένου OSWs. Από το συγκεκριμένο εκχύλισμα ανακτήθηκαν και ποσοτικοποιήθηκαν c.90 mg ολικών πολυφαινόλων εκφρασμένων σε γαλλικό οξύ (GAE) ανά γραμμάριο ξηρής μάζας. Οι κυριότερες πολυφαινόλες που προσδιορίστηκαν στο γλυκερινικό εκχύλισμα φλοιού κρεμμυδιού σύμφωνα με τους Katsamba *et al.* (2015), ήταν η κερκετίνη 4'-O-γλυκοζίτης (quercetin 4'-O-glucoside) και η κερκετίνη (quercetin). Συγκεκριμένα η κερκετίνη ταυτοποιήθηκε συγκρίνοντας το χρόνο έκλουσης της και το φάσμα UV-Vis με εκείνη του προτύπου. Η ταυτοποίηση της πολυφαινόλης κερκετίνη 4'-O-γλυκοζίτης έγινε με υγρή χρωματογραφία-σπεκτρομετρία μάζας (Katsamba *et al.*, 2015).

Για τις ανάγκες του πειράματος προστέθηκε σε αποστειρωμένο θρεπτικό μέσο, που περιείχε ακάθαρτη γλυκερόλη σε αρχική συγκέντρωση 80 g/L, ποσότητα του συγκεκριμένου εκχυλίσματος σε συγκέντρωση 40 g/L (40 mg πολυφαινόλων εκφρασμένων σε GAE ανά L θρεπτικού μέσου καλλιέργειας) και πραγματοποιήθηκαν ασυνεχείς καλλιέργειες σε κωνικές φιάλες. Ένα πείραμα που διενεργήθηκε υπό ασηπτικές συνθήκες και περιείχε αποκλειστικά γλυκερόλη σε αρχική συγκέντρωση 80 g/L χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας. Για την επανάληψη του πειράματος που περιείχε OSWs υπό μη-ασηπτικές συνθήκες έγινε παστερίωση του θρεπτικού μέσου της καλλιέργειας (T=100 °C; 5 min) (Πίνακας 2.6.). Σε όλα τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν το αρχικό pH ήταν 5,5±0,2.

Πίνακας 2.6. Συγκεντρώσεις OSWs σε g/L σε ασυνεχείς ζυμώσεις υπό ασηπτικές και μη-ασηπτικές συνθήκες του μικροοργανισμού *Rhodospiridium toruloides* NRRL Y-27012 σε υπόστρωμα γλυκερόλης 80 g/L.

Θερμική επεξεργασία	Συγκέντρωση γλυκερόλης (g/L)	Συγκέντρωση OSWs (g/L)	Πεπτόνη (g/L)	Εκχύλισμα ζύμης (g/L)
Αποστείρωση	80	0	2	1
Αποστείρωση	80	40	2	1
Παστερίωση	80	40	2	1

Λαμβάνοντας υπόψη το γεγονός ότι τόσο η αύξηση όσο και ο μεταβολισμός επηρεάζονται από την αρχική συγκέντρωση του υποστρώματος και το λόγο C/N, έλαβαν χώρα αρχικά δύο πειράματα σε διαφορετικές αρχικές συγκεντρώσεις γλυκερόλης, 50 g/L και 90 g/L (Πίνακας 2.7.). Το προηγούμενο πείραμα με 80 g/L γλυκερόλης χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας και η συγκέντρωση με 90 g/L γλυκερόλης επιλέχθηκε ως υπόστρωμα για δοκιμές σε διαφορετικούς λόγους C/N (=50; 100; 160; 240 moles/moles) με μεταβαλλόμενες συγκεντρώσεις αζώτου στις συνθήκες καλλιέργειας που αναφέρθηκαν προηγουμένως σε κωνικές φιάλες. Ως πηγή άνθρακα χρησιμοποιήθηκε η γλυκερόλη και ως πηγή αζώτου χρησιμοποιήθηκε πεπτόνη και εκχύλισμα ζύμης. Για κάθε πειραματική διαδικασία διενεργήθηκαν δύο επαναλήψεις. Στον Πίνακα 2.8. συνοψίζονται οι συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν στο κάθε πείραμα.

Πίνακας 2.7. Συγκεντρώσεις πηγής άνθρακα και αζώτου σε g/L σε ασυνεχείς ζυμώσεις του μικροοργανισμού *Rhodospiridium toruloides* NRRL Y-27012 σε υπόστρωμα γλυκερόλης

Πείραμα	Συγκέντρωση γλυκερόλης (g/L)	Πεπτόνη (g/L)	Εκχύλισμα ζύμης (g/L)
1	50	2	1
2	80	2	1
3	90	2	1

Πίνακας 2.8. Συγκεντρώσεις πηγής άνθρακα και αζώτου σε g/L σε ασυνεχείς ζυμώσεις του μικροοργανισμού *Rhodospiridium toruloides* NRRL Y-27012 σε υπόστρωμα γλυκερόλης 90 g/L.

Πείραμα	Συγκέντρωση γλυκερόλης (g/L)	Λόγος C/N (moles/moles)	Πεπτόνη (g/L)	Εκχύλισμα ζύμης (g/L)
1	90	50	4	2
2	90	100	2	1
3	90	160	1	1
4	90	240	0,75	0,5

Στη συνέχεια ο λόγος C/N=100 moles/moles επιλέχθηκε για πείραμα που έλαβε χώρα σε βιοαντιδραστήρα με αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης 90 g/L στις συνθήκες που περιγράφονται παραπάνω.

2.3.2 Ζυμώσεις χρησιμοποιώντας το στελέχος *Debaryomyces* sp. FMCC Y₆₉

Για τις ζυμώσεις που ακολούθησαν χρησιμοποιήθηκε το στελέχος *Debaryomyces* sp. FMCC Y₆₉ το οποίο απομονώθηκε από ψάρια του είδους *Oreochromis niloticus* (Filippousi *et al.*, 2019).

Αρχικά πραγματοποιήθηκε πείραμα το οποίο περιείχε γλυκόζη 50%, w/v (purity≥99%, w/w) για περαιτέρω ταυτοποίηση του στελέχους. Λόγω του γεγονότος ότι η ζύμη προήλθε από περιβάλλον υψηλής ωσμωτικής πίεσης, για την αξιολόγηση της ικανότητας του μικροοργανισμού *Debaryomyces* sp. FMCC Y₆₉ να καταναλώνει τη γλυκερόλη προς παραγωγή αραβιτόλης, πραγματοποιήθηκαν ασυνεχείς καλλιέργειες σε κωνικές φιάλες και σε βιοαντιδραστήρα σε δύο υψηλές αρχικές συγκεντρώσεις γλυκερόλης, 80 και 125 g/L. Επίσης πραγματοποιήθηκαν ζυμώσεις κλειστού τύπου σε κωνικές φιάλες σε μικτό υπόστρωμα γλυκόζης-γλυκερόλης σε αναλογίες Glc: Glol, 1: 3 w/w, 3: 1 w/w, 1: 1 w/w (Πίνακας 2.9.).

Πίνακας 2.9. Συγκεντρώσεις πηγής άνθρακα και αζώτου σε g/L σε ασυνεχείς ζυμώσεις του μικροοργανισμού *Debaryomyces* sp. FMCC Y₆₉ σε υπόστρωμα γλυκόζης-γλυκερόλης.

Πείραμα	Συγκέντρωση γλυκερόλης (g/L)	Συγκέντρωση γλυκόζης (g/L)	Πεπτόνη (g/L)	Εκχύλισμα ζύμης (g/L)
1	125	0	2	1
2	0	125	2	1
3	93	32	2	1
4	32	93	2	1
5	62,5	62,5	2	1

Ακολούθησαν ζυμώσεις κλειστού τύπου σε κωνικές φιάλες χρησιμοποιώντας γλυκερόλη ως πηγή άνθρακα σε διαφορετικές τιμές pH (3,5; 7,5). Το pH 5,5 που είχε δοκιμαστεί πρωτίτερα επιλέχθηκε ως μάρτυρας. Επίσης, έλαβε χώρα μια σειρά πειραμάτων με αυξανόμενη συγκέντρωση NaCl (2%, w/v, 5%, w/v, 8%, w/v, 12%, w/v, 16%, w/v) σε υπόστρωμα γλυκερόλης με στόχο τη μελέτη της ικανότητας του στελέχους να αυξάνεται και να παράγει αραβιτόλη σε περιβάλλον υψηλής ωσμωτικής πίεσης σε υπόστρωμα γλυκερόλης (Πίνακας 2.10.).

Πίνακας 2.10. Συγκεντρώσεις NaCl και αζώτου σε g/L σε ασυνεχείς ζυμώσεις του μικροοργανισμού *Debaryomyces* sp. FMCC Y₆₉ σε υπόστρωμα γλυκερόλης 125 g/L.

Πείραμα	Συγκέντρωση NaCl (%, w/v)	Συγκέντρωση γλυκόζης (g/L)	Πεπτόνη (g/L)	Εκχύλισμα ζύμης (g/L)
1	2	125	2	1
2	5	125	2	1
3	8	125	2	1
4	12	125	2	1
5	16	125	2	1

Στη συνέχεια της πειραματικής διαδικασίας, έγιναν πειράματα σε μη θερμικά επεξεργασμένο θρεπτικό μέσο με γλυκερόλη ως πηγή άνθρακα και μη θερμικά επεξεργασμένο θρεπτικό μέσο με γλυκερόλη και προσθήκη άλατος σε συγκέντρωση 5,0%, w/v, σε ασυνεχείς καλλιέργειες σε κωνικές φιάλες. Ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε πείραμα με αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης 125 g/L που προηγουμένως είχε υποστεί θερμική επεξεργασία (αποστείρωση) (Πίνακας 2.11.).

Πίνακας 2.11. Συγκεντρώσεις πηγής άνθρακα και αζώτου σε g/L σε ασυνεχείς ζυμώσεις του μικροοργανισμού *Debaryomyces* sp. FMCC Y₆₉ σε υπόστρωμα γλυκερόλης 125 g/L.

Θερμική επεξεργασία	Συγκέντρωση γλυκερόλης (g/L)	Συγκέντρωση NaCl (%, w/v)	Πεπτόνη (g/L)	Εκχύλισμα ζύμης (g/L)
Αποστείρωση	125	0	2	1
Μη θερμικά επεξεργασμένο	125	0	2	1
Μη θερμικά επεξεργασμένο	125	5	2	1

Επιπλέον πραγματοποιήθηκαν τρία πειράματα σε διαφορετικούς λόγους C/N (79; 158; 240 moles/moles) με αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης 135 g/L στις συνθήκες που αναφέρθηκαν προηγουμένως σε κωνικές φιάλες. Ως πηγή άνθρακα χρησιμοποιήθηκε η γλυκερόλη σε συγκέντρωση 135 g/L και ως πηγή αζώτου χρησιμοποιήθηκε πεπτόνη και εκχύλισμα ζύμης. Για κάθε πειραματική διαδικασία διενεργήθηκαν δύο επαναλήψεις. Στον παρακάτω πίνακα συνοψίζονται οι συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν στο κάθε πείραμα (Πίνακας 2.12.).

Πίνακας 2.12. Συγκεντρώσεις πηγής άνθρακα και αζώτου σε g/L σε ασυνεχείς ζυμώσεις του μικροοργανισμού *Debaryomyces* sp. FMCC Y₆₉ σε υπόστρωμα γλυκερόλης 135 g/L.

Πείραμα	Συγκέντρωση γλυκερόλης (g/L)	Λόγος C/N (moles/moles)	Πεπτόνη (g/L)	Εκχύλισμα ζύμης (g/L)
1	135	79	4	2
2	135	158	2	1
3	135	246	1	1

Τέλος, το στέλεχος *Debaryomyces* sp. FMCC Y₆₉ καλλιεργήθηκε σε ημι-συνεχή καλλιέργεια σε κωνικές φιάλες με αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης 125 g/L. Μετά από 457 h ζύμωσης έγινε η προσθήκη αποστειρωμένου πυκνού διαλύματος γλυκερόλης 60 g/L.

2.4. Αναλύσεις

2.4.1. Προσδιορισμός βιομάζας

Για το διαχωρισμό της βιομάζας (στερεή φάση) από την υγρή φάση σε κάθε δείγμα (Εικόνα 2.3., 2.4) πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση (Hettich Universal 320R, Γερμανία) σε 9000 rpm για 10 min και σε θερμοκρασία 4 °C. Το υπερκείμενο που προέκυψε από την πρώτη φυγοκέντρηση συλλέχθηκε σε Eppendorf των 2 mL και χρησιμοποιήθηκε για περαιτέρω αναλύσεις (Εικόνα 2.5., 2.6). Ακολούθησαν διαδοχικές φυγοκεντρήσεις, υπό τις ίδιες συνθήκες, με χρήση απιονισμένου νερού με σκοπό την έκπλυση της βιομάζας από υπολείμματα του θρεπτικού μέσου της καλλιέργειας. Τέλος, η βιομάζα μεταφέρθηκε σε προζυγισμένα φιαλίδια McCartney και τοποθετήθηκε στο φούρνο προς ξήρανση στους 80±5 °C.

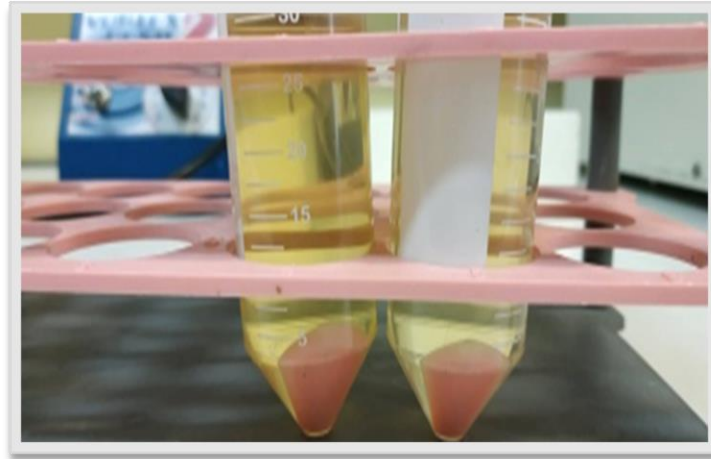
Ο προσδιορισμός της παραγόμενης βιομάζας στις κωνικές φιάλες καλλιέργειας πραγματοποιήθηκε με τον υπολογισμό της διαφοράς του βάρους του φιαλιδίου πριν την τοποθέτηση της βιομάζας και μετά την τοποθέτηση και ξήρανσή αυτής. Η παραγόμενη βιομάζα εκφράζεται σε g/L.



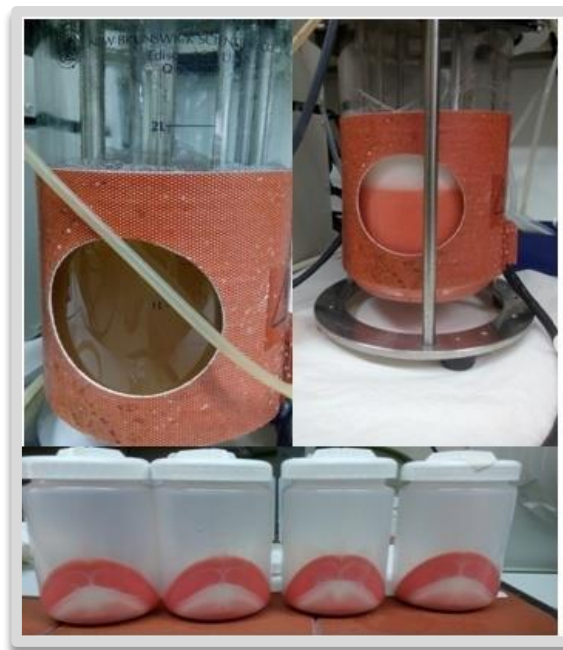
Εικόνα 2.3. Κωνικές φιάλες μετά από 120 h επώασης του μικροοργανισμού *Rhodospiridium toruloides* στον ανακινούμενο επωαστικό θάλαμο (New Brunswick Sc, USA) σε συνθήκες ανάδευσης 180 rpm και σε θερμοκρασία 28 ± 1 °C, συλλογή νοπής βιομάζας, πριν τοποθετηθεί στον ξηραντήρα.



Εικόνα 2.4. Συλλογή δείγματος για ανάλυση του μικροοργανισμού *Rhodospiridium toruloides*.



Εικόνα 2.5. Διαχωρισμός βιομάζας και υπερκειμένου έπειτα από τη φυγοκέντρηση από καλλιέργεια του μικροοργανισμού *Rhodospiridium toruloides* σε κωνικές φιάλες.



Εικόνα 2.6. Διαχωρισμός βιομάζας και υπερκειμένου έπειτα από τη φυγοκέντρηση από καλλιέργεια του μικροοργανισμού *Rhodospiridium toruloides* σε βιοαντιδραστήρα.

2.4.2. Προσδιορισμός pH

Για τη μέτρηση του pH χρησιμοποιήθηκε pH-μετρο τύπου HI 2211 pH meter. Όπου ήταν αναγκαίο, δηλαδή όταν η καταγραφείσα τιμή παρουσίαζε σημαντική απόκλιση από την επιθυμητή ανάλογα με τις ανάγκες του πειράματος, πραγματοποιούνταν ρύθμιση. Η ρύθμιση αυτή πραγματοποιούνταν με την προσθήκη κατάλληλης ποσότητας 5 M NaOH και 5 M HCl υπό ασηπτικές συνθήκες.

2.4.3. Προσδιορισμός και μέτρηση του οξυγόνου

Η μέτρηση του διαλυτού οξυγόνου στις κωνικές φιάλες πραγματοποιήθηκε off-line με τη χρήση φορητού οξυγονόμετρου. Το οξυγονόμετρο αξιοποιούσε τεχνολογία βασισμένη στη πολαρογραφική μέθοδο μέτρησης των Ross και Klark. Ουσιαστικά ο αισθητήρας του οξυγονόμετρου αποτελείται από 1 ηλεκτρόδιο καθόδου (πλατίνα) και 2 ηλεκτρόδια ανόδου (ασήμι) μέσα σε διάλυμα ηλεκτρολύτη το οποίο περικλειόταν σε μεμβράνη πολυτετραφθοροαιθυλενίου (PTFE). Το οξυγόνο μετά την είσοδό του στον αισθητήρα μέσω μιας διαπερατής μεμβράνης από τεφλόν, υφίστατο ηλεκτρόλυση δημιουργώντας έτσι ένα μετρήσιμο ηλεκτρικό ρεύμα το οποίο αντιστοιχούσε στη ποσότητα του διαλυτού οξυγόνου.

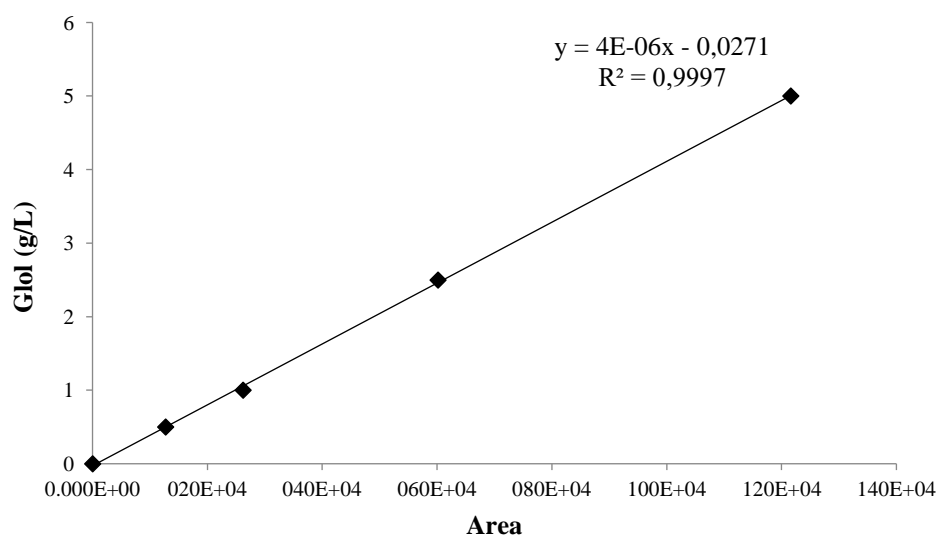
Στο πείραμα η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν η εξής: μετά τη λήψη του σημείου το οξυγονόμετρο τοποθετούνταν μέσα στην κωνική φιάλη της κύριας καλλιέργειας, η οποία στη συνέχεια επανατοποθετούνταν πίσω στον αναδευόμενο επωαστικό κλίβανο όπου και κατά τη διάρκεια της ανάδευσης γινόταν η λήψη του ποσοστού του διαλυτού οξυγόνου (% , v/v και mg/L). Η διάρκεια της μέτρησης ανά κωνική ήταν 20 δευτερόλεπτα και συνολικά λαμβάνονταν 5 τιμές μαζί με το μηδενικό σημείο.

2.4.4. Προσδιορισμός κατανάλωσης υποστρώματος και παραγωγής μεταβολικών προϊόντων

Η συγκέντρωση του υποστρώματος αλλά και των παραγόμενων μεταβολικών προϊόντων για κάθε δείγμα προσδιορίστηκε με τη χρήση της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography-HPLC) σε σύστημα Waters 600E. Ως κινητή φάση για τη στήλη διαχωρισμού χρησιμοποιήθηκε υδατικό διάλυμα H_2SO_4 σε συγκέντρωση 5 mM χρησιμοποιώντας απιονισμένο-απεσταγμένο νερό το οποίο υπέστη φιλτράρισμα πριν τη χρήση. Η ροή του διαλύτη ήταν ρυθμισμένη στα 0,6 mL/min. Η στήλη με την οποία έγινε ο διαχωρισμός ήταν τύπου phenomenex Rezex TM RoA-Organic acid H^+ (8%) σε θερμοκρασία 60 °C. Στη στήλη τοποθετήθηκε κάθε φορά δείγμα 10 μ L και η διάρκεια ανάλυσης ήταν 24 min.

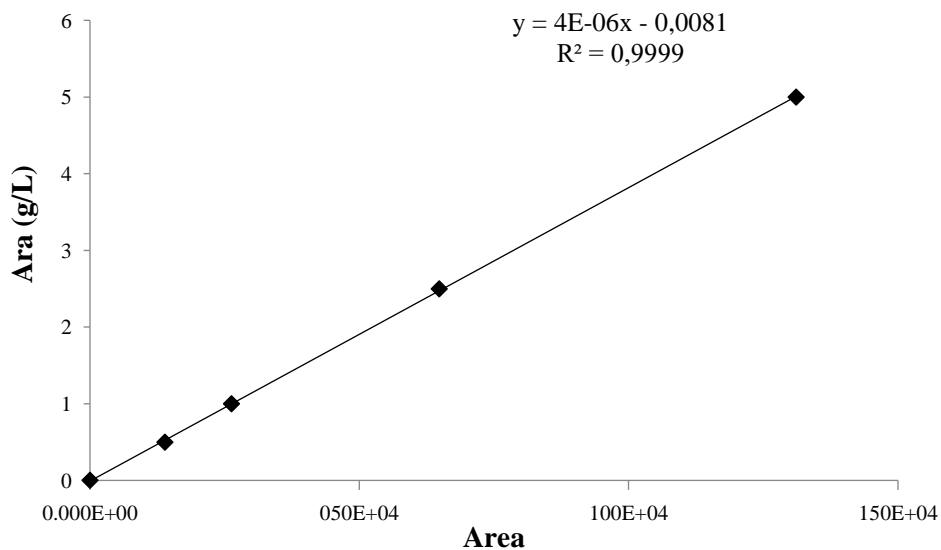
Όλα τα υπερκείμενα των δειγμάτων κατά τη διάρκεια της προετοιμασίας τους αραιώθηκαν και φιλτραρίστηκαν με χρήση φίλτρων whatman που διέθεταν μεμβράνη με διάμετρο σπών 0,2 μ m. Για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης κάθε ουσίας δημιουργήθηκαν καμπύλες αναφοράς πρότυπων ουσιών ενώ η ταυτοποίησή τους βασίστηκε στο χρόνο κατακράτησης καθεμιάς από αυτές.

Πρότυπη Καμπύλη Γλυκερόλης



Εικόνα 2.7. Πρότυπη καμπύλη αναφοράς γλυκερόλης.

Πρότυπη Καμπύλη Αραβιτόλης



Εικόνα 2.8. Πρότυπη καμπύλη αναφοράς αραβιτόλης.

2.4.5. Ποσοτικός προσδιορισμός ενδοκυτταρικού λίπους

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό της συγκέντρωσης του ενδοκυτταρικού λίπους χρησιμοποιήθηκαν δύο μέθοδοι. Κατά την πρώτη μέθοδο, χρησιμοποιήθηκε μίγμα διαλυτών χλωροφορμίου (CHCl_3)-μεθανόλης (CH_3OH) σε αναλογία 2: 1 (Folch *et al.*, 1957; Papanikolaou *et al.*, 2001; Papanikolaou *et al.*, 2002; Wiebe *et al.*, 2012; Sarantou *et al.*, 2021). Η χρήση του συγκεκριμένου διαλύματος έχει τη δυνατότητα να επιτυγχάνει τη διάρρηξη των κυττάρων και να εκχλιρίζει το συνολικό μικροβιακό λίπος (Total Intracellular Lipids, TL). Συγκεκριμένα, 300 mg αποξηραμένης βιομάζας τοποθετήθηκαν σε φιαλίδιο McCartney όπου προστέθηκε μίγμα χλωροφορμίου/μεθανόλης σε αναλογία 2: 1 (v/v) (έως 25 mL). Το φιαλίδιο σφραγίστηκε με βιδωτό καπάκι αλουμινίου και έμεινε για τουλάχιστον 72 ώρες στο σκοτάδι ενώ το περιεχόμενο του φιαλιδίου αναμειγνυόταν περιστασιακά με τη βοήθεια γυάλινης ράβδου. Στη συνέχεια, τα στερεά υπολείμματα των κυττάρων απομακρύνθηκαν μέσω διήθησης (φίλτρο Whatman® no3), το μίγμα διαλυτών συλλέχθηκε σε προζυγισμένη φιάλη εξάτμισης (Εικόνα 2.9.) και τοποθετήθηκε σε περιστροφικό εξατμιστήρα (R-144, Büchi Labortechnik, Flawil, Ελβετία), τέλος ακολούθησε ποσοτικός προσδιορισμός των ολικών λιπιδίων.

Κατά τη δεύτερη μέθοδο (Tchakouteu *et al.*, 2015b), τοποθετήθηκαν 300 mg ξηρής βιομάζας σε γυάλινα φιαλίδια και προστέθηκε σε αυτά 4,0 mL HCl 2 M. Στη συνέχεια το μίγμα τοποθετήθηκε σε υδατόλουτρο στους 100 °C για 40 λεπτά. Εν τέλει, στο μίγμα, αφού ήρθε σε θερμοκρασία δωματίου, προστέθηκε μίγμα διαλυτών χλωροφορμίου/μεθανόλης σε αναλογία 2: 1 (v/v) και έμεινε για τουλάχιστον 72 ώρες στο σκοτάδι. Στη συνέχεια, τα στερεά υπολείμματα των κυττάρων απομακρύνθηκαν μέσω διήθησης (φίλτρο Whatman® no3) και το μίγμα διαλυτών συλλέχθηκε σε προζυγισμένη φιάλη εξάτμισης.



Εικόνα 2.9. Λίπος διαλυμένο σε Folch του μικροοργανισμού *Rhodosporidium toruloides*.

Έπειτα ακολούθησε εξάτμιση του διηθήματος με τη χρήση περιστροφικού εξατμιστήρα (R-144, Büchi Labortechnik, Flawil, Ελβετία) υπό κενό, σε θερμοκρασία 50–55 °C έτσι ώστε να απομακρυνθούν πλήρως οι διαλύτες χλωροφορμίου–μεθανόλης και να παραμείνει μόνο το μικροβιακό λίπος (Εικόνα 2.10.) Τέλος, τα ενδοκυτταρικά λιπίδια (L) ζυγίστηκαν σε ζυγό ακριβείας και εκφράστηκαν σε g μικροβιακών λιπιδίων ανά g ξηρής βιομάζας και συνακόλουθα σε g λιπιδίων ανά L καλλιέργειας.



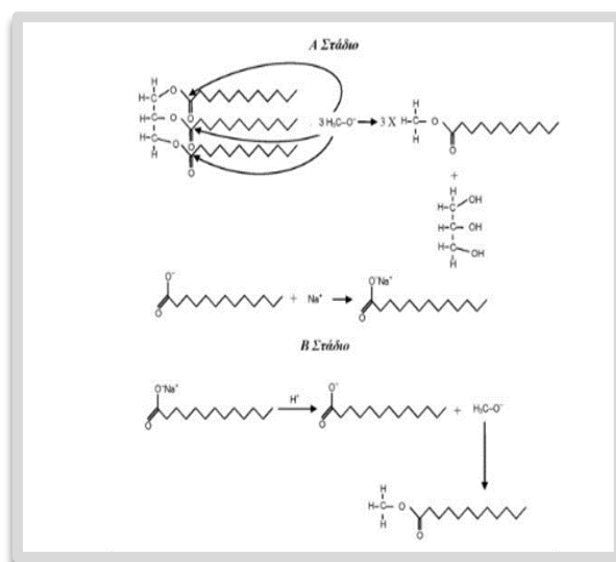
Εικόνα 2.10. Ενδοκυτταρικό λίπος έπειτα από εξάτμιση του μικροοργανισμού *Rhodosporidium toruloides*.

2.4.6. Μεθυλεστεροποίηση

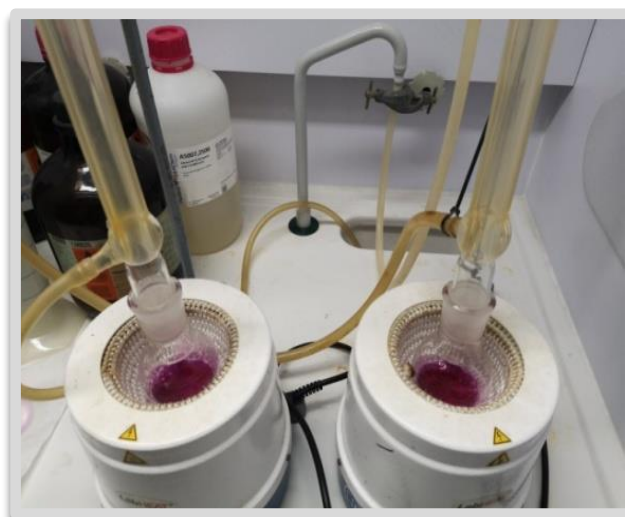
Για τη μετατροπή των λιπαρών οξέων στους αντίστοιχους πτητικούς μεθυλικούς εστέρες (FAMES), προκειμένου να ακολουθήσει η ανάλυση τους μέσω αέριας χρωματογραφίας (GC), πραγματοποιήθηκε μεθυλεστεροποίηση. Συγκεκριμένα, το κυτταρικό λίπος μετατράπηκε με μεθυλίωση στους αντίστοιχους μεθυλικούς εστέρες, με τη γενικευμένη μέθοδο AFNOR (1959), προκειμένου να γίνει ο ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός των λιπαρών οξέων που περιέχονται σε αυτό. Η εστεροποίηση πραγματοποιήθηκε σε δύο στάδια, το πρώτο σε αλκαλικό περιβάλλον και το δεύτερο σε όξινο. Κατά το πρώτο στάδιο τελείται η πυρηνόφιλη υποκατάσταση στο μόριο των τριγλυκεριδίων και των φωσφολιπιδίων, με τελικό προϊόν τους αντίστοιχους μεθυλεστέρες των λιπαρών οξέων. Παράλληλα, τα ήδη υπάρχοντα ελεύθερα λιπαρά οξέα αντιδρούν με το διάλυμα του μεθανολικού νατρίου και παραλαμβάνονται οι αντίστοιχοι σάπωνές τους.

Στο δεύτερο στάδιο πραγματοποιήθηκε η μετατροπή των σαπώνων των λιπαρών οξέων προς τους αντίστοιχους μεθυλεστέρες, έτσι ώστε να καταστούν πτητικά για να αναλυθούν στον αέριο χρωματογράφο. Συγκεκριμένα, στη σφαιρική φιάλη με το ζυγισθέν κυτταρικό λίπος προστέθηκαν λίγες πέτρες βρασμού και 10 mL διαλύματος μεθανολικού νατρίου (MeO-Na^+) (Εικόνα 2.12.) που περιείχαν φαινολοφθαλεΐνη ως δείκτη pH και το δείγμα τοποθετήθηκε προς ήπιο βρασμό για 20 min. Το διάλυμα του μεθανολικού νατρίου παρασκευάστηκε διαλύοντας 1 g μεταλλικού νατρίου σε 100 mL μίγματος μεθανόλης/βενζολίου 70/30 (v/v). Μετά το πέρας του χρόνου προστέθηκαν 5-10 mL υδροχλωρικής μεθανόλης (έως ότου το δείγμα αποχρωματιστεί) και ακολούθησε βρασμός για άλλα 20 min. Το διάλυμα της υδροχλωρικής μεθανόλης παρασκευάστηκε προσθέτοντας στάγδην 10 mL ακετυλο-χλωριδίου σε 125 mL μεθανόλης (ισχυρά εξώθερμη αντίδραση). Ακολούθησε προσθήκη απιονισμένου νερού προκειμένου να λάβει τέλος η αντίδραση και το δείγμα μεταφέρθηκε σε εκχυλιστική χοάνη. Προστέθηκαν 6 mL εξανίου, ακολούθησε έντονη

ανάδευση και το δείγμα έμεινε για λίγα λεπτά σε ηρεμία προκειμένου να διαχωριστούν οι δύο φάσεις (η οργανική και η υδατική φάση) (Εικόνα 2.13.). Η φάση του εξανίου συλλέχθηκε σε μικρό φιαλίδιο και προστέθηκε μικρή ποσότητα άνυδρου θεικού νατρίου (Na_2SO_4) για την απορρόφηση της υγρασίας. Τέλος, το δείγμα αναλύθηκε στον αέριο χρωματογράφο, προκειμένου να γίνει ο προσδιορισμός των μεθυλεστέρων των λιπαρών οξέων που περιέχονταν σε αυτό. Οι μηχανισμοί των αντιδράσεων, τόσο του πρώτου (διεργασία υπό αλκαλικό περιβάλλον) όσο και του δευτέρου (διεργασία υπό όξινο περιβάλλον) σταδίου, φαίνονται στην Εικόνα 2.11. (Μακρή, 2011).



Εικόνα 2.11. Η αντίδραση μεθυλεστεροποίησης που τελείται σε δύο διακριτά στάδια, το πρώτο σε αλκαλικό περιβάλλον και το δεύτερο σε όξινο (Μακρή, 2011).



Εικόνα 2.12. Βρασμός με MeO-Na^+ προς μετατροπή των ελεύθερων λιπαρών οξέων στους αντίστοιχους σάπωνες κατά τη μεθυλεστεροποίηση του λίπους του μικροοργανισμού *Rhodospiridium toruloides*.



Εικόνα 2.13. Διαχωρισμός δύο φάσεων μετά την προσθήκη εξανίου κατά τη μεθυλεστεροποίηση του μικροοργανισμού *Rhodospiridium toruloides*.

2.4.7. Ανάλυση στον αέριο χρωματογράφο (GC)

Για τον ποιοτικό προσδιορισμό της σύστασης του μικροβιακού λίπους στα επιμέρους λιπαρά οξέα χρησιμοποιήθηκε αέριος χρωματογράφος τύπου Fisons GC 8000 εξοπλισμένος με τριχοειδή στήλη CPWAX 52 CB μήκους 30 m και με ανιχνευτή FID (Flame Ionization Detector). Το φέρον αέριο ήταν το He, του οποίου η ροή ρυθμίστηκε στα 2 mL/min (25 °C). Στον εισαγωγέα του αέριου χρωματογράφου με τη βοήθεια σύριγγας εισήλθε 1 μL δείγματος. Η ταυτοποίηση των λιπαρών οξέων έγινε τη βοήθεια πρότυπων μεθυλεστέρων των βασικότερων λιπαρών οξέων αντιστοιχίζοντας τους χρόνους κατακράτησης τους (tR). Το % ποσοστό κάθε λιπαρού οξέος υπολογίστηκε με βάση το εμβαδό της κάθε κορυφής στα χρωματογραφήματα με τη βοήθεια του τύπου: $\%, w/w \Lambda. O. = (\text{Εμβαδό } \Lambda. O. / \text{Συνολικό εμβαδό}) * 100$

2.4.8. Κλασμάτωση λιπιδίων

Για τη κλασμάτωση λιπιδίων περίπου 100 mg καθαρού μικροβιακού ελαίου παρελήφθησαν σε 1 mL χλωροφορμίου και μεταφέρθηκαν σε χρωματογραφική στήλη πυριτικού οξέος (silicic acid, Sigma), όπως παρουσιάζεται στην Εικόνα 2.14. Το πυριτικό οξύ είχε ενεργοποιηθεί προηγουμένως μετά από παραμονή για 1 h σε θερμοκρασία 120 °C.



Εικόνα 2.14. Στήλη κλασμάτωσης λιπιδίων.

Εν συνεχεία, για την έκπλυση του λίπους που ζυγίστηκε προστέθηκε σε αυτό 25%, w/w κορεσμένου KCl (0,88%) και 75% Folch. Ανακινήθηκε καλά ώστε να διαλυθεί όλη η ποσότητα του λίπους και στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκε. Το διάλυμα μεταφέρθηκε σε διαχωριστική χοάνη και συλλέχθηκε η κάτω φάση (καθαρό λίπος) σε προζυγισμένη σφαιρική φιάλη και εξατμίστηκαν οι διαλύτες (Εικόνα 2.15).



Εικόνα 2.15. Καθαρό λίπος σε διαχωριστική χοάνη.

Για την προετοιμασία της στήλης περίπου 1,3 g πυριτικού οξέως ενυδατώθηκαν με προσθήκη 5 mL χλωροφορμίου σε ποτήρι ζέσεως. Το εναιώρημα προστέθηκε ανακινούμενο στο κέντρο της στήλης, έτσι ώστε να πέσει όσο λιγότερο γίνεται στα τοιχώματα της στήλης. Στη συνέχεια προστέθηκε στο ποτήρι χλωροφόρμιο και η διαδικασία επαναλήφθηκε μέχρι να παραληφθεί το σύνολο σχεδόν του πυριτικού οξέως. Για το πακετάρισμα της στήλης, προστέθηκε με πιπέτα ποσότητα χλωροφορμίου στα τοιχώματα της στήλης ώστε να απομακρυνθεί το πυριτικό οξύ που είχε επικαθίσει στο εσωτερικό της στήλης. Στη συνέχεια

ανοίχθηκε η στρόφιγγα ώστε να περάσει με πίεση ο διαλύτης από το πυριτικό οξύ.

Μετά το πακετάρισμα η στήλη άδειασε από το διαλύτη και αφέθηκε τόσο ώστε η στάθμη του να είναι λίγο πάνω από την επιφάνεια του πυριτικού οξέως. Εν συνεχεία, στο καθαρό λίπος προστέθηκε μικρή ποσότητα χλωροφορμίου ώστε να διαλυθεί. Με μια γυάλινη πιπέτα προστέθηκαν τα λιπίδια στα τοιχώματα της στήλης ώστε να μη διαταράξουμε την επιφάνεια. Ακολούθησε η έκλυση των λιπιδίων με άνοιγμα της στρόφυγγας και διαδοχική προσθήκη 40 mL χλωροφορμίου, ακετόνης και μεθανόλης, ενώ τα κλάσματα συλλέχθηκαν σε προζυγισμένες γυάλινες φιάλες. Η ποσότητα του διαλύτη που περνάει από τη στήλη υπολογίζεται από τον τύπο: $V_{\text{silica}} \times 5 \text{ bed volume}$, όπου $V_{\text{silica}} = \pi r^2 h$

Έτσι, στο κλάσμα του χλωροφορμίου περιέχονταν τα ουδέτερα λιπίδια, στο κλάσμα της ακετόνης τα γλυκολιπίδια και τα σφιγγολιπίδια και στο κλάσμα της μεθανόλης τα φωσφολιπίδια.

2.4.9. Προσδιορισμός ενδοπολυσακχαριτών (IPS)

Οι παραγόμενοι ενδοπολυσακχαρίτες (IPS, Intracellular Polysaccharides) σε όλα τα δείγματα προσδιορίστηκαν ποιοτικά και ποσοτικά. Ακολουθήθηκε η διαδικασία η οποία είναι βασισμένη σε ένα τροποποιημένο πρωτόκολλο μεθόδου, το οποίο παρουσιάζεται στα δημοσιεύματα από τους Liang *et al.* (2009) και Argyropoulos *et al.* (2022). Κατά τη διαδικασία που ακολουθήθηκε προστέθηκαν σε 0,05 g ξηρής βιομάζας 10 mL υδροχλωρικού οξέος (HCl 2M), το διάλυμα που προέκυπτε υδρολύονταν στους 100 °C για 30 λεπτά, ακολουθούσε εξουδετέρωση του HCl με προσθήκη 10 mL καυστικού νατρίου (NaOH 2M) και διήθηση με διπλό διηθητικό χαρτί, ώστε το διήθημα που προκύπτει να είναι διαυγές.

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό των ενδοπολυσακχαριτών εφαρμόστηκε η μέθοδος για τον προσδιορισμό των αναγόντων σακχάρων σε ισοδύναμα γλυκόζης με χρήση του 3,5-δινιτροσαλικυλικού οξέος (αντιδραστήριο DNS), που εφαρμόστηκε από το Miller (1959). Η μέθοδος για τον προσδιορισμό των αναγωγικών σακχάρων 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. Για την παρασκευή του αντιδραστηρίου 400 περίπου mL θερμάνθηκαν και προστέθηκαν 8 g NaOH. Στη συνέχεια προστέθηκαν 5 g 3,5-δινιτροσαλικυλικού οξέος και μετά 150 g τρυγικό καλιονάτριο. Ο όγκος συμπληρώθηκε στα 500 mL. Μετά την παρασκευή του το αντιδραστήριο διατηρούταν σε σκούρο μπουκάλι σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Σε γυάλινους δοκιμαστικούς σωλήνες τοποθετήθηκαν 0,5 mL δείγματος και 0,5 mL αντιδραστηρίου DNS. Τα δείγματα αναδεύτηκαν και ακολούθησε βρασμός στους $T=100\text{ }^{\circ}\text{C}$ για 5 λεπτά και αμέσως μετά ψύξη αυτών με νερό (περίπου 5 λεπτά). Έπειτα προστέθηκαν 5 mL απιονισμένο νερό στα δείγματα και μετά από ανάδευση πραγματοποιήθηκε μέτρηση της απορρόφησης στα 540 nm σε φασματοφωτόμετρο τύπου (Hitachi U-2000 Spectro photometer). Το τυφλό δείγμα για το μηδενισμό του φασματοφωτόμετρου, περιείχε 0,5 mL απιονισμένο νερό και 0,5 mL αντιδραστηρίου DNS. Η συγκέντρωση του εκάστοτε δείγματος σε ανάγοντα σάκχαρα υπολογίστηκε από την πρότυπη καμπύλη αναφοράς και εκφράστηκε σε ισοδύναμη συγκέντρωση γλυκόζης (g/L).



Εικόνα 2.16. Χρωματισμός διαλυμάτων κατά την εφαρμογή της μεθόδου DNS.

2.4.10. Προσδιορισμός Αζώτου των Ελεύθερων Αμινομάδων (FAN analysis)

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό του αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων (Free Amino Nitrogen, FAN) χρησιμοποιήθηκε η φωτομετρική μέθοδος της νινυδρίνης (Lie, 1973). Η νινυδρίνη έχει τη δυνατότητα να αντιδρά με τα αμινοξέα που βρίσκονται στο εκάστοτε δείγμα και να παράγει μωβ χρώμα. Η απορρόφηση σε μήκος κύματος 570 nm μας δίνει την ποσότητα των ελεύθερων αμινομάδων τη δεδομένη χρονική στιγμή της ζύμωσης. Η ένταση του χρώματος που παράγεται είναι ανάλογη της συγκέντρωσης των αμινοξέων που εμπεριέχονται στο δείγμα. Όσον αφορά τα βήματα που ακολουθήθηκαν, αρχικά σε δοκιμαστικό σωλήνα προστέθηκε 1 mL κατάλληλα αραιωμένου δείγματος και 0,5 mL αντιδραστηρίου χρώσης (color reagent). Οι δοκιμαστικοί σωλήνες πωματίστηκαν και μεταφέρθηκαν σε υδατόλουτρο για θέρμανση στους 100 °C για 16 λεπτά. Ακολούθησε ψύξη των δειγμάτων σε νερό στους 20 °C για 20 λεπτά. Έπειτα, προστέθηκαν 2,5 mL αντιδραστηρίου αραιώσης (dilution reagent) και αναδεύτηκαν για 20 δευτερόλεπτα, μέχρι την αλλαγή χρώματος. Τέλος, μετρήθηκε η απορρόφηση σε φασματοφωτόμετρο (Hitachi U-2000 Spectro photometer) στα 570 nm. Το τυφλό δείγμα για το μηδενισμό του φασματοφωτόμετρου, περιείχε 1 mL απιονισμένο νερό και 0,5 mL αντιδραστηρίου χρώσης. Για το υπολογισμό της συγκέντρωσης του δείγματος σε FAN χρησιμοποιήθηκε η πρότυπη καμπύλη αναφοράς που κατασκευάστηκε, εκφρασμένη σε mg/L. Για την πρότυπη καμπύλη αναφοράς ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία, χρησιμοποιώντας δείγματα με διαφορετικές αραιώσεις πρότυπου διαλύματος γλυκίνης.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1. Αποτελέσματα ζυμώσεων του στελέχους *Rhodospiridium toruloides* NRRL Y-27012

3.1.1. Ασυνεχείς ζυμώσεις σε υπόστρωμα γλυκερόλης σε κωνικές φιάλες–Επαναληψιμότητα αποτελεσμάτων–Αξιολόγηση μεθόδων εκχύλισης λίπους

Το στέλεχος *Rhodospiridium toruloides* NRRL Y-27012 αρχικά καλλιεργήθηκε σε ζύμωση κλειστού τύπου σε κωνικές φιάλες χρησιμοποιώντας τη γλυκερόλη ως τη μοναδική πηγή άνθρακα σε αρχική συγκέντρωση 80 g/L και pH 5,5. Η αύξηση της ζύμης πραγματοποιήθηκε σε περιοριστικές για το άζωτο συνθήκες, καθώς η αρχική συγκέντρωση του αζώτου (FAN) ήταν ~100 mg/L και μετά από 40 h ζύμωσης αυτή προσδιορίστηκε σε ~20 mg/L (οι αρχικές συγκεντρώσεις των αζωτούχων ενώσεων ήταν 2,0 g/L πεπτόνη και 1,0 g/L εκχύλισμα ζύμης). Μελετήθηκε η επίδραση της αύξησης της αρχικής συγκέντρωσης της γλυκερόλης στην αύξηση της ζύμης, στην παραγωγή βιομάζας (X) και δευτερογενών μεταβολιτών όπως λιπίδια (L) και ενδοκυτταρικοί πολυσακχαρίτες (IPS). Επαναλήφθηκαν δύο ζυμώσεις με τις ίδιες συνθήκες ενώ διαφοροποιήθηκε η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για την εκχύλιση των λιπιδίων. Σε κάθε ζύμωση, το εκάστοτε σημείο αποτελούσε το μέσο όρο δύο ανεξαρτήτων μετρήσεων, σε πειράματα που είχαν λάβει χώρα με διαφορετικά εμβόλια. Στην πρώτη ζύμωση χρησιμοποιήθηκε η εκχύλιση με τη μέθοδο μίγματος διαλυτών χλωροφορμίου (CHCl₃)–μεθανόλης (CH₃OH), ενώ στη δεύτερη έγινε αρχικά όξινη υδρόλυση με HCl και στη συνέχεια εκχύλιση με μίγμα διαλυτών χλωροφορμίου (CHCl₃)–μεθανόλης (CH₃OH).

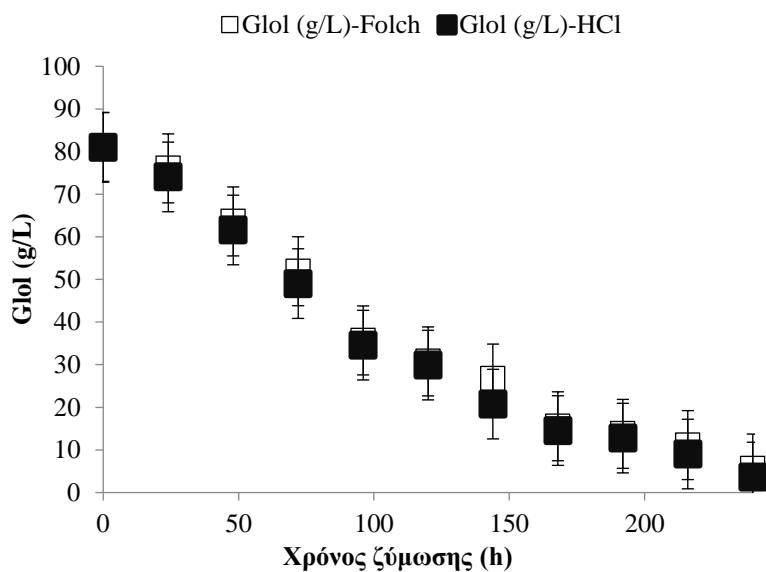
Σε ό,τι αφορά στην πρώτη μέθοδο εκχύλισης [με μίγμα χλωροφορμίου (CHCl₃)–μεθανόλης (CH₃OH)], το στέλεχος έδειξε να καταναλώνει πλήρως τη γλυκερόλη στις 264 h, ενώ η διάρκεια της ζύμωσης επεκτάθηκε μέχρι τις 408 h προς μελέτη της φυσιολογικής συμπεριφοράς του μικροοργανισμού. Η μέγιστη συγκέντρωση παραγόμενης βιομάζας και λιπιδίων σημειώθηκε στις 240 h της ζύμωσης και ήταν 20,4 g/L και 8,9 g/L αντίστοιχα. Το μέγιστο ποσοστό λίπους επί ξηράς ουσίας (L/X) ήταν 43,8%, w/w στις 240 h ζύμωσης, ενώ η μέγιστη εκατοστιαία αναλογία ενδοπολυσακχαριτών ανά παραγόμενη βιομάζα (IPS/X) ήταν 42,9%, w/w στις 24 h και μειώθηκε σταδιακά σε 7,9%, w/w στις 408 h. Οι μέγιστες αποδόσεις λίπους και βιομάζας προς το καταναλωθέν υπόστρωμα ήταν $Y_{L/Glcl}$ =0,18 g/g και $Y_{X/Glcl}$ =0,42 g/g αντίστοιχα.

Στο δεύτερο σετ πειραμάτων (εκχύλιση με πέψη με πυκνό HCl), η μέγιστη συγκέντρωση παραγόμενης βιομάζας και λιπιδίων σημειώθηκε στο τέλος της ζύμωσης (240 h) και ήταν 19,8 g/L και 8,1 g/L αντίστοιχα. Η όξινη υδρόλυση του λίπους με HCl δεν επέφερε μεταβολή στην τελική συγκέντρωση των παραγόμενων λιπιδίων σε σχέση με την εκχύλιση με μίγμα χλωροφορμίου (CHCl₃)–μεθανόλης (CH₃OH). Το μέγιστο ποσοστό L/X ήταν 40,8%, w/w στις 240 h ζύμωσης, ενώ η μέγιστη εκατοστιαία αναλογία IPS/X ήταν 48,9%, w/w στις 24 h και μειώθηκε σταδιακά σε ~10%, w/w στις 240 h. Οι μέγιστες

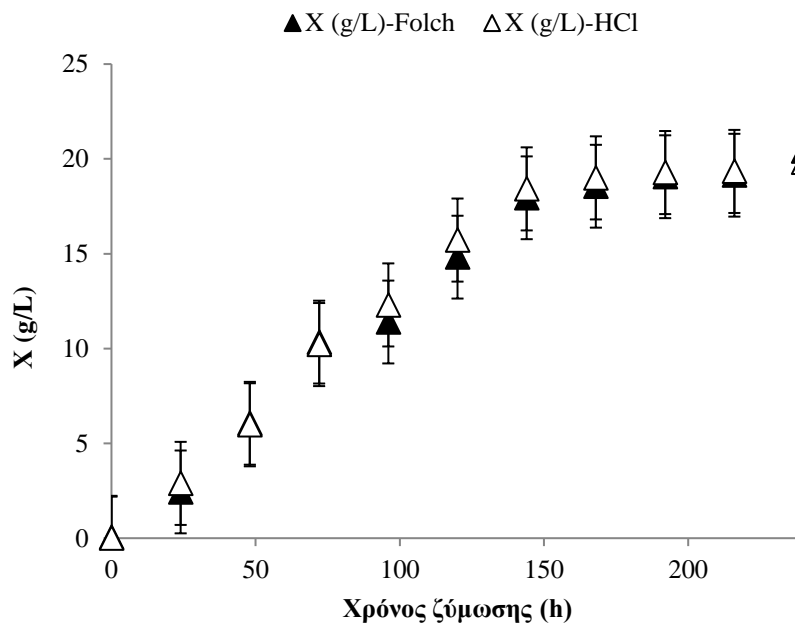
αποδόσεις λίπους και βιομάζας προς το καταναλωθέν υπόστρωμα ήταν $Y_{X/Glcl}=0,15$ g/g και $Y_{X/Glcl}=0,41$ g/g αντίστοιχα.

Σε προηγούμενες μελέτες η μέθοδος με τη χρήση HCl αποδείχτηκε πιο αποτελεσματική σε σύγκριση με τη μέθοδο μίγματος διαλυτών χλωροφορμίου ($CHCl_3$)–μεθανόλης (CH_3OH) όσον αφορά στην εκχύλιση των λιπιδίων (Tchakouteu *et al.*, 2015; Sarantou *et al.*, 2021). Ωστόσο, στην παρούσα εργασία η χρήση των δύο διαφορετικών μεθόδων έδωσε σε ικανοποιητικό βαθμό, επαναλήψιμα και ισοδύναμα αποτελέσματα τα οποία παρουσιάζονται στις παρακάτω εικόνες (Εικόνα 3.1. α-ε). Σε σχέση τα πειραματικά αποτελέσματα τα οποία παρατίθενται, για τα περισσότερα από τα πειραματικά σημεία, το σχετικό τυπικό σφάλμα (SE) ήταν $\leq 18\%$.

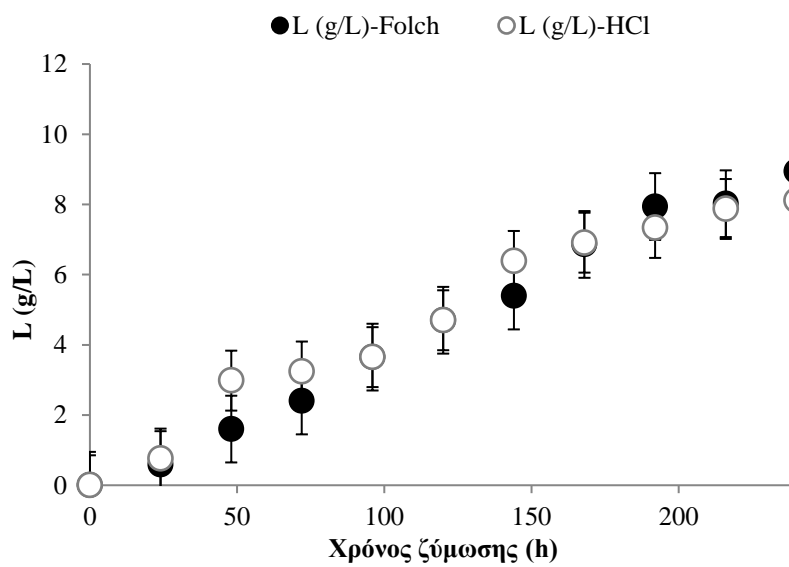
Στις εικόνες που ακολουθούν παρουσιάζεται η κινητική της αύξησης του στελέχους *R. toruloides* NRRL Y-27012, η κατανάλωση του υποστρώματος καθώς επίσης και η παραγωγή βιομάζας, λιπιδίων και ενδοπολυσακχαριτών σε αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης 80 g/L σε πείραμα στα οποία έγινε εκχύλιση λιπιδίων με μίγμα χλωροφορμίου ($CHCl_3$)–μεθανόλης (CH_3OH) σε σύγκριση με πείραμα όπου πραγματοποιήθηκε όξινη υδρόλυση με υδροχλώριο.



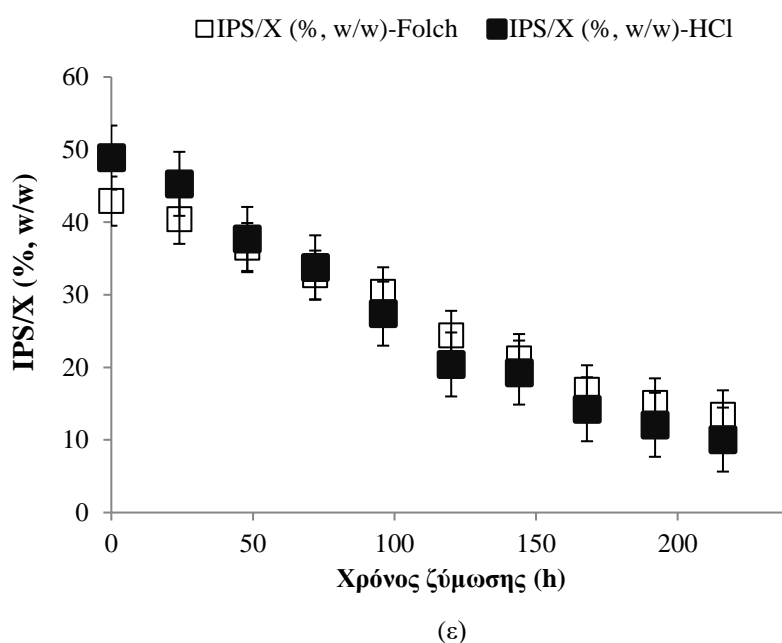
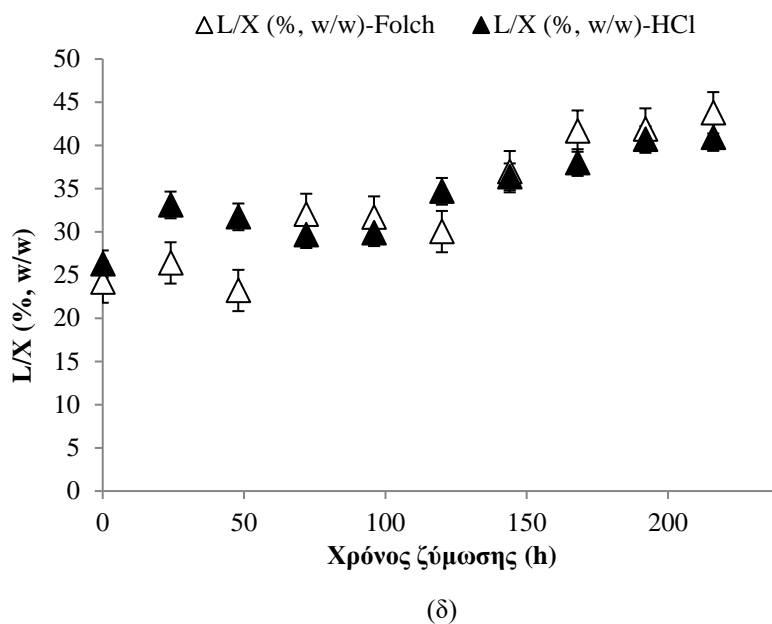
(α)



(β)



(γ)



Εικόνα 3.1. Κινητική της κατανάλωσης γλυκερόλης (GloI, g/L) (α), της παραγωγής βιομάζας (X, g/L) (β), της παραγωγής λίπους (L, g/L) (γ), λίπους επί ξηράς ουσίας (L/X, %, w/w) (δ), ενδοπολυσακχαριτών ανά παραγόμενη βιομάζα (IPS/X, %, w/w) (ε) κατά τη διάρκεια καλλιέργειας του μικροοργανισμού *Rhodospiridium toruloides* NRRL Y-27012 σε ζύμωση κλειστού τύπου σε κωνικές φιάλες σε αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης 80 g/L με εκχύλιση με χρήση του αντιδραστηρίου Folch σε σύγκριση με όξινη υδρόλυση με HCl. Συνθήκες καλλιέργειας: ανάδευση 180±5 rpm, θερμοκρασία 28±1 °C, pH 5,5. Κάθε σημείο αποτελεί μέσο όρο 2 ανεξάρτητων επαναλήψεων και το σχετικό τυπικό σφάλμα για τα περισσότερα από τα σημεία της ζύμωσης προσδιορίστηκε σε ≤18%.

3.1.2. Αξιολόγηση της επίδρασης του pH σε ασυνεχείς ζυμώσεις σε υπόστρωμα γλυκερόλης σε κωνικές φιάλες

Ένας σημαντικός παράγοντας που δύναται να επηρεάσει την αύξηση ενός μικροοργανισμού είναι η ενεργός οξύτητα (pH) στο μέσο της καλλιέργειας. Για το λόγο αυτό πραγματοποιήθηκαν τρεις ζυμώσεις κλειστού τύπου σε κωνικές φιάλες σε τρεις διαφορετικές αρχικές τιμές pH του μέσου (3,5; 5,5; 6,5) με

στόχο τη μελέτη της επίδρασης του συγκεκριμένου παράγοντα στη σύνθεση δευτερογενών μεταβολικών προϊόντων. Σε όλες τις ζυμώσεις χρησιμοποιήθηκε ως πηγή άνθρακα η γλυκερόλη σε αρχική συγκέντρωση ~80 g/L. Η ζύμωση με pH 5,5 που είχε δώσει ικανοποιητικά αποτελέσματα σύμφωνα με το προηγούμενο πείραμα χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας. Τα πειραματικά αποτελέσματα (Πίνακας 3.1.) έδειξαν ότι η ζύμη *R. toruloides* δύναται να μεταβολίζει τη βιομηχανική γλυκερόλη προς παραγωγή βιομάζας, λιπιδίων και ενδοπολυσακχαριτών σε ποικίλες τιμές του pH του μέσου. Στη ζύμωση με pH 5,5 το άζωτο καταναλώθηκε στις πρώτες 48 h, η γλυκερόλη καταναλώθηκε πλήρως στις 264 h ζύμωσης όπου παρήχθησαν 20,4 g/L βιομάζας με απόδοση $Y_{X/Glcl}$ =0,32 g/g και 8,9 g/L λίπους με ποσοστό λίπους επί ξηράς ουσίας L/X =44,8%, w/w. Από την άλλη πλευρά, η ρύθμιση του pH σε 3,5 στο μέσο καλλιέργειας επηρέασε αρνητικά την κατανάλωση υποστρώματος καθώς μόλις 20,1 g/L γλυκερόλη είχαν καταναλωθεί μετά από 192 h ζύμωσης, επιπλέον σημειώθηκε σημαντική μείωση τόσο στην παραγόμενη βιομάζα όσο και στα ενδοκυτταρικά λιπίδια, οι συγκεντρώσεις των οποίων έφτασαν τα 7,0 g/L με απόδοση $Y_{X/Glcl}$ =0,35 g/g και 2,6 g/L με ποσοστό λίπους επί ξηράς ουσίας L/X ~35%, w/w αντίστοιχα, στο τέλος της ζύμωσης. Αντίθετα στη καλλιέργεια που πραγματοποιήθηκε σε pH με τιμή 6,5 οι συγκεντρώσεις της παραγόμενης βιομάζας και των λιπιδίων δεν επηρεάστηκαν σημαντικά ενώ η ζύμη έδειξε να καταναλώνει τη γλυκερόλη με πιο αργό ρυθμό σε σχέση με τη ζύμωση μάρτυρα εφόσον 12,6 g/L παρέμειναν ακατανάλωτα στο τέλος της ζύμωσης. Συγκεκριμένα η τιμή της βιομάζας ήταν ίση με 20,7 g/L με απόδοση $Y_{X/Glcl}$ =0,29 g/g ενώ του λίπους, ίση με 7,1 g/L με ποσοστό λίπους επί ξηράς ουσίας L/X ~36%, w/w στις 216 h ζύμωσης.

Πίνακας 3.1. Συγκεντρωτικά αποτελέσματα της κατανάλωσης υποστρώματος (GloI, g/L), της παραγωγής βιομάζας (X, g/L), λιπιδίων (L, g/L), ενδοπολυσακχαριτών ανά παραγόμενη βιομάζα (IPS/X, %, w/w), συντελεστή απόδοσης λίπους ανά μονάδα καταναλωθέντος υποστρώματος ($Y_{L/GloI}$, g/g), και ποσοστού λίπους επί ξηράς ουσίας (L/X, %, w/w) του μικροοργανισμού *Rhodospiridium toruloides* NRRL Y-27012 σε ζύμωση κλειστού τύπου σε κωνικές φιάλες σε αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης 80 g/L. Συνθήκες καλλιέργειας: ανάδευση 180 ± 5 rpm, θερμοκρασία 28 ± 1 °C, pH 5,5. Κάθε σημείο αποτελεί μέσο όρο 2 ανεξάρτητων επαναλήψεων και το τυπικό σφάλμα για τα περισσότερα σημεία της ζύμωσης προσδιορίστηκε σε $\leq 18\%$.

pH	Χρόνος ζύμωσης (h)		GloI _{cons} (g/L)	X (g/L)	L (g/L)	$Y_{L/GloI}$ (g/g)	L/X (% w/w)	IPS/X (% w/w)
3,5	192	a, b, c	20,1	7,0	2,5	0,12	35,2	14,2
5,5	240	a, b, c	75,5	20,4	8,9	0,12	44,8	13,4
6,5	216	a, b, c	72,7	20,7	7,1	0,10	36,2	10,6

Συνομογραφίες:

a: Μέγιστη τιμή συγκέντρωσης βιομάζας X (g/L)

b: Μέγιστη τιμή συγκέντρωσης παραγόμενου μικροβιακού λίπους L (g/L)

c: Μέγιστη τιμή του λόγου L/X (% w/w)

X: η παραγόμενη βιομάζα (g/L)

L: το παραγόμενο ενδοκυτταρικό λίπος (g/L)

GloI_{cons}: καταναλωθείσα γλυκερόλη (g/L)

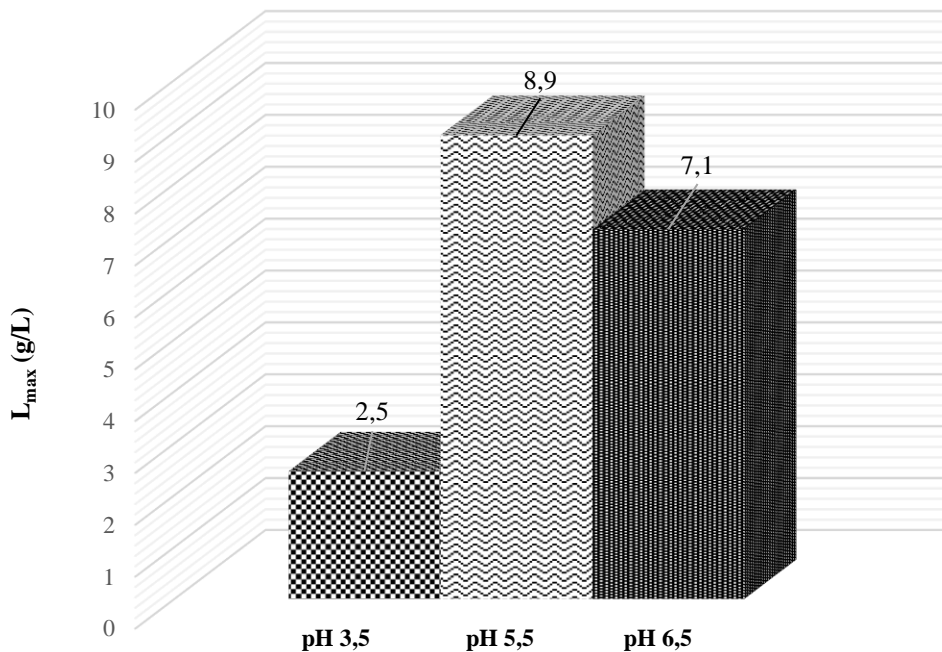
$Y_{L/GloI}$: συντελεστής απόδοσης παραγωγής λίπους προς καταναλωθέν υπόστρωμα (g/g)

L/X: ποσοστό λίπους επί ξηράς ουσίας (% w/w)

IPS/X: τιμή παραγόμενων ενδοπολυσακχαριτών ανά παραγόμενη βιομάζα (% w/w)

Η απόδοση του λίπους προς το καταναλωθέν υπόστρωμα ($Y_{L/GloI}$) κυμάνθηκε περίπου σε $\sim 0,10$ g/g σε όλες τις περιπτώσεις και δεν επηρεάστηκε από τη διακύμανση του pH, η δε εκατοστιαία αναλογία των ενδοπολυσακχαριτών κυμάνθηκε στις παραπάνω ζυμώσεις μεταξύ των τιμών $\sim 15-50\%$, w/w, παρουσιάζοντας τη μέγιστη τιμή στις αρχικές ώρες ενώ μειωνόταν σταδιακά κατά την πορεία της ζύμωσης. Η υπαγωγή της καλλιέργειας σε διαφορετικές τιμές pH δεν επηρέασε το ποσοστό παραγόμενου λίπους προς την παραγόμενη βιομάζα, το οποίο κυμάνθηκε από 35% , w/w έως 50% , w/w.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το pH 5,5 αποτελεί το καταλληλότερο για την αύξηση και την παραγωγή μεταβολικών προϊόντων για το στέλεχος *R.toruloides* NRRL Y-27012 και επιλέχθηκε για όλες τις ζυμώσεις που ακολούθησαν. Στην Εικόνα που ακολουθεί παρουσιάζεται συγκριτικά η μέγιστη τιμή παραγθέντων λιπιδίων για τις τρεις διαφορετικές τιμές του pH.



Εικόνα 3.2. Σύγκριση της μέγιστης τελικής συγκέντρωσης λιπιδίων (L_{max} , g/L) κατά τη διάρκεια καλλιέργειας του μικροοργανισμού *Rhodosporidium toruloides* NRRL Y-27012 σε ζύμωση κλειστού τύπου σε κωνικές φιάλες σε αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης 80g/L. Συνθήκες καλλιέργειας: ανάδευση 180 ± 5 rpm, θερμοκρασία 28 ± 1 °C και διαφορετικές τιμές pH. Κάθε σημείο αποτελεί μέσο όρο 2 ανεξάρτητων επαναλήψεων και το σχετικό τυπικό σφάλμα για τα περισσότερα από τα σημεία της ζύμωσης προσδιορίστηκε σε $\leq 18\%$.

Όσον αφορά στη σύσταση των λιπαρών οξέων (Πίνακας 3.2.) πραγματοποιήθηκε ανάλυση του λίπους σε αέρια χρωματογραφία. Τα σημεία που επιλέχθηκαν να μελετηθούν στην εκάστοτε ζύμωση ανήκαν στο τέλος της εκθετικής (48 h) και στη στατική φάση (216 h). Τα λιπαρά οξέα που εντοπίστηκαν ήταν το ελαϊκό (Δ^9 C18: 1), το παλμιτικό (C16: 0), το στεατικό (C18: 0), το λινελαϊκό ($\Delta^9,12$ C18: 2) ενώ σε μικρές ποσότητες εντοπίστηκε α -λινολενικό οξύ ($\Delta^9,12,15$ C18: 3). Όπως απεικονίζεται στον Πίνακα 3.2. η υπαγωγή της καλλιέργειας σε διαφορετικές τιμές pH δεν είχε σοβαρή επίδραση στο προφίλ των λιπαρών οξέων. Άξιο αναφοράς είναι το γεγονός ότι το ελαϊκό οξύ (Δ^9 C18: 1) βρέθηκε να είναι σε κάθε περίπτωση το επικρατέστερο οξύ με ποσοστό που κυμάνθηκε από 49,5 έως 58,8%, w/w. Ακολούθησε το παλμιτικό οξύ (C16: 0) με ποσοστό 22,8 έως 33,4%, w/w ενώ τα υπόλοιπα οξέα δεν ξεπέρασαν συνολικά το 15%, w/w. Ειδικότερα το ποσοστό του ελαϊκού οξέος ήταν αυξημένο στο τέλος της εκθετικής φάσης ενώ υπέστη μικρή μείωση στη στατική φάση της τάξεως του 2-5%, w/w.

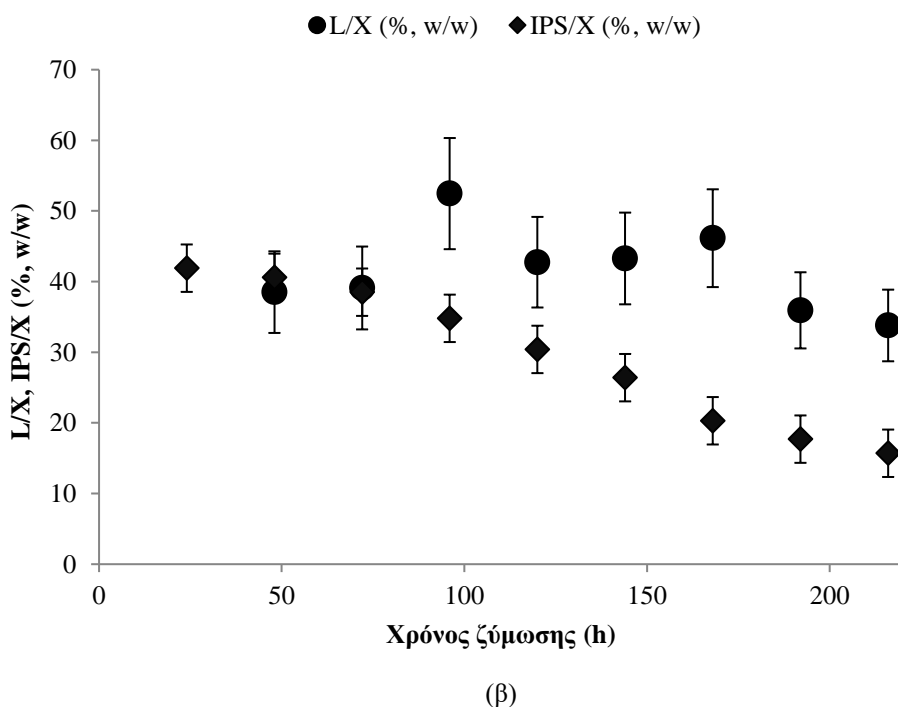
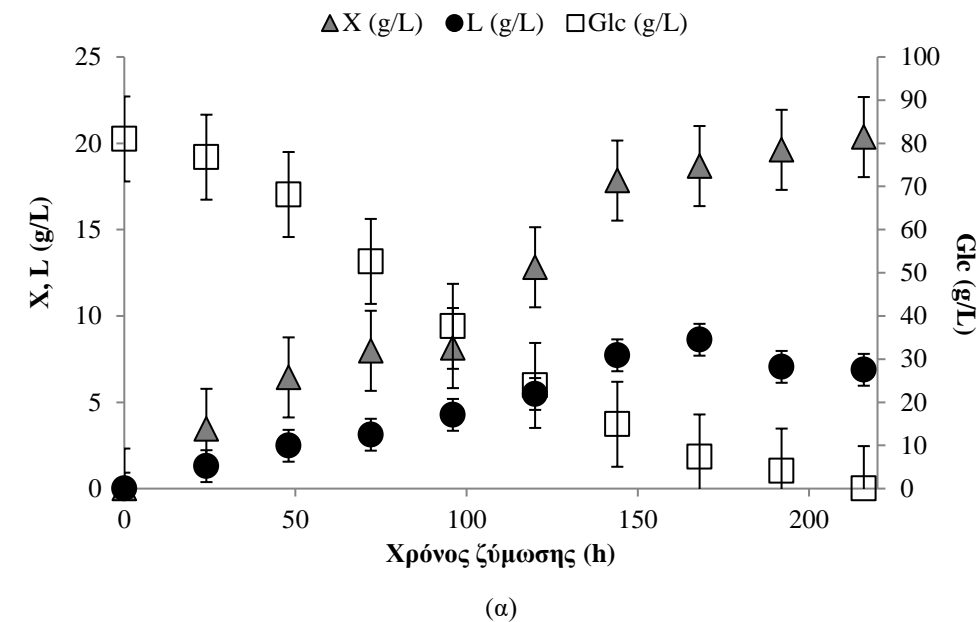
Πίνακας 3.2. Σύνθεση λιπαρών οξέων των ενδοκυτταρικών λιπιδίων του μικροοργανισμού *Rhodospiridium toruloides* NRRL Y-27012 κατά τη διάρκεια καλλιέργειας σε ζύμωση κλειστού τύπου σε κωνικές φιάλες σε υπόστρωμα με αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης 80 g/L σε διαφορετικά pH. Συνθήκες καλλιέργειας: ανάδευση 180±5 rpm, θερμοκρασία 28±1 °C. Κάθε σημείο αποτελεί μέσο όρο 2 ανεξάρτητων επαναλήψεων και το σχετικό τυπικό σφάλμα για τα περισσότερα από τα σημεία της ζύμωσης προσδιορίστηκε σε ≤18%.

Προφίλ λιπαρών οξέων (% w/w)						
pH	Χρόνος ζύμωσης (h)	C16: 0	C18: 0	^{Δ9} C18: 1	^{Δ9,12} C18: 2	^{Δ9,12,15} C18: 3
3,5	48	28,0	10,1	58,8	2,6	0,5
	216	27,1	9,9	55,3	7,1	0,5
5,5	48	27,7	9,2	51,2	10,4	1,5
	216	32,5	8,6	49,6	8,8	0,4
6,5	48	22,8	9,5	54,2	13,1	0,3
	216	33,4	8,8	49,5	7,8	0,5

3.1.3. Ασυνεχείς ζυμώσεις σε μικτό υπόστρωμα γλυκόζης-γλυκερόλης σε κωνικές φιάλες

Τα διάφορα σάκχαρα έχουν τη δυνατότητα να επηρεάζουν με διαφορετικό τρόπο την κυτταρική αύξηση αλλά και την παραγωγή μεταβολικών προϊόντων στους μικροοργανισμούς. Γι' αυτό το λόγο σχεδιάστηκαν πειράματα ώστε να μελετηθεί η επίδραση της διαφορετικής σύνθεσης του υποστρώματος στην αύξηση και την παραγωγή βιομάζας (X), λιπιδίων (L) και ενδοπολυσακχαριτών (IPS). Επομένως πραγματοποιήθηκαν ζυμώσεις κλειστού τύπου σε κωνικές φιάλες σε μίγματα υποστρωμάτων γλυκόζης-γλυκερόλης με συνολική συγκέντρωση της πηγής άνθρακα ~80 g/L. Ως μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν δύο καλλιέργειες που περιείχαν αμιγώς 80 g/L γλυκόζη (Glc) και 80 g/L γλυκερόλη (Glo) αντίστοιχα. Στη ζύμωση-μάρτυρα με 80 g/L γλυκόζη, το υπόστρωμα καταναλώθηκε πλήρως από τη ζύμη στις 192 h ζύμωσης. Το ποσοστό των ενδοπολυσακχαριτών κυμάνθηκε από 45%, w/w έως 15%, w/w (Εικόνα 3.3. β). Η ποσοστιαία αναλογία του λίπους προς τη βιομάζα δεν παρουσίασε μεταβολή σε σχέση με το πείραμα-μάρτυρα που περιείχε μόνο γλυκερόλη και η τιμή του ήταν ίση με ~43%, w/w (Εικόνα 3.3. β). Η μέγιστη τιμή της παραχθείσας βιομάζας ήταν 17,7 g/L ενώ η αντίστοιχη τιμή για το παραγόμενου λίπος ήταν 7,7 g/L. Η χρήση αμιγώς της γλυκόζης ως υπόστρωμα οδήγησε στη μείωση της βιομάζας και του λίπους που παρήχθησαν σε σύγκριση με το υπόστρωμα που περιείχε αμιγώς γλυκερόλη όπου οι αντίστοιχες μέγιστες τιμές βιομάζας και λιπιδίων ήταν 20,4 g/L και 8,9 g/L.

Στην Εικόνα που ακολουθεί παρουσιάζεται η κινητική της αύξησης του στελέχους *R. toruloides* NRRL Y-27012, η κατανάλωση του υποστρώματος καθώς επίσης και η παραγωγή βιομάζας, λιπιδίων και ενδοπολυσακχαριτών με αρχική συγκέντρωση γλυκόζης 80 g/L σε κωνικές φιάλες.



Εικόνα 3.3. Κινητική της κατανάλωσης γλυκόζης (Glc, g/L), της παραγωγής βιομάζας (X, g/L), λίπους (L, g/L) (α) του ποσοστού ενδοπολυσακχαριτών ανά παραγόμενη βιομάζα (IPS/X, %, w/w) και λίπους επί ξηράς ουσίας (L/X, %, w/w) (β) κατά τη διάρκεια καλλιέργειας του μικροοργανισμού *Rhodospiridium toruloides* NRRL Y-27012 σε ζύμωση κλειστού τύπου σε κωνικές φιάλες σε αρχική συγκέντρωση γλυκόζης 80 g/L. Συνθήκες καλλιέργειας: ανάδευση 180±5 rpm, θερμοκρασία 28±1 °C, pH 5,5. Κάθε σημείο αποτελεί μέσο όρο 2 ανεξάρτητων επαναλήψεων και το σχετικό τυπικό σφάλμα για τα περισσότερα από τα σημεία της ζύμωσης προσδιορίστηκε σε ≤18%.

Στη συνέχεια, προκειμένου να διερευνηθεί η αύξηση και η φυσιολογική συμπεριφορά της ζύμης σε ταυτόχρονη παρουσία γλυκόζης και γλυκερόλης στο θρεπτικό μέσο, πραγματοποιήθηκαν τρεις ζυμώσεις με διαφορετική αναλογία γλυκόζης-γλυκερόλης (1: 1 w/w, 1: 3 w/w, 3: 1 w/w). Στον πίνακα που ακολουθεί παρουσιάζονται η κατανάλωση του υποστρώματος σε κάθε περίπτωση καθώς και η παραγωγή βιομάζας, λιπιδίων και ενδοπολυσακχαριτών.

Πίνακας 3.3. Συγκεντρωτικά αποτελέσματα της κατανάλωσης υποστρώματος (S_{cons} , g/L), της παραγωγής βιομάζας (X, g/L), λιπιδίων (L, g/L), ενδοπολυσακχαριτών ανά παραγόμενη βιομάζα (IPS/X, %, w/w), συντελεστή απόδοσης λίπους ανά μονάδα καταναλωθέντος υποστρώματος ($Y_{L/S}$, g/g), και ποσοστού λίπους επί ξηράς ουσίας (L/X, %, w/w) του μικροοργανισμού *Rhodospiridium toruloides* NRRL Y-27012 σε ζύμωση κλειστού τύπου σε κωνικές φιάλες σε αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης 80 g/L. Συνθήκες καλλιέργειας: ανάδευση 180±5 rpm, θερμοκρασία 28±1 °C, pH 5,5. Κάθε σημείο αποτελεί μέσο όρο 2 ανεξάρτητων επαναλήψεων και το σχετικό τυπικό σφάλμα για τα περισσότερα από τα σημεία της ζύμωσης προσδιορίστηκε σε ≤18%.

Σύνθεση υποστρώματος	Χρόνος ζύμωσης (h)		S_{cons} (g/L)	X (g/L)	L (g/L)	$Y_{L/S}$ (g/g)	L/X (% w/w)	IPS/X (% w/w)
Glc	168	a, b, c	73,3	17,7	7,7	0,10	43,3	20,9
Glol	240	a, b, c	75,4	20,4	8,9	0,12	43,8	13,4
Glc: Glol=1: 1 w/w	216	a, b, c	75,5	19,9	8,0	0,10	40,0	14,6
Glc: Glol=1: 3 w/w	72	c	36,8	7,9	3,8	0,10	46,9	16,5
	216	a, b	79,4	20,6	8,2	0,10	37,8	15,3
Glc: Glol=3: 1 w/w	96	c	33,6	8,8	3,6	0,10	40,6	14,8
	216	a, b	75,8	18,8	7,8	0,09	38,7	8,6

Συντομογραφίες:

a: Μέγιστη τιμή συγκέντρωσης βιομάζας X (g/L)

b: Μέγιστη τιμή συγκέντρωσης παραγόμενου μικροβιακού λίπους L (g/L)

c: Μέγιστη τιμή του λόγου L/X (% w/w)

X: η παραγόμενη βιομάζα (g/L)

L: το παραγόμενο ενδοκυτταρικό λίπος (g/L)

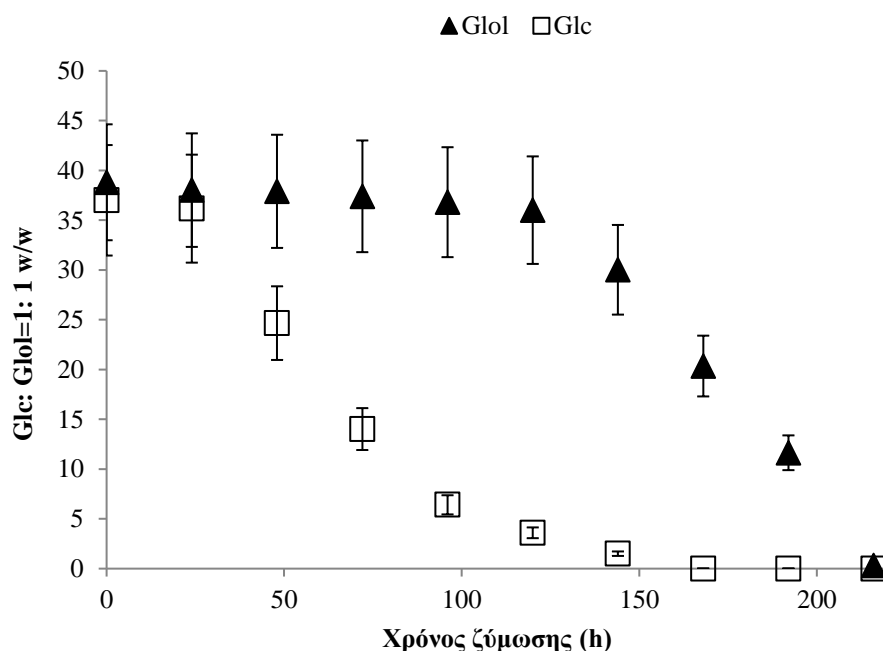
S_{cons} : Συνολικά καταναλωθέντα σάκχαρα και γλυκερόλη

$Y_{L/S}$: συντελεστής απόδοσης παραγωγής λίπους προς καταναλωθέν υπόστρωμα (g/g)

L/X: ποσοστό λίπους επί ξηράς ουσίας (% w/w)

IPS/X: τιμή παραγόμενων ενδοπολυσακχαριτών ανά παραγόμενη βιομάζα (% w/w)

Όταν η ζύμη *R.toruloides* αναπτύχθηκε σε μικτό υπόστρωμα που περιείχε γλυκόζη και γλυκερόλη παρατηρήθηκε καταστολή της κατανάλωσης γλυκερόλης ως προς την κατανάλωση της γλυκόζης ένα φαινόμενο το οποίο ονομάζεται καταστολή καταβολίτη. Σύμφωνα με τους Görke and Stülke, (2008) η καταστολή καταβολίτη είναι ένας ρυθμιστικός μηχανισμός κατά τον οποίο αναστέλλονται οι μεταβολικές δραστηριότητες ενός μικροοργανισμού, όσον αφορά στην αφομοίωση δευτερογενών πηγών άνθρακα, όταν μια πιο προτιμητέα πηγή άνθρακα είναι παρούσα στο θρεπτικό μέσο. Ανάμεσα στις ζυμώσεις με τις τρεις διαφορετικές αναλογίες, εκείνες με αναλογία Glc: Glol=1: 1 w/w και Glc: Glol=1: 3 w/w παρουσίασαν τα καλύτερα αποτελέσματα σε σχέση με την παραγωγή λιπιδίων (8,0 g/L και 8,2 g/L αντίστοιχα). Όπως παρουσιάζεται στην Εικόνα 3.4. στο πείραμα με αναλογία Glc: Glol=1: 1 w/w η αφομοίωση της γλυκερόλης ξεκίνησε μετά από το πέρας της κατανάλωσης της γλυκόζης στις 120 h ζύμωσης. Αντιθέτως, σε προγενέστερες μελέτες παρατηρήθηκε ότι σε ταυτόχρονη παρουσία γλυκόζης-γλυκερόλης η ζύμη *Yarrowia lipolytica* έδειξε προτίμηση στην κατανάλωση γλυκερόλης σε σχέση με τη γλυκόζη, χωρίς να εμφανίζεται το φαινόμενο της καταβολικής καταστολής (Workman *et al.*, 2013; Papanikolaou *et al.*, 2017).



Εικόνα 3.4. Κινητική της κατανάλωσης γλυκόζης (Glc, g/L) και της κατανάλωσης γλυκερόλης (GloI, g/L), κατά τη διάρκεια καλλιέργειας του μικροοργανισμού *Rhodospiridium toruloides* NRRL Y-27012 σε ζύμωση κλειστού τύπου σε κωνικές φιάλες σε συνζύμωση γλυκόζης-γλυκερόλης με τελική συγκέντρωση 80 g/L σε αναλογία 1: 1 w/w. Συνθήκες καλλιέργειας: ανάδευση 180±5 rpm, θερμοκρασία 28±1 °C, pH 5,5. Κάθε σημείο αποτελεί μέσο όρο 2 ανεξάρτητων επαναλήψεων και το σχετικό τυπικό σφάλμα για τα περισσότερα από τα σημεία της ζύμωσης προσδιορίστηκε σε ≤18%.

Παρόμοια αλλά λιγότερο ικανοποιητικά αποτελέσματα έδωσε η αναλογία Glc: GloI=3: 1 w/w όπου η μέγιστη τιμή λίπους ήταν ίση με 7,8 g/L. Ωστόσο, η τιμή του παραγόμενου λίπους εμφανίστηκε μειωμένη και στις τρεις αναλογίες σε σύγκριση με τους μάρτυρες. Ομοίως η μέγιστη τιμή βιομάζας παρατηρήθηκε στις ζυμώσεις με αναλογία Glc: GloI=1: 1 w/w και 1: 3 w/w η οποία ήταν 19,9 g/L και 20,6 g/L αντίστοιχα. Ενώ στη ζύμωση με αναλογία Glc: GloI=3: 1 w/w έφτασε μόλις τα 18,8 g/L. Το μέγιστο ποσοστό

παραγόμενου λίπους προς την παραγόμενη βιομάζα κυμάνθηκε και στις τρεις αναλογίες από 38 έως 47%, w/w παρουσιάζοντας τη μέγιστη τιμή στη ζύμωση Glc: Glol=1: 3 w/w. Αντίθετα ο συντελεστή απόδοσης λίπους δεν παρουσίασε διακύμανση μεταξύ των δοκιμών η τιμή του οποίου ήταν $Y_{L/Glc} \sim 0,10$ g/g. Η εκατοστιαία αναλογία των ενδοπολυσακχαριτών κυμάνθηκε στις παραπάνω ζυμώσεις μεταξύ των τιμών ~40-14%, w/w, παρουσιάζοντας τη μέγιστη τιμή στις αρχικές ώρες ενώ μειωνόταν σταδιακά κατά την πορεία της ζύμωσης. Συνεπώς τα παραπάνω αποτελέσματα, καθιστούν τη βιομηχανική γλυκερόλη καταλληλότερο υπόστρωμα σε σχέση με τη γλυκόζη ως προς την παραγωγή δευτερογενών μεταβολιτών από το στέλεχος *R. toruloides* NRRL Y-27012.

Τέλος διερευνήθηκε το προφίλ των κυτταρικών λιπιδίων στο τέλος της εκθετικής φάσης (48 h) καθώς και στη στατική φάση (216 h) στις ζυμώσεις μάρτυρες αλλά και σε εκείνες που περιείχαν μίγματα γλυκερόλης-γλυκόζης και ακολούθησε ανάλυση των λιπαρών οξέων σε υγρή χρωματογραφία. Σε αυτή την περίπτωση διαπιστώθηκε ότι η προσθήκη γλυκόζης στην καλλιέργεια δεν επηρέασε σημαντικά το προφίλ των λιπαρών οξέων όπως απεικονίζεται στον Πίνακα 3.4.. Το κύριο λιπαρό οξύ που εντοπίστηκε ήταν το ελαϊκό οξύ ($^{13}C18: 1$) το οποίο ήταν αυξημένο κατά τις πρώτες ώρες της ζύμωσης ενώ μειωνόταν στη στατική φάση με ποσοστό που κυμάνθηκε από 45,1% έως 52,4%, w/w. Το ποσοστό του παλμιτικού οξέος (C16: 0) κυμάνθηκε μεταξύ 25,4 έως 32,5%, w/w. Αναφορικά με τα υπόλοιπα λιπαρά οξέα, τα ποσοστά αυτών εμφάνισαν διακυμάνσεις ενώ σε κάθε περίπτωση καθένα από αυτά δεν ξεπέρασε το 15%, w/w.

Πίνακας 3.4. Σύνθεση λιπαρών οξέων των ενδοκυτταρικών λιπιδίων του μικροοργανισμού *Rhodospiridium toruloides* NRRL Y-27012 κατά τη διάρκεια καλλιέργειας σε ζύμωση κλειστού τύπου σε κωνικές φιάλες σε υπόστρωμα γλυκόζης, γλυκερόλης και μίγματα αυτών. Συνθήκες καλλιέργειας: ανάδευση 180±5 rpm, θερμοκρασία 28±1 °C, pH 5,5. Κάθε σημείο αποτελεί μέσο όρο 2 ανεξάρτητων επαναλήψεων και το σχετικό τυπικό σφάλμα για τα περισσότερα από τα σημεία της ζύμωσης προσδιορίστηκε σε ≤18%.

Προφίλ λιπαρών οξέων (% w/w)

Σύνθεση υποστρώματος	Χρόνος ζύμωσης (h)	C16: 0	C18: 0	^{Δ9} C18: 1	^{Δ9,12} C18: 2	^{Δ9,12,15} C18: 3
Glc	48	27,2	10,3	49,6	9,6	3,2
	216	32,0	10,8	47,3	8,8	1,3
Glo1	48	27,7	9,2	51,2	10,4	1,5
	216	32,5	8,6	49,6	8,8	0,4
Glc: Glo1=1: 1 w/w	48	29,1	9,5	49,8	8,8	2,3
	216	32,3	13,8	45,9	6,7	0,7
Glc: Glo1=3: 1 w/w	48	25,4	12,5	52,4	9,0	2,5
	216	32,1	14,2	45,1	6,1	2,5
Glc: Glo1=1: 3 w/w	48	27,4	12,1	51,0	6,9	0,9
	216	31,6	10,1	49,4	8,0	1,2

3.1.4. Αξιολόγηση της επίδρασης της συγκέντρωσης του NaCl σε ασυνεχείς ζυμώσεις

Εν συνεχεία, ακολούθησαν ζυμώσεις οι οποίες περιείχαν διαφορετικές αρχικές συγκεντρώσεις NaCl στο μέσο καλλιέργειας, ώστε να αξιολογηθεί η επίδραση της ωσμωτικής πίεσης στην αύξηση του στελέχους, αλλά και στην απόδοση και στη σύνθεση των μεταβολικών του προϊόντων. Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκαν ζυμώσεις σε μέσο που περιείχε 80 g/L γλυκερόλη με διαφορετικές συγκεντρώσεις NaCl οι οποίες ήταν αρχικά ίσες με 0,2%, w/v, 0,5%, w/v και 0,8%, w/v, και ακολούθως, δοθείσης της αντίστασης που επέδειξαν τα κύτταρα 1,0%, w/v, 2,0%, w/v και 3,0%, w/v.

Όσον αφορά στην αύξηση του στελέχους παρουσία NaCl=0,2%, w/v τα αποτελέσματα έδειξαν ανοχή της ζύμης στην αλατότητα. Η γλυκερόλη καταναλώθηκε πλήρως στις 240 h όπου σημειώθηκε και η μέγιστη τιμή παραγόμενης βιομάζας και ήταν X=20,1 g/L με συντελεστή απόδοσης παραγωγής της βιομάζας ως προς το καταναλωθέν υπόστρωμα $Y_{X/Glo1}=0,24$ g/g. Να σημειωθεί ότι την ίδια χρονική στιγμή εμφανίστηκε και η μέγιστη παραγόμενη ποσότητα μικροβιακού λίπους με την τιμή της να ισούται με 13,3 g/L και λόγο L/X=66,5%, w/w ο οποίος σημείωσε τη μέγιστη τιμή σε σχέση με όλα τα πειράματα που

εκτελέστηκαν. Η αύξηση της αλατότητας είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση του συντελεστή απόδοσης λίπους κατά 4 μονάδες σε σχέση με το μάρτυρα ($Y_{L/Glcl}=0,12$ g/g) φτάνοντας να ισούται με $Y_{L/Glcl}=0,16$ g/g. Το μέγιστο ποσοστό παραγόμενων ενδοπολυσακχαριτών έφτασε το 30,8%, w/w σε 48 h από την έναρξη της ζύμωσης και μειώθηκε σταδιακά μέχρι το 16,4%, w/w.

Ακολούθως, κατά την αύξηση του μικροοργανισμού σε μέσο καλλιέργειας σε υψηλότερη συγκέντρωση NaCl της τάξεως του 0,5%, w/v, το μέγιστο της παραγόμενης βιομάζας εμφανίστηκε στις 240 h, με την τιμή της να ανέρχεται στα 19,5 g/L και αντίστοιχο συντελεστή απόδοσης βιομάζας $Y_{X/Glcl}=0,23$ g/g. Ταυτόχρονα, στις 240 h παρατηρήθηκε και η μέγιστη τιμή μικροβιακού λίπους ίση με 12,7 g/L, ποσοστό λίπους επί της βιομάζας ίσο με $L/X=65,2\%$, w/w και $Y_{L/Glcl}=0,15$ g/g. Όσον αφορά στη μέγιστη παραγωγή ενδοπολυσακχαριτών, αυτή σημειώθηκε στις 48 h ζύμωσης, με το ποσοστό τους να ανέρχεται στο 65,9%, w/w. Κατά την αύξηση του ίδιου στελέχους σε μέσο καλλιέργειας με την υψηλότερη συγκέντρωση NaCl=0,8%, w/v, στις 240 h σημειώθηκε το μέγιστο της μικροβιακής βιομάζας καθώς και του ενδοκυτταρικού λίπους. Η τιμή της βιομάζας ήταν 19,8 g/L με συντελεστή απόδοσης $Y_{X/Glcl}=0,23$ g/g, ενώ του ενδοκυτταρικού λίπους ήταν 11,0 g/L, ο λόγος L/X ήταν 55,4%, w/w με $Y_{L/Glcl}=0,13$ g/g. Τέλος, στις 48 h εμφανίστηκε η μέγιστη παραγωγή ενδοπολυσακχαριτών με το ποσοστό αυτών να φθάνει το 48,1%, w/w, υψηλότερο, επίσης, αποτέλεσμα συγκριτικά από όλα τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν στις αντίστοιχες συνθήκες.

Στη συνέχεια του πειραματικού σχεδιασμού και εφόσον ο μικροοργανισμός έδειξε να αναπτύσσεται σε παρουσία άλατος πραγματοποιήθηκαν τρεις επιπλέον ζυμώσεις με μεγαλύτερες συγκεντρώσεις άλατος NaCl=1,0%, w/v, 2,0%, w/v και 3,0%, w/v. Όσον αφορά στην αύξηση του στελέχους σε μέσο καλλιέργειας με NaCl=1,0%, w/v η μέγιστη τιμή παραγόμενης βιομάζας παρατηρήθηκε στις 192 h και ήταν ίση με 16,0 g/L και συντελεστή απόδοσης παραγωγής της βιομάζας ως προς το καταναλωθέν υπόστρωμα $Y_{X/Glcl}=0,31$ g/g. Να σημειωθεί ότι την ίδια χρονική στιγμή εμφανίστηκε και η μέγιστη παραγόμενη ποσότητα μικροβιακού λίπους με την τιμή της να ισούται με 5,8 g/L ενώ το μέγιστο ποσοστό λίπους εμφανίστηκε στις 96 h και ήταν $L/X=44,7\%$, w/w. Το μέγιστο ποσοστό παραγόμενων ενδοπολυσακχαριτών έφτασε το 21,3%, w/w σε 48 h από την έναρξη της ζύμωσης.

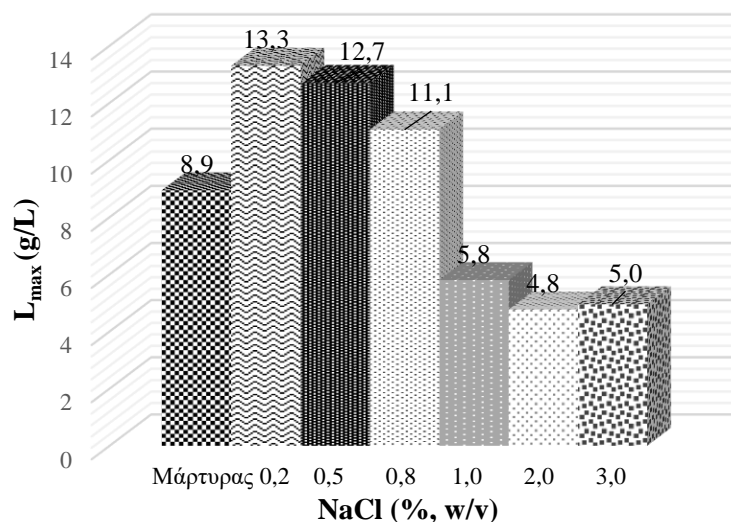
Εν συνεχεία, κατά την αύξηση του μικροοργανισμού σε μέσο καλλιέργειας με υψηλότερη συγκέντρωση NaCl της τάξεως του 2,0%, w/v, το μέγιστο της παραγόμενης βιομάζας εμφανίστηκε στις 192 h, με τιμή της να ανέρχεται στα 13,4 g/L και αντίστοιχο συντελεστή απόδοσης βιομάζας $Y_{X/Glcl}=0,27$ g/g. Στις ίδιες ώρες ζύμωσης παρατηρήθηκε και η μέγιστη τιμή μικροβιακού λίπους ίση με 4,7 g/L και μέγιστο ποσοστό λίπους επί ξηράς ουσίας ήταν $L/X=35,5\%$, w/w ενώ ο συντελεστής απόδοσης λίπους $Y_{L/Glcl}=0,13$ g/g. Όσον αφορά τη μέγιστη παραγωγή ενδοπολυσακχαριτών, αυτή σημειώθηκε στις 24 h ζύμωσης, με το ποσοστό τους να ανέρχεται στο ~22 %, w/w ενώ μειωνόταν σταδιακά φτάνοντας το ~11 %, w/w.

Κατά την αύξηση του ίδιου στελέχους στην υψηλότερη συγκέντρωση NaCl 3,0%, w/v, στις 216 h σημειώθηκε το μέγιστο της μικροβιακής βιομάζας καθώς και του ενδοκυτταρικού λίπους. Η τιμή της βιομάζας ήταν 12,2 g/L με συντελεστή απόδοσης $Y_{X/Glcl}=0,26$ g/g, ενώ του ενδοκυτταρικού λίπους ήταν 4,9 g/L και το ποσοστό λίπους L/X που σημειώθηκε ήταν 43,7%, w/w. Τέλος, στις 24 h εμφανίστηκε η μέγιστη παραγωγή ενδοπολυσακχαριτών με το ποσοστό αυτών να φθάνει το 14,0%, w/w.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η προσθήκη NaCl σε μικρές συγκεντρώσεις από 0,2%, w/v, έως 0,8%, w/v, επέδρασε θετικά στη σύνθεση λιπιδίων καθώς οι απόλυτες τιμές τους αυξήθηκαν από 8,9 g/L σε 13,3 g/L σε σχέση με το μάρτυρα. Αξιοσημείωτο είναι επίσης το γεγονός ότι η τιμή του λόγου του παραγόμενου λίπους επί ξηράς ουσίας αυξήθηκε κατά 10-20 μονάδες σε σχέση με το μάρτυρα (L/X~44 %, w/w) η τιμή του οποίου κυμάνθηκε μεταξύ L/X~55-67%, w/w ενώ η τιμή της παραγόμενης βιομάζας δεν είχε σημαντική μεταβολή. Τέτοιου είδους «διέγερση» («stimulation») της παραγωγής μικροβιακών λιπιδίων λόγω της παρουσίας σχετικά χαμηλών ποσοτήτων NaCl σε σχέση με το μάρτυρα (καθόλου αρχική παρουσία NaCl) έχει παρατηρηθεί και για το στέλεχος *R. toruloides* DSM 4444 κατά την καλλιέργειά του σε υποστρώματα τύπου «γλυκόζης», τόσο σε φιάλες όσο και σε εργαστηριακής κλίμακας βιοαντιδραστήρες (Tchakouteu *et al.*, 2017), υποδηλώνοντας το ενδιαφέρον το οποίο υπάρχει σε σχέση με την πραγματοποίηση ζυμώσεων με χρήση θαλασσινού νερού, ή αποβλήτων περιεχόντων ποσότητες NaCl (π.χ. άλμες επεξεργασίας ελιών ή τυροκομικών προϊόντων). Από την άλλη πλευρά, κατά την παρούσα εργασία, η προσθήκη άλατος σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις από 1,0%, w/v έως 3,0%, w/v, επηρέασε αρνητικά τόσο την παραγωγή βιομάζας όσο και την παραγωγή λιπιδίων, οι τιμές των οποίων μειώθηκαν κατά το ήμισυ συγκριτικά με τις αντίστοιχες τιμές που σημειώθηκαν στη ζύμωση μάρτυρα.

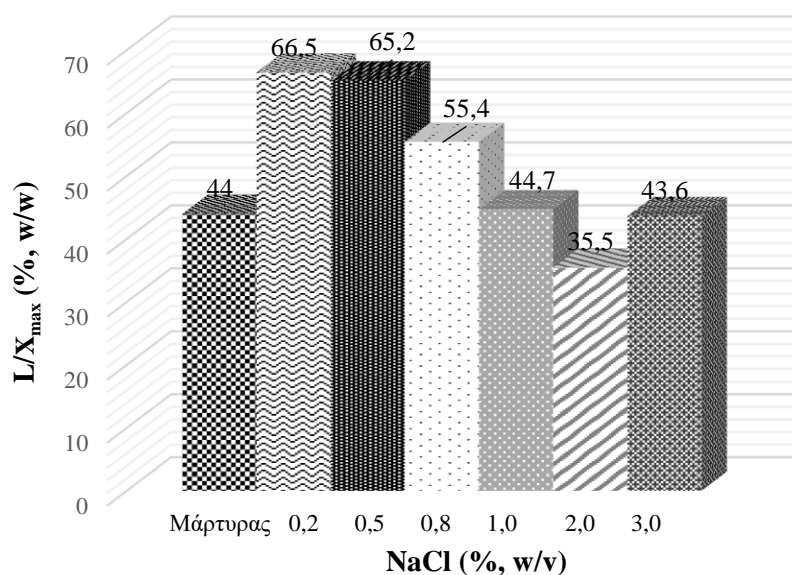
Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 3.5.) παρουσιάζονται αναλυτικά τα αποτελέσματα από τις μετρήσεις που πραγματοποιήθηκαν κατά τη διάρκεια των συγκεκριμένων πειραματικών διαδικασιών. Στις μετρήσεις συμπεριλαμβάνονται η παραγωγή ξηρής μάζας σε g/L (X), η παραγωγή ενδοπολυσακχαριτών σε ποσοστό (IPS/X, %, w/w), η κατανάλωση υποστρώματος σε g/L (Glcl) και η παραγωγή ενδοκυτταρικού λίπους σε g/L (L).

Στην Εικόνα που ακολουθεί παρουσιάζεται η μέγιστη τιμή λίπους σε g/L για όλες τις συγκεντρώσεις NaCl.



Εικόνα 3.5. Σύγκριση της μέγιστης συγκέντρωσης λιπιδίων (L_{max} , g/L) κατά τη διάρκεια καλλιέργειας του στελέχους *Rhodosporidium toruloides* NRRL Y-27012 σε ζυμώσεις κλειστού τύπου σε κωνικές φιάλες σε αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης 80 g/L και διαφορετικές συγκεντρώσεις NaCl. Συνθήκες καλλιέργειας: ανάδευση 180±5 rpm, θερμοκρασία 28±1 °C. Κάθε σημείο αποτελεί μέσο όρο 2 ανεξάρτητων επαναλήψεων και το σχετικό τυπικό σφάλμα για τα περισσότερα από τα σημεία της ζύμωσης προσδιορίστηκε σε ≤18%.

Στην Εικόνα που ακολουθεί παρουσιάζεται το μέγιστο ποσοστό λίπους επί ξηράς ουσίας L/X (% w/w) για όλες τις συγκεντρώσεις NaCl.



Εικόνα 3.6. Σύγκριση του μέγιστου ποσοστού λίπους επί ξηράς ουσίας (L/X_{max} , % w/w) κατά τη διάρκεια καλλιέργειας του στελέχους *Rhodosporidium toruloides* NRRL Y-27012 σε ζυμώσεις κλειστού τύπου σε κωνικές φιάλες σε αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης 80 g/L και διαφορετικές συγκεντρώσεις NaCl. Συνθήκες καλλιέργειας: ανάδευση 180±5 rpm, θερμοκρασία 28±1 °C. Κάθε σημείο αποτελεί μέσο όρο 2 ανεξάρτητων επαναλήψεων και το σχετικό τυπικό σφάλμα για τα περισσότερα από τα σημεία της ζύμωσης προσδιορίστηκε σε ≤18%.

Πίνακας 3.5. Συγκενρωτικός πίνακας αποτελεσμάτων των ζυμώσεων σε υπόστρωμα γλυκερόλης αρχικής συγκέντρωσης 80 g/L για διαφορετικές συγκεντρώσεις άλατος 0,2%, w/v, 0,5%, w/v, 0,8%, w/v, 1,0%, w/v, 2,0%, w/v και 3,0%, w/v. Παρουσιάζονται οι τιμές της κατανάλωσης υποστρώματος (G_{Iol} , g/L), της παραγωγής βιομάζας (X, g/L), λιπιδίων (L, g/L), ενδοπολυσακχαριτών ανά παραγόμενη βιομάζα ($IPS/X\%$, w/w), συντελεστή απόδοσης βιομάζας ανά μονάδα καταναλωθέντος υποστρώματος ($Y_{X/G_{Iol}}$, g/g), και ποσοστού λίπους επί ξηράς ουσίας ($L/X\%$, w/w) του μικροοργανισμού *Rhodospiridium toruloides* NRRL Y-27012. Κάθε σημείο αποτελεί μέσο όρο 2 ανεξάρτητων επαναλήψεων και το σχετικό τυπικό σφάλμα για τα περισσότερα από τα σημεία της ζύμωσης προσδιορίστηκε σε $\leq 18\%$.

NaCl (%, w/v)	Χρόνος ζύμωσης (h)		$G_{Iol_{cons}}$ (g/L)	X (g/L)	L (g/L)	$Y_{X/G_{Iol}}$ (g/g)	L/X (%, w/w)	IPS/X (%, w/w)
Μάρτυρας	240	a, b, c	75,5	20,4	8,9	0,27	44,0	13,5
0,2%, w/v	312	a, b, c	82,4	20,1	13,3	0,24	66,5	19,4
0,5%, w/v	312	a, b, c	83,1	19,5	12,7	0,23	65,2	25,9
0,8%, w/v	312	a, b, c	79,8	19,8	11,0	0,24	55,4	33,2
1,0%, w/v	192	a, b	51,2	16,0	5,8	0,09	30,4	6,5
	96	c	35,9	10,2	4,6	0,24	44,7	11,0
2,0%, w/v	192	a, b, c	50,2	13,4	4,8	0,10	35,5	11,0
3,0%, w/v	216	a, b	46,0	12,2	5,0	0,11	40,7	3,7
	144	c	34,9	9,6	4,2	0,12	43,6	6,5

Συντομογραφίες:

a: Μέγιστη τιμή συγκέντρωσης βιομάζας X (g/L)

b: Μέγιστη τιμή συγκέντρωσης παραγόμενου μικροβιακού λίπους L (g/L)

c: Μέγιστη τιμή του λόγου L/X (% , w/w)

X: η παραγόμενη βιομάζα (g/L)

L: το παραγόμενο ενδοκυτταρικό λίπος (g/L)

$G_{Iol_{cons}}$: καταναλωθείσα γλυκερόλη (g/L)

$Y_{X/G_{Iol}}$: συντελεστής απόδοσης παραγωγής βιομάζας προς καταναλωθέν υπόστρωμα (g/g)

L/X: ποσοστό λίπους επί ξηράς ουσίας (% , w/w)

IPS/X: τιμή παραγόμενων ενδοπολυσακχαριτών ανά παραγόμενη βιομάζα (% , w/w)

Για τη διερεύνηση της επίδρασης της προσθήκης άλατος στη σύσταση των λιπιδίων πραγματοποιήθηκε ανάλυση των μεθυλεστέρων αυτών. Όπως και στις προηγούμενες πειραματικές διαδικασίες επιλέχθηκαν δύο σημεία από κάθε ζύμωση στο τέλος της εκθετικής (48 h) και στη στατική φάση (216 h). Αρχικά, μελετήθηκε το προφίλ των κυτταρικών λιπιδίων που συλλέχθηκαν από τις έξι ζυμώσεις με διαφορετικές συγκεντρώσεις NaCl, ήτοι 0,2%, w/v, 0,5%, w/v, 0,8%, w/v, 1,0%, w/v, 2,0%, w/v και 3,0%, w/v. Σαν γενική παρατήρηση μπορεί να ειπωθεί ότι το ποσοστό του ελαϊκού (Δ^9 C18: 1), του παλμιτικού (C16: 0), του στεατικού (C18: 0) και του λινελαϊκού οξέος ($\Delta^{9,12}$ C18: 2) δεν επηρεάστηκε από την παρουσία άλατος σε συγκεντρώσεις από 0,2%, w/v έως 2,0%, w/v, στο υπόστρωμα. Αντίθετα η συγκέντρωση του α -λινολενικού οξέος ($\Delta^{9,12,15}$ C18: 3) παρουσίασε διακυμάνσεις κατά την εφαρμογή διαφορετικών συγκεντρώσεων NaCl. Συγκεκριμένα όπως απεικονίζεται στον Πίνακα 3.6., το ποσοστό του α -λινολενικού οξέος ($\Delta^{9,12,15}$ C18: 3) στις ζυμώσεις με συγκεντρώσεις NaCl: 0,2%, w/v, 0,5%, w/v, 0,8%, w/v, 1,0%, w/v και 2,0%, w/v κυμάνθηκε μεταξύ 0,5-3,0%, w/w ενώ αξίζει να αναφερθεί ότι η υπαγωγή της καλλιέργειας σε υψηλή συγκέντρωση άλατος (3,0%, w/v) ευνόησε τη σύνθεση του συγκεκριμένου οξέος, το ποσοστό του οποίου ανήλθε σε ~8,5%, w/w ενώ το ελαϊκό (Δ^9 C18: 1) οξύ παρουσίασε μείωση της τάξεως του ~10-13%, w/w.

Πίνακας 3.6. Σύνθεση λιπαρών οξέων των ενδοκυτταρικών λιπιδίων, για τα ολικά λιπίδια του μικροοργανισμού *Rhodospiridium toruloides* NRRL Y-27012 σε υπόστρωμα γλυκερόλης αρχικής συγκέντρωσης 80 g/L για διαφορετικές συγκεντρώσεις άλατος 1,0%, w/v, 2,0%, w/v και 3,0%, w/v. Κάθε σημείο αποτελεί μέσο όρο 2 ανεξάρτητων επαναλήψεων και το σχετικό τυπικό σφάλμα για τα περισσότερα από τα σημεία της ζύμωσης προσδιορίστηκε σε $\leq 18\%$.

Προφίλ λιπαρών οξέων (% w/w)						
NaCl (% w/v)	Χρόνος ζύμωσης (h)	C16: 0	C18: 0	Δ^9 C18: 1	$\Delta^{9,12}$ C18: 2	$\Delta^{9,12,15}$ C18: 3
Μάρτυρας	48	27,7	9,2	51,2	10,4	1,5
	216	32,5	8,6	49,6	8,8	0,4
1,0%, w/v	48	25,3	9,7	54,7	8,9	1,0
	216	29,6	8,3	53,1	8,2	0,8
2,0%, w/v	48	27,0	8,3	54,1	8,5	1,2
	216	31,0	7,0	53,7	7,7	0,3
3,0%, w/v	48	27,0	9,2	39,5	15,6	8,5
	216	30,4	7,8	33,4	20,4	7,6

Σύμφωνα με τα προηγούμενα πειραματικά αποτελέσματα η συγκέντρωση λιπιδίων αυξάνεται παράλληλα με την αύξηση της συγκέντρωσης άλατος όταν αυτό βρίσκεται σε συγκεντρώσεις από 0,2-0,8%, w/v στο μέσο καλλιέργειας. Προκειμένου να μελετηθεί ενδελεχώς η πιθανή επίδραση του άλατος στο προφίλ των λιπαρών οξέων διενεργήθηκαν διαδοχικές κλασματώσεις του λίπους στις συγκεντρώσεις αυτές και ακολούθησε ανάλυση στον αέριο χρωματογράφο.

Όπως παρατηρούμε στον Πίνακα 3.7. τα ουδέτερα λίπη έδειξαν να καταλαμβάνουν το υψηλότερο ποσοστό σε όλες τις ζυμώσεις με αυτό να κυμαίνεται από 75,3-84,3%. Ακολουθούν τα σφιγγογλυκολιπίδια με ποσοστά από 11,5 έως 20,7%, ενώ το ποσοστό των φωσφολιπιδίων κυμάνθηκε μεταξύ 3,2 έως 4,2%. Ωστόσο η προσθήκη NaCl σε χαμηλές συγκεντρώσεις στην καλλιέργεια δεν φάνηκε να επηρεάζει το προφίλ των λιπαρών οξέων τόσο στα ολικά λιπίδια όσο και στα κλάσματα αυτών. Το επικρατέστερο σε κάθε περίπτωση οξύ παρέμεινε το ελαϊκό (Δ^9 C18: 1) με ποσοστά ~46-50%, w/w, ενώ το παλμιτικό (C16: 0) κυμάνθηκε μεταξύ ~28-35%, w/w. Τέλος, όσον αφορά τα υπόλοιπα λιπαρά οξέα, το στεατικό (C18: 0), το λινελαϊκό οξύ ($\Delta^{9,12}$ C18: 2) και το α-λινολενικό οξύ ($\Delta^{9,12,15}$ C18: 3) κατείχαν συνολικά σχετικά μικρό ποσοστό έως ~13%, w/w.

Πίνακας 3.7. Σύνθεση λιπαρών οξέων των ενδοκυτταρικών λιπιδίων και τα κλάσματα αυτών, Ουδέτερα (NL), Σφιγγολιπίδια και γλυκολιπίδια (G+S) και Φωσφολιπίδια (P), του μικροοργανισμού *Rhodospiridium toruloides* NRRL Y-27012 σε υπόστρωμα γλυκερόλης αρχικής συγκέντρωσης 80 g/L για διαφορετικές συγκεντρώσεις άλατος 0,2%, w/v, 0,5%, w/v και 0,8%, w/v. Κάθε σημείο αποτελεί μέσο όρο 2 ανεξάρτητων επαναλήψεων και το σχετικό τυπικό σφάλμα για τα περισσότερα από τα σημεία της ζύμωσης προσδιορίστηκε σε $\leq 18\%$.

Προφίλ λιπαρών οξέων (% w/w)						
NaCl=0,2 (% w/v)						
	Χρόνος ζύμωσης (h)	Κλάσμα (%)	C16: 0	C18: 0	Δ^9 C18: 1	$\Delta^{9,12}$ C18: 2
TL	48	-	31,5	11,2	48,3	7,1
	216	-	30,7	11,1	48,4	8,4
NL	48	84,3	34,2	10,5	47,1	7,8
	216	77,5	33,5	10,6	46,1	7,7
G+S	48	11,5	34,8	10,6	48,7	5,5
	216	19,2	30,2	12,2	47,3	8,7
P	48	4,2	28,5	11,6	48,8	9,1
	216	3,3	31,9	10,1	49,3	7,8

NaCl=0,5 (% w/v)						
	Χρόνος ζύμωσης (h)	Κλάσμα (%)	C16: 0	C18: 0	^{Δ9} C18: 1	^{Δ9,12} C18: 2
TL	48	-	30,8	8,9	49,1	8,1
	216	-	31,1	10,2	48,1	7,2
NL	48	78,0	34,3	9,1	49,5	6,7
	216	75,3	30,2	10,9	49,4	7,7
G+S	48	18,8	30,6	8,4	49,7	9,2
	216	20,7	33,7	10,4	46,9	5,7
P	48	3,2	34,1	8,3	47,4	8,8
	216	4,0	32,1	11,8	46,4	8,4

NaCl=0,8 (% w/v)						
	Χρόνος ζύμωσης (h)	Κλάσμα (%)	C16: 0	C18: 0	^{Δ9} C18: 1	^{Δ9,12} C18: 2
TL	48	-	29,6	9,7	49,8	9,9
	216	-	31,1	10,8	47,8	8,8
NL	48	80,0	30,1	9,9	48,7	10,3
	216	76,3	30,9	11,3	47,1	8,2
G+S	48	15,8	29,2	9,6	50,7	8,1
	216	19,7	31,2	9,8	49,6	8,9
P	48	4,2	34,5	8,1	46,9	7,1
	216	4,0	33,8	10,1	46,6	8,4

3.1.5. Αξιολόγηση του υδρογλυκερικού εκχυλίσματος φλοιού κρεμμυδιού (Onion Solid Wastes-OSWs) στην παραγωγή των λιπιδίων-μη ασηπτική διεργασία

Προκειμένου να μειωθεί το κόστος της διαδικασίας, διεξήχθησαν πειράματα με βιομηχανική γλυκερόλη υπό ασηπτικές (προηγούμενη αποστείρωση του μέσου) και υπό μη ασηπτικές (προηγούμενη παστερίωση του μέσου) συνθήκες, ενώ ένας «ανασταλτικός» παράγοντας που θα μπορούσε δυνητικά να καταστείλει τη μικροβιακή αύξηση μολυσματικών βακτηρίων (υδρογλυκερικό εκχύλισμα φλοιού κρεμμυδιού) προστέθηκε στο μέσο. Τα αποτελέσματα συγκρίθηκαν με μάρτυρα που περιείχε (Glol~80 g/L, χωρίς προσθήκη εκχυλίσματος) (Πίνακας 3.8.). Η προσθήκη του υδρογλυκερικού εκχυλίσματος αποβλήτων κρεμμυδιού είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση των λιπιδίων που συσσωρεύτηκαν στα κύτταρα ζύμης, τόσο σε απόλυτες (L, g/L) όσο και σε σχετικές (L/X, % w/w) τιμές (Πίνακας 3.8.). Εντούτοις, η παρουσία αυτών των ενώσεων δεν φάνηκε να ασκεί αρνητική επίδραση στην παραγωγή βιομάζας στο

R. toruloides. Η μη ασηπτική δοκιμή στο μέσο που περιείχε το υδρογλυκερικό εκχύλισμα των OSWs, οδήγησε σε σημαντική παραγωγή X και αξιοσημείωτη συσσώρευση ενδοκυτταρικών λιπιδίων. Η συσσώρευση λιπιδίων ήταν χαμηλότερη σε σύγκριση με το πείραμα στο οποίο το μέσο είχε προηγουμένως υποβληθεί σε θερμική αποστείρωση (L=5,2 g/L έναντι 6,2 g/L). Ωστόσο, η παραγωγή βιομάζας και η αφομοίωση της γλυκερόλης στο σημείο όπου παρουσιάστηκε η μέγιστη συγκέντρωση L_{max} , ήταν μεγαλύτερες στο πείραμα όπου πραγματοποιήθηκε παστερίωση του μέσου καλλιέργειας. Οι μικροσκοπικές παρατηρήσεις έδειξαν την παρουσία μολυσματικών βακτηρίων (ράβδοι), που ευθύνονται για το περίπου 10% του συνολικού μικροβιακού πληθυσμού. Συνεπώς η αυξημένη τιμή της βιομάζας σε σχέση με το μάρτυρα αποδίδεται και στην ύπαρξη βακτηριακών κυττάρων.

Πίνακας 3.8. Ποσοτικά δεδομένα του μικροοργανισμού *Rhodosporidium toruloides* NRRL Y-27012 σε υπόστρωμα γλυκερόλης σε πείραμα σε κωνικές φιάλες. Η αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης ήταν 80 g/L. Στο μάρτυρα προστέθηκε γλυκερόλη 80 g/L, ενώ στα λοιπά πειράματα προστέθηκε γλυκερόλη και υδρογλυκερικό εκχύλισμα OSWs. Παρουσιάζονται οι τιμές της κατανάλωσης υποστρώματος (G_{l0l} , g/L), της παραγωγής βιομάζας (X, g/L), λιπιδίων (L, g/L), ενδοπολυσακχαριτών ανά παραγόμενη βιομάζα (IPS/X, %, w/w), συντελεστή απόδοσης λίπους ανά μονάδα καταναλωθέντος υποστρώματος ($Y_{L/G_{l0l}}$, g/g), και ποσοστό λίπους επί ξηράς ουσίας (L/X, %, w/w). Κάθε σημείο αποτελεί μέσο όρο 2 ανεξάρτητων επαναλήψεων και το σχετικό τυπικό σφάλμα για τα περισσότερα από τα σημεία της ζύμωσης προσδιορίστηκε σε $\leq 18\%$.

	Χρόνος ζύμωσης (h)		$G_{l0l_{cons}}$ (g/L)	X (g/L)	L (g/L)	$Y_{L/G_{l0l}}$ (g/g)	L/X (%, w/w)	IPS/X (%, w/w)
G_{l0l} 80 g/L; μάρτυρας, αποστείρωση	240	a, b	75,5	20,4	8,9	0,11	44,0	13,5
G_{l0l} 80 g/L; 40 mL/L υδρογλυκερικό εκχύλισμα OSWs, αποστείρωση	240	a, b	71,5	21,9	6,2	0,09	28,3	9,4
G_{l0l} 80 g/L; 40 mL/L υδρογλυκερικό εκχύλισμα OSWs, παστερίωση	240	a, b	80,1	23,6	5,2	0,06	22,0	11,5

Συνομογραφίες:

a: Μέγιστη τιμή συγκέντρωσης βιομάζας X (g/L)

b: Μέγιστη τιμή συγκέντρωσης παραγόμενου μικροβιακού λίπους L (g/L)

X: η παραγόμενη βιομάζα (g/L)

L: το παραγόμενο ενδοκυτταρικό λίπος (g/L)

$G_{l0l_{cons}}$: καταναλωθείσα γλυκερόλη (g/L)

$Y_{L/G_{l0l}}$: συντελεστής απόδοσης παραγωγής λίπους προς καταναλωθέν υπόστρωμα (g/g)

L/X: ποσοστό λίπους επί ξηράς ουσίας (%, w/w)

IPS/X: τιμή παραγόμενων ενδοπολυσακχαριτών ανά παραγόμενη βιομάζα (%, w/w)

3.1.6. Αξιολόγηση της συγκέντρωσης της γλυκερόλης και του λόγου C/N σε ασυνεχείς ζυμώσεις σε υπόστρωμα γλυκερόλης σε κωνικές φιάλες

Είναι γνωστό από τη διεθνή βιβλιογραφία ότι ο αρχικός λόγος C/N καθώς και η αρχική τιμή της πηγής άνθρακα, αποτελούν σημαντικούς παράγοντες που δύνανται να επηρεάσουν τη *de novo* σύνθεση

λιπιδίων στους ελαιογόνους μικροοργανισμούς (Davies and Holdsworth, 1992; Ratledge, 1997; Papanikolaou and Aggelis 2010; 2011a). Έτσι, πραγματοποιήθηκε καλλιέργεια με αρχικές συγκεντρώσεις γλυκερόλης (Glo₀) ~50, 80 και 90 g/L, με την ίδια αρχική συγκέντρωση αζώτου (πεπτόνη 2,0 g/L και εκχύλισμα ζύμης 1,0 g/L), και τα αποτελέσματα φαίνονται στον κάτωθι πίνακα:

Πίνακας 3.9. Συγκεντρωτικός πίνακας αποτελεσμάτων, ζυμώσεων του μικροοργανισμού *Rhodospiridium toruloides* NRRL Y-27012 σε υπόστρωμα γλυκερόλης με ποικίλες αρχικές συγκεντρώσεις γλυκερόλης και ίδια αρχική συγκέντρωση αζώτου. Παρουσιάζονται οι τιμές της κατανάλωσης υποστρώματος (Glo₁, g/L), της παραγωγής βιομάζας (X, g/L), λιπιδίων (L, g/L), ενδοπολυσακχαριτών ανά παραγόμενη βιομάζα (IPS/X, %, w/w), συντελεστή απόδοσης λίπους ανά μονάδα καταναλωθέντος υποστρώματος (Y_{L/Glo₁}, g/g), και ποσοστού λίπους επί ξηράς ουσίας (L/X, %, w/w). Κάθε σημείο αποτελεί μέσο όρο 2 ανεξάρτητων επαναλήψεων και το σχετικό τυπικό σφάλμα για τα περισσότερα από τα σημεία της ζύμωσης προσδιορίστηκε σε ≤18%.

Glo ₀ (g/L)	Χρόνος ζύμωσης (h)		Glo _{1cons} (g/L)	X (g/L)	L (g/L)	IPS (g/L)	L/X (%, w/w)	IPS/X (%, w/w)
~90 g/L	216	b	88,4	25,1	11,6	5,6	46,5	22,5
	325	a	92,0	30,0	10,0	6,3	33,3	21,0
~80 g/L	240	a, b	75,4	20,4	8,9	2,7	43,6	13,4
~50 g/L	210	a, b	51,5	18,8	6,9	2,9	36,7	15,9

a: Μέγιστη τιμή παραγόμενης βιομάζας X (g/L)

b: Μέγιστη τιμή παραγόμενου μικροβιακού λίπους ανά παραγόμενη βιομάζα L/X (% , w/w)

X: η παραγόμενη βιομάζα (g/L)

L: το παραγόμενο ενδοκυτταρικό λίπος (g/L)

Glo_{1cons}: καταναλωθείσα γλυκερόλη (g/L)

Y_{L/Glo₁}: συντελεστής απόδοσης παραγωγής λίπους προς καταναλωθέν υπόστρωμα (g/g)

L/X: ποσοστό λίπους επί ξηράς ουσίας (% , w/w)

IPS/X: τιμή παραγόμενων ενδοπολυσακχαριτών ανά παραγόμενη βιομάζα (% , w/w)

IPS: τιμή παραγόμενων ενδοπολυσακχαριτών (g/L)

Από τα παραπάνω αποτελέσματα προέκυψε ότι η αύξηση της αρχικής συγκέντρωσης γλυκερόλης σε ~90 g/L επέφερε αύξηση στην απόλυτη τιμή των παραγόμενων λιπιδίων η οποία προσδιορίστηκε σε ~11,6 g/L. Στη συνέχεια της πειραματικής διαδικασίας, με αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης ~90 g/L χρησιμοποιούμενης ως μόνης πηγής άνθρακα, πραγματοποιήθηκαν ζυμώσεις κλειστού τύπου σε κωνικές φιάλες και σε διαφορετικούς λόγους C/N, με στόχο τη διερεύνηση της επίδρασης αυτού του παράγοντα στη σύνθεση των λιπιδίων. Ως αναφέρθηκε, η αρχική συγκέντρωση της γλυκερόλης ήταν ~90 g/L σε όλες τις περιπτώσεις, ενώ κάθε φορά άλλαζε η ποσότητα της πηγής αζώτου ώστε οι αντίστοιχοι λόγοι να είναι C/N=50; 100; 160 και 240 moles/moles (βλέπε Πίνακα 3.10). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, ανεξάρτητα από το λόγο C/N που επιλέχθηκε, σε όλες τις ζυμώσεις παρατηρήθηκε σημαντική παραγωγή βιομάζας που κυμάνθηκε μεταξύ 20-30 g/L και καλή ικανότητα αφομοίωσης της γλυκερόλης. Ελαφρώς υψηλότερες ποσότητες γλυκερόλης αφομοιώθηκαν όταν εφαρμόστηκε χαμηλός λόγος C/N, ενώ χαμηλότερες

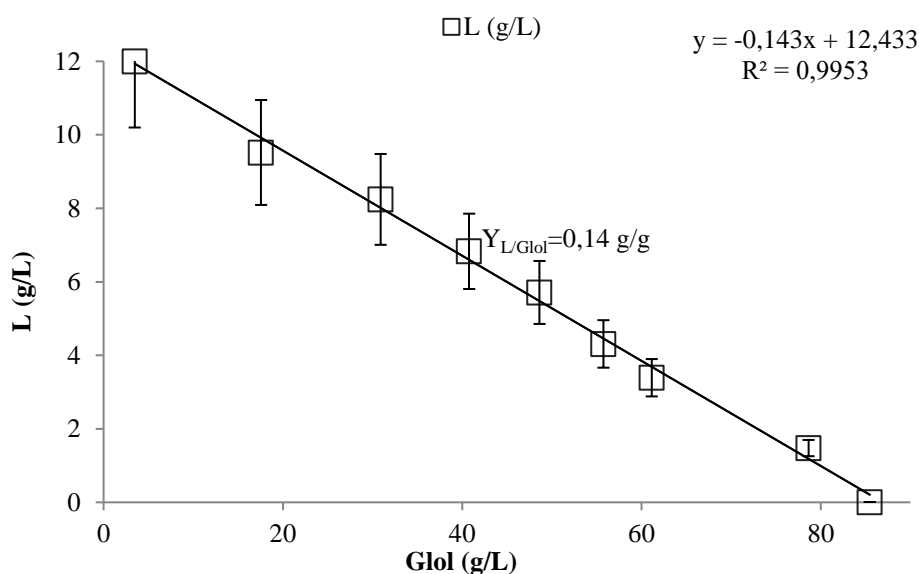
συγκεντρώσεις X_{\max} σημειώθηκαν με την αύξηση του λόγου C/N. Επιπλέον, ανεξάρτητα από το λόγο C/N, η απόδοση της βιομάζας $Y_{X/Glcl}$ παρέμεινε σχεδόν σταθερή σε τιμές που κυμαίνονται μεταξύ 0,27-0,32 g/g. Σε όλες τις περιπτώσεις με διαφορετικούς λόγους C/N, σημαντικές ποσότητες κυτταρικών λιπιδίων αναφέρθηκαν (π.χ. οι τιμές L_{\max} κυμαίνονται μεταξύ 9,5 και 12,0 g/L που αντιστοιχούν σε ποσοστά $L/X=46-49\%$, w/w) ενώ η παραγωγικότητα κατ' όγκον ήταν ~0,04-0,06 g/L/h.

Σύμφωνα με τα παραπάνω αποτελέσματα προκύπτει ότι στη ζύμωση που πραγματοποιήθηκε με γλυκερόλη και λόγο C/N=50 moles/moles στις 325 h το στέλεχος παρήγαγε τη μεγαλύτερη ποσότητα μικροβιακής βιομάζας, φτάνοντας τα ~30 g/L με συντελεστή απόδοσης 0,30 g/g και ενδοκυτταρικού λίπους, της τάξης των ~10 g/L που αντιστοιχεί στο ~34%, w/w της παραγόμενης βιομάζας. Το μέγιστο ποσοστό λίπους επί ξηράς ουσίας εμφανίστηκε στη συγκεκριμένη ζύμωση στις 216 h και ήταν ίσο με ~47%, w/w. Η μέγιστη παραγωγή ενδοπολυσακχαριτών σημειώθηκε, όπως και στις περισσότερες από τις προηγούμενες πειραματικές δοκιμές, στα πρώτα στάδια της ζύμωσης, στις 48 h δηλαδή, με το ποσοστό τους να ανέρχεται στο ~55 %, w/w. Όταν το στέλεχος καλλιεργήθηκε σε γλυκερόλη αρχικής συγκέντρωσης ~90 g/L και αρχικό λόγο C/N=100 moles/moles, στις 48 h παρήχθη η μέγιστη ποσότητα των ενδοπολυσακχαριτών με ποσοστό ~58%, w/w. Ακόμη, στις 325 h εμφανίστηκε η μέγιστη τιμή της παραγόμενης βιομάζας που ήταν 24,5 g/L με $Y_{X/Glcl}=0,31$ g/g, καθώς επίσης και του ενδοκυτταρικού λίπους ίσου με 12,0 g/L, με αντίστοιχο λίπος επί ξηρής ουσίας $L/X=49,0\%$, w/w. Επιπλέον αξίζει να τονιστεί ότι η τιμή της απόδοσης λίπους σε σχέση με το καταναλωθέν υπόστρωμα ήταν σχεδόν σταθερή κατά τη διάρκεια της ζύμωσης λαμβάνοντας την τιμή $Y_{L/Glcl}\sim 0,14$ g/g (Εικόνα 3.7.).

Όταν το στέλεχος αυξήθηκε σε μέσο καλλιέργειας με γλυκερόλη και λόγο C/N=160 moles/moles, στις πρώτες 48 h, σημειώθηκε το υψηλότερο ποσοστό παραγόμενων ενδοπολυσακχαριτών ίσο με 60,4%, w/w, ενώ στις 325 h η υψηλότερη παραγωγή μικροβιακού λίπους που ήταν ίση με 9,5 g/L και ποσοστό λίπους επί ξηρής ουσίας $L/X=47,5\%$, w/w. Ακόμη, στις 325 h σημειώθηκε η υψηλότερη παραγωγή βιομάζας 20,0 g/L με συντελεστή απόδοσης $Y_{X/Glcl}=0,28$ g/g. Σε όλες τις καλλιέργειες που πραγματοποιήθηκαν, η συγκέντρωση διαλυτού οξυγόνου (DOC, σε %, v/v) μειώθηκε σχετικά γρήγορα (π.χ. εντός των πρώτων 40-60 h μετά από τον εμβολιασμό) σε τιμές ~35%, v/v, ενώ σημείωσε αύξηση (σε τιμές ~60-70%, v/v) στα τελευταία στάδια της καλλιέργειας (π.χ. σε $t>260-280$ ώρες μετά τον εμβολιασμό). Παρά τις μειωμένες τιμές DOC στις πρώτες ώρες της καλλιέργειας, η αύξηση του μικροοργανισμού πραγματοποιήθηκε σε πλήρως αερόβιες συνθήκες (Αγγελής, 2017; Παλαιογεοργίου *et al.*, 2019). Η μείωση της τιμής του κορεσμού σε οξυγόνο (DOC) έλαβε χώρα όταν σημειώθηκε περιορισμός του αζώτου στο θρεπτικό μέσο της καλλιέργειας (σε συμφωνία με Παπανικόλαου *et al.*, 2004). Το άζωτο έγινε περιοριστικό για τη μικροβιακή αύξηση περίπου 40-45 h μετά από τον εμβολιασμό, όταν η συγκέντρωση του FAN στο μέσο ήταν ≤ 20 mg/L (η αρχική συγκέντρωση του FAN ήταν ~110 mg/L). Σε όλες τις περιπτώσεις, η έναρξη της συσσώρευσης λιπιδίων έλαβε χώρα μετά τον περιορισμό του αφομοιώσιμου αζώτου στο μέσο. Όπως και στις προηγούμενες διεργασίες ζυμώσεων οι οποίες είχαν λάβει χώρα με το μικροοργανισμό *R.*

toruloides NRRL Y-27012, με ενδιαφέρον παρατηρήθηκε ότι στο αρχικό στάδιο αύξησης της καλλιέργειας (0-48 ώρες μετά τον εμβολιασμό) και παρόλο που βρέθηκε άζωτο στο μέσο αύξησης ή είχε μόλις τούτο καταναλωθεί, είχαν παραχθεί σημαντικές ποσότητες ενδοπολυσακχαριτών (IPS/X \geq 60,0%, w/w), σε αντίθεση με τη θεωρία η οποία αναφέρεται στην παραγωγή αποθησαυριστικών ενδοκυτταρικών υλικών (λιπιδίων και πολυσακχαριτών) από τους αντίστοιχους μικροοργανισμούς (Athenaki *et al.*, 2018; Papanikolaou and Aggelis, 2019).

Τα εν λόγω αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.10. και την Εικόνα 3.7..



Εικόνα 3.7. Γραφική απεικόνιση του συνολικού συντελεστή μετατροπής της γλυκερόλης (Glol, g/L) σε λίπος (L, g/L) κατά τη διάρκεια καλλιέργειας του μικροοργανισμού *Rhodospiridium toruloides* NRRL Y-27012 σε ζύμωση κλειστού τύπου σε κωνικές φιάλες σε ζύμωση σε υπόστρωμα γλυκερόλης με τελική συγκέντρωση 90 g/L. Συνθήκες καλλιέργειας: C/N=100 moles/moles, ανάδευση 180 \pm 5 rpm, θερμοκρασία 28 \pm 1 °C, pH 5,5. Κάθε σημείο αποτελεί μέσο όρο 2 ανεξάρτητων επαναλήψεων και το σχετικό τυπικό σφάλμα για τα περισσότερα από τα σημεία της ζύμωσης προσδιορίστηκε σε \leq 18%.

Πίνακας 3.10. Συγκεντρωτικός πίνακας αποτελεσμάτων, ζυμώσεων του μικροοργανισμού *Rhodospiridium toruloides* NRRL Y-27012 σε υπόστρωμα γλυκερόλης αρχικής συγκέντρωσης 90 g/L για τους τέσσερις λόγους C/N=50 moles/moles, C/N=100 moles/moles, C/N=160 moles/moles και C/N=240 moles/moles. Παρουσιάζονται οι τιμές της κατανάλωσης υποστρώματος (Glc_{cons}, g/L), της παραγωγής βιομάζας (X, g/L), λιπιδίων (L, g/L), ενδοπολυσακχαριτών ανά παραγόμενη βιομάζα (IPS/X%, w/w), ενδοπολυσακχαριτών (IPS, g/L) και λίπους επί ξηράς ουσίας (L/X, %, w/w). Κάθε σημείο αποτελεί μέσο όρο 2 ανεξάρτητων επαναλήψεων και το σχετικό τυπικό σφάλμα για τα περισσότερα από τα σημεία της ζύμωσης προσδιορίστηκε σε ≤18%.

C/N (moles/moles)	Χρόνος ζύμωσης (h)		Glc _{cons} (g/L)	X (g/L)	L (g/L)	IPS (g/L)	L/X (%, w/w)	IPS/X (%, w/w)
50	48	a	16,4	6,2	1,5	3,4	25,0	55,0
	216	b	88,4	20,9	11,6	5,6	46,5	22,5
	325	c	92,0	30,2	10,1	6,3	33,5	21,0
100	48	a	6,8	5,3	1,5	3,1	27,9	58,8
	325	b,c	82,0	24,5	12,0	7,2	49,0	29,5
160	48	a	17,0	5,4	1,5	2,7	28,0	50,4
	325	b,c	73,0	20,0	9,5	5,4	47,5	27,0
240	48	a	11,9	5,1	0,7	2,5	15,0	50,0
	325	b,c	75,5	22,7	10,5	4,3	46,0	18,9

Συντομογραφίες:

a: Μέγιστη τιμή παραγόμενων ενδοπολυσακχαριτών ανά παραγόμενη βιομάζα IPS/X (% , w/w)

b: Μέγιστη τιμή παραγόμενου μικροβιακού λίπους ανά παραγόμενη βιομάζα L/X (% , w/w)

c: Μέγιστη τιμή παραγόμενης βιομάζας X (g/L)

X: η παραγόμενη βιομάζα (g/L)

L: το παραγόμενο ενδοκυτταρικό λίπος (g/L)

IPS: παραγόμενοι ενδοπολυσακχαρίτες (g/L)

Glc_{cons}: καταναλωθείσα γλυκερόλη (g/L)

L/X: ποσοστό λίπους επί ξηράς ουσίας (% , w/w)

IPS/X: ποσοστό παραγόμενων ενδοπολυσακχαριτών (% , w/w)

Όσον αφορά στον ποιοτικό προσδιορισμό του λίπους για τις ζυμώσεις με διαφορετικό C/N προκειμένου να γίνει πιο ενδεδειγμένη ανάλυση της σύστασης του ενδοκυτταρικού λίπους πραγματοποιήθηκαν, αρχικά, διαδοχικές κλασματώσεις σε όλες τις ζυμώσεις για τις χρονικές στιγμές 48 h και 216 h και ακολούθησε ανάλυση των λιπαρών οξέων των κλασμάτων.

Συμπερασματικά τα ουδέτερα λίπη έδειξαν να καταλαμβάνουν το υψηλότερο ποσοστό σε όλες τις ζυμώσεις με αυτό να κυμαίνεται από 79,0-86,6%. Ακολουθούν τα σφινγγολυκολιπίδια με ποσοστά από 9,2 έως 15,8%, ενώ το ποσοστό των φωσφολιπιδίων κυμάνθηκε μεταξύ 2,4 έως 10,3%. Ωστόσο το προφίλ των λιπαρών οξέων τόσο στα ολικά λιπίδια όσο και στα κλάσματα αυτών δεν επηρεάστηκε από τη μεταβολή του λόγου C/N. Σε όλες τις περιπτώσεις το κυρίαρχο λιπαρό οξύ ήταν το ελαϊκό (^Δ9C18: 1) με ποσοστό που κυμάνθηκε μεταξύ 39-48%, w/w. Τα συγκεκριμένα αποτελέσματα παρουσιάζονται στους Πίνακες 3.11 και 3.12.. Το παλμιτικό (C16: 0) κυμάνθηκε μεταξύ ~26-35%, w/w. Επίσης, τα ποσοστά του α-λινολενικού

οξέος ($\Delta^{9,12,15}\text{C18: 3}$) κυμάνθηκαν από ~1-3%, w/w σε όλα τα πειράματα. Τέλος, τόσο το στεατικό (C18: 0) όσο και το λινελαϊκό οξύ ($\Delta^{9,12}\text{C18: 2}$) κατείχαν σχετικά μικρό ποσοστό επί του συνόλου περίπου της τάξεως του ~10-15%, w/w.

Πίνακας 3.11. Σύνθεση των λιπαρών οξέων των ολικών λιπιδίων (% w/w) κατά τη διάρκεια καλλιέργειας του μικροοργανισμού *Rhodospiridium toruloides* NRRL Y-27012 σε ζυμώσεις κλειστού τύπου σε κωνικές φιάλες σε αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης 90 g/L για τους τέσσερις λόγους C/N=50 moles/moles, C/N=100 moles/moles, C/N=160 moles/moles και C/N=240 moles/moles. Συνθήκες καλλιέργειας: ανάδευση 180±5 rpm, θερμοκρασία 28±1 °C. Κάθε σημείο αποτελεί μέσο όρο 2 ανεξάρτητων επαναλήψεων και το σχετικό τυπικό σφάλμα για τα περισσότερα από τα σημεία της ζύμωσης προσδιορίστηκε σε ≤18%.

Χρόνος ζύμωσης (h)	Προφίλ λιπαρών οξέων (% w/w)			
	C16: 0	C18: 0	$\Delta^9\text{C18: 1}$	$\Delta^{9,12}\text{C18: 2}$
C/N=50 moles/moles				
48	26,2	12,3	48,1	8,3
216	28,6	12,9	47,3	7,8
C/N=100 moles/moles				
48	29,5	12,5	44,9	9,6
216	30,7	14,1	42,5	9,2
C/N=160 moles/moles				
48	33,1	15,1	43,2	5,9
216	35,1	15,4	40,2	6,2
C/N=240 moles/moles				
48	32,1	15,3	42,1	6,4
216	35,9	15,2	39,5	7,2

Πίνακας 3.12. Σύνθεση λιπαρών οξέων των ενδοκυτταρικών λιπιδίων, για τα ολικά λιπίδια και τα κλάσματα αυτών, ουδέτερα (NL), Σφιγγολιπίδια και γλυκολιπίδια (G+S) και Φωσφολιπίδια (P) του μικροοργανισμού *Rhodospiridium toruloides* NRRL Y-27012 σε υπόστρωμα γλυκερόλης αρχικής συγκέντρωσης 90 g/L για τους τέσσερις λόγους C/N=50 moles/moles, C/N=100 moles/moles, C/N=160 moles/moles και C/N=240 moles/moles. Κάθε σημείο αποτελεί μέσο όρο 2 ανεξάρτητων επαναλήψεων και το σχετικό τυπικό σφάλμα για τα περισσότερα από τα σημεία της ζύμωσης προσδιορίστηκε σε $\leq 18\%$.

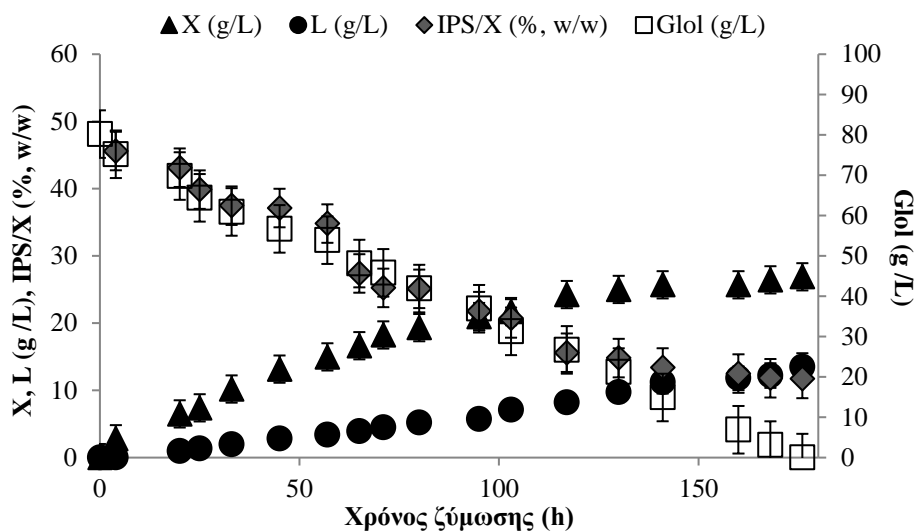
Προφίλ λιπαρών οξέων (% w/w)						
C/N=50 moles/moles						
	Χρόνος ζύμωσης (h)	Κλάσμα (%)	C16: 0	C18: 0	Δ^9C18: 1	$\Delta^9,12$C18: 2
NL	48	86,6	30,2	11,5	47,3	7,1
	216	79,5	24,5	12,5	53,4	6,7
G+S	48	11,0	25,3	14,3	48,8	9,5
	216	15,8	23,9	12,8	51,6	8,9
P	48	2,4	30,5	12,1	48,6	6,1
	216	4,7	29,8	13,2	46,2	8,8
C/N=100 moles/moles						
	Χρόνος ζύμωσης (h)	Κλάσμα (%)	C16: 0	C18: 0	Δ^9C18: 1	$\Delta^9,12$C18: 2
NL	48	85,8	29,8	10,8	45,8	10,8
	216	76,5	30,6	15,9	42,6	10,3
G+S	48	9,2	30,2	11,7	42,2	8,7
	216	13,2	31,7	13,1	43,7	9,5
P	48	5,0	28,9	13,7	42,9	10,6
	216	10,3	29,6	10,7	40,6	8,2
C/N=160 moles/moles						
	Χρόνος ζύμωσης (h)	Κλάσμα (%)	C16: 0	C18: 0	Δ^9C18: 1	$\Delta^9,12$C18: 2
NL	48	85,0	32,9	11,2	44,6	4,8
	216	79,0	33,5	15,5	39,2	7,9
G+S	48	11,8	34,9	10,1	41,6	8,6
	216	13,6	36,6	9,3	45,5	4,1
P	48	3,2	34,2	15,6	41,8	6,2
	216	7,4	30,4	10,8	40,9	7,3

C/N=240 moles/moles						
	Χρόνος ζύμωσης (h)	Κλάσμα (%)	C16: 0	C18: 0	^{Δ9} C18: 1	^{Δ9,12} C18: 2
NL	48	80,7	32,2	12,3	44,2	9,7
	216	77,7	37,2	10,6	41,6	8,4
G+S	48	13,3	30,9	13,1	43,4	6,2
	216	14,1	35,4	15,8	38,9	8,9
P	48	6,0	36,6	15,9	39,9	6,3
	216	8,2	33,5	12,6	42,6	6,6

3.1.7. Ασυνεχείς ζυμώσεις σε υπόστρωμα γλυκερόλης σε βιοαντιδραστήρα

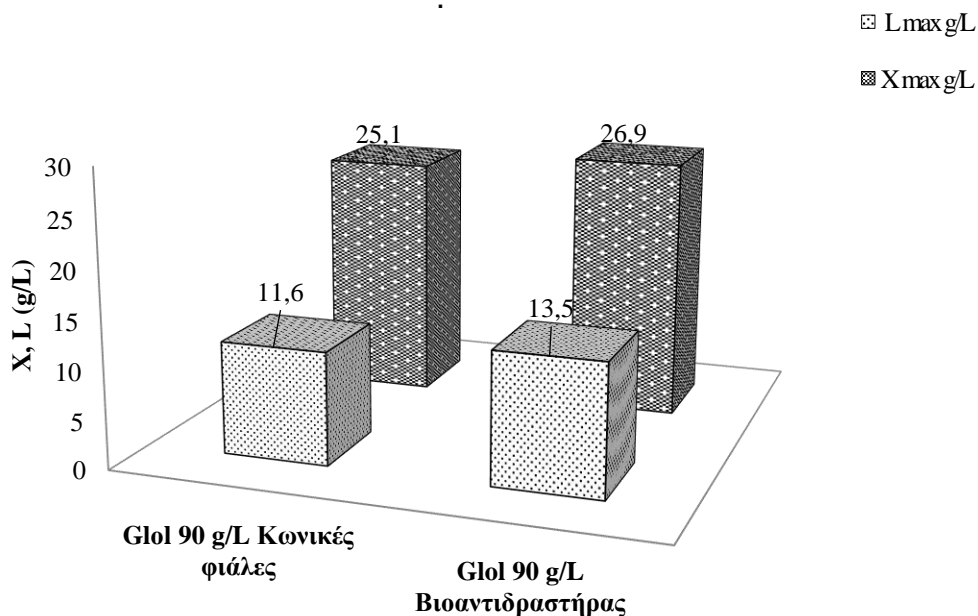
Η ζύμωση με αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης ~90 g/L πραγματοποιήθηκε εν συνεχεία σε βιοαντιδραστήρα, διατηρώντας τις ίδιες συνθήκες όπως το προηγούμενο πείραμα που πραγματοποιήθηκε σε κωνικές φιάλες. Η διάρκεια της ζύμωσης μειώθηκε στο μισό σε σύγκριση με τις κωνικές φιάλες καθώς το υπόστρωμα καταναλώθηκε πλήρως στις 176 h, σε συνάφεια με τη βιβλιογραφία όπου δεικνύεται σε γενικές γραμμές ότι επιτυγχάνεται καλύτερη και ταχύτερη παραγωγή βιομάζας στην καλλιέργεια βιοαντιδραστήρα σε σχέση με τις αναδεδυόμενες φιάλες (Athenaki *et al.*, 2018; Diamantopoulou *et al.*, 2020b). Γενικώς οι καλλιέργειες των ελαιογόνων ζυμών σε συστήματα καλώς αναδεδυμένων και αεριζόμενων βιοαντιδραστήρων, θεωρούνται ιδανικές για τη μεγιστοποίηση της παραγωγής μικροβιακών ελαίων (Ratledge and Wynn, 2002; Papanikolaou and Aggelis, 2011a; 2011b; Athenaki *et al.*, 2018). Οι μέγιστες τιμές παραγόμενης βιομάζας και λιπιδίων σημείωσαν αύξηση σε σχέση με τις κωνικές φιάλες στο τέλος της ζύμωσης φτάνοντας τα 26,8 g/L και 13,5 g/L αντίστοιχα. Η μέγιστη ποσοστιαία περιεκτικότητα της βιομάζας σε λίπος ήταν ~50%, w/w, ενώ οι μέγιστες αποδόσεις βιομάζας και λιπιδίων ήταν 0,56 g/g και 0,16 g/g αντίστοιχα, οι οποίες δεν έδειξαν να επηρεάζονται σημαντικά σε σύγκριση με το πείραμα που διεξήχθη σε κωνικές φιάλες. Τέλος η πορεία του ποσοστού των ενδοπολυσακχαριτών ήταν όμοια με τις κωνικές φιάλες και εμφάνισε τη μέγιστη τιμή του στην αρχή της ζύμωσης ~46%, w/w, ενώ μειωνόταν σταδιακά μέχρι το τέλος της ζύμωσης, ~12%, w/w.

Στην Εικόνα που ακολουθεί παρουσιάζεται η κινητική της αύξησης του στελέχους *R. toruloides* NRRL Y-27012, η κατανάλωση του υποστρώματος καθώς επίσης και η παραγωγή βιομάζας, λιπιδίων και IPS/X με αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης ~90 g/L σε βιοαντιδραστήρα.

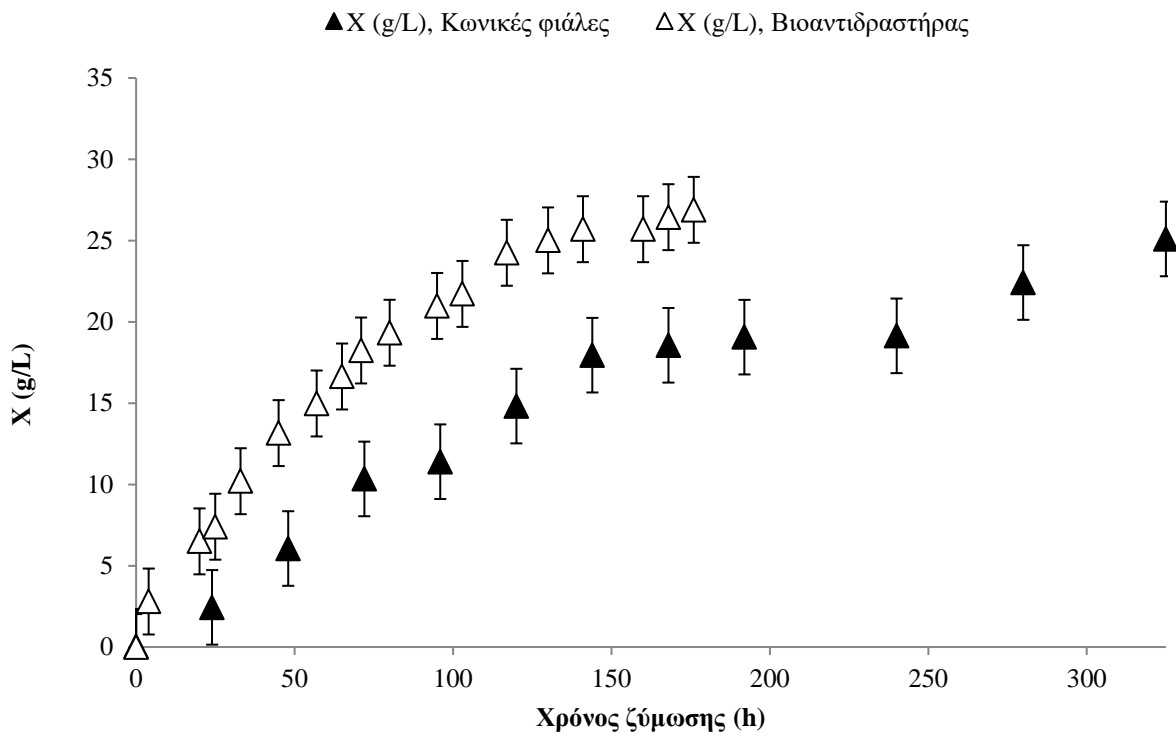


Εικόνα 3.8. Κινητική της κατανάλωσης γλυκερόλης (Glol, g/L), της παραγωγής βιομάζας (X, g/L), λίπους (L, g/L) και ενδοπολυσακχαριτών ανά παραγόμενη βιομάζα (IPS/X, %, w/w) κατά τη διάρκεια καλλιέργειας του μικροοργανισμού *Rhodosporidium toruloides* NRRL Y-27012 σε ζύμωση κλειστού τύπου σε βιοαντιδραστήρα σε αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης 90 g/L. Συνθήκες καλλιέργειας: ανάδευση 180±5 rpm, θερμοκρασία 28±1 °C, pH 5,5. Κάθε σημείο αποτελεί μέσο όρο 2 ανεξάρτητων επαναλήψεων και το σχετικό τυπικό σφάλμα για τα περισσότερα από τα σημεία της ζύμωσης προσδιορίστηκε σε ≤18%.

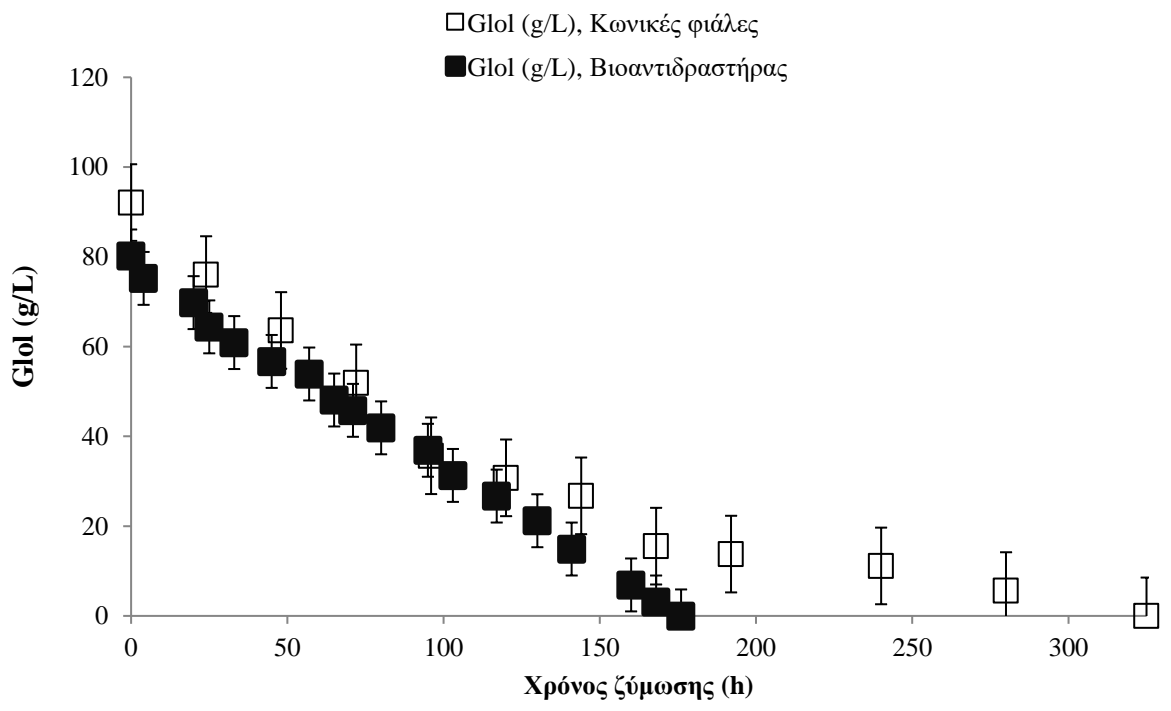
Στην Εικόνα που ακολουθεί παρουσιάζεται η συγκέντρωση της παραγόμενης βιομάζας και των παραγόμενων λιπιδίων για τις δύο ασυνεχείς καλλιέργειες που πραγματοποιήθηκαν σε κωνικές φιάλες και σε βιοαντιδραστήρα με αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης 90 g/L.



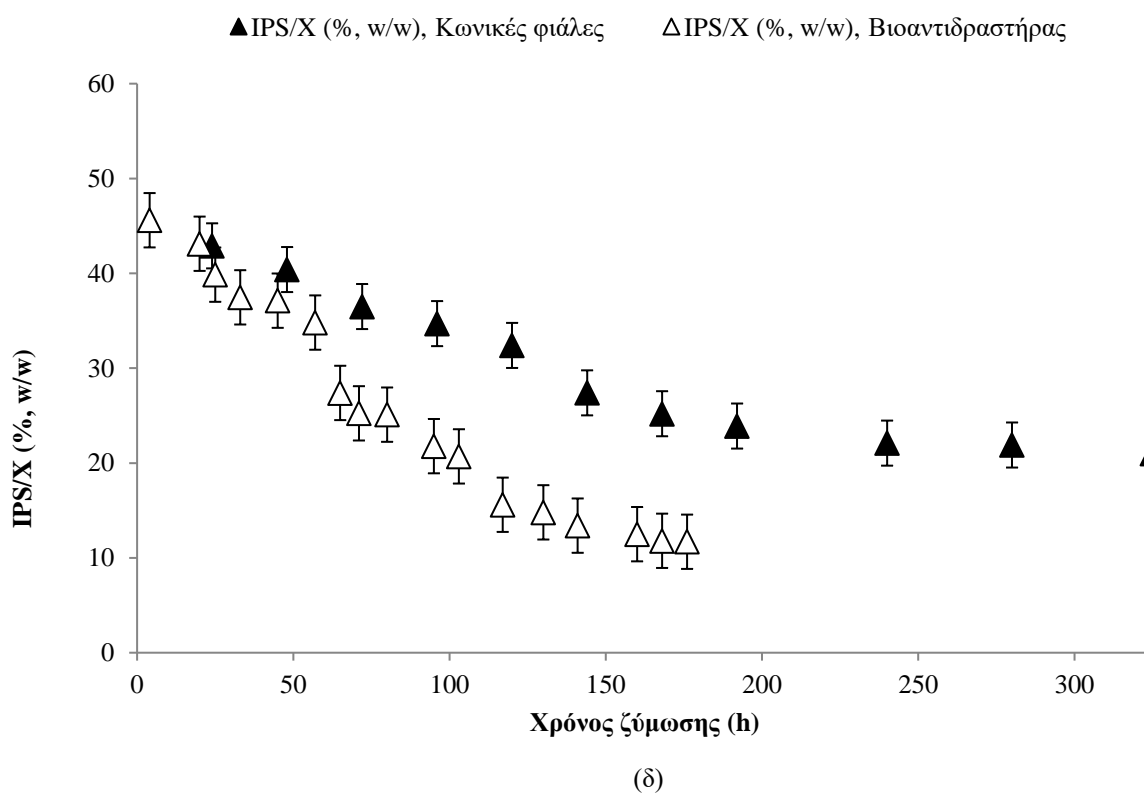
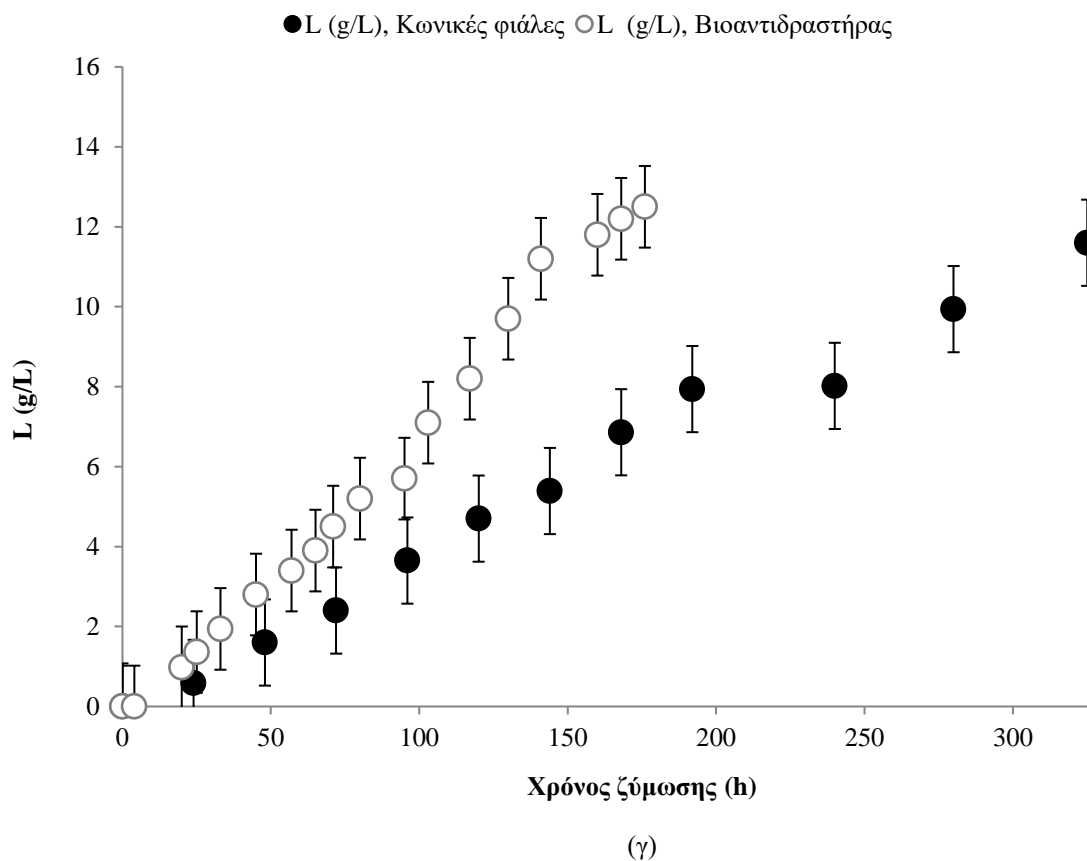
Εικόνα 3.9. Σύγκριση της τελικής συγκέντρωσης παραγόμενης βιομάζας και παραγόμενων λιπιδίων του μικροοργανισμού *Rhodosporidium toruloides* NRRL Y-27012 σε ασυνεχείς ζυμώσεις σε κωνικές φιάλες και βιοαντιδραστήρα σε αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης 90 g/L. Συνθήκες καλλιέργειας: ανάδευση 180±5 rpm, θερμοκρασία 28±1 °C, pH 5,5. Κάθε σημείο αποτελεί μέσο όρο 2 ανεξάρτητων επαναλήψεων και το σχετικό τυπικό σφάλμα για τα περισσότερα από τα σημεία της ζύμωσης προσδιορίστηκε σε ≤18%.

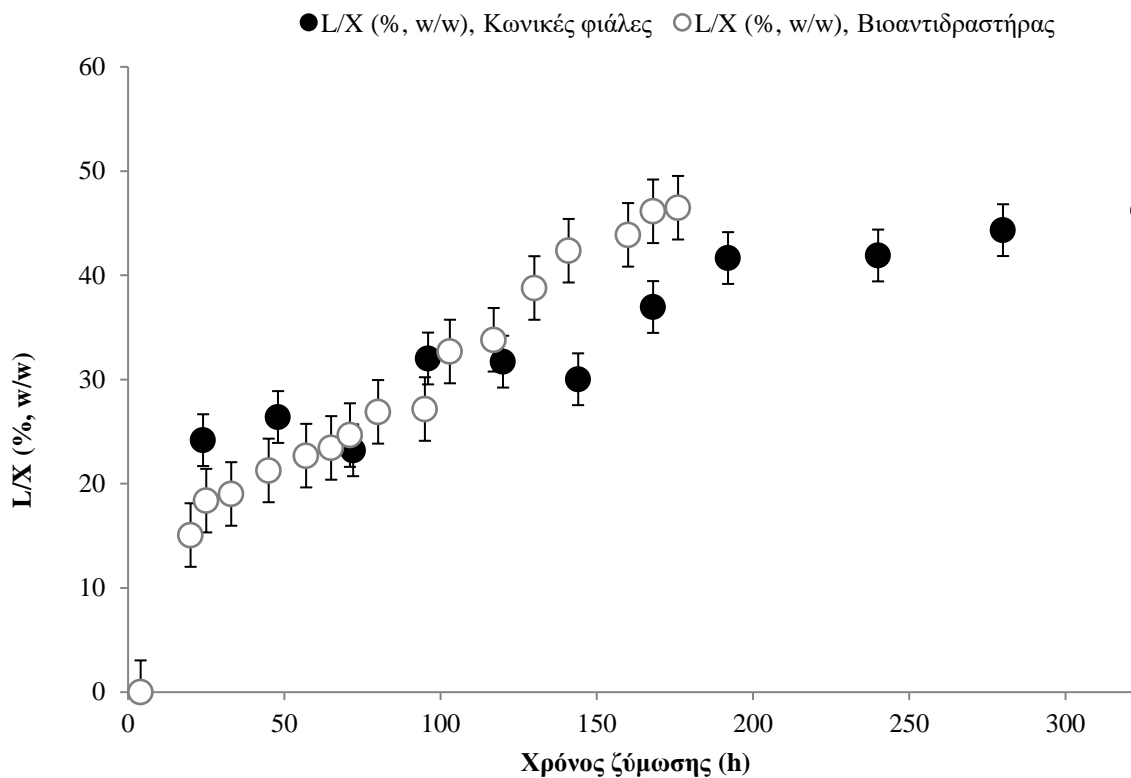


(α)



(β)





(ε)

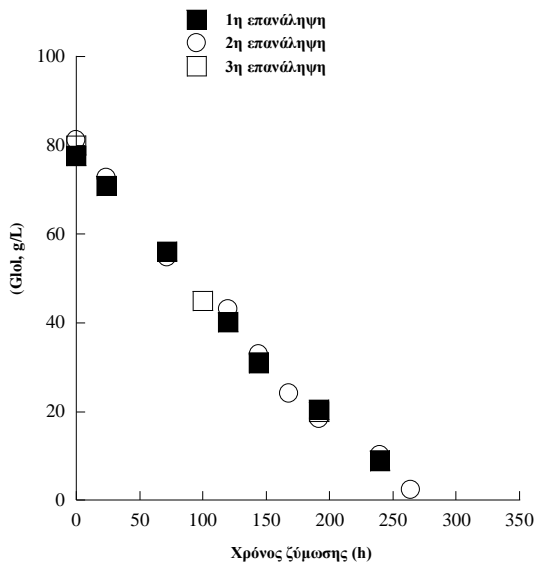
Εικόνα 3.10. Κινητική της παραγωγής βιομάζας (X , g/L) (α), της κατανάλωσης γλυκερόλης (Glol, g/L) (β), της παραγωγής λίπους (L , g/L) (γ) ενδοπολυσακχαριτών ανά παραγόμενη βιομάζα (IPS/ X , %, w/w) (δ) και ποσοστού λίπους επί ξηράς ουσίας (L/X , %, w/w) (ε) κατά τη διάρκεια καλλιέργειας του μικροοργανισμού *Rhodosporidium toruloides* NRRL Y-27012 σε ζύμωση κλειστού τύπου σε βιοαντιδραστήρα και κωνικές φιάλες σε αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης 90 g/L. Συνθήκες καλλιέργειας: ανάδευση 180 ± 5 rpm, θερμοκρασία 28 ± 1 °C, pH 5,5. Κάθε σημείο αποτελεί μέσο όρο 2 ανεξάρτητων επαναλήψεων και το σχετικό τυπικό σφάλμα για τα περισσότερα από τα σημεία της ζύμωσης προσδιορίστηκε σε $\leq 18\%$.

3.2. Αποτελέσματα ζυμώνσεων του στελέχους *Debaryomyces* sp FMCC Y₆₉

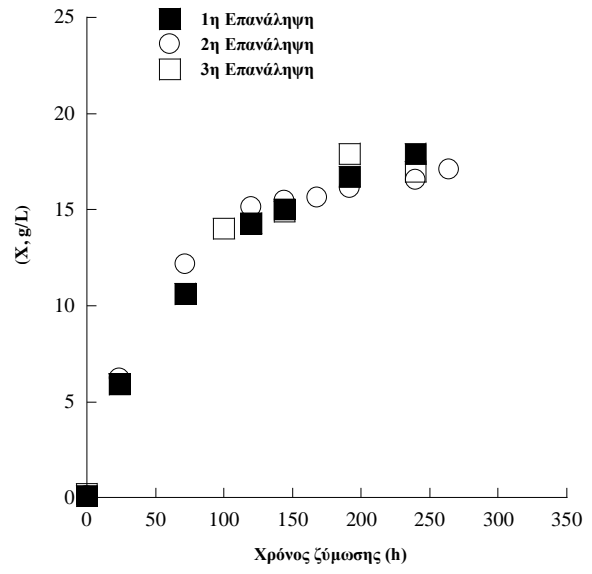
3.2.1. Ασυνεχείς ζυμώνσεις σε σύστημα αναδεδυόμενων κωνικών φιαλών–Επαναληψιμότητα αποτελεσμάτων

Σε πρώτο επίπεδο, προκειμένου να αξιολογηθεί η επαναληψιμότητα των δοκιμών, πραγματοποιήθηκε πείραμα χρησιμοποιώντας το μικροοργανισμό *Debaryomyces* sp FMCC Y₆₉ με αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης (G10₀) ~80 g/L, και αρχική συγκέντρωση εκχυλίσματος ζύμης και πεπτόνης 1,0 και 2,0 g/L αντίστοιχα, σε τρεις διαφορετικές επαναλήψεις, με τρία διαφορετικά αρχικά εμβόλια. Τα αποτελέσματα σε σχέση με την εξέλιξη της εναπομένουσας γλυκερόλης, της παραχθείσας βιομάζας, της παραχθείσας αραβιτόλης, των συσσωρευθέντων λιπιδίων και των συσσωρευθέντων ενδοπολυσακχαριτών παρουσιάζονται στις Εικόνες 3.11. α-ε. Περαιτέρω, στις 144 h ζύμωσης, τρία πειραματικά σημεία έλαβαν χώρα. Για τη συνολική βιομάζα (X), η μέγιστη και η ελάχιστη τιμή ήταν 14,9 και 15,5 g/L, η μέση τιμή ήταν 15,1 g/L, η τυπική απόκλιση ήταν 0,310, το τυπικό σφάλμα ήταν 0,179 και η διακύμανση ήταν 0,096. Για τη γλυκερόλη (G101), η μέγιστη και η ελάχιστη τιμή ήταν 32,9 και 30,9 g/L, η μέση τιμή ήταν 31,6 g/L, η τυπική απόκλιση ήταν 1,162, το τυπικό σφάλμα ήταν 0,670 και η διακύμανση ήταν 1,349. Για την αραβιτόλη (Ara), η μέγιστη και η ελάχιστη τιμή ήταν 12,8 και 16,2 g/L, η μέση τιμή ήταν 14,6 g/L, η τυπική απόκλιση ήταν 1,729, το τυπικό σφάλμα ήταν 0,998 και η διακύμανση ήταν 2,991. Για τα συνολικά λιπίδια (L), η μέγιστη και η ελάχιστη τιμή ήταν 1,2 και 1,5 g/L, η μέση τιμή ήταν 1,3 g/L, η τυπική απόκλιση ήταν 0,346, το τυπικό σφάλμα ήταν 0,094 και η διακύμανση ήταν 0,027. Τέλος για τους συνολικούς ενδοκυτταρικούς πολυσακχαρίτες (IPS), η μέγιστη και η ελάχιστη τιμή ήταν 6,5 και 4,6 g/L, η μέση τιμή ήταν 5,5 g/L, η τυπική απόκλιση ήταν 0,165, το τυπικό σφάλμα ήταν 0,546 και η διακύμανση ήταν 0,895. Για τις περισσότερες από τις ανωτέρω τιμές συνεπώς, το σχετικό τυπικό σφάλμα (=Τυπική απόκλιση/μέση τιμή %, SE) είναι $\leq 18\%$.

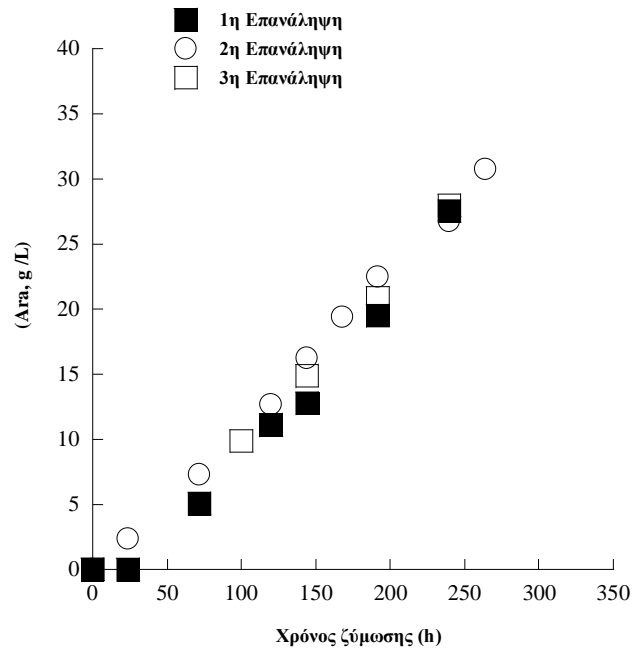
Σε όλα τα πειράματα τα οποία έγιναν εφεξής, όλες οι τιμές οι οποίες εμφανίζονται στα γραφήματα και στους πίνακες, αποτελούν το μέσο όρο 2 ανεξαρτήτων επαναλήψεων, οι οποίες πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας διαφορετικά εμβόλια. Και στα επόμενα εδάφια, για τις περισσότερες από τις τιμές οι οποίες θα εμφανίζονται, το σχετικό τυπικό σφάλμα θα είναι $\leq 18\%$.



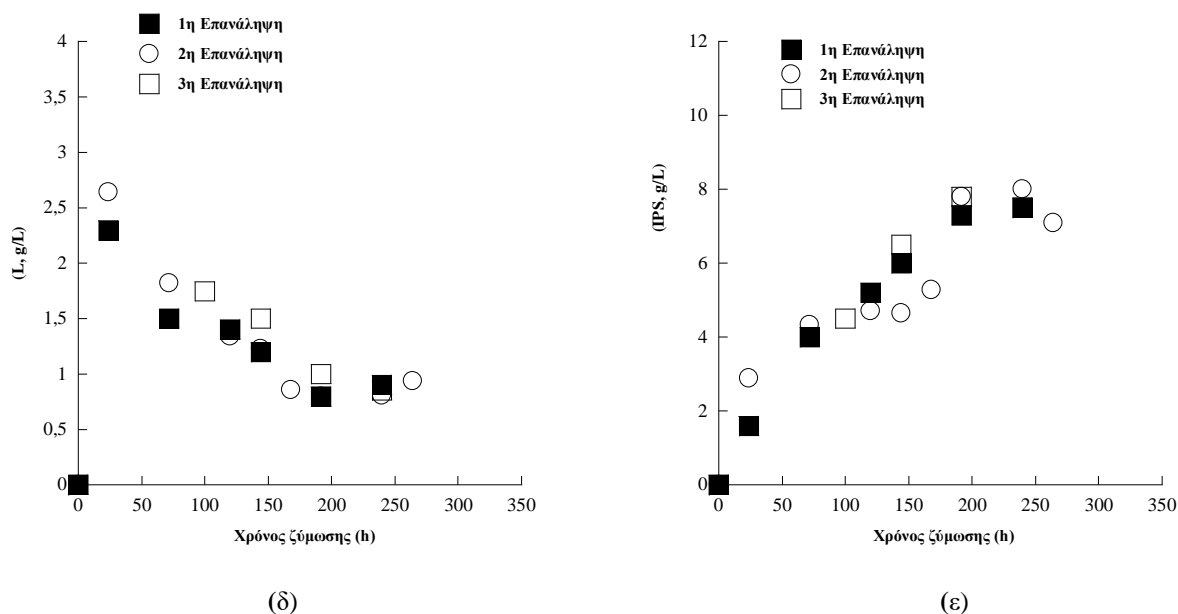
(α)



(β)



(γ)



Εικόνα 3.11. Κινητική της κατανάλωσης γλυκερόλης (Glol, g/L) (α), της παραγωγής βιομάζας (X, g/L) (β), αραβιτόλης (Ara, g/L) (γ), λίπους (L, g/L) (δ) και ενδοπολυσακχαριτών (IPS, g/L) (ε) κατά τη διάρκεια καλλιέργειας του μικροοργανισμού *Debaryomyces prosopidis* σε ασυνεχή ζύμωση σε κωνικές φιάλες σε αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης 80 g/L σε τρεις επαναλήψεις. Συνθήκες καλλιέργειας: ανάδευση 180±5 rpm, θερμοκρασία 30±1 °C, pH 5,5.

3.2.2. Ταυτοποίηση στελέχους

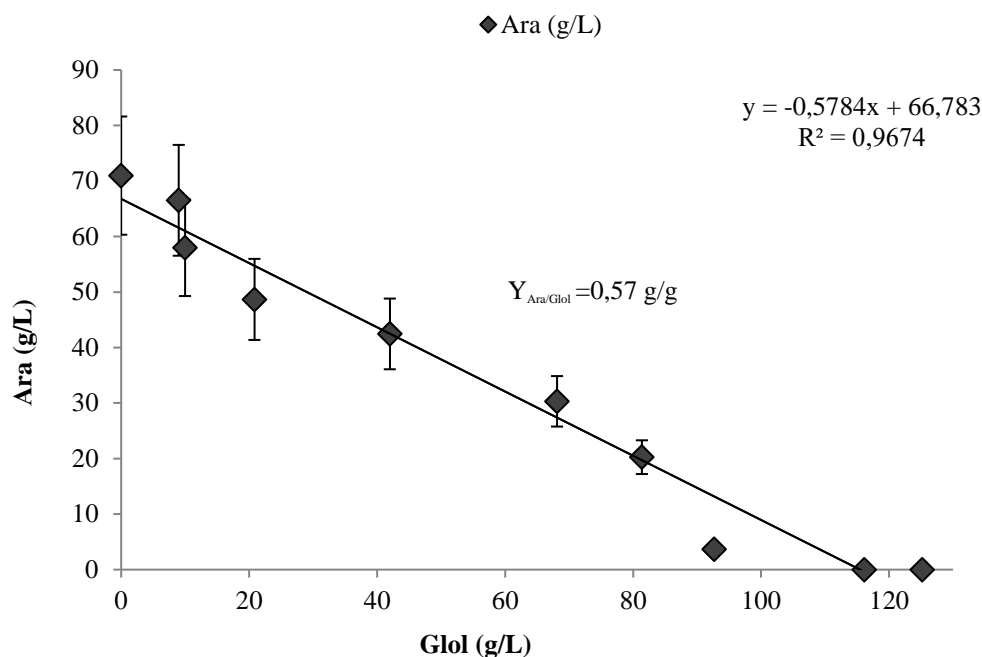
Η ζύμη του γένους *Debaryomyces* sp. καλλιεργήθηκε αρχικά σε μέσο που περιείχε 50%, w/v γλυκόζη. Η πιθανή αύξηση του στελέχους στο εν λόγω θρεπτικό μέσο θα κατέτασσε τον υπό μελέτη μικροοργανισμό στο είδος *D. prosopidis* ενώ η αδυναμία αύξησης του θα συνεπαγόταν ότι ο μικροοργανισμός ανήκει στο είδος *D. hansenii* ή *D. fabryi* ή *D. subglobosus* (Lopandic *et al.*, 2013). Τα δεδομένα που προέκυψαν έδειξαν ικανοποιητική αύξηση του μικροοργανισμού στο συγκεκριμένο υπόστρωμα και παραγωγή αραβιτόλης. Πιο συγκεκριμένα, το πείραμα σε 50%, w/v αρχικής συγκέντρωσης γλυκόζης κατέληξε σε σύνθεση βιομάζας 14,5 g/L και παραγωγή αραβιτόλης 38,1 g/L μετά από 280 h ζύμωσης ενώ η κατανάλωση γλυκόζης έφτασε σε ποσοστό ~20%, w/w (σε εκείνο το σημείο ζύμωσης η συγκέντρωση γλυκόζης που καταναλώθηκε ήταν ίση με 101,2 g/L). Το αφομοιώσιμο άζωτο, το οποίο παρουσιάζεται υπό τη μορφή του FAN (αρχική συγκέντρωση ~70 mg/L) είχε σχεδόν εξαντληθεί πλήρως 30 h μετά από τον εμβολιασμό (τότε η συγκέντρωση του FAN ήταν=14,5 mg/L) ενώ η παραγωγή αραβιτόλης ξεκίνησε μετά από αυτό το σημείο. Μετά από 280 h, η συγκέντρωση FAN προσδιορίστηκε σε ~10 mg/L, υποδεικνύοντας ότι ο περιορισμός του αζώτου έλαβε χώρα όταν η συγκέντρωση του FAN ήταν εντός των ορίων ~12 mg/L. Με βάση τα προαναφερθέντα αποτελέσματα, προέκυψε το συμπέρασμα ότι το στέλεχος της ζύμης που απομονώθηκε ανήκει στο είδος *D. prosopidis*.

3.2.3. Ασυνεχείς ζυμώσεις σε υπόστρωμα γλυκερόλης σε κωνικές φιάλες

Η ζύμη *D. prosopidis* αρχικά καλλιεργήθηκε σε ζύμωση κλειστού τύπου σε κωνικές φιάλες χρησιμοποιώντας τη γλυκερόλη ως τη μοναδική πηγή άνθρακα με αρχική συγκέντρωση 80 g/L. Η αύξηση της ζύμης πραγματοποιήθηκε σε περιοριστικές για το άζωτο συνθήκες, καθώς η αρχική συγκέντρωση του αζώτου (FAN) ήταν ~100 mg/L και μετά από 40 h μειώθηκε σε ~20 mg/L. Η διάρκεια της ζύμωσης ήταν 408 h και η τελική συγκέντρωση του παραχθέντος προϊόντος (αραβιτόλη–Ara) ήταν ίση με 38,5 g/L, με την απόδοση να φτάνει τα 0,48 g/g. Με βάση τη βιβλιογραφία (Diamantopoulou and Papanikolaou, 2023), η αρχική συγκέντρωση της γλυκερόλης αποτελεί σημαντικό παράγοντα για την παραγωγή αραβιτόλης καθώς σημαντικές ποσότητες της πρώτης στο μέσο καλλιέργειας δημιουργούν συνθήκες ωσμωτικής πίεσης που ευνοούν την παραγωγή της δεύτερης.

Έτσι, στη συνέχεια ακολούθησε μία ακόμη ζύμωση κλειστού τύπου σε κωνικές φιάλες με αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης 125 g/L, με στόχο τη μελέτη της επίδρασης της συγκέντρωσης της γλυκερόλης στην αύξηση της ζύμης αλλά και στη παραγωγή αραβιτόλης. Ο Πίνακας 3.13. απεικονίζει την επίδραση δύο αρχικών συγκεντρώσεων γλυκερόλης (~80 g/L και ~125 g/L) στην κυτταρική αύξηση και τη συγκέντρωση αραβιτόλης κατά τη διάρκεια ζυμώσεων σε ωσμώφιλο περιβάλλον με υψηλή συγκέντρωση γλυκερόλης του *D. prosopidis*, στις οποίες η αρχική συγκέντρωση αζώτου παρέμεινε σταθερή (οι αρχικές συγκεντρώσεις των αζωτούχων ενώσεων ήταν 2,0 g/L πεπτόνη και 1,0 g/L εκχύλισμα ζύμης). Προσδιορίστηκε επίσης η παραγωγή μικροβιακού λίπους και ενδοπολυσακχαριτών (IPS). Τρία διαφορετικά σημεία παρατίθενται για κάθε ζύμωση που αντιπροσωπεύουν τις μέγιστες συγκεντρώσεις για τα ενδοκυτταρικά ολικά σάκχαρα (IPS), για τα ολικά λιπίδια και για την αραβιτόλη. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, η εφαρμογή δύο αρχικών συγκεντρώσεων γλυκερόλης οδήγησε σε σημαντικές διαφορές ως προς την απόδοση και τη συγκέντρωση αραβιτόλης. Πιο συγκεκριμένα, η υψηλότερη συγκέντρωση αραβιτόλης (70,9 g/L) επιτεύχθηκε στη ζύμωση με 125,0 g/L αρχικής γλυκερόλης σε συνδυασμό με την υψηλότερη απόδοση προϊόντος ως προς το αναλωθέν υπόστρωμα ($Y_{Ara/Glcl}=0,57$ g/g). Το μικροβιακό στέλεχος έδειξε καλή δυνατότητα μεταβολισμού της γλυκερόλης με συνολική κατανάλωση 100%, w/w μετά από 520 h ζύμωσης. Οι αντίστοιχες τιμές με 80,0 g/L αρχικής γλυκερόλης ήταν 38,5 g/L, με απόδοση 0,48 g/g και κατανάλωση γλυκερόλης 100%, w/w. Θα πρέπει επίσης να σημειωθεί ότι η αύξηση της συγκέντρωσης της γλυκερόλης στο θρεπτικό μέσο δεν επηρέασε τη μέγιστη παραγωγή ξηράς βιομάζας της ζύμης καθώς η τελική συγκέντρωση της βιομάζας ήταν αντίστοιχη με αυτή στη ζύμωση με 80 g/L αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης. Η μέγιστη τιμή της βιομάζας ήταν και στις δύο περιπτώσεις ίση με ~16 g/L. Όσον αφορά την εκατοστιαία αναλογία των ενδοπολυσακχαριτών αυτή κυμάνθηκε και στις δύο παραπάνω ζυμώσεις στις τιμές 20-40%, w/w παραμένοντας σχεδόν σταθερή καθ' όλη τη διάρκεια των ζυμώσεων (Πίνακας 3.13.).

Η Εικόνα 3.12. απεικονίζει το συνολικό συντελεστή απόδοσης της παραγόμενης αραβιτόλης ανά μονάδα αναλυσκομένης γλυκερόλης ($Y_{Ara/Glcl}$), σε ζύμωση που πραγματοποιήθηκε με 125 g/L αρχικής γλυκερόλης διάρκειας 520 ωρών, ο οποίος έλαβε την ιδιαίτερα ενδιαφέρουσα τιμή των ~0,57 g/g.



Εικόνα 3.12. Γραφική απεικόνιση του συντελεστή απόδοσης της παραγόμενης αραβιτόλης ($Y_{Ara/Glcl}$, g/g) ανά καταναλωθείσα γλυκερόλη κατά τη διάρκεια καλλιέργειας του μικροοργανισμού *Debaryomyces prosopidis* σε ασυνεχή ζύμωση σε κωνικές φιάλες σε αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης 125 g/L. Συνθήκες καλλιέργειας: ανάδευση 180 ± 5 rpm, θερμοκρασία 30 ± 1 °C, pH 5,5. Κάθε σημείο αποτελεί μέσο όρο 2 ανεξάρτητων επαναλήψεων και το σχετικό τυπικό σφάλμα για τα περισσότερα από τα σημεία της ζύμωσης προσδιορίστηκε σε $\leq 18\%$.

Η ζύμωση ξεκίνησε με περίπου ~65 mg/L αρχικής συγκέντρωσης FAN, ενώ το άζωτο έγινε περιοριστικό για την αύξηση κατά το πρώτο στάδιο του πειράματος, όταν η συγκέντρωση FAN μειώθηκε σε ~10 mg/L μετά από 40 h. Η αραβιτόλη παρήχθη ταυτόχρονα με περιορισμό αζώτου που επιβλήθηκε στο μέσο. Ο ρυθμός παραγωγής της αραβιτόλης ήταν σταθερός καθ' όλη τη διάρκεια της ζύμωσης ενώ έφτασε στη μέγιστη τιμή του μετά από 480 h.

Η συσσώρευση ενδοκυτταρικών λιπιδίων σε απόλυτες τιμές ήταν σχετικά χαμηλή καθ' όλη τη διάρκεια της ζύμωσης και στις δύο περιπτώσεις (μέγιστη συγκέντρωση λιπιδίων- L_{max} έως 1,3 g/L). Το αφομοιώσιμο άζωτο σχεδόν εξαντλήθηκε μετά από 40 ώρες ζύμωσης, με τελική συγκέντρωση FAN ~12 mg/L, ενώ συγκέντρωσή του ήταν περίπου ~20 mg/L στις 24 h μετά τον εμβολιασμό, υποδηλώνοντας ότι από το σημείο εκείνο και εφεξής, κυριαρχούσαν περιοριστικές σε άζωτο συνθήκες στην καλλιέργεια. Μάλιστα, παρατηρήθηκε μια μη τυπική ελαιογόνος συμπεριφορά για το μικροοργανισμό *D. prosopidis*, καθώς ότι οι σχετικές τιμές παραγωγής μικροβιακού λίπους κυμάνθηκαν μεταξύ 16,6-20,9%, w/w στο πρώτο και πρώιμο στάδιο της ζύμωσης (24 h) παρά το γεγονός ότι το άζωτο δεν ήταν ο περιοριστικός παράγοντας για τη μικροβιακή αύξηση στη συγκεκριμένη φάση. Οι τιμές L/X έδειξαν φθίνουσα τάση στη συνέχεια, ενώ στο μέσο αύξησης επικρατούσαν συνθήκες περιοριστικές σε άζωτο και η γλυκερόλη αφομοιώθηκε πλήρως.

Πίνακας 3.13. Συγκεντρωτικά αποτελέσματα της κατανάλωσης υποστρώματος ($G_{Iol_{cons}}$, g/L), της παραγωγής βιομάζας (X , g/L), αραβιτόλης (Ara , g/L), λίπους (L , g/L), λίπους επί ξηράς ουσίας (L/X , %, w/w) και ενδοπολυσακχαριτών ανά παραγόμενη βιομάζα (IPS/X , %, w/w), κατά τη διάρκεια ζυμώσεων του μικροοργανισμού *Debaryomyces prosopidis* σε ασυνεχή ζύμωση σε κωνικές φιάλες σε αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης 80 g/L και 125 g/L. Συνθήκες καλλιέργειας: ανάδευση 180 ± 5 rpm, θερμοκρασία 30 ± 1 °C, pH 5,5. Κάθε σημείο αποτελεί μέσο όρο 2 ανεξάρτητων επαναλήψεων και το σχετικό τυπικό σφάλμα για τα περισσότερα από τα σημεία της ζύμωσης προσδιορίστηκε σε $\leq 18\%$.

G_{Iol_0} (g/L)	Χρόνος ζύμωσης (h)	$G_{Iol_{cons}}$ (g/L)	X (g/L)	L (g/L)	Ara (g/L)	IPS/X (%, w/w)	$Y_{Ara/G_{Iol}}$ (g/g)
~80 g/L	216	42,9	15,6	0,8	22,7	40,9	0,53
	408	80,3	15,9	0,9	38,5	38,2	0,48
~125 g/L	312	58,1	15,4	1,1	32,5	29,2	0,39
	520	125,2	16,9	0,8	70,9	28,5	0,57

Συντομογραφίες:

X : η παραγόμενη βιομάζα (g/L)

Ara : η παραγόμενη αραβιτόλη (g/L)

L : το παραγόμενο ενδοκυτταρικό λίπος (g/L)

$G_{Iol_{cons}}$: καταναλωθείσα γλυκερόλη (g/L)

$Y_{Ara/G_{Iol}}$: συντελεστής απόδοσης παραγωγής αραβιτόλης προς καταναλωθέν υπόστρωμα (g/g)

IPS/X : τιμή παραγόμενων ενδοπολυσακχαριτών ανά παραγόμενη βιομάζα (%, w/w)

3.2.4. Ασυνεχείς ζυμώσεις σε υπόστρωμα γλυκερόλης σε βιοαντιδραστήρα

Οι ζυμώσεις με αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης ~80 g/L και ~125 g/L πραγματοποιήθηκαν στη συνέχεια σε βιοαντιδραστήρα στις ίδιες συνθήκες με αυτές που πραγματοποιήθηκαν στις κωνικές φιάλες. Η ζύμωση ξεκίνησε με περίπου ~70 mg/L αρχικής συγκέντρωσης FAN, ενώ το άζωτο φαινόταν να γίνεται περιοριστικό για την αύξηση κατά το πρώτο στάδιο του πειράματος, όταν η συγκέντρωση FAN ήταν ~10-15 mg/L μετά από 35 h. Η αραβιτόλη παρήχθη όταν περιορισμός αζώτου εφαρμόστηκε και εμφανίστηκε στο μέσο καλλιέργειας. Μετά από την ταχεία εξάντληση του αφομοιώσιμου αζώτου από το μέσο ζύμωσης (μετά από χρόνο επώασης ~35 h), σημειώθηκε σταθερή τιμή βιομάζας καθ' όλη τη διάρκεια της ζύμωσης. Η παραγωγή IPS/X προσδιορίστηκε μεταξύ ~20-40%, w/w επί της ξηρής μάζας στη συγκέντρωση G_{Iol} ~80 g/L και 20-32%, w/w στη συγκέντρωση G_{Iol} ~125 g/L, μετά από 104 ώρες και 150 ώρες ζύμωσης, αντίστοιχα. Η συσσώρευση ενδοπολυσακχαριτών δεν παρουσίασε διακύμανση κατά την πορεία της ζύμωσης εφόσον το ποσοστό τους παρέμενε σταθερό κατά τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας.

Στη χαμηλότερη αρχική συγκέντρωση υποστρώματος στο τέλος της ζύμωσης στις 104 h, παρήχθησαν ~36 g/L αραβιτόλης με μέγιστη απόδοση προϊόντος $Y_{Ara/G_{Iol}}=0,47$ g/g. Στην υψηλότερη συγκέντρωση γλυκερόλης η τελική συγκέντρωση του προϊόντος ήταν ~65 g/L με συντελεστή απόδοσης

$Y_{Ara/GloI}=0,53$ g/g. Η αύξηση της συγκέντρωσης της γλυκερόλης δεν επηρέασε ιδιαίτερα την αύξηση της ζύμης, αφού και στις δύο ζυμώσεις η τελική συγκέντρωση της βιομάζας έλαβε την καθόλου ευκαταφρόνητη τιμή των ~27-29 g/L. Τα παραπάνω αποτελέσματα απεικονίζονται στον Πίνακα 3.14. που ακολουθεί στη συνέχεια.

Πίνακας 3.14. Συγκεντρωτικά αποτελέσματα της κατανάλωσης υποστρώματος ($GloI_{cons}$, g/L), της παραγωγής βιομάζας (X, g/L), αραβιτόλης (Ara, g/L), λίπους (L, g/L), συντελεστή απόδοσης αραβιτόλης προς καταναλωθέν υπόστρωμα ($Y_{Ara/GloI}$, g/g) και ενδοπολυσακχαριτών ανά παραγόμενη βιομάζα (IPS/X, %, w/w), κατά τη διάρκεια ζυμώσεων του μικροοργανισμού *Debaryomyces prosopidis* σε ασυνεχή ζύμωση σε βιοαντιδραστήρα σε αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης 80 g/L και 125 g/L. Συνθήκες καλλιέργειας: ανάδευση 180 ± 5 rpm, θερμοκρασία 30 ± 1 °C, pH 5,5. Κάθε σημείο αποτελεί μέσο όρο 2 ανεξάρτητων επαναλήψεων και το σχετικό τυπικό σφάλμα για τα περισσότερα από τα σημεία της ζύμωσης προσδιορίστηκε σε $\leq 18\%$.

$GloI_0$ (g/L)	Χρόνος ζύμωσης (h)	$GloI_{cons}$ (g/L)	X (g/L)	L (g/L)	Ara (g/L)	IPS/X (%, w/w)	$Y_{Ara/GloI}$ (g/g)
~80 g/L	56	70,3	27,0	1,1	19,5	39,6	0,28
	104	76,5	27,1	1,7	36,2	39,1	0,47
~125 g/L	86	92,3	29,1	1,7	46,1	32,5	0,50
	150	124,3	29,2	1,1	65,5	31,6	0,53

Συνομογραφίες:

X: η παραγόμενη βιομάζα (g/L)

Ara: η παραγόμενη αραβιτόλη (g/L)

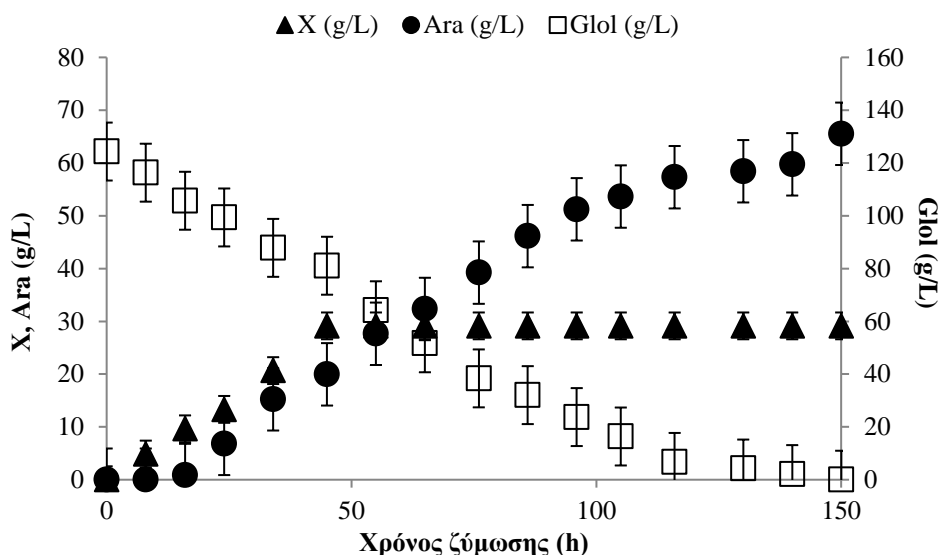
L: το παραγόμενο ενδοκυτταρικό λίπος (g/L)

$GloI_{cons}$: καταναλωθείσα γλυκερόλη (g/L)

$Y_{Ara/GloI}$: συντελεστής απόδοσης παραγωγής αραβιτόλης προς καταναλωθέν υπόστρωμα (g/g)

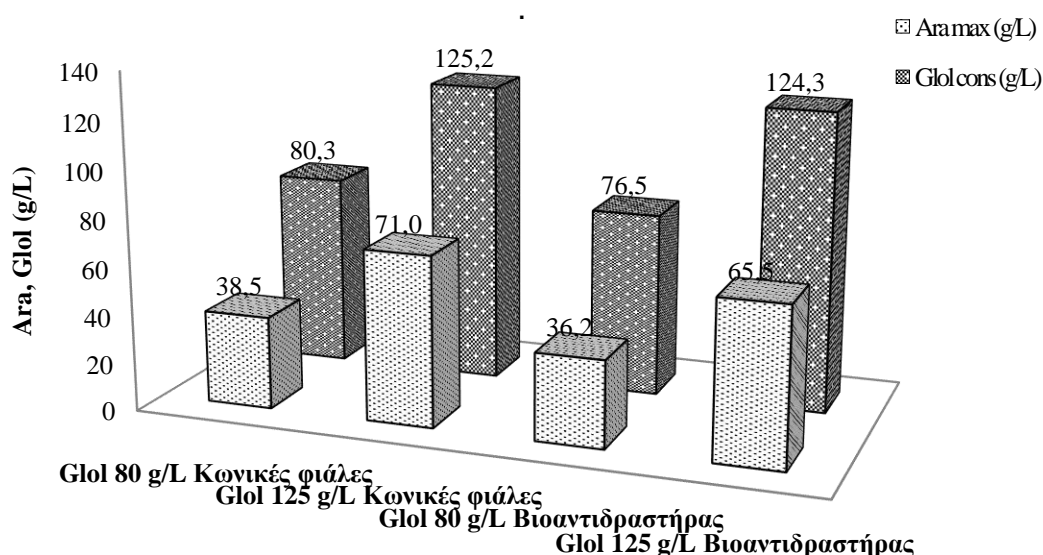
IPS/X: τιμή παραγόμενων ενδοπολυσακχαριτών ανά παραγόμενη βιομάζα (%, w/w)

Στην Εικόνα 3.13. παρουσιάζεται η κινητική της αύξησης του στελέχους *D. prosopidis*, η κατανάλωση του υποστρώματος καθώς επίσης και η παραγωγή της αραβιτόλης κατά τη διάρκεια της ασυνεχούς καλλιέργειας με αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης ~125 g/L σε κλειστού τύπου βιοαντιδραστήρα εργαστηριακής κλίμακας.



Εικόνα 3.13. Κινητική της κατανάλωσης γλυκερόλης (Glol, g/L), της παραγωγής βιομάζας (X, g/L) και αραβιτόλης (Ara, g/L) κατά τη διάρκεια καλλιέργειας του μικροοργανισμού *Debaryomyces prosopidis* σε ασυνεχή ζύμωση σε βιοαντιδραστήρα σε αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης 125 g/L. Συνθήκες καλλιέργειας: ανάδευση 150 έως 450 rpm, θερμοκρασία 30±1 °C, pH=5,5. Κάθε σημείο αποτελεί μέσο όρο 2 ανεξάρτητων επαναλήψεων και το σχετικό τυπικό σφάλμα για τα περισσότερα από τα σημεία της ζύμωσης προσδιορίστηκε σε ≤18%.

Η Εικόνα που ακολουθεί παρουσιάζει τη συγκέντρωση της καταναλωθείσας γλυκερόλης και της παραγόμενης αραβιτόλης για τις τέσσερις ασυνεχείς καλλιέργειες που πραγματοποιήθηκαν. Όπως παρατηρήθηκε η αύξηση της συγκέντρωσης του υποστρώματος επέδρασε με θετικό τρόπο στην παραγωγή του προϊόντος καθώς στις ζυμώσεις με $Glol_0 \sim 125$ g/L παρατηρήθηκαν οι μέγιστες αποδόσεις προϊόντος τόσο στις κωνικές φιάλες (0,57 g/g) όσο και στο βιοαντιδραστήρα (0,53 g/g).

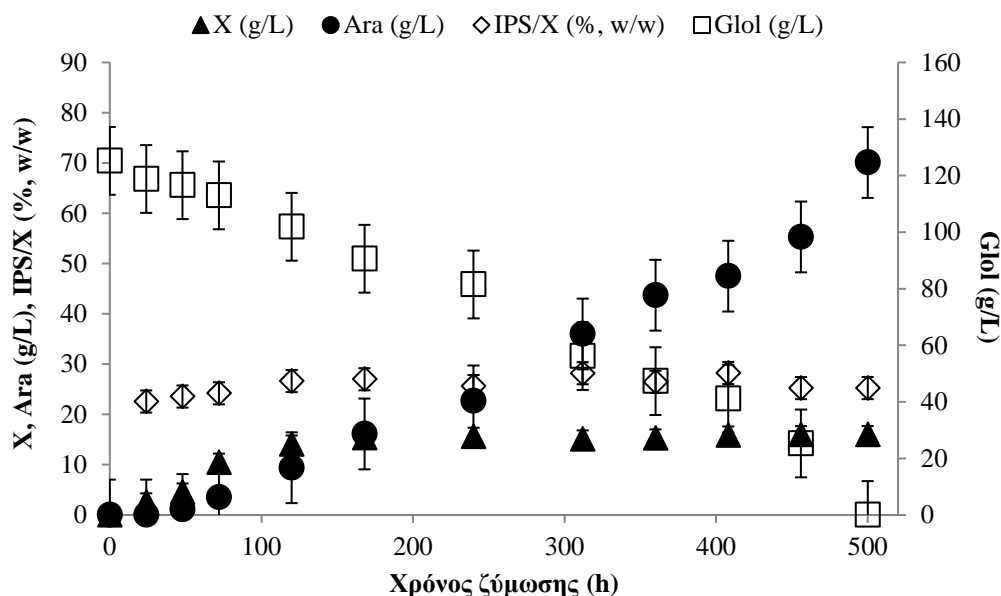


Εικόνα 3.14. Σύγκριση της κατανάλωσης της γλυκερόλης (Glol, g/L) και της μέγιστης τελικής συγκέντρωσης αραβιτόλης (Ara_{max} , g/L) του μικροοργανισμού *Debaryomyces prosopidis* σε ασυνεχείς ζυμώσεις σε κωνικές φιάλες και βιοαντιδραστήρα σε διαφορετικές αρχικές συγκεντρώσεις γλυκερόλης. Συνθήκες καλλιέργειας: ανάδευση 180±5 rpm και 150 έως 450 rpm αντίστοιχα, θερμοκρασία 30±1 °C, pH 5,5. Κάθε σημείο αποτελεί μέσο όρο 2 ανεξάρτητων επαναλήψεων και το σχετικό τυπικό σφάλμα για τα περισσότερα από τα σημεία της ζύμωσης προσδιορίστηκε σε ≤18%.

Από τα παραπάνω πειράματα προέκυψε το συμπέρασμα, ότι η διάρκεια ζύμωσης στο βιοαντιδραστήρα μειώθηκε κατά το 1/3 του χρόνου σε σχέση με τις κωνικές φιάλες και ο ρυθμός κατανάλωσης γλυκερόλης ήταν σαφώς μεγαλύτερος. Επίσης, η αυξημένη παραγωγή βιομάζας στο βιοαντιδραστήρα μπορεί να αποδοθεί στην υψηλή συσσώρευση ενδοπολυσακχαριτών στην ξηρή μάζα, η οποία έλαβε χώρα λόγω του περιορισμού σε άζωτο, όσο η ζύμωση προχωρούσε. Σχετικά με την παραγωγή αραβιτόλης και την απόδοση αυτής τα δύο πειράματα απέδωσαν παρόμοια αποτελέσματα με τη μέγιστη τελική συγκέντρωση προϊόντος να εμφανίζεται στο πείραμα σε κωνικές φιάλες. Αντιθέτως, παρατηρήθηκε διαφορά στην παραγωγικότητα της αραβιτόλης, η οποία σημείωσε αρκετά υψηλότερη τιμή στο βιοαντιδραστήρα ($Q_p=0,43$ g/L/h) συγκριτικά με τις φιάλες ($Q_p=0,15$ g/L/h).

3.2.5. Αξιολόγηση της επίδρασης του pH σε ασυνεχείς ζυμώσεις

Ένας από τους βασικότερους παράγοντες που μπορεί να επηρεάσει τη σύνθεση των πολυολών σύμφωνα με τη διεθνή βιβλιογραφία είναι το pH στο μέσο της καλλιέργειας (Tomaszewska *et al.*, 2012; Kordowska *et al.*, 2015; Vastaroucha *et al.*, 2024). Για το λόγο αυτό πραγματοποιήθηκαν τρεις ζυμώσεις κλειστού τύπου σε κωνικές φιάλες σε τρεις διαφορετικές τιμές pH (3,5; 5,5; 7,5) με στόχο τον προσδιορισμό της βέλτιστης τιμής αυτού. Το pH 5,5 αποτέλεσε τη ζύμωση μάρτυρα λόγω των ικανοποιητικών αποτελεσμάτων που έδωσε σε προηγούμενα πειράματα. Σε όλες τις ζυμώσεις χρησιμοποιήθηκε ως πηγή άνθρακα η γλυκερόλη σε αρχική συγκέντρωση ~125 g/L. Οι πηγές αζώτου που χρησιμοποιήθηκαν ήταν πεπτόνη σε συγκέντρωση 2,0 g/L και εκχύλισμα ζύμης σε συγκέντρωση 1,0 g/L. Το άζωτο σε όλες τις περιπτώσεις καταναλώθηκε μέσα στις πρώτες 72 h. Η πρώτη καλλιέργεια πραγματοποιήθηκε σε pH 3,5 που σύμφωνα με τη βιβλιογραφία δύναται να επάγει τη σύνθεση πολυολών (Al-qaysi *et al.*, 2017). Ωστόσο Στη συγκεκριμένη περίπτωση, παρατηρήθηκε μειωμένη παραγωγή αραβιτόλης (~39 g/L) σε σχέση με το μάρτυρα (Πίνακας 3.15.). Επίσης η απόδοση του παραγόμενου προϊόντος σημείωσε τη μικρότερη τιμή ($Y_{Ara/Glcl} \sim 0,45$ g/g) συγκριτικά με τις τρεις δοκιμές ενώ η παραγωγικότητα ήταν ίση με $Q_p=0,08$ g/L/h και 40,7 g/L γλυκερόλης παρέμεναν ακατανάλωτα στις 520 h ζύμωσης. Όσον αφορά στην παραγωγή της αραβιτόλης, στη ζύμωση με pH 7,5 η τελική συγκέντρωση προϊόντος ήταν ~57g/L με υψηλή απόδοση $Y_{Ara/Glcl} \sim 0,52$ g/g ενώ η παραγωγικότητα ήταν ίση με $Q_p=0,11$ g/L/h. Στην Εικόνα που ακολουθεί παρουσιάζεται η κινητική της μικροβιακής αύξησης, η κατανάλωση του υποστρώματος και η παραγωγή αραβιτόλης για τη ζύμωση που πραγματοποιήθηκε σε τιμή pH 5,5.



Εικόνα 3.15. Κινητική της κατανάλωσης γλυκερόλης (GloI, g/L), της παραγωγής βιομάζας (X, g/L), αραβιτόλης (Ara, g/L) και ενδοπολυσακχαριτών ανά παραγόμενη βιομάζα (IPS/X, %, w/w) κατά τη διάρκεια καλλιέργειας του μικροοργανισμού *Debaryomyces prosopidis* σε ασυνεχή ζύμωση σε κωνικές φιάλες σε αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης 125 g/L. Συνθήκες καλλιέργειας: ανάδευση 180 rpm, θερμοκρασία 30±1 °C, pH 5,5. Κάθε σημείο αποτελεί μέσο όρο 2 ανεξάρτητων επαναλήψεων και το σχετικό τυπικό σφάλμα για τα περισσότερα από τα σημεία της ζύμωσης προσδιορίστηκε σε ≤18%.

Πίνακας 3.15. Συγκεντρωτικά αποτελέσματα της κατανάλωσης υποστρώματος (GloI_{cons}, g/L), της παραγωγής βιομάζας (X, g/L), αραβιτόλης (Ara, g/L), συντελεστή απόδοσης αραβιτόλης ανά μονάδα καταναλωθέντος υποστρώματος (Y_{Ara/GloI}, g/g), παραγωγικότητας αραβιτόλης ανά ώρα (Q_p, g/L/h) και ενδοπολυσακχαριτών ανά παραγόμενη βιομάζα (IPS/X, %, w/w), κατά τη διάρκεια ζυμώσεων του μικροοργανισμού *Debaryomyces prosopidis* σε ασυνεχή ζύμωση σε κωνικές φιάλες σε αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης 125g/L. Συνθήκες καλλιέργειας: ανάδευση 180±5 rpm, θερμοκρασία 30±1 °C, pH 5,5. Κάθε σημείο αποτελεί μέσο όρο 2 ανεξάρτητων επαναλήψεων και το σχετικό τυπικό σφάλμα για τα περισσότερα από τα σημεία της ζύμωσης προσδιορίστηκε σε ≤18%.

pH	Χρόνος ζύμωσης (h)	GloI _{cons} (g/L)	X (g/L)	Ara (g/L)	Y _{Ara/GloI} (g/g)	Q _p (g/L/h)	IPS/X (% w/w)
3,5	520	84,5	12,8	38,5	0,46	0,08	22,6
5,5	520	125,2	15,9	70,9	0,57	0,15	26,2
7,5	520	109,9	13,6	56,7	0,52	0,11	24,7

Συνομογραφίες

X: η παραγόμενη βιομάζα (g/L)

Ara: η παραγόμενη αραβιτόλη (g/L)

GloI_{cons}: καταναλωθείσα γλυκερόλη (g/L)

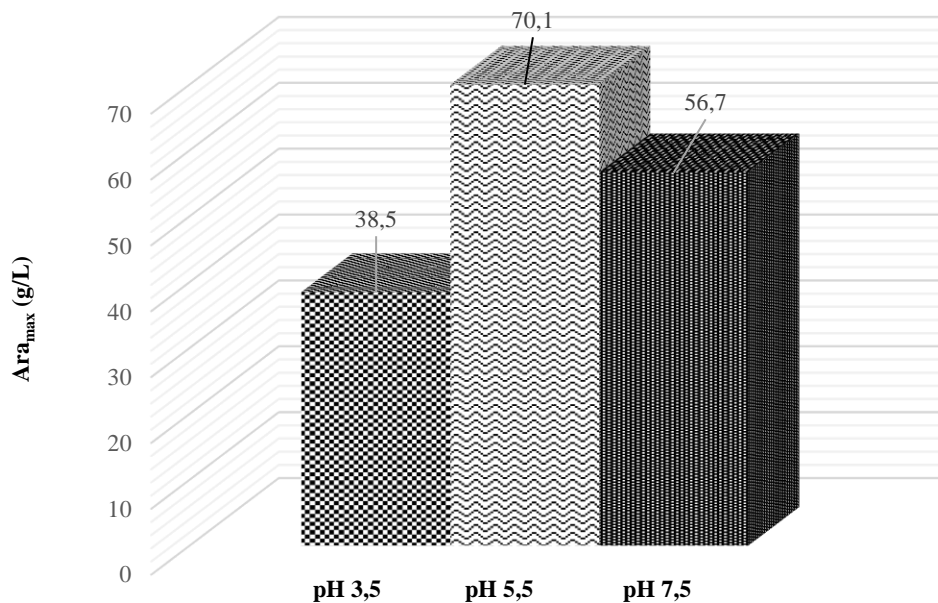
Y_{Ara/GloI}: συντελεστής απόδοσης παραγωγής αραβιτόλης προς καταναλωθέν υπόστρωμα (g/g)

IPS/X: τιμή παραγόμενων ενδοπολυσακχαριτών ανά παραγόμενη βιομάζα (% w/w)

Q_p: η παραγωγικότητα της αραβιτόλης σε συνάρτηση με τον χρόνο (g/L/h)

Η μεταβολή του pH σε 3,5 και 7,5 είχε σαν αποτέλεσμα τη μείωση της παραχθείσας βιομάζας σε ~12-13 g/L και για τις δύο περιπτώσεις.

Τέλος το ποσοστό των IPS δεν επηρεάστηκε από την υπαγωγή της καλλιέργειας σε διαφορετικές τιμές pH και κυμάνθηκε σε όλες τις ζυμώσεις από 22 έως 26%, w/w. Συμπερασματικά, το όξινο περιβάλλον ανάπτυξης επηρέασε αρνητικά την αύξηση του μικροοργανισμού *D. prosopidis*. Η βέλτιστη τιμή pH για την παραγωγή βιομάζας αλλά και αραβιτόλης ήταν αυτή του 5,5 καθώς στο τέλος της ζύμωσης παρήχθησαν ~71 g/L αραβιτόλης με ταυτόχρονο συντελεστή απόδοσης $Y_{Ara/Glc} \sim 0,57$ g/g και σημειώθηκε η μέγιστη παραγωγικότητα η οποία ήταν ίση με $Q_p = 0,15$ g/L/h. Η Εικόνα που ακολουθεί παρουσιάζει με συγκριτικό τρόπο τη μέγιστη παραγωγή αραβιτόλης για τις τρεις διαφορετικές τιμές του pH.



Εικόνα 3.16. Σύγκριση της μέγιστης τελικής συγκέντρωσης αραβιτόλης (Ara_{max} , g/L) κατά τη διάρκεια καλλιέργειας του μικροοργανισμού *Debaryomyces prosopidis* σε ασυνεχείς ζυμώσεις σε κωνικές φιάλες σε αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης 125 g/L και διαφορετικές τιμές pH. Συνθήκες καλλιέργειας: ανάδευση 180 ± 5 rpm, θερμοκρασία 30 ± 1 °C. Κάθε σημείο αποτελεί μέσο όρο 2 ανεξάρτητων επαναλήψεων και το σχετικό τυπικό σφάλμα για τα περισσότερα από τα σημεία της ζύμωσης προσδιορίστηκε σε $\leq 18\%$.

Όπως φαίνεται και στην Εικόνα 3.16. το pH 5,5 αποτέλεσε το καταλληλότερο για την αύξηση και την παραγωγή μεταβολικών προϊόντων για το μικροοργανισμό *D.prosopdis* και επιλέχθηκε για όλες τις ζυμώσεις που ακολούθησαν.

3.2.6. Ασυνεχείς ζυμώσεις σε μικτό υπόστρωμα γλυκόζης-γλυκερόλης σε κωνικές φιάλες

Στη συνέχεια της πειραματικής διαδικασίας μελετήθηκε η επίδραση της διαφορετικής σύνθεσης του υποστρώματος στην αύξηση και την παραγωγή της αραβιτόλης. Στην πραγματικότητα ήταν επιθυμητό να μελετηθεί η παρουσία της γλυκόζης ως συν-υποστρώματος της ζύμωσης (ή και ως μοναδικού υλικού εκκίνησης της βιοδιεργασίας) προκειμένου να αξιολογηθεί η εκλεκτικότητα (“specificity”) της κατανάλωσης γλυκερόλης, η πιθανή καταβολική καταστολή της αφομοίωσης του ενός ή του άλλου

υποστρώματος λόγω παρουσίας του ετέρου στο μέσο της αύξησης (βλέπε για παράδειγμα Dritsas and Aggelis, 2023; Papanikolaou *et al.*, 2017b, ως επίσης και η πιθανή επίδραση της παρουσίας της γλυκόζης στην παραγωγή αραβιτόλης από το μελετηθέν στέλεχος. Για το σκοπό αυτό, πραγματοποιήθηκαν ζυμώσεις κλειστού τύπου σε κωνικές φιάλες με συνολική συγκέντρωση της πηγής άνθρακα ~125 g/L. Ως μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν δύο καλλιέργειες που περιείχαν αμιγώς 125 g/L γλυκόζη (Glc) και 125 g/L γλυκερόλη (GloI) αντίστοιχα. Επίσης πραγματοποιήθηκαν τρεις ζυμώσεις με διαφορετική αναλογία Glc: GloI (=1: 1 w/w, 1: 3 w/w, 3: 1 w/w). Στον πίνακα που ακολουθεί παρουσιάζονται η κατανάλωση του υποστρώματος σε κάθε περίπτωση καθώς και η παραγωγή βιομάζας, αραβιτόλης και ενδοπολυσακχαριτών.

Πίνακας 3.16. Συγκεντρωτικά αποτελέσματα της κατανάλωσης υποστρώματος (TS_{cons} , g/L), της παραγωγής βιομάζας (X , g/L), αραβιτόλης (Ara , g/L), ενδοπολυσακχαριτών ανά παραγόμενη βιομάζα (IPS/X %, w/w), συντελεστή απόδοσης αραβιτόλης ανά μονάδα καταναλωθέντος υποστρώματος ($Y_{Ara/S}$, g/g), και παραγωγικότητας αραβιτόλης ανά ώρα (Q_p , g/L/h) κατά τη διάρκεια ζυμώσεων σε διαφορετικά υποστρώματα. Κάθε σημείο αποτελεί μέσο όρο 2 ανεξάρτητων επαναλήψεων και το σχετικό τυπικό σφάλμα για τα περισσότερα από τα σημεία της ζύμωσης προσδιορίστηκε σε $\leq 18\%$.

Σύνθεση υποστρώματος	Χρόνος ζύμωσης (h)		TS_{cons} (g/L)	X (g/L)	Ara (g/L)	$Y_{Ara/S}$ (g/g)	Q_p (g/L/h)	IPS/X (% w/w)
Glc	336	a,b	125,2	13,2	63,8	0,51	0,18	40,9
GloI	520	a,b	126,2	16,9	70,9	0,57	0,15	26,2
Glc: GloI= 1: 1 w/w	500	a,b	122,7	16,6	67,7	0,55	0,13	30,4
Glc: GloI= 1: 3 w/w	512	a,b	123,1	16,3	65,3	0,53	0,14	26,0
Glc: GloI= 3: 1 w/w	430	a,b	124,8	15,2	66,4	0,53	0,15	28,6

Συνομογραφίες

a: Μέγιστη τιμή συγκέντρωσης αραβιτόλης Ara (g/L)

b: Μέγιστη τιμή απόδοσης αραβιτόλης προς το καταναλωθέν υπόστρωμα $Y_{Ara/S}$ (g/g)

X : η παραγόμενη βιομάζα (g/L)

Ara : η παραγόμενη αραβιτόλη (g/L)

$Y_{Ara/S}$: συντελεστής απόδοσης παραγωγής αραβιτόλης προς καταναλωθέν υπόστρωμα (g/g)

TS_{cons} : κατανάλωση υποστρώματος (g/L)

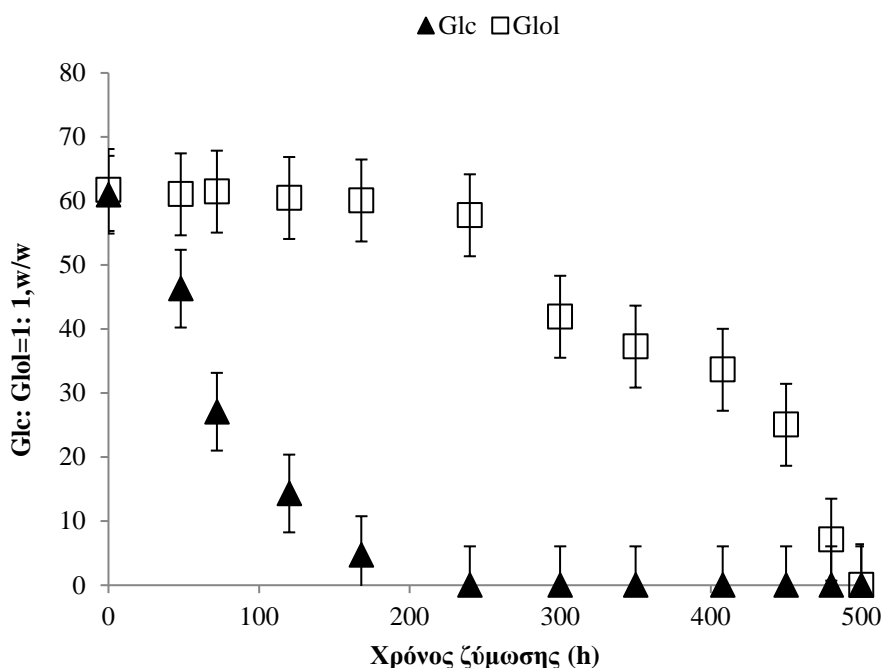
IPS/X : τιμή παραγόμενων ενδοπολυσακχαριτών ανά παραγόμενη βιομάζα (% w/w)

Q_p : η παραγωγικότητα της αραβιτόλης σε συνάρτηση με τον χρόνο (g/L/h)

Στην περίπτωση της ζύμωσης που χρησιμοποιήθηκε γλυκόζη ως η μοναδική πηγή άνθρακα, μετά από 336 h, η συγκέντρωση της βιομάζας ήταν 13,2 g/L ενώ η παραγωγή της αραβιτόλης ήταν ίση με 63,8 g/L. Όσον αφορά την απόδοση του προϊόντος ήταν $Y_{Ara/S}=0,51$ g/g ενώ η τιμή της παραγωγικότητας εμφάνισε τη μέγιστη τιμή της σε σχέση με τις υπόλοιπες δοκιμές η οποία ήταν $Q_p=0,18$ g/L/h. Η ζύμωση-μάρτυρας με χρήση ~125 g/L γλυκερόλης οδήγησε στη παραγωγή 70,9 g/L αραβιτόλης μετά από 520 h καλλιέργειας ενώ παρατηρήθηκε αύξηση και στη παραγόμενη βιομάζα. Η απόδοση του προϊόντος δεν παρουσίασε σημαντική μεταβολή ενώ η παραγωγικότητα μειώθηκε φτάνοντας τα $Q_p=0,15$ g/L/h. Στις ζυμώσεις όπου χρησιμοποιήθηκε μικτό υπόστρωμα γλυκόζης-γλυκερόλης, η ζύμη έδειξε να καταναλώνει αρχικά τη γλυκόζη και στη συνέχεια τη γλυκερόλη επιβεβαιώνοντας το φαινόμενο της καταστολής καταβολίτη, όπως παρατηρήθηκε και σε προγενέστερα πειράματα της παρούσας διατριβής με τη ζύμη *Rhodosporidium toruloides* (Εικόνα 3.17.). Ανάμεσα στις ζυμώσεις με τα μίγματα υποστρωμάτων, εκείνη με αναλογία Glc: Glol=1: 1 w/w παρουσίασε τα καλύτερα αποτελέσματα σε σχέση με την παραγωγή της αραβιτόλης. Η γλυκόζη καταναλώθηκε πρώτη σε 240 h χωρίς ωστόσο να καταναλωθεί γλυκερόλη ως εκείνη τη χρονική στιγμή. Στο τέλος της ζύμωσης (500 h) η συγκέντρωση της βιομάζας ήταν 16,6 g/L. Όσον αφορά την τελική συγκέντρωση αραβιτόλης ήταν 67,7 g/L με απόδοση $Y_{Ara/S}=0,55$ g/g, ελαφρώς υψηλότερη σε σχέση με την τιμή που παρουσίασε στις δύο ζυμώσεις-μάρτυρες. Η παραγωγικότητα αρχικά ήταν $Q_p\sim 0,16$ g/L/h, κατά τη διάρκεια της κατανάλωσης της γλυκόζης. Ωστόσο, όταν η ζύμη στράφηκε στην κατανάλωση της γλυκερόλης, η τιμή της παραγωγικότητας ήταν ίση με $Q_p\sim 0,13$ g/L/h.

Οι ζυμώσεις με αναλογία Glc: Glol=1: 3 w/w και Glc: Glol=3: 1 w/w παρουσίασαν μικρότερη διάρκεια σε σχέση με τη γλυκερόλη όπου η τελική συγκέντρωση βιομάζας ήταν 16,3 g/L και 15,2 g/L αντίστοιχα. Στην πρώτη περίπτωση η τελική συγκέντρωση προϊόντος ήταν 65,3 g/L με απόδοση 0,53 g/g. Όπως και στην παραπάνω περίπτωση, η τιμή της παραγωγικότητας ήταν ~0,13 g/L/h καθ' όλη τη διάρκεια της ζύμωσης. Στη δεύτερη περίπτωση, όπου η αναλογία της πηγής άνθρακα ήταν Glc: Glol=3: 1, w/w, η τελική συγκέντρωση προϊόντος ήταν 66,4 g/L με απόδοση $Y_{Ara/S}=0,53$ g/g και παραγωγικότητα $Q_p\sim 0,15$ g/L/h, η οποία, παρέμεινε σχεδόν σταθερή καθ' όλη τη διάρκεια της ζύμωσης. Σε όλες τις περιπτώσεις που χρησιμοποιήθηκαν μίγματα γλυκόζης-γλυκερόλης στο υπόστρωμα της καλλιέργειας, παρατηρήθηκε καταστολή του καταβολίτη της γλυκερόλης καθώς η κατανάλωση της ξεκινούσε πάντοτε μετά την εξάντληση της γλυκόζης στο μέσο καλλιέργειας. Σύμφωνα με τη Gancendo (1992) σε πειράματα που πραγματοποιήθηκαν στο μικροοργανισμό *Saccharomyces cerevisiae* και σε ορισμένες άλλες ζύμες η παρουσία γλυκόζης μπορεί να επηρεάσει τα επίπεδα των ενζύμων, τόσο μέσω της μείωσης του ρυθμού μεταγραφής, όσο και μέσω της αύξησης του ρυθμού αποδόμησης των αντίστοιχων πρωτεϊνών. Αυτή η τελευταία διαδικασία είναι γνωστή ως αδρανοποίηση των καταβολιτών. Αντίστοιχα, οι Loman *et al.* (2017) σε πειράματα που διενεργήθηκαν με το μικροοργανισμό *D. hansenii*, παρουσία τριών εξοζών στο μέσο καλλιέργειας παρατήρησαν καταστολή των καταβολιτών εφόσον η ζύμη κατανάλωνε τις εξόζες κατά σειρά προτίμησης, η οποία ήταν η εξής: γλυκόζη >φρουκτόζη >γαλακτόζη. Στην Εικόνα 3.17. απεικονίζεται

εμφανώς η καταβολική καταστολή της γλυκερόλης, σε πείραμα με αναλογία Glol: Glc=1: 1,w/w, της οποίας η αφομοίωση ξεκινά στις 240 h όπου η γλυκόζη καταναλώθηκε πλήρως.



Εικόνα 3.17. Κινητική της κατανάλωσης γλυκόζης (Glc, g/L) και της κατανάλωσης γλυκερόλης (Glol, g/L), κατά τη διάρκεια καλλιέργειας του μικροοργανισμού *Debaryomyces prosopidis* σε ζύμωση κλειστού τύπου σε κωνικές φιάλες σε συνζύμωση γλυκόζης-γλυκερόλης με τελική συγκέντρωση 125 g/L σε αναλογία 1: 1, w/w. Συνθήκες καλλιέργειας: ανάδευση 180 ± 5 rpm, θερμοκρασία 30 ± 1 °C, pH 5,5. Κάθε σημείο αποτελεί μέσο όρο 2 ανεξάρτητων επαναλήψεων και το σχετικό τυπικό σφάλμα για τα περισσότερα από τα σημεία της ζύμωσης προσδιορίστηκε σε $\leq 18\%$.

Η εκατοστιαία αναλογία των ενδοπολυσακχαριτών ανά παραγόμενη βιομάζα κυμάνθηκε στις παραπάνω ζυμώσεις μεταξύ 24-31%, w/w παραμένοντας σχεδόν σταθερή καθ' όλη τη διάρκεια των ζυμώσεων. Εξαιρέση αποτέλεσε η περίπτωση της ζύμωσης μόνο με γλυκόζη στο θρεπτικό μέσο όπου η τιμή κυμάνθηκε στο ~40%, w/w.

Συμπερασματικά, η ζύμη έδειξε να αναπτύσσεται ικανοποιητικά τόσο στη γλυκόζη όσο και σε μίγματα αυτής με γλυκερόλη σημειώνοντας ιδιαίτερα υψηλές αποδόσεις σε παραγωγή προϊόντος. Ωστόσο με βάση τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται παραπάνω ως καταλληλότερο υπόστρωμα για την ανάπτυξη του μικροοργανισμού *D. prosopidis* επιλέχθηκε μεταξύ των δοκιμών, η γλυκερόλη λόγω της υψηλότερης τελικής συγκέντρωσης παραγόμενης αραβιτόλης και επιπλέον λόγω του χαμηλότερου κόστους που έχει σε σχέση με τη γλυκόζη και τα μίγματα αυτής.

3.2.7. Αξιολόγηση της επίδρασης της συγκέντρωσης του NaCl σε ασυνεχείς ζυμώσεις

Σύμφωνα με ποικίλες βιβλιογραφικές αναφορές είναι γνωστό ότι τα είδη του γένους *Debaryomyces* αναπτύσσονται ικανοποιητικά σε περιβάλλον υψηλής ωσμωτικής πίεσης (Almagro *et al.*, 2000; Sánchez *et al.*, 2018; Sharma *et al.*, 2005). Στη σειρά πειραμάτων που ακολούθησε μελετήθηκε η ικανότητα της ζύμης *D. prosopidis* να αναπτύσσεται σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις NaCl (2,0%, w/v, 5,0%, w/v, 8,0%, w/v, 12,0%, w/v, 16,0%, w/v). Οι ζυμώσεις ήταν κλειστού τύπου και πραγματοποιήθηκαν σε κωνικές φιάλες χρησιμοποιώντας ως πηγή άνθρακα τη γλυκερόλη σε αρχική συγκέντρωση ~125 g/L. Μία ζύμωση στο υπόστρωμα της οποίας δεν προστέθηκε NaCl χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία έχει διαπιστωθεί ότι το ωσμωτικό στρες δρα με θετικό τρόπο στη σύνθεση των πολυολών καθώς επάγει την παραγωγή τους (Adler *et al.*, 1982). Ωστόσο, από τις μετρήσεις που ελήφθησαν προέκυψε ότι υπάρχει αντίστροφη σχέση μεταξύ της συγκέντρωσης του NaCl και της παραγωγής αραβιτόλης. Όσο υψηλότερη ήταν η συγκέντρωση του NaCl στο θρεπτικό μέσο τόσο μικρότερη ήταν η τελική συγκέντρωση του προϊόντος αλλά και η ικανότητα αφομοίωσης του υποστρώματος. Συγκεκριμένα, η τιμή της αραβιτόλης σε όλες της ζυμώσεις κυμάνθηκε μεταξύ 26-51 g/L με αποδόσεις $Y_{Ara/Glcl} \sim 0,37-0,47$ g/g με τη μέγιστη τιμή της να σημειώνεται στη ζύμωση με συγκέντρωση NaCl=2,0%, w/v. Πιο αναλυτικά, η τιμή της αραβιτόλης σε συγκέντρωση NaCl=2,0%, w/v ήταν 51,0 g/L με απόδοση $Y_{Ara/Glcl}=0,47$ g/g. Επίσης σε συγκέντρωση NaCl=5,0%, w/v η αραβιτόλη υπολογίστηκε σε 43,6 g/L με απόδοση $Y_{Ara/Glcl}=0,43$ g/g, ενώ η τιμή της αραβιτόλης σε συγκέντρωση NaCl=8,0%, w/v μειώθηκε σε 34,6 g/L με απόδοση $Y_{Ara/Glcl}=0,41$ g/g. Ακόμη όταν προστέθηκε στο μέσο αλάτι σε συγκέντρωση NaCl=12,0%, w/v η τιμή του προϊόντος μειώθηκε κατά ~45 g/L σε σχέση με το μάρτυρα φτάνοντας τα 26,1 g/L με απόδοση $Y_{Ara/Glcl}=0,37$ g/g. Η ζύμη επέδειξε υψηλή ωσμωανθεκτική ικανότητα καθώς η αύξηση της συγκέντρωσης NaCl επηρέασε ελάχιστα την παραγωγή βιομάζας, η τιμή της οποίας κυμάνθηκε μεταξύ $X \sim 13-16$ g/L. Ο ρυθμός παραγωγικότητας του προϊόντος διατηρήθηκε σχεδόν σταθερός σε όλες τις δοκιμές με τιμή $Q_p \sim 0,12$ g/L/h.

Ωστόσο, όταν προστέθηκε NaCl=16,0%, w/v στο θρεπτικό μέσο η κατανάλωση της γλυκερόλης μετά από 312 h ήταν μόλις 18,2 g/L κάτι το οποίο δηλώνει ότι σε τέτοια συγκέντρωση υπάρχει παρεμπόδιση της αύξησης. Συγκεκριμένα η τελική συγκέντρωση της παραχθείσας βιομάζας αλλά και της αραβιτόλης ήταν πολύ χαμηλότερες σε σχέση με τις υπόλοιπες ζυμώσεις, 4,3 g/L και 1,9 g/L αντίστοιχα. Ο Πίνακας 3.17. παρουσιάζει συγκεντρωτικά τα αποτελέσματα που ελήφθησαν στο τέλος των παραπάνω ζυμώσεων.

Πίνακας 3.17. Συγκεντρωτικά αποτελέσματα της κατανάλωσης υποστρώματος ($G_{\text{Glol}_{\text{cons}}}$, g/L), της παραγωγής βιομάζας (X , g/L), αραβιτόλης (A_{ra} , g/L), ενδοπολυσακχαριτών ανά παραγόμενη βιομάζα ($\text{IPS}/X\%$, w/w), συντελεστή απόδοσης αραβιτόλης ανά μονάδα καταναλωθέντος υποστρώματος ($Y_{\text{Ara}/\text{Glol}}$, g/g), και παραγωγικότητας αραβιτόλης ανά ώρα (Q_p , g/L/h) κατά τη διάρκεια ζυμώσεων σε διαφορετικές συγκεντρώσεις NaCl. Κάθε σημείο αποτελεί μέσο όρο 2 ανεξάρτητων επαναλήψεων και το σχετικό τυπικό σφάλμα για τα περισσότερα από τα σημεία της ζύμωσης προσδιορίστηκε σε $\leq 18\%$.

NaCl (g/L)	Χρόνος ζύμωσης (h)	$G_{\text{Glol}_{\text{cons}}}$ (g/L)	X (g/L)	A_{ra} (g/L)	$Y_{\text{Ara}/\text{Glol}}$ (g/g)	Q_p (g/L/h)	IPS/X (%, w/w)
Μάρτυρας	520	126,2	16,9	70,9	0,56	0,13	30,6
2,0%, w/v	520	107,2	15,1	51,0	0,47	0,09	27,3
5,0%, w/v	520	100,5	16,5	43,6	0,43	0,08	26,6
8,0%, w/v	520	84,9	13,6	34,6	0,41	0,06	25,4
12,0%, w/v	520	70,4	13,2	26,1	0,37	0,13	31,4
16,0%, w/v	312	18,4	4,3	1,9	0,10	0,02	38,2

Συντομογραφίες

X : η παραγόμενη βιομάζα (g/L)

A_{ra} : η παραγόμενη αραβιτόλη (g/L)

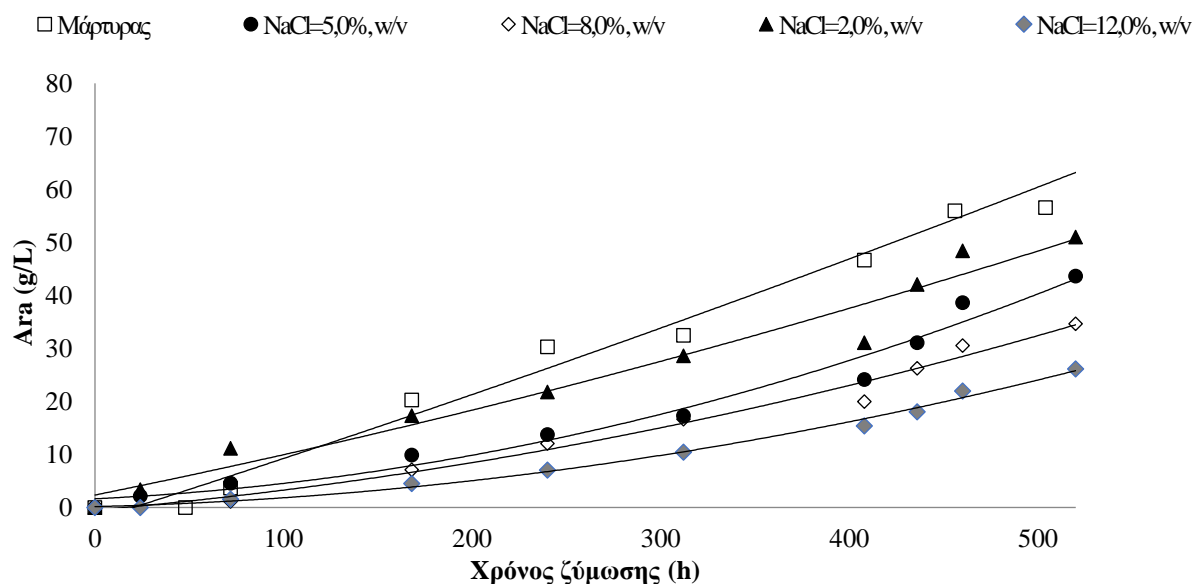
$G_{\text{Glol}_{\text{cons}}}$: καταναλωθείσα γλυκερόλη (g/L)

$Y_{\text{Ara}/\text{Glol}}$: συντελεστής απόδοσης παραγωγής αραβιτόλης προς καταναλωθέν υπόστρωμα (g/g)

IPS/X : τιμή παραγόμενων ενδοπολυσακχαριτών ανά παραγόμενη βιομάζα (% w/w)

Q_p : η παραγωγικότητα της αραβιτόλης σε συνάρτηση με τον χρόνο (g/L/h)

Στην Εικόνα που ακολουθεί παρουσιάζεται η παραγωγή της αραβιτόλης για όλες τις συγκεντρώσεις NaCl.



Εικόνα 3.18. Σύγκριση της τελικής συγκέντρωσης αραβιτόλης κατά τη διάρκεια καλλιέργειας του μικροοργανισμού *Debaryomyces prosopidis* σε ζυμώσεις κλειστού τύπου σε κωνικές φιάλες σε αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης 125 g/L με αυξανόμενη συγκέντρωση NaCl. Μάρτυρας, NaCl=2,0%, w/v, NaCl=5,0%, w/v, NaCl=8,0%, w/v, NaCl=12,0%, w/v. Συνθήκες καλλιέργειας: ανάδευση 180±5 rpm, θερμοκρασία 30±1 °C. Κάθε σημείο αποτελεί μέσο όρο 2 ανεξάρτητων επαναλήψεων και το σχετικό τυπικό σφάλμα για τα περισσότερα από τα σημεία της ζύμωσης προσδιορίστηκε σε ≤18%.

Όσον αφορά την παραγωγή ενδοπολυσακχαριτών, στις ζυμώσεις με συγκέντρωση NaCl=2,0%, w/v; 5,0%, w/v; 8,0%, w/v και 12,0%, w/v NaCl κυμάνθηκε μεταξύ 25-30%, w/w. Ωστόσο, στη συγκέντρωση 16,0%, w/v NaCl παρατηρήθηκε αύξηση στη τιμή που έφτασε το 38%, w/w.

3.2.8. Ασυνεχείς ζυμώσεις σε μη θερμικά επεξεργασμένο υπόστρωμα γλυκερόλης σε κωνικές φιάλες

Η προσθήκη NaCl στο μέσο της καλλιέργειας έχει αποδειχθεί σε προηγούμενες μελέτες ότι δύναται να αναστείλει ή και να περιορίσει την ανάπτυξη βακτηρίων (Korkeala *et al.*, 1992). Λαμβάνοντας υπόψη τα συγκεκριμένα συμπεράσματα άλλα και την υψηλή ωσμωανθεκτικότητα της ζύμης *D. prosopidis* που αποδείχθηκε παραπάνω, ακολούθησε μία σειρά πειραμάτων σε μη θερμικά επεξεργασμένο θρεπτικό υπόστρωμα. Ως πηγή άνθρακα χρησιμοποιήθηκε η γλυκερόλη σε αρχική συγκέντρωση ~125 g/L. Δύο ζυμώσεις με αποστειρωμένο θρεπτικό μέσο, χωρίς NaCl και με προσθήκη NaCl σε συγκέντρωση 5,0%, w/v, χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες και πραγματοποιήθηκαν δυο ασυνεχείς καλλιέργειες σε μη θερμικά επεξεργασμένο υπόστρωμα. Στο συγκριτικό πίνακα που ακολουθεί παρουσιάζονται τα αποτελέσματα που ελήφθησαν στο τέλος των παραπάνω ζυμώσεων.

Πίνακας 3.18. Συγκεντρωτικά αποτελέσματα της κατανάλωσης υποστρώματος ($G_{Iol_{cons}}$, g/L), της παραγωγής βιομάζας (X , g/L), αραβιτόλης (Ara , g/L), συντελεστή απόδοσης αραβιτόλης ανά μονάδα καταναλωθέντος υποστρώματος ($Y_{Ara/GIol}$, g/g) και παραγωγικότητας αραβιτόλης ανά ώρα (Q_p , g/L/h), κατά τη διάρκεια ζυμώσεων σε μη θερμικά επεξεργασμένο θρεπτικό μέσο. Συνθήκες καλλιέργειας: ανάδευση 180 ± 5 rpm, θερμοκρασία 30 ± 1 °C, pH 5,5. Κάθε σημείο αποτελεί μέσο όρο 2 ανεξάρτητων επαναλήψεων και το σχετικό τυπικό σφάλμα για τα περισσότερα από τα σημεία της ζύμωσης προσδιορίστηκε σε $\leq 18\%$.

Τύπος υποστρώματος	Χρόνος ζύμωσης (h)	$G_{Iol_{cons}}$ (g/L)	X (g/L)	Ara (g/L)	$Y_{Ara/GIol}$ (g/g)	Q_p (g/L/h)
Αποστειρωμένο	520	126,2	16,6	70,9	0,56	0,13
Μη θερμικά επεξεργασμένο	504	122,2	19,4	27,1	0,22	0,05
Αποστειρωμένο, με NaCl	520	100,5	16,5	43,6	0,43	0,08
Μη θερμικά επεξεργασμένο, με NaCl	456	111,9	18,1	39,1	0,35	0,08

Συντομογραφίες

X : η παραγόμενη βιομάζα (g/L)

Ara : η παραγόμενη αραβιτόλη (g/L)

$G_{Iol_{cons}}$: καταναλωθείσα γλυκερόλη (g/L)

$Y_{Ara/GIol}$: συντελεστής απόδοσης παραγωγής αραβιτόλης προς καταναλωθέν υπόστρωμα (g/g)

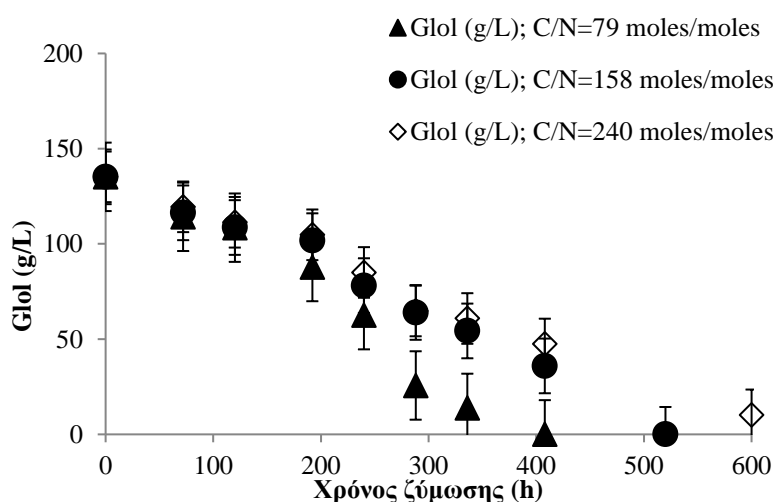
Q_p : η παραγωγικότητα της αραβιτόλης σε συνάρτηση με τον χρόνο (g/L/h)

Όπως ήταν αναμενόμενο, και στα δύο μη θερμικά επεξεργασμένα πειράματα η τελική συγκέντρωση του προϊόντος μειώθηκε σε σχέση με το μάρτυρα. Συγκεκριμένα στη ζύμωση χωρίς προσθήκη άλατος και απουσία αποστείρωσης η τιμή της παραχθείσας αραβιτόλης ήταν ίση με 27,1 g/L με απόδοση $Y_{Ara/GIol}=0,22$ g/g ενώ η παραγωγικότητα η οποία σημειώθηκε ήταν μόλις $Q_p=0,05$ g/L/h. Συνεπώς ο ανταγωνισμός μεταξύ της ζύμης και των βακτηρίων μείωσε τόσο την τελική συγκέντρωση του προϊόντος κατά ~40 g/L όσο και την απόδοση της αραβιτόλης προς το καταναλωθέν υπόστρωμα στο μισό σε σχέση με το αποστειρωμένο πείραμα-μάρτυρα. Ωστόσο, όταν στο μη θερμικά επεξεργασμένο θρεπτικό μέσο προστέθηκε αλάτι τότε, 39,1 g/L αραβιτόλης παρήχθησαν στο τέλος της ζύμωσης. Η σύγκριση των δύο ζυμώσεων με το μη θερμικά επεξεργασμένο υπόστρωμα έδειξε ότι στη περίπτωση προσθήκης NaCl σε συγκέντρωση 5,0%, w/v η μόλυνση από άλλους μικροοργανισμούς περιορίστηκε από 30 σε 10% της ξηρής μάζας, κάτι το οποίο οδήγησε σε αύξηση της τελικής συγκέντρωσης αραβιτόλης κατά ~12 g/L σε σχέση με το μη θερμικά επεξεργασμένο πείραμα-μάρτυρα. Η σύγκριση του θερμικά επεξεργασμένου πειράματος με NaCl σε σχέση με το μη θερμικά επεξεργασμένο πείραμα με NaCl έδωσε παραπλήσια αποτελέσματα σε τελική συγκέντρωση προϊόντος. Η αύξηση της βιομάζας κατά ~2 g/L στο μη θερμικά επεξεργασμένο

πείραμα μπορεί να αποδοθεί στην ύπαρξη των βακτηριακών κυττάρων στη ξηρή μάζα. Επίσης το πείραμα σε μη θερμικά επεξεργασμένο μέσο με προσθήκη NaCl έδωσε παρόμοια αποτελέσματα σε σχέση με την απόδοση αραβιτόλης ανά μονάδα καταναλωθέντος υποστρώματος $Y_{Ara/Glcl}=0,35$ g/g καθώς και της παραγωγικότητας $Q_p=0,08$ g/L/h με το πείραμα μάρτυρα.

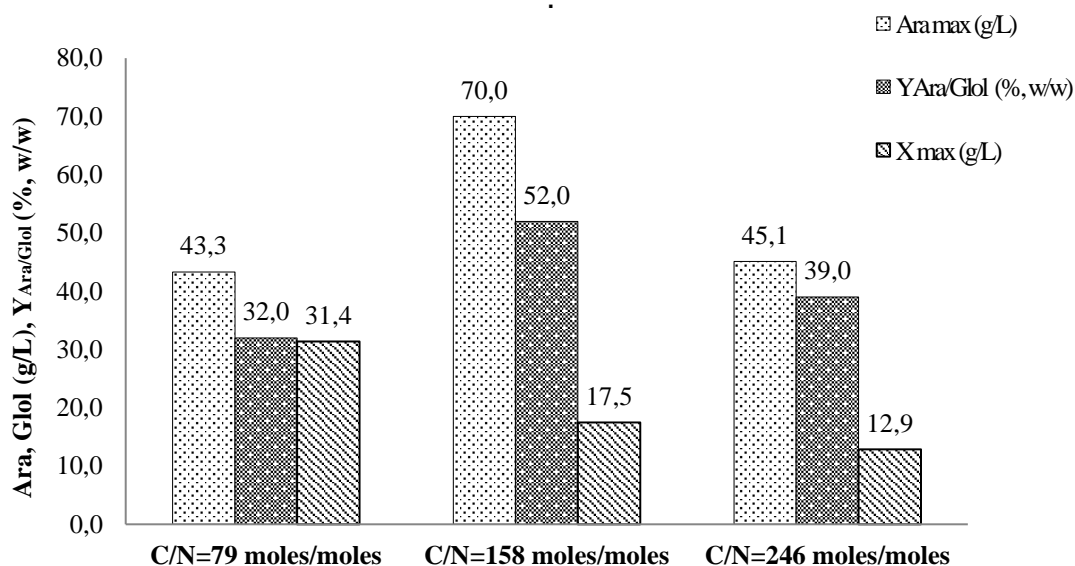
3.2.9. Αξιολόγηση της επίδρασης του λόγου C/N σε ασυνεχείς ζυμώσεις σε υπόστρωμα γλυκερόλης σε κωνικές φιάλες

Η πειραματική διαδικασία στη συνέχεια επικεντρώθηκε στη μελέτη της επίδρασης των διαφορετικών λόγων C/N στο θρεπτικό μέσο κατά τη διάρκεια ζυμώσεων κλειστού τύπου σε κωνικές φιάλες χρησιμοποιώντας ως πηγή άνθρακα τη γλυκερόλη. Η συγκέντρωση της πηγής άνθρακα στο υπόστρωμα ήταν η ίδια στις τρεις ζυμώσεις που πραγματοποιήθηκαν, αλλάζοντας κάθε φορά την ποσότητα της πηγής αζώτου ενώ η αρχική συγκέντρωση της πηγής άνθρακα ήταν ~ 135 g/L. Η παραγωγή αραβιτόλης αξιολογήθηκε υπό διαφορετικές αναλογίες C/N (=79, 158, 246 moles/moles). Τα πειραματικά δεδομένα έδειξαν ότι οι λόγοι C/N επηρέασαν σε σημαντικό επίπεδο τη συγκέντρωση της αραβιτόλης και την απόδοση της. Η αύξηση των λόγων C/N οδήγησε σε μείωση των συγκεντρώσεων της βιομάζας που αποδίδεται στη μειωμένη διαθεσιμότητα αζώτου για τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων (Πίνακας 3.19.). Η Εικόνα 3.19. απεικονίζει το προφίλ κατανάλωσης γλυκερόλης σε διαφορετικούς λόγους C/N κατά τη διάρκεια της ζύμωσης. Η γλυκερόλη καταναλώθηκε με σχετικά πιο γρήγορο ρυθμό στο πείραμα με το μικρότερο λόγο C/N, γεγονός που θα μπορούσε να αποδοθεί στην αύξηση της βιομάζας λόγω της περίσσειας αζώτου στο μέσο καλλιέργειας. Συγκεκριμένα η γλυκερόλη καταναλώθηκε πλήρως στις 456 h για το λόγο C/N=79 moles/moles, ενώ η διάρκεια ζύμωσης για το λόγο C/N=158 moles/moles ήταν 525 h. Ωστόσο, στο λόγο C/N=240 moles/moles, ~ 20 g/L γλυκερόλης παρέμειναν ακατανάλωτα στις 600 h ζύμωσης. Σε γενικές γραμμές, παρατηρήθηκε συνολική κατανάλωση γλυκερόλης μεγαλύτερη από 85% w/w για όλες τις δοκιμές.



Εικόνα 3.19. Κινητική της κατανάλωσης γλυκερόλης κατά τη διάρκεια καλλιέργειας του μικροοργανισμού *Debaryomyces prosopidis* σε ασυνεχή ζύμωση σε κωνικές φιάλες σε αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης 135 g/L και λόγους C/N=79 moles/moles, C/N=158 moles/moles, C/N=246 moles/moles Συνθήκες καλλιέργειας: ανάδευση 180 ± 5 rpm, θερμοκρασία 30 ± 1 °C, pH 5,5. Κάθε σημείο αποτελεί μέσο όρο 2 ανεξάρτητων επαναλήψεων και το σχετικό τυπικό σφάλμα για τα περισσότερα από τα σημεία της ζύμωσης προσδιορίστηκε σε $\leq 18\%$.

Η δευτερογενής αναβολική δραστηριότητα της σύνθεσης αραβιτόλης ξεκίνησε όταν η ζύμη εισήλθε στη λεγόμενη ιδιοφάση, η οποία σχετίζεται με την εξάντληση αζώτου από το θρεπτικό υπόστρωμα. Στο πρώιμο στάδιο της ζύμωσης, τη λεγόμενη τροφοφάση, ο καταβολισμός της γλυκερόλης συνέβαλε κυρίως στο σχηματισμό βιομάζας, ενώ η αραβιτόλη παρήχθη με πολύ αργό ρυθμό. Η Εικόνα 3.20. παρουσιάζει με συγκριτικό τρόπο τη μέγιστη παραγωγή αραβιτόλης και βιομάζας καθώς επίσης και τη μέγιστη απόδοση αραβιτόλης ανά μονάδα καταναλωθέντος υποστρώματος.



Εικόνα 3.20. Σύγκριση της μέγιστης παραγωγής βιομάζας (X_{max} , g/L), της μέγιστης τελικής συγκέντρωσης αραβιτόλης (Ara_{max} , g/L), και της απόδοσης αραβιτόλης ανά μονάδα καταναλωθέντος υποστρώματος ($Y_{Ara/Glcl}$, %, w/w) κατά τη διάρκεια καλλιέργειας του μικροοργανισμού *Debaryomyces prosopidis* σε ζυμώσεις κλειστού τύπου σε κωνικές φιάλες σε αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης 135 g/L και διαφορετικούς λόγους C/N. Συνθήκες καλλιέργειας: ανάδευση 180 ± 5 rpm, θερμοκρασία 30 ± 1 °C. Κάθε σημείο αποτελεί μέσο όρο 2 ανεξάρτητων επαναλήψεων και το σχετικό τυπικό σφάλμα για τα περισσότερα από τα σημεία της ζύμωσης προσδιορίστηκε σε $\leq 18\%$.

Όπως προέκυψε, η καλλιέργεια στο χαμηλότερο αρχικό λόγο C/N=79 moles/moles συνοδεύτηκε από τη μεγαλύτερη παραγωγή μικροβιακής μάζας, η οποία έλαβε την ιδιαίτερα ενδιαφέρουσα τιμή των 31,4 g/L, τιμή υψηλότερη σε σχέση με τα δύο άλλα πειράματα όπου η μέγιστη παραχθείσα βιομάζα ήταν 17,5 g/L και 12,5 g/L για τους λόγους C/N=158 moles/moles και C/N=246 moles/moles αντίστοιχα. Η παραγωγή αραβιτόλης μεγιστοποιήθηκε (~70 g/L) όταν ο λόγος C/N ήταν ίσος με 158 moles/moles, ενώ η απόδοση και η παραγωγικότητα παρουσίασαν επίσης υψηλές τιμές, $Y_{Ara/Glcl}=0,52$ g/g και $Q_p=0,11$ g/L/h. Η παραγωγή της αραβιτόλης παρουσίασε χαμηλότερη τελική συγκέντρωση στις ζυμώσεις με λόγους C/N=79 moles/moles και C/N=246 moles/moles φτάνοντας τα ~43 g/L και τα ~45 g/L αντίστοιχα. Μεταξύ των τριών διαφορετικών ζυμώσεων, εκείνη με λόγο C/N=79 moles/moles παρουσίασε τη χαμηλότερη απόδοση, 0,32 g/g και ακολούθησε εκείνη με λόγο C/N=246 moles/moles με απόδοση 0,39 g/g. Η παραγωγή των ενδοπολυσακχαριτών κυμάνθηκε σε όλες τις περιπτώσεις μεταξύ ~25%, w/w.

Πίνακας 3.19. Συγκεντρωτικά αποτελέσματα της κατανάλωσης υποστρώματος ($G_{Iol_{cons}}$, g/L) της μέγιστης τιμής παραγωγής βιομάζας (X , g/L), της μέγιστης συγκέντρωσης αραβιτόλης (Ara , g/L), συντελεστή απόδοσης αραβιτόλης ανά μονάδα καταναλωθέντος υποστρώματος ($Y_{Ara/GIol}$, g/g) και ενδοπολυσακχαριτών ανά παραγόμενη βιομάζα (IPS/X , %, w/w), κατά τη διάρκεια καλλιέργειας του μικροοργανισμού *Debaryomyces prosopidis* σε ζυμώσεις κλειστού τύπου σε κωνικές φιάλες σε αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης 135 g/L και λόγους C/N=79 moles/moles, C/N=158 moles/moles, C/N=246 moles/moles. Συνθήκες καλλιέργειας: ανάδευση 180±5 rpm, θερμοκρασία 30±1 °C, pH 5,5. Κάθε σημείο αποτελεί μέσο όρο 2 ανεξάρτητων επαναλήψεων και το σχετικό τυπικό σφάλμα για τα περισσότερα από τα σημεία της ζύμωσης προσδιορίστηκε σε ≤18%.

C/N (moles/moles)	Χρόνος ζύμωσης (h)	$G_{Iol_{cons}}$ (g/L)	X (g/L)	Ara (g/L)	$Y_{Ara/GIol}$ (g/g)	IPS/X (%, w/w)
79	456	135,2	31,4	43,3	0,32	23,1
158	525	135,0	17,5	70,0	0,52	24,7
246	600	115,7	12,5	45,1	0,39	26,4

Συντομογραφίες

X: η παραγόμενη βιομάζα (g/L)

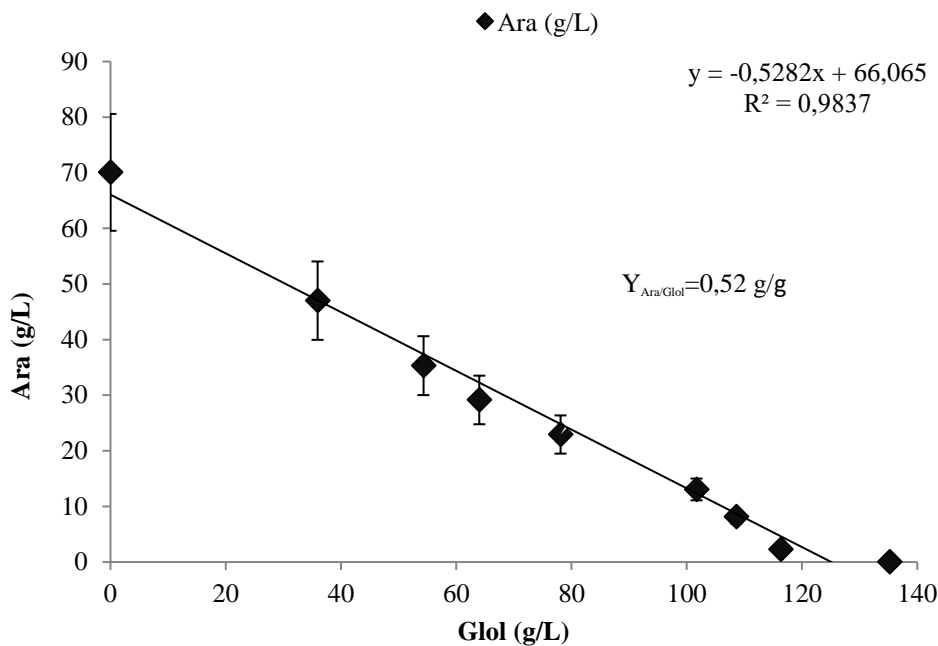
Ara: η παραγόμενη αραβιτόλη (g/L)

$G_{Iol_{cons}}$: καταναλωθείσα γλυκερόλη (g/L)

$Y_{Ara/GIol}$: συντελεστής απόδοσης παραγωγής αραβιτόλης προς καταναλωθέν υπόστρωμα (g/g)

IPS/X: τιμή παραγόμενων ενδοπολυσακχαριτών ανά παραγόμενη βιομάζα (%, w/w)

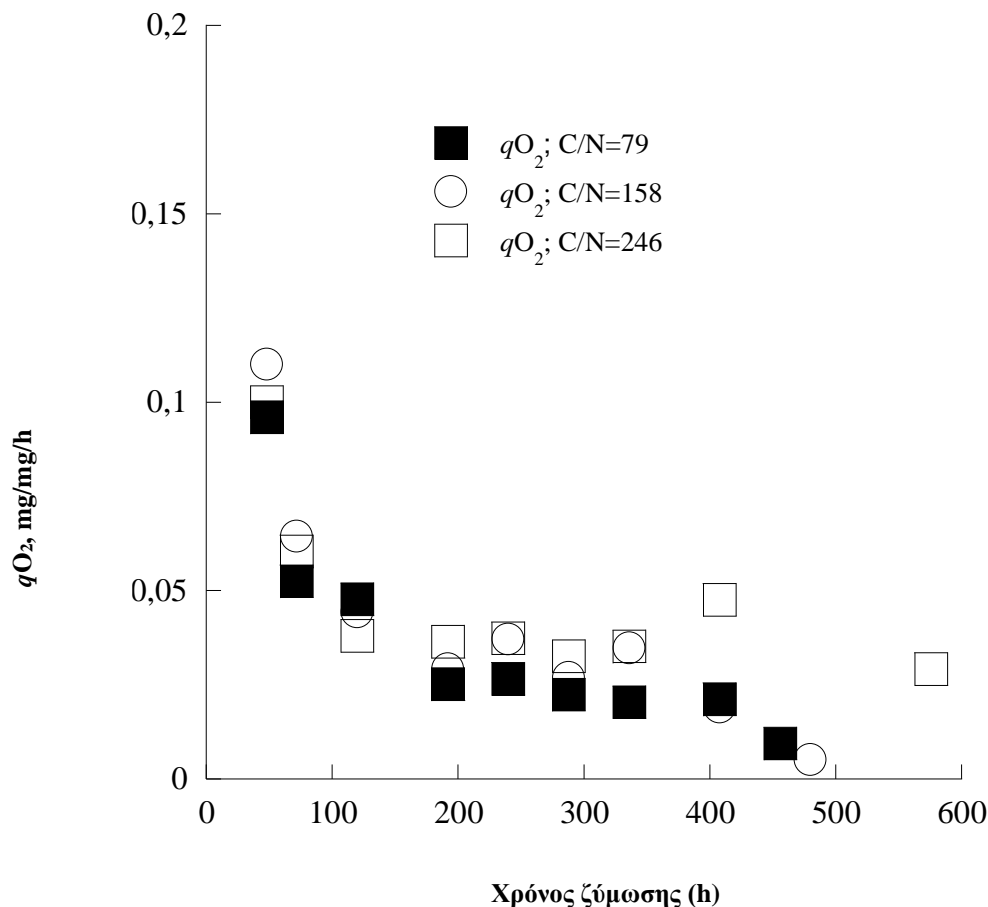
Στην Εικόνα 3.21. παρουσιάζεται ο συνολικός συντελεστής απόδοσης της αραβιτόλης ($Y_{Ara/GIol}$, g/g) ανά καταναλωθείσα γλυκερόλη κατά τη διάρκεια καλλιέργειας του στελέχους *D. prosopidis* σε ασυνεχή ζύμωση σε κωνικές φιάλες σε αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης ~135 g/L και λόγο C/N=158 moles/moles.



Εικόνα 3.21. Γραφική απεικόνιση του συντελεστή απόδοσης της παραγόμενης αραβιτόλης ($Y_{Ara/Glol}$, g/g) ανά καταναλωθείσα γλυκερόλη κατά τη διάρκεια καλλιέργειας του μικροοργανισμού *Debaryomyces prosopidis* σε ασυνεχή ζύμωση σε κωνικές φιάλες σε αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης 135 g/L και λόγο C/N=158 moles/moles. Συνθήκες καλλιέργειας: ανάδευση 180 ± 5 rpm, θερμοκρασία 30 ± 1 °C, pH 5,5. Κάθε σημείο αποτελεί μέσο όρο 2 ανεξάρτητων επαναλήψεων και το σχετικό τυπικό σφάλμα για τα περισσότερα από τα σημεία της ζύμωσης προσδιορίστηκε σε $\leq 18\%$.

Σε αυτό το πειραματικό στάδιο, μελετήθηκε επιπλέον ο ειδικός ρυθμός κατανάλωσης οξυγόνου (qO_2) σε όλο το εύρος της καλλιέργειας (Εικόνα 3.22.), καθώς προηγούμενες έρευνες έχουν δείξει ότι επηρεάζει σημαντικά το σχηματισμό αρκετών μεταβολιτών στους ζυμομύκητες και τους μυκηλιακούς μύκητες (Papanikolaou *et al.*, 2004; Roseiro *et al.*, 1991; Vandeska *et al.*, 1995; Sambaio *et al.*, 2004). Στο πρώτο στάδιο ανάπτυξης της ζύμης σε όλες τις δοκιμές (0-40 h), το qO_2 παρουσίασε σχετικά υψηλές τιμές (0,9-0,12 mg/mg/h) υποδηλώνοντας ενισχυμένη αναπνευστική δραστηριότητα του μικροοργανισμού. Οι τιμές qO_2 μειώθηκαν δραστικά στη φάση της ιδιόφασης κατά την οποία παρήχθη η αραβιτόλη (100-520 h). Σύμφωνα με τους Papanikolaou *et al.* (2004) το φαινόμενο αυτό αποδόθηκε στις συνθήκες περιορισμού του αζώτου που επικρατούσαν στο μέσο ζύμωσης. Στις όψιμες φάσεις ζύμωσης, οι μειωμένες τιμές qO_2 (Εικόνα 3.22.) θα μπορούσαν ενδεχομένως να υποδεικνύουν συνθήκες μικρο-αερόβιας αύξησης, που έχει αναφερθεί ότι μετατοπίζουν το μικροβιακό μεταβολισμό προς την παραγωγή πολυολών σε βάρος της αναπνοής ή του σχηματισμού βιομάζας. Σε αυτή την περίπτωση, το οξυγόνο είναι απλώς επαρκές για την αναγέννηση του $NADH_2^+$, ενώ το $NADPH_2^+$ χρησιμοποιείται αποκλειστικά για τη σύνθεση πολυολών. Οι Sampaio *et al.* (2004) ανέφεραν ότι η βιοσύνθεση ξυλιτόλης από το μικροοργανισμό *D. hansenii* μπορεί να περιοριστεί με αναερόβωση λόγω του γεγονότος ότι το $NADH_2^+$, που συσσωρεύεται στο κυτοσόλιο, μπορεί να αναγεννηθεί εν μέρει οδηγώντας σε παραγωγή αιθανόλης και γλυκερόλης για περαιτέρω διατήρηση της οξειδοαναγωγικής ισορροπίας. Υπό αερόβιες συνθήκες, το οξυγόνο μπορεί να

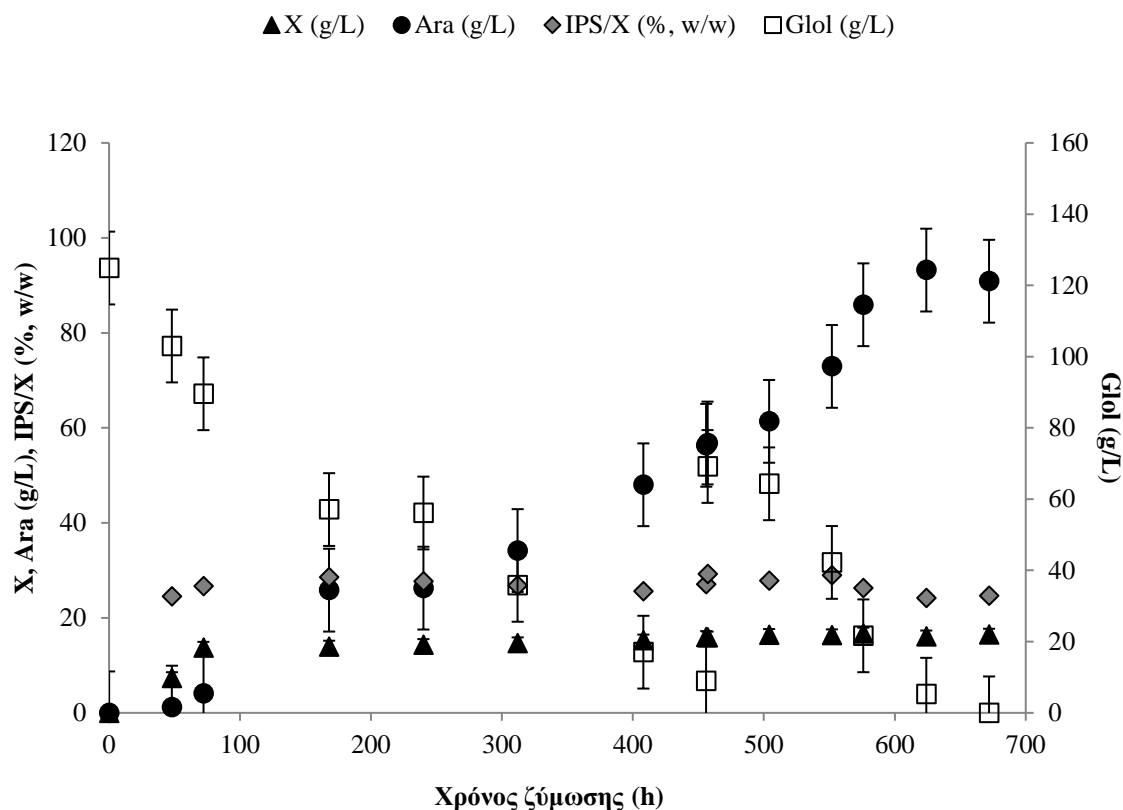
επαναοξειδώσει το NADH_2^+ μέσω της αναπνευστικής αλυσίδας ενισχύοντας τη μικροβιακή αύξηση και εμποδίζοντας την παραγωγή ξυλιτόλης.



Εικόνα 3.22. Κινητική ειδικού ρυθμού κατανάλωσης οξυγόνου κατά τη διάρκεια καλλιέργειας του μικροοργανισμού *Debaromyces prosopidis* σε ασυνεχή ζύμωση σε κωνικές φιάλες σε αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης 135 g/L σε διάφορους λόγους C/N. Συνθήκες καλλιέργειας: ανάδευση 180 ± 5 rpm, θερμοκρασία 30 ± 1 °C, pH 5,5. Κάθε σημείο αποτελεί μέσο όρο 2 ανεξάρτητων επαναλήψεων και το σχετικό τυπικό σφάλμα για τα περισσότερα από τα σημεία της ζύμωσης προσδιορίστηκε σε $\leq 18\%$.

3.2.10. Ημι-συνεχείς καλλιέργειες σε υπόστρωμα γλυκερόλης σε κωνικές φιάλες

Λαμβάνοντας υπόψη τα αποτελέσματα που ελήφθησαν από τις παραπάνω ζυμώσεις στη συνέχεια της πειραματικής διαδικασίας πραγματοποιήθηκε ημι-συνεχής καλλιέργεια σε κωνικές φιάλες με στόχο την αύξηση της τελικής συγκέντρωσης του προϊόντος και της βελτιστοποίησης της τιμής της απόδοσης και της παραγωγικότητας. Ως πηγή άνθρακα χρησιμοποιήθηκε η γλυκερόλη σε αρχική συγκέντρωση ~ 125 g/L. Μετά από 457 h ζύμωσης έγινε η προσθήκη αποστειρωμένου πυκνού διαλύματος γλυκερόλης 60 g/L. Στην Εικόνα που ακολουθεί παρουσιάζεται η κινητική της κατανάλωσης της γλυκερόλης και η παραγωγή της βιομάζας, της αραβιτόλης και των ενδοπολυσακχαριτών κατά τη διάρκεια της ημι-συνεχούς ζύμωσης.



Εικόνα 3.23. Κινητική της κατανάλωσης γλυκερόλης (Glol, g/L), της παραγωγής βιομάζας (X, g/L), αραβιτόλης (Ara, g/L) και ενδοπολυσακχαριτών ανά παραγόμενη βιομάζα (IPS/X, %, w/w) κατά τη διάρκεια καλλιέργειας του μικροοργανισμού *Debaryomyces prosopidis* σε ημι-συνεχή ζύμωση σε κωνικές φιάλες σε αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης 125 g/L Συνθήκες καλλιέργειας: ανάδευση 180±5 rpm, θερμοκρασία 30±1 °C, pH 5,5. Η προσθήκη στείρου θρεπτικού υποστρώματος έγινε στις 457 h. Κάθε σημείο αποτελεί μέσο όρο 2 ανεξάρτητων επαναλήψεων και το σχετικό τυπικό σφάλμα για τα περισσότερα από τα σημεία της ζύμωσης προσδιορίστηκε σε ≤18%.

Όπως προκύπτει από την Εικόνα 3.23, η γλυκερόλη καταναλώθηκε σχεδόν εξ' ολοκλήρου στις 457 h, όπου στο θρεπτικό μέσο μετρήθηκαν 8,9 g/L, οπότε και ξεκίνησε η προσθήκη στείρου θρεπτικού υποστρώματος σε συγκέντρωση 60 g/L γλυκερόλη. Ως εκείνη τη χρονική στιγμή η παραγωγή της αραβιτόλης ήταν 56,3 g/L με απόδοση $Y_{Ara/Glol}=0,49$ g/g. Ο ρυθμός κατανάλωσης της γλυκερόλης, όπως φαίνεται και στο διάγραμμα, ήταν ιδιαίτερα υψηλός, ~0,40 g/g/h, κατά την εκθετική και τη στατική φάση ενώ σταδιακά μειώθηκε στα 0,19 g/g/h. Μετά τη προσθήκη γλυκερόλης ο ρυθμός κατανάλωσης του υποστρώματος αυξήθηκε και πάλι στα ~0,50 g/g/h. Στο τέλος της ζύμωσης στις 672 h η συγκέντρωση της αραβιτόλης ήταν 90,9 g/L ενώ η μέγιστη απόδοση του προϊόντος ανά μονάδα καταναλωθέντος υποστρώματος ήταν ίση με $Y_{Ara/Glol}=0,53$ g/g. Η συνολική ποσότητα γλυκερόλης που καταναλώθηκε κατά τη διάρκεια της ημι-συνεχούς καλλιέργειας ήταν ~185 g/L. Τέλος, η μέγιστη συγκέντρωση βιομάζας που σημειώθηκε ήταν $X \sim 17$ g/L. Ομοίως με τις προηγούμενες δοκιμές η συσσώρευση των ενδοπολυσακχαριτών δεν παρουσίασε σημαντική διακύμανση κατά τη διάρκεια της ζύμωσης και κινήθηκε μεταξύ ~24-29%, w/w.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

4.1. Καλλιέργειες του μικροοργανισμού *Rhodosporidium toruloides*

Τα τελευταία χρόνια το ερευνητικό ενδιαφέρον έχει στραφεί στην παραγωγή λιπών και ελαίων μέσω βιοτεχνολογικών διεργασιών με την ταυτόχρονη αξιοποίηση οργανικών αποβλήτων. Τέτοιοι τύποι υλικών, ικανοί να χρησιμοποιηθούν ως υποστρώματα ζυμώσεων, μπορεί να προέρχονται από τη βιομηχανία τροφίμων, τη βιομηχανία παραγωγής βιοντίζελ ή από αγρό-βιομηχανικές δραστηριότητες ως «απόβλητα» ή παραπροϊόντα της γραμμής παραγωγής με πολύ μικρό ή μηδενικό κόστος. Η αξιοποίηση των βιομηχανικών αποβλήτων έχει ιδιαίτερη σημασία καθώς ο αυξανόμενος όγκος τους δημιουργεί ένα δευτερεύον πρόβλημα ρύπανσης που χρειάζεται ολοκληρωμένη διαχείριση.

Η παραγωγή μικροβιακών ελαίων σε μεγάλη κλίμακα φαίνεται, ωστόσο, να είναι αρκετά δαπανηρή σε σχέση με τα φυτικής προέλευσης έλαια (Kumar *et al.*, 2019; Koutinas *et al.*, 2014). Αυτό συμβαίνει κυρίως λόγω της χαμηλής παραγωγικότητας των ελαιογόνων μικροοργανισμών, το υψηλό κόστος των ζυμώσεων και των ακριβών πρώτων υλών που χρησιμοποιούνται όπως είναι η γλυκόζη (Ratlidge and Lippmeier, 2017). Συνεπώς η αξιοποίηση φτηνών ανανεώσιμων πρώτων υλών αποτελεί επιτακτική ανάγκη όσον αφορά στη βιωσιμότητα της διεργασίας με ταυτόχρονα όμως οφέλη και στο περιβάλλον.

Η δυνατότητα παραγωγής μονοκυτταρικών ελαίων σε μεγάλη κλίμακα εξακολουθεί να υπάρχει, καθώς η τιμή των ελαίων κυμαίνεται ανάλογα με τα λιπαρά οξέα από τα οποία αποτελούνται (Paranikolaou and Aggelis, 2019). Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν να μελετηθεί η επίδραση της βιομηχανικής γλυκερόλης, η οποία χρησιμοποιήθηκε ως υπόστρωμα στην ανάπτυξη της ζύμης *Rhodosporidium toruloides* NRRL Y-27012 και στην παραγωγή των προϊόντων αυτής. Επίσης με τις μεταβολές του pH και του λόγου C/N καθώς και με την προσθήκη NaCl και γλυκόζης στις καλλιέργειες, έγινε προσπάθεια να αριστοποιηθούν οι συνθήκες στις οποίες ο μικροοργανισμός αποδίδει καλύτερα και να βρεθεί ο βέλτιστος δυνατός συνδυασμός που θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί σε μελλοντικές εφαρμογές.

Αρχικά πραγματοποιήθηκαν δύο ζυμώσεις σε υπόστρωμα ακάθαρτης γλυκερόλης προκειμένου να ερευνηθεί η ιδανική μέθοδος εκχύλισης του λίπους για το στέλεχος *R.toruloides* NRRL Y-27012. Στην πρώτη ζύμωση έγινε εκχύλιση του λίπους με τη χρήση μίγματος διαλυτών χλωροφορμίου (CHCl_3)–μεθανόλης (CH_3OH), ενώ στη δεύτερη έγινε αρχικά όξινη υδρόλυση με HCl και στη συνέχεια εκχύλιση με μίγμα διαλυτών χλωροφορμίου (CHCl_3)–μεθανόλης (CH_3OH). Η μέθοδος με όξινη υδρόλυση με HCl έχει δώσει ικανοποιητικά αποτελέσματα όσον αφορά στην εκχύλιση των λιπιδίων (Xenopoulos *et al.*, 2020). Ωστόσο τα αποτελέσματα στη συγκεκριμένη μελέτη έδειξαν ότι οι δύο διαφορετικές μέθοδοι δεν επηρέασαν την τελική τιμή του παραγόμενου λίπους.

Αρχικά προκειμένου να μελετηθεί η επίδραση της μεταβολής του pH, διενεργήθηκαν τρεις ζυμώσεις σε διαφορετικές τιμές pH (3,5; 5,5 και 6,5) σε υπόστρωμα γλυκερόλης αρχικής συγκέντρωσης ~80 g/L. Οι παράγοντες που μελετήθηκαν ήταν η κατανάλωση του υποστρώματος, η κυτταρική ανάπτυξη

της ζύμης, η παραγωγή ενδοπολυσακχαριτών και η παραγωγή μικροβιακού λίπους, καθώς και η σύσταση των λιπαρών οξέων.

Κατά την υπαγωγή της καλλιέργειας σε χαμηλό pH (3,5) η αφομοίωση του υποστρώματος επηρεάστηκε αρνητικά καθώς μόλις 20 g/L γλυκερόλης καταναλώθηκαν μετά από 192 h ζύμωσης. Αυτό είχε ως συνέπεια να μειωθεί σημαντικά η παραγωγή βιομάζας και λιπιδίων, η συγκέντρωση των οποίων δεν ξεπέρασε σε ποσότητα τα 2,5 g/L. Αντίθετα η ζύμη έδειξε να αναπτύσσεται ικανοποιητικά σε pH 5,5 όπου σημειώθηκαν οι μέγιστες τιμές λίπους και παραγόμενης βιομάζας, ίσες με 20,4 g/L και 8,9 g/L αντίστοιχα. Επίσης όταν το pH της καλλιέργειας ρυθμίστηκε σε 6,5 τότε 20,7 g/L βιομάζας και 7,1 g/L λίπους, παρήχθησαν αντίστοιχα. Τη σημασία της επίδρασης του pH σε ελαιογόνους μικροοργανισμούς μελέτησαν επίσης οι Dias *et al.* (2016). Ειδικότερα, παρατήρησαν ότι σε ζύμωση με θρεπτικό μέσο τη γλυκόζη και τιμές pH που κυμαίνονταν μεταξύ 4 και 5,5, η παραγωγή λιπιδίων και βιομάζας ήταν μεγαλύτερη όταν το pH ήταν κοντά στο 4. Αντίθετα οι Yong-hong *et al.* (2006), σε πειράματα που διεξήχθησαν με στέλεχος της ζύμης *R. toruloides* σε ένα εύρος τιμών pH από 3 έως 10 επισήμαναν ότι ο μικροοργανισμός φτάνει σε υψηλά ποσοστά λίπους όταν το pH κυμαίνεται κοντά στο 6 σε υπόστρωμα γλυκόζης. Επίσης σύμφωνα με τους da Silva *et al.* (2020) το pH δεν είχε αξιόλογη επίδραση στην παραχθείσα βιομάζα της ζύμης *Rhodotorula mucilaginosa*. Εντούτοις η μείωση του pH από 7 σε 5 ευνόησε τη σύνθεση καροτενοειδών χρωστικών.

Η μεταβολή του pH δύναται να επηρεάσει σύμφωνα με τους Bodnaruk and Golden (1996), το προφίλ των λιπαρών οξέων του μικροβιακού λίπους. Συγκεκριμένα, μελέτη που έγινε με το βακτήριο *Yersinia enterocolitica* έδειξε ότι η ρύθμιση του pH στην τιμή 5 είχε σαν αποτέλεσμα την αύξηση των κορεσμένων και τη μείωση των ακόρεστων λιπαρών οξέων ενώ με τη ρύθμιση του pH σε 9, το ποσοστό των κορεσμένων λιπαρών μειώθηκε σημαντικά. Σε αυτό συνηγορούν και οι Gianotti *et al.* (2009), καθώς σε πειράματα που έγιναν με το βακτήριο *Escherichia coli* διαπίστωσαν ότι τα ακόρεστα λιπαρά οξέα σημείωσαν αύξηση όταν το pH μεταβλήθηκε στο μέσο καλλιέργειας από 6,7 σε 4,5.

Στην παρούσα μελέτη, όσον αφορά στη σύσταση του μικροβιακού λίπους η μεταβολή του pH στο μέσο καλλιέργειας δεν επηρέασε το προφίλ των λιπαρών οξέων. Αναλυτικότερα τα ποσοστά των λιπαρών οξέων παρέμειναν σχεδόν σταθερά κατά τη διάρκεια όλων των ζυμώσεων, ακόμα και στις όξινες συνθήκες. Τα λιπαρά οξέα που εντοπίστηκαν ήταν το ελαϊκό ($^{A9}C18$: 1), το παλμιτικό (C16: 0), το στεατικό (C18: 0), το λινελαϊκό ($^{A9,12}C18$: 2) ενώ σε μικρές ποσότητες εντοπίστηκε το α-λινολενικό οξύ ($^{A9,12,15}C18$: 3). Το ελαϊκό οξύ ($^{A9}C18$: 1) οξύ βρέθηκε να είναι σε κάθε περίπτωση το επικρατέστερο οξύ με ποσοστό που κυμάνθηκε από ~49,5-58,8%, w/w. Ακολούθησε το παλμιτικό οξύ (C16: 0) με ποσοστό ~22,8-33,4%, w/w ενώ τα υπόλοιπα οξέα δεν ξεπέρασαν συνολικά το 15%, w/w.

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία η ελαιογόνος ζύμη *R. toruloides* δύναται να συσσωρεύει λιπίδια σε ποσοστό μεγαλύτερο από 70% επί της ξηράς ουσίας. Ποικίλες μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί με τη συγκεκριμένη ζύμη σε υποστρώματα που περιείχαν ως πηγή άνθρακα είτε γλυκόζη είτε γλυκερόλη.

Σύμφωνα με βιβλιογραφικές μελέτες η ζύμη *R.toruloides* δύναται να μεταβολίζει τη γλυκόζη ακόμα και υψηλές συγκεντρώσεις, προς παραγωγή, βιομάζας και λιπιδίων (Li *et al.*, 2007). Μάλιστα οι Garay *et al.* (2016) απέδειξαν ότι η συγκεκριμένη ζύμη όταν αναπτύσσεται σε γλυκόζη δύναται να συσσωρεύει λιπίδια σε ποσοστό μεγαλύτερο από 50-60%, w/w επί της ξηρής μάζας. Ωστόσο ελάχιστες είναι οι πληροφορίες που έχουμε για το μεταβολισμό του συγκεκριμένου μικροοργανισμού όταν αναπτύσσεται σε μίγμα γλυκόζης με γλυκερόλη. Σύμφωνα με τους Bommareddy *et al.* (2015, 2017) όταν η ζύμη *R.toruloides* DSMZ 4444 αναπτύχθηκε σε υπόστρωμα που περιείχε γλυκόζη και γλυκερόλη, η ύπαρξη γλυκόζης στο μέσο είχε σαν αποτέλεσμα την καταβολική καταστολή της γλυκερόλης. Συγκεκριμένα, αναφέρουν ότι ο ρυθμός ανάπτυξης της ζύμης ήταν 0,16 g/L/h στη γλυκόζη και 0,12 g/L/h στη γλυκερόλη. Επιπρόσθετα κατά την αφομοίωση της γλυκόζης η βιομάζα ήταν αυξημένη αλλά το ποσοστό λίπους επί ξηράς ουσίας (L/X, % w/w) δεν ξεπέρασε το ~45%. Αντίθετα κατά την αφομοίωση γλυκερόλης η τιμή της ξηρής μάζας μειώθηκε αισθητά όμως το ποσοστό L/X αυξήθηκε σε ~57%, w/w. Το φαινόμενο αυτό ονομάζεται καταστολή καταβολίτη και έχει παρατηρηθεί σε διάφορους μικροοργανισμούς όταν αναπτύσσονται σε μίγματα διαφόρων πηγών άνθρακα παρουσία γλυκόζης (Görke and Stülke, 2008; da Cruz *et al.*, 2003; New *et al.*, 2014; Simpson and Kuriek, 2019). Συνεπώς σε συνέχεια της πειραματικής διαδικασίας μελετήθηκε η επίδραση της γλυκόζης στην αύξηση του στελέχους *Rhodosporidium toruloides* NRRL Y27012 και στη σύνθεση των μεταβολικών του προϊόντων. Για το σκοπό αυτό διενεργήθηκαν τρεις ζυμώσεις σε κωνικές φιάλες με τελική συγκέντρωση της πηγής άνθρακα 80 g/L σε αναλογίες Glc: Glol=1: 1 w/w; 3: 1 w/w και 1: 3 w/w. Η παρουσία της γλυκόζης στο μέσο καλλιέργειας προκάλεσε καταστολή του καταβολισμού της γλυκερόλης επιβεβαιώνοντας τη σχετικά περιορισμένη στο αντίστοιχο θέμα βιβλιογραφία (Bommareddy *et al.*, 2015; 2017). Η παραγωγή των λιπιδίων ήταν μειωμένη σε όλες τις συνδυασμούς που πραγματοποιήθηκαν σε σχέση με του μάρτυρες που περιείχαν αμιγώς γλυκόζη ή γλυκερόλη σε συγκέντρωση 80 g/L. Συγκεκριμένα στις αναλογίες Glc: Glol=1: 1 w/w; 3: 1 w/w και 1: 3 w/w παρήχθησαν 8,0 g/L, 7,8 g/L και 8,2 g/L λίπους αντίστοιχα. Αντίθετα η τιμή των λιπιδίων στους μάρτυρες ήταν ίση με 7,7 g/L στο υπόστρωμα γλυκόζης και 8,9 g/L στο υπόστρωμα γλυκερόλης. Συνεπώς η προσθήκη γλυκόζης στο υπόστρωμα δεν ευνόησε την παραγωγή λίπους, αντιθέτως επέφερε μείωση στην απόλυτη τιμή του.

Όσον αφορά τη μέγιστη τιμή της παραγόμενης βιομάζας, αυτή σημειώθηκε στο μάρτυρα με 80 g/L γλυκερόλη αλλά και στην αναλογία Glc: Glol=1: 3 w/w και ήταν ίση με 20,6 g/L. Αντίθετα παρατηρήθηκε ότι στο μάρτυρα με 80 g/L γλυκόζη αλλά και στο μίγμα με αναλογία Glc: Glol=3: 1 w/w, το οποίο περιείχε γλυκόζη σε μεγαλύτερη ποσότητα, η βιομάζα έφτασε μόλις τα 17,7 g/L και 18,8 g/L αντίστοιχα. Το μέγιστο ποσοστό παραγόμενου λίπους προς την παραγόμενη βιομάζα κυμάνθηκε και στις τρεις αναλογίες από 40 έως 45%, w/w χωρίς να παρουσιάζει αισθητή μεταβολή σε σχέση με την τιμή που σημειώθηκε στις δύο ζυμώσεις-μάρτυρες. Η εκατοστιαία αναλογία των ενδοπολυσακχαριτών κυμάνθηκε στις παραπάνω ζυμώσεις μεταξύ των τιμών ~40-15%, w/w, παρουσιάζοντας τη μέγιστη τιμή στις αρχικές ώρες ενώ μειωνόταν σταδιακά κατά την πορεία της ζύμωσης. Οι Tchakouteau *et al.* (2015) και οι Papanikolaou *et*

al. (2017), μετά από πειράματα που διεξήγαγαν με διαφορετικά στελέχη του *R. toruloides* και άλλων ειδών ζυμομυκήτων, κατέληξαν ότι η ζύμη *R. toruloides* εμφανίζει το μεγαλύτερο ποσοστό λίπους, βιομάζας και ενδοπολυσακχαριτών σε υπόστρωμα γλυκερόλης έναντι άλλων υποστρωμάτων που δοκιμάστηκαν.

Σύμφωνα με τους Patel *et al.* (2015a) η πηγή άνθρακα δύναται να επηρεάζει τη σύσταση του λίπους αναφορικά με την αναλογία των λιπαρών οξέων. Συγκεκριμένα παρατήρησαν ότι όταν η ζύμη *R. toruloides* HIMPA1 αναπτύχθηκε σε υπόστρωμα γλυκόζης-φρουκτόζης το παραγόμενο λίπος ήταν πλούσιο σε μονοακόρεστα λιπαρά οξέα ενώ σε υπόστρωμα σουκρόζης, υψηλότερο ποσοστό κατείχαν τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα.

Τέλος στην παρούσα μελέτη κατά τη διερεύνηση του προφίλ των κυτταρικών λιπιδίων σε διαφορετικές αναλογίες γλυκόζης-γλυκερόλης, διαπιστώθηκε ότι η προσθήκη γλυκόζης στην καλλιέργεια δεν επηρέασε σημαντικά το προφίλ των λιπαρών οξέων. Το κύριο λιπαρό οξύ που εντοπίστηκε σε όλες τις περιπτώσεις ήταν το ελαϊκό οξύ (^{Δ9}C18: 1) το οποίο ήταν αυξημένο κατά τις πρώτες ώρες της εξέλιξης της ζύμωσης ενώ μειωνόταν στη στατική φάση με ποσοστό που κυμάνθηκε από 45,1% έως 52,4%, w/w. Το ποσοστό του παλμιτικού οξέος (C16: 0) κυμάνθηκε μεταξύ 25,4 έως 32,5%, w/w. Αναφορικά με τα υπόλοιπα λιπαρά οξέα, τα ποσοστά αυτών εμφάνισαν διακυμάνσεις ενώ σε κάθε περίπτωση καθένα από αυτά δεν ξεπέρασε το 15%, w/w.

Τα αποτελέσματα αυτά έδειξαν ότι τη βιομηχανική γλυκερόλη αποτελεί καταλληλότερο υπόστρωμα σε σχέση με τη γλυκόζη ως προς την παραγωγή δευτερογενών μεταβολιτών από το στέλεχος *R. toruloides* NRRL Y-27012. Το συμπέρασμα αυτό είναι ελπιδοφόρο για την παραγωγή βιοντίζελ καθώς η βιομηχανική γλυκερόλη είναι ένα χαμηλού κόστους υπόστρωμα σε σχέση με την εμπορική γλυκόζη.

Προκειμένου να μειωθεί το κόστος της διαδικασίας, διεξήχθησαν πειράματα με βιομηχανική γλυκερόλη υπό ασηπτικές (αποστείρωση) και υπό μη ασηπτικές (παστερίωση), ενώ ως φυσικός «ανασταλτικός» παράγοντας που παρεμποδίζει την ανάπτυξη μολυσματικών βακτηρίων προστέθηκε υδρογλυκερικό εκχύλισμα φλοιού κρεμμυδιού στο μέσο καλλιέργειας. Η προσθήκη του υδρογλυκερικού εκχυλίσματος αποβλήτων κρεμμυδιού είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση των λιπιδίων που συσσωρεύτηκαν στα κύτταρα ζύμης, τόσο σε απόλυτες (L σε g/L) όσο και σε σχετικές (L/X, σε %, w/w) τιμές. Εντούτοις, η παρουσία αυτών των ενώσεων δεν φάνηκε να ασκεί αρνητική επίδραση στην παραγωγή βιομάζας στο *R. toruloides*. Η προσθήκη «ξενοβιοτικών» ενώσεων που βρίσκονται σε διάφορα φυσικά προϊόντα ή απόβλητα (δηλαδή διαφορετικοί τύποι φαινολικών ενώσεων που βρίσκονται σε λύματα ελαιολιπιδίων, αιθέρια έλαια, κυκλοπροπενικά λιπαρά οξέα κ.λπ.) έχει πραγματοποιηθεί σε διάφορες περιπτώσεις στις οποίες χρησιμοποιήθηκαν ελαογόνοι μικροοργανισμοί (δηλαδή στελέχη των ζυμομυκήτων *R. toruloides*, *Cryptococcus curvatus*, *Yarrowia lipolytica*, *Lipomyces strakeyi*, με στόχο τόσο την αύξηση της παραγωγής SCO σε αυτούς τους μικροοργανισμούς όσο και την αλλαγή της σύνθεσης των λιπαρών οξέων των κυτταρικών λιπιδίων που παράγονται. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν στη βιβλιογραφία ήταν μάλλον διφορούμενα και φαινόταν να εξαρτώνται από το «στέλεχος» και το «προστιθέμενο φυσικό προϊόν». Για

παράδειγμα, σύμφωνα με την τρέχουσα έρευνα, η προσθήκη λυμάτων ελαιοτριβείου που περιέχουν διάφορους τύπους φαινολικών ενώσεων και για το εύρος των αρχικών συγκεντρώσεων φαινολικών ενώσεων που εξετάστηκαν, μείωσε την ποσότητα των συσσωρευμένων λιπιδίων στα κύτταρα *C. curvatus* ATCC 20509, ενώ από την άλλη οι συγκεντρώσεις βιομάζας αυξάνονταν με την ποσότητα των προστιθέμενων λυμάτων. Σε αντίθεση με το *C. curvatus*, για το στελέχος *L. starkeyi* DSM 70296 και για το εύρος των αρχικών συγκεντρώσεων φαινολικών ενώσεων που δοκιμάστηκαν, τόσο η συσσώρευση λιπιδίων (L/X, σε % w/w) όσο και η παραγωγή ξηράς συνολικής κυτταρικής βιομάζας (σε g/L) ήταν σχεδόν ίδια με το πείραμα μάρτυρα (χωρίς προσθήκη φαινολικών ενώσεων) (Xenopoulos *et al.*, 2020). Η εφαρμογή μη ασηπτικών συνθηκών (δηλαδή εφαρμογή παστερίωσης ή ακόμη και εμβολιασμός χωρίς προηγούμενη θερμική επεξεργασία) έχει πραγματοποιηθεί κυρίως για ζυμώσεις στις οποίες τα παραγόμενα μεταβολικά προϊόντα έχουν τη δυνατότητα να αναστέλλουν διάφορους τύπους μολυσματικών βακτηρίων. Αυτό αφορά κυρίως την παραγωγή μικροβιακών διαλυτών/αλκοολών, όπως αιθανόλη, 1,3-προπανοδιόλη, κ.λπ. (Chatzifragou *et al.*, 2011; Sarris *et al.*, 2013). Στις προαναφερθείσες περιπτώσεις, η κύρια μεταβολική ένωση που προβλεπόταν να παραχθεί σύντομα σε υψηλές συγκεντρώσεις και θα προκαλούσε αναστολή στους διάφορους ανεπιθύμητους μολυσματικούς μικροοργανισμούς. Αυτό το γεγονός δεν ισχύει κατά τη διάρκεια της ζύμωσης προς βιοσύνθεση μικροβιακών λιπιδίων. Εδώ, δεν παράγεται μεταβολίτης που θα ανέστειλε την ανάπτυξη μολυσματικών μικροοργανισμών. Επομένως, για να ολοκληρωθεί με επιτυχία μια βιοδιεργασία που παράγει μικροβιακό λίπος σε μη ασηπτική καλλιέργεια, θα πρέπει να προστεθεί ένα μέσο παρεμπόδισης, όπως το NaCl σε αυξημένες ποσότητες (Tchakouteu *et al.*, 2017) αιθέρια έλαια ή αντιβιοτικά (Moustogianni *et al.*, 2015) ή λύματα ελαιοτριβείων που περιέχουν σε υψηλές ποσότητες, φαινολικές ενώσεις (Sarris *et al.*, 2017). Σε κάθε περίπτωση, η παρούσα μελέτη παρέχει επαρκή στοιχεία σχετικά με την παραγωγή μικροβιακού ελαίου ζύμης σε μη ασηπτικές συνθήκες, μειώνοντας το κόστος της διαδικασίας.

Ακολούθως, διερευνήθηκε η επίδραση της προσθήκης άλατος στην παραγωγή μεταβολικών προϊόντων του στελέχους *R. toruloides* NRRL Y-27012 αλλά και στη σύσταση αυτών. Αρχικά προστέθηκε στο θρεπτικό μέσο με πηγή άνθρακα τη γλυκερόλη 80 g/L, NaCl σε αναλογίες 0,2; 0,5 και 0,8%, w/v. Η προσθήκη άλατος φάνηκε να επηρεάζει την παραγωγή του ενδοκυτταρικού λίπους όχι όμως και της παραγόμενης βιομάζας. Συγκεκριμένα όσον αφορά στην ανάπτυξη του στελέχους σε παρουσία NaCl 0,2%, w/v η μέγιστη τιμή παραγόμενης βιομάζας ήταν ίση με 20,1 g/L και η μέγιστη παραγόμενη ποσότητα μικροβιακού λίπους ίση με 13,3 g/L με ποσοστό λίπους επί ξηράς ουσίας L/X=66,5%, w/w ο οποίος σημείωσε τη μέγιστη τιμή σε σχέση με όλα τα πειράματα που εκτελέστηκαν. Κατά την ανάπτυξη του ίδιου στελέχους με την υψηλότερη συγκέντρωση NaCl 0,8%, w/v, ο λόγος L/X ήταν 55,4%, w/v.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι σε σύγκριση με την καλλιέργεια μάρτυρα η παραγωγή του μικροβιακού λίπους αυξήθηκε με την προσθήκη άλατος κατά 2-4 g/L, ενώ η κυτταρική βιομάζα δεν παρουσίασε σημαντική διακύμανση. Στην αντοχή της συγκεκριμένης ζύμης σε συνθήκες αλατότητας

συνηγορούν και οι Butinar *et al.* (2005) οι οποίοι αναφέρουν ότι πολλά στελέχη του γένους *Rhodosporidium* sp. έχουν απομονωθεί από οικοσυστήματα με υψηλή αλατότητα.

Σε συνέχεια του πειραματικού σχεδιασμού, εφόσον η προσθήκη άλατος έδειξε να επάγει την παραγωγή λίπους πραγματοποιήθηκαν τρεις επιπλέον ζυμώσεις με μεγαλύτερες συγκεντρώσεις άλατος 1,0%, w/v, 2,0%, w/v και 3,0%, w/v προς περαιτέρω διερεύνηση του συγκεκριμένου φαινομένου. Η προσθήκη υψηλών συγκεντρώσεων άλατος στο θρεπτικό μέσο επέδρασε αρνητικά τόσο στην αύξηση της ζύμης όσο και στα παραγόμενα λιπίδια. Για παράδειγμα κατά την ανάπτυξη του ίδιου στελέχους στην υψηλότερη συγκέντρωση NaCl 3,0%, w/v, η τιμή της βιομάζας ήταν 12,2 g/L, ενώ του ενδοκυτταρικού λίπους ήταν 4,9 g/L και το ποσοστό λίπους L/X που σημειώθηκε ήταν 43,7%, w/w.

Τα αποτελέσματα που παρατηρήθηκαν σε αυτή τη μελέτη επιβεβαιώνονται και από τους Tchakouteau *et al.* (2017), οι οποίοι πραγματοποίησαν ζυμώσεις με το μικροοργανισμό *R. toruloides* DSM 4444 προσθέτοντας σχετικά υψηλές αρχικές συγκεντρώσεις NaCl (παρόμοιες ή/και υψηλότερες σε σχέση με την παρούσα μελέτη) και σε υπόστρωμα γλυκόζης. Οι ερευνητές παρατήρησαν ότι η βιομάζα δεν παρεμποδίστηκε σε σημαντικά ποσοστά όσο αυξανόταν η συγκέντρωση του άλατος στην καλλιέργεια. Το λίπος από την άλλη πλευρά παράχθηκε σε αρκετά υψηλότερα ποσά όταν η τιμή της συγκέντρωσης του άλατος στο μέσο της αύξησης ήταν μεταξύ ~2-4%, w/v, υποδηλώνοντας «διέγερση» της παραγωγής ελαίων σε μέσα υψηλής αλατότητας (Tchakouteu *et al.*, 2017). Από την άλλη πλευρά, και η σύσταση των λιπιδίων του ανωτέρω μικροοργανισμού του δεν διαφοροποιήθηκε ιδιαίτερα από καλλιέργεια σε καλλιέργεια. Η παρατήρηση αυτή οδηγεί στο συμπέρασμα ότι ο μικροοργανισμός μπορεί να προσαρμοστεί και να αποδώσει σε αρκετά καλό βαθμό, σε συνθήκες υψηλής αλατότητας.

Κατά τη διερεύνηση της επίδρασης της προσθήκης άλατος στο προφίλ των κυτταρικών λιπιδίων που συλλέχθηκαν από τις έξι ζυμώσεις με διαφορετικές συγκεντρώσεις NaCl διαπιστώθηκε ότι το ποσοστό του ελαϊκού (Δ^9 C18: 1), του παλμιτικού (C16: 0), του στεατικού (C18: 0) και του λινελαϊκού οξέος ($\Delta^9,12$ C18: 2) δεν επηρεάστηκε από την παρουσία άλατος στο υπόστρωμα. Τα κυριότερα οξέα ήταν το ελαϊκό (Δ^9 C18: 1) και το παλμιτικό οξύ (C16: 0) συμπέρασμα που επιβεβαιώνεται και από τη βιβλιογραφία (Easterling *et al.*, 2009), οι οποίοι βρήκαν ότι τα δύο αυτά λιπαρά οξέα αντιπροσώπευαν περίπου το 70%, w/w της συνολικής σύνθεσης. Επιπρόσθετα, δε παρατηρήθηκε σημαντική μεταβολή στη ποσοστιαία κατανομή των λιπαρών οξέων κατά τη διάρκεια της κάθε ζύμωσης. Αντίθετα μόνο η συγκέντρωση άλατος 3,0%, w/v στο μέσο καλλιέργειας ευνόησε τη σύνθεση του α-λινολενικού οξέος ($\Delta^9,12,15$ C18: 3), το ποσοστό του οποίου σημείωσε αύξηση της τάξεως του 0-5% σε σύγκριση με τις υπόλοιπες συγκεντρώσεις.

Αναφορικά με τα ποσοστά των κλασμάτων των λιπιδίων οι κατά μέσο όρο τιμές τους ήταν 79,8%, w/w, 16,1%, w/w και 3,3%, w/w για τα ουδέτερα, τα σφιγγογλυκολιπίδια και τα φωσφολιπίδια αντίστοιχα. Τα ανωτέρω αποτελέσματα επιβεβαιώνεται και από τη βιβλιογραφία καθώς οι Fakas *et al.* (2006) υπολόγισαν το κλάσμα των ουδέτερων λιπιδίων στη στάσιμη φάση με ποσοστό 74,0%, w/w, τα σφιγγογλυκολιπίδια με 20,0%, w/w και τα φωσφολιπίδια με 6,0%, w/w. Ακόμα παρατηρήθηκε ότι κατά τη

διάρκεια της ζύμωσης τα ουδέτερα λιπίδια είχαν την τάση να μειώνονται, ενώ αντίθετα τα σφιγγογλυκολιπίδια και τα φωσφολιπίδια παρουσίαζαν κάποια αύξηση.

Συνεπώς όσον αφορά τις ζυμώσεις όπου είχε προστεθεί στο υπόστρωμα χλωριούχο νάτριο διαπιστώνεται ότι τα ποσοστά του ελαϊκού οξέος αυξήθηκαν, ωστόσο, μειώθηκαν εκείνα του στεατικού. Σε κάθε περίπτωση, βέβαια, οι ποσοστιαίες διαφορές στη σύνθεση των λιπιδίων της καλλιέργειας μάρτυρα με εκείνες στις οποίες είχε προστεθεί χλωριούχο νάτριο δεν ξεπερνούν το ~4%, w/w, δείχνοντας ότι η προσθήκη άλατος στο μέσο ελάχιστα επηρέασε την αναλογία των λιπαρών οξέων.

Το τελευταίο πρόκειται για ένα εύρημα ιδιαίτερα σημαντικό αφού οδηγεί στο συμπέρασμα ότι δεν είναι απαραίτητος ο πλήρης εξευγενισμός της γλυκερόλης προκειμένου να χρησιμοποιηθεί στη βιομηχανία του βιοντίζελ. Επομένως η χρήση της ακάθαρτης γλυκερόλης θα μπορούσε να μειώσει σημαντικά το κόστος παραγωγής στις βιομηχανίες βιοντίζελ, αυξάνοντας παράλληλα την αξία του ως εναλλακτικό καύσιμο. Τα εν λόγω αποτελέσματα ενισχύουν το βιομηχανικό ενδιαφέρον γύρω από τη βέλτιστη παραγωγή μικροβιακού λίπους, λόγω των ιδιαίτερων χαρακτηριστικών του, αλλά και την καλύτερη αξιοποίηση της γλυκερόλης. Η έρευνα αυτή αποτελεί ένα έναυσμα για μια πιο ενδεδειγμένη μελέτη προκειμένου να επιτευχθεί η μέγιστη δυνατή παραγωγή μικροβιακού λίπους από ελαιογόνες ζύμες χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα βιομηχανικά απόβλητα.

Αξίζει να σημειωθεί ότι ακόμα και στις συγκεντρώσεις άλατος από 1 έως 3%, w/v παρόλο που ο μικροοργανισμός δυσκολεύτηκε να ανταπεξέλθει στο ωσμωτικό στρες και δεν παρήγαγε αρκετή βιομάζα, τα ποσοστά του ελαϊκού οξέος ήταν σχεδόν σταθερά σε όλες τις ζυμώσεις και αρκετά υψηλά, γεγονός που το καθιστά κατάλληλο για την παραγωγή βιοντίζελ.

Με την τελευταία άνοδο της παραγωγής του βιοντίζελ, έχει γίνει σημαντική αύξηση των υποκατάστατων των βρώσιμων ελαίων που μπορούν να συμμετέχουν στην παραγωγή του. Ο μικροοργανισμός *R. toruloides* θεωρείται ένας μικροοργανισμός εξαιρετικής σημασίας για την παραγωγή βιοντίζελ, καθώς μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη μετατροπή υλικών χαμηλού κόστους σε μονοκυτταρικό λίπος. Επίσης η ανοχή του μικροοργανισμού σε αρκετά υψηλές συγκεντρώσεις NaCl δημιουργεί τη δυνατότητα να χρησιμοποιηθεί και σε καλλιέργειες χωρίς αποστείρωση, μειώνοντας έτσι ακόμα περισσότερο το κόστος της βιοεπεξεργασίας και ανοίγει μονοπάτια για περαιτέρω μελέτη (Tchakouteau *et al.*, 2017).

Είναι γνωστό ότι ο περιορισμός του αζώτου στο μέσο καλλιέργειας επάγει τη συσσώρευση λιπιδίων στους ελαιογόνους μικροοργανισμούς. Διάφορες πηγές αζώτου έχουν ερευνηθεί σε μελέτες αναφορικά με τη ζύμη *R.toruloides* (Zhou *et al.*, 2013; Kiran *et al.*, 2012, 2013). Ο λόγος C/N μπορεί να επηρεάσει το ενδοκυτταρικό λίπος (Papanikolaou and Aggelis, 2011). Σε πειράματα όπου διερευνήθηκαν διαφορετικοί λόγοι C/N με τη ζύμη *Lipomyces starkeyi*, διαπιστώθηκε ότι η συσσώρευση λιπιδίων συνήθως αυξάνεται καθώς αυξάνεται ο λόγος C/N (Calvey *et al.*, 2016), δηλαδή όταν μειώνεται η περιεκτικότητα του θρεπτικού μέσου σε άζωτο. Στην παρούσα μελέτη, μελετήθηκε η επίδραση του λόγου C/N στην παραγωγή

μεταβολικών προϊόντων αλλά και στη σύνθεση αυτών. Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκαν αρχικά καλλιέργειες με αρχικές συγκεντρώσεις γλυκερόλης (G10l₀) ~50, 80 και 90 g/L, με την ίδια αρχική συγκέντρωση αζώτου (πεπτόνη 2,0 g/L και εκχύλισμα ζύμης 1,0 g/L). Η αύξηση της συγκέντρωσης του άνθρακα είχε ως συνέπεια την αύξηση της συγκέντρωσης των ολικών λιπιδίων από 6,9 g/L (G10l₀ ~50) σε 11,6 g/L (G10l₀ ~90). Ακολούθησαν ζυμώσεις με πηγή άνθρακα τη γλυκερόλη και αρχική συγκέντρωση (G10l₀) ~90 g/L και τέσσερις διαφορετικές συγκεντρώσεις αζώτου και οι αναλογίες που προέκυψαν ήταν οι C/N=50 moles/moles, C/N=100 moles/moles, C/N=160 moles/moles και C/N=240 moles/moles. Η αύξηση του αζώτου στο θρεπτικό μέσο ευνόησε την παραγωγή κυτταρικής μάζας του μικροοργανισμού καθώς η μέγιστη τιμή βιομάζας σημειώθηκε στην αναλογία με τη μεγαλύτερη συγκέντρωση αζώτου (C/N=50 moles/moles) και ήταν ίση με 30,2 g/L με απόδοση 0,30 g/g. Η τιμή αυτή μπορεί να χαρακτηριστεί ως αρκετά ενδιαφέροντα, συγκρινόμενη με αντίστοιχες τιμές παραγωγής ξηράς μικροβιακής μάζας κατά την αύξηση ετεροτρόφων μικροοργανισμών στη γλυκερόλη χρησιμοποιούμενη ως υλικό εκκίνησης της διεργασίας (Koukoumaki *et al.*, 2024). Στις λοιπές αναλογίες η απόλυτη τιμή μειώθηκε, με τις αποδόσεις βιομάζας προς καταναλωθέν υπόστρωμα, όμως, να παραμένουν στα ίδια σχεδόν επίπεδα, 0,31 g/g και 0,28 g/g, για τους λόγους C/N=100 moles/moles, C/N=160 moles/moles και C/N=240 moles/moles, αντίστοιχα. Αναφορικά με την επίδραση του λόγου C/N στο ποσοστό λίπους επί ξηράς ουσίας οι Wiebe *et al.* (2012) διαπίστωσαν ότι σε πειράματα που διενεργήθηκαν με τη ζύμη *R.toruloides* το ποσοστό λίπους σημείωσε αύξηση όταν ο λόγος C/N αυξήθηκε από 50 moles/moles σε 100 moles/moles. Οι Tchakouteu *et al.* (2015), χρησιμοποιώντας στέλεχος του *R.toruloides* σε θρεπτικό μέσο με αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης 30 g/L ανέφεραν ότι σε αναλογία C/N=100 moles/moles, η μέγιστη απόδοση λίπους επί ξηρής ουσίας ήταν 25,7%, w/w.

Στη συγκεκριμένη μελέτη οι διαφορετικοί λόγοι C/N επηρέασαν το ποσοστό λίπους επί ξηράς ουσίας και την απόλυτη τιμή του παραγόμενου λίπους. Συγκεκριμένα στη ζύμωση με C/N=50 moles/moles το στέλεχος παρήγαγε ποσότητα ενδοκυτταρικού λίπους, της τάξης των 10,1 g/L με L/X να είναι ίσο με 34,4%, w/w. Στη ζύμωση με C/N=100 moles/moles η τελική τιμή του λίπους έφτασε τα 12,0 g/L, ενώ σημειώθηκε το μέγιστο ποσοστό λίπους επί ξηράς ουσίας ανάμεσα στις τρεις αναλογίες και ήταν ίσο με 49,0%, w/w στις 325 h ζύμωσης. Αντίθετα η μείωση του αζώτου, στο λόγο C/N=160 moles/moles, επέφερε μείωση στην τιμή των λιπιδίων που ήταν ίση με 9,5 g/L χωρίς να επηρεάσει σημαντικά το μέγιστο ποσοστό λίπους επί ξηράς ουσίας που ήταν ίσο με 46,0%, w/w. Έτσι, εντός του εύρους των αρχικών μοριακών αναλογιών C/N που δοκιμάστηκαν (50 έως 240 moles/moles) σημειώθηκε σημαντική παραγωγή SCO. Αυτό είναι σχετικά απροσδόκητο, καθώς σύμφωνα με τη θεωρία της διαδικασίας παραγωγής λιπιδίων από σάκχαρα και συναφείς ενώσεις (όπως η γλυκερίνη), όσο περισσότερη είναι η περίσσεια άνθρακα στο μέσο (άρα όσο υψηλότερος ο αρχικός λόγος C/N) τόσο περισσότερα λιπίδια αποθηκεύονται εντός των κυττάρων. Παρόλα αυτά, σε καλλιέργεια άλλου στελέχους του είδους *R. toruloides* (στέλεχος IFO 0559) στη γλυκόζη υπό συνθήκες περιορισμού σε άζωτο, εδείχθη ότι και εκεί, όπως στην παρούσα εργασία, υπήρξε

«βέλτιστος» («optimum») αρχικός λόγος C/N, και σε συνθήκες ακραίου περιορισμού σε άζωτο, η ελαιοσυσσώρευση μειωνόταν, τόσο σε απόλυτες όσο και σε σχετικές τιμές (Moreton, 1988).

Η πηγή αζώτου έχει αποδειχτεί ότι μπορεί να επηρεάσει τη σύσταση των λιπαρών οξέων (Kiran *et al.*, 2013). Όσον αφορά τον ποιοτικό προσδιορισμό του λίπους για τις ζυμώσεις με διαφορετικό C/N, τα ουδέτερα λίπη έδειξαν να καταλαμβάνουν το υψηλότερο ποσοστό σε όλες τις ζυμώσεις με αυτό να κυμαίνεται από 79,0-86,6%. Ακολούθησαν τα σφιγγογλυκολιπίδια με ποσοστά από 9,2 έως 15,8%, ενώ το ποσοστό των φωσφολιπιδίων κυμάνθηκε μεταξύ 2,4 έως 10,3%. Ωστόσο το προφίλ των λιπαρών οξέων τόσο στα ολικά λιπίδια όσο και στα κλάσματα αυτών δεν επηρεάστηκε από τη μεταβολή του λόγου C/N. Το κυρίαρχο οξύ παρέμεινε, όπως και σε όλες τις προηγούμενες διεργασίες ζυμώσεων, το ελαϊκό με ποσοστά ~40-50%, w/w και ακολούθησε το παλμιτικό οξύ, το ποσοστό του οποίου κυμάνθηκε μεταξύ ~24-37%, w/w ενώ το ποσοστό για τα υπόλοιπα λιπαρά οξέα δεν ξεπέρασε το 15,0%, w/w.

Σύμφωνα με αρκετές μελέτες, υψηλά ποσοστά της πηγής άνθρακα στο μέσο καλλιέργειας (≥ 65 g/L) σε σχέση με την περιεκτικότητα σε άζωτο, επιτρέπουν μέγιστη απόδοση και ικανότητα αποθήκευσης λιπιδίων από την ελαιογόνο ζύμη. Αυτό αποδίδεται τόσο στο ωσμωτικό σοκ που προκαλεί η πηγή άνθρακα όταν είναι σε μεγάλη αναλογία στο μέσο καλλιέργειας, όσο και στις εν γένει βιοχημικές διαφοροποιήσεις οι οποίες επισυμβαίνουν λόγω του περιορισμού σε άζωτο, με απόρροια η δραστηριότητα του κύκλου Krebs να μειώνεται λόγω της ενδοκυτταρικής αύξησης του κιτρικού οξέος, και συνακολούθως το κιτρικό οξύ να αποτελεί το υλικό εκκίνησης για τη βιοσύνθεση των ενδοκυτταρικών τριγλυκεριδίων (Moreton, 1988; Makri *et al.*, 2010; Papanikolaou and Aggelis, 2011a; b; Osorio-Gonzalez, *et al.*, 2019). Η συγκέντρωση, ωστόσο, της πηγής άνθρακα, και συγκεκριμένα της γλυκερόλης, δεν ενδείκνυται να υπερβαίνει τα 100 g/L, καθώς υπάρχει κίνδυνος η υψηλή ωσμωτική πίεση να παρεμποδίσει την κυτταρική ανάπτυξη σύμφωνα με τους Yang *et al.* (2014). Βεβαίως, υπάρχουν και εργασίες κατά τις οποίες έλαβε χώρα αύξηση στελεχών «κόκκινων» ζυμών (*R. toruloides*) σε μεγάλες αρχικές συγκεντρώσεις υποστρώματος (≥ 110 g/L) με πολύ καλή παραγωγή βιομάζας και λιπιδίων, και ελάχιστη (ή αμελητέα) παρεμπόδιση η οποία προκλήθηκε εκ μέρους του υποστρώματος (Papanikolaou *et al.*, 2017b; Diamantis *et al.*, 2023). Με γνώμονα την επίδραση στο ποσοστό λίπους επί ξηράς ουσίας και το κόστος της πηγής αζώτου ο λόγος C/N=100 moles/moles κρίθηκε ο καταλληλότερος ανάμεσα σε όσους δοκιμάστηκαν καθώς σημείωσε τα καλύτερα αποτελέσματα χωρίς να απαιτείται χρήση μεγάλης συγκέντρωσης αζώτου, γεγονός που μειώνει το τελικό κόστος της διεργασίας.

Συγκεφαλαιώνοντας θα παρουσιάσουμε σύνθεση βιβλιογραφίας σε σχέση με την παραγωγή μικροβιακών ελαίων από μικροοργανισμούς του γένους *Rhodospiridium* καλλιεργούμενους σε ποικίλες πηγές άνθρακα και τη σύγκρισή τους με την παρούσα εργασία στον πιο κάτω πίνακα:

Πίνακας 4.1. Συγκριτικά αποτελέσματα της διεθνούς βιβλιογραφίας, ζυμώσεων του μικροοργανισμού *Rhodospiridium toruloides* σε διάφορα υποστρώματα. Παρουσιάζονται η παραγωγή βιομάζας (X, g/L) και το λίπος επί ξηράς ουσίας (L/X %, w/w)

Στέλεχος	Υπόστρωμα	Τύπος καλλιέργειας	X (g/L)	L/X (% w/w)	Αναφορά
<i>R. toruloides</i> *	Στεατικό οξύ	Κωνικές φιάλες	11,7	35,0	Gierhart (1984)
<i>R. toruloides</i> AS2.1389	Γλυκερόλη	Κωνικές φιάλες	19,2	47,7	Xu <i>et al.</i> (2012)
<i>R. toruloides</i> AS2.1389	Γλυκερόλη	Ασυνεχής ζύμωση σε βιοαντιδραστήρα	26,7	69,5	”
<i>R. toruloides</i> AS2.1389	Γλυκόζη	Κωνικές φιάλες	18,3	76,0	Li <i>et al.</i> (2006)
<i>R. toruloides</i> CCT 0783	Εκχύλισμα σόργου	Κωνικές φιάλες	41,7	33,1	Matsakas <i>et al.</i> (2015)
<i>R. toruloides</i> DSM 444	Γλυκερόλη/ηλιέλαιο	Κωνικές φιάλες	27,9	29,0	Leiva-Candia <i>et al.</i> (2015)
<i>R. toruloides</i> DSM 444	Γλυκερόλη/ ηλιέλαιο	Ημι-συνεχής ζύμωση σε βιοαντιδραστήρα	37,4	51,3	”
<i>R. toruloides</i> NRRL Y-27012	Ακάθαρτη γλυκερόλη	Κωνικές φιάλες	30,1	40,0	Tchakouteu <i>et al.</i> (2015)
<i>R. toruloides</i> Y4	Γλυκόζη	Ημι-συνεχής ζύμωση σε βιοαντιδραστήρα	106,5	67,5	Li <i>et al.</i> (2007)
<i>R. toruloides</i> Y4	Γλυκόζη	Κωνικές φιάλες	20,6	51,4	Wu <i>et al.</i> (2011)
<i>R. toruloides</i> Y4	Γλυκόζη	Κωνικές φιάλες	19,4	62,4	”
<i>R. toruloides</i> Y4	Γλυκόζη	Κωνικές φιάλες	23,0	20,8	Wu <i>et al.</i> (2011)
<i>R. toruloides</i> Y4	Γλυκόζη	Κωνικές φιάλες	14,2	55,6	”
<i>R. toruloides</i> Y4	Γλυκόζη	Κωνικές φιάλες	17,8	55,7	”
<i>R. toruloides</i> *	Γλυκόζη/στεατικό οξύ	Κωνικές φιάλες	9,8	46,1	Gierhart (1984)
<i>R. toruloides</i> CBS14	Γλυκόζη	Κωνικές φιάλες	12,3	30,8	Moreton (1985)
<i>R. toruloides</i> CBS14	Γλυκόζη	Κωνικές φιάλες	8,0	42,5	Moreton (1988)
<i>R. toruloides</i> CBS14	Φρουκτόζη	Κωνικές φιάλες	7,9	25,3	”
<i>R. toruloides</i> CBS14	Γλυκερόλη	Κωνικές φιάλες	5,8	34,6	”
<i>R. toruloides</i> CBS14	Γλυκόζη	Ασυνεχής ζύμωση σε βιοαντιδραστήρα	12,5	42,9	”
<i>R. toruloides</i> CBS14	Φρουκτόζη	Ασυνεχής ζύμωση σε βιοαντιδραστήρα	8,7	39,8	”
<i>R. toruloides</i> CBS14	Ξυλόζη	Ασυνεχής ζύμωση σε βιοαντιδραστήρα	8,3	42,2	”
<i>R. toruloides</i> Y4	Εκχύλισμα <i>Jerusalem artichoke</i>	Κωνικές φιάλες	25,5	40,0	Zhao <i>et al.</i> (2010)
<i>R. toruloides</i> Y4	Υδρόλυμα <i>Jerusalem artichoke</i>	Ημι-συνεχής ζύμωση σε βιοαντιδραστήρα	70,1	56,5	”

<i>R. toruloides</i> CBS14	Γλυκόζη	Ημι-συνεχής ζύμωση σε βιοαντιδραστήρα	35,0	71,4	Wiebe <i>et al.</i> (2012)
<i>R. toruloides</i> CBS14	Γλυκόζη/ξυλόζη/αραβινόζη	Ημι-συνεχής ζύμωση σε βιοαντιδραστήρα	27,0	55,5	”
<i>R. toruloides</i> Y4	Ακάθαρτη γλυκερόλη	Ασυνεχής ζύμωση σε βιοαντιδραστήρα	35,3	46,0	Kiran <i>et al.</i> (2013)
<i>R. toruloides</i> 2F5	Ινουλίνη	Κωνικές φιάλες	15,8	62,1	Wang <i>et al.</i> (2014)
<i>R. toruloides</i> 2F5	Ινουλίνη	Ασυνεχής ζύμωση σε βιοαντιδραστήρα	15,6	70,4	”
<i>R. toruloides</i> CCT 0783	Γλυκόζη/ξυλόζη	Ασυνεχής ζύμωση σε βιοαντιδραστήρα	13,3	42,0	Bonturi <i>et al.</i> (2015)
<i>R. toruloides</i> DSM 444	Γλυκόζη	Ασυνεχής ζύμωση σε βιοαντιδραστήρα	~22	~40	Bommareddy <i>et al.</i> (2015)
<i>R. toruloides</i> DSM 444	Γλυκερόλη	Ασυνεχής ζύμωση σε βιοαντιδραστήρα	~15	~57	”
<i>R. toruloides</i> AS2.1389	Γλυκόζη	Συνεχής ζύμωση σε βιοαντιδραστήρα	8,7	61,8	Shen <i>et al.</i> (2013)
<i>R. toruloides</i> AS2.1389	Γλυκόζη	Συνεχής ζύμωση σε βιοαντιδραστήρα	5,7	53,1	”
<i>Rhodospodium toruloides</i> Y4	Ακάθαρτη γλυκερόλη	Κωνικές φιάλες	24,9	48,9	Yang <i>et al.</i> (2014)
<i>R. toruloides</i> DSM 4444	Γλυκόζη	Ημι-συνεχής ζύμωση σε βιοαντιδραστήρα	37,2	64,5	Tchakouteu <i>et al.</i> , (2017)
<i>R. toruloides</i> DSM 4444	Ακάθαρτη γλυκερόλη	Κωνικές φιάλες	28,9	43,3	Diamantopoulou <i>et al.</i> , (2020)
<i>R. toruloides</i> DSM 4444	Ακάθαρτη γλυκερόλη	Κωνικές φιάλες	18,7	26,7	Sarantou <i>et al.</i> , (2021)
<i>R. toruloides</i> NRRL Y-27013	Ακάθαρτη γλυκερόλη	Κωνικές φιάλες	29,3	43,0	Diamantis <i>et al.</i> , (2023)
<i>R. toruloides</i> NRRL Y-6985	Ακάθαρτη γλυκερόλη	Κωνικές φιάλες	29,1	43,2	Diamantis <i>et al.</i> , (2023)
<i>R. toruloides</i> NRRL Y-27012	Ακάθαρτη γλυκερόλη	Κωνικές φιάλες	25,1	46,5	Παρούσα εργασία
<i>R. toruloides</i> NRRL Y-27012	Ακάθαρτη γλυκερόλη	Ασυνεχής ζύμωση σε βιοαντιδραστήρα	26,8	50,3	Παρούσα εργασία

*: Μη ταυτοποίηση στελέχους

4.2. Καλλιέργειες του μικροοργανισμού *Debaryomyces prosopidis*

Ο καθαρισμός της ακατέργαστης γλυκερόλης είναι μια πολύ δαπανηρή διαδικασία και ως εκ τούτου, αρκετές ερευνητικές μελέτες επικεντρώνονται στη βιομετατροπή της, σε προϊόντα προστιθέμενης αξίας, με απώτερο σκοπό τη βιωσιμότητα της βιομηχανίας βιοντίζελ. Ο μικροοργανισμός *Debaryomyces prosopidis* απέδειξε ότι δύναται να μεταβολίζει την ακατέργαστη γλυκερόλη προς παραγωγή αραβιτόλης, μια γλυκαντική αλκοόλη σπουδαίας σημασίας για τη βιομηχανία τροφίμων αλλά και τη βιοτεχνολογική έρευνα.

Διάφορες ερευνητικές μελέτες έχουν στραφεί προς τη βιοτεχνολογική παραγωγή της αραβιτόλης χρησιμοποιώντας ωσμώφιλες ζύμες. Στην παρούσα διδακτορική διατριβή χρησιμοποιήθηκε η ζύμη *D. prosopidis* FMCC Y₆₉ η οποία είναι ικανή να καταναλώνει τη γλυκερόλη παράγοντας αραβιτόλη με ικανοποιητική απόδοση. Για το λόγο αυτό η πειραματική διαδικασία σχεδιάστηκε με στόχο τη μελέτη και αξιολόγηση των διαφορετικών παραγόντων που επηρεάζουν τη σύνθεση της αραβιτόλης. Στους παράγοντες αυτούς συμπεριλαμβάνονται η θερμοκρασία επώασης, η πηγή άνθρακα και αζώτου, το pH και ο αερισμός (Kordowska *et al.*, 2015).

Αρχικά μελετήθηκε η ικανότητα του συγκεκριμένου στελέχους να αυξάνεται σε υψηλές συγκεντρώσεις γλυκερόλης κατά τη διάρκεια ασυνεχών ζυμώσεων τόσο σε κωνικές φιάλες όσο και σε βιοαντιδραστήρα. Από τα αποτελέσματα των ζυμώσεων προέκυψε ότι η ζύμη *D. prosopidis* FMCC Y₆₉ είναι ικανή να αυξάνεται σε ιδιαίτερα υψηλές συγκεντρώσεις γλυκερόλης λόγω του ωσμώφιλου χαρακτήρα της. Μάλιστα τόσο στις ζυμώσεις σε κωνικές φιάλες όσο και στο βιοαντιδραστήρα η απόδοση της αραβιτόλης αυξήθηκε με την αύξηση της αρχικής συγκέντρωσης της γλυκερόλης. Πρόσφατες έρευνες επιβεβαιώνουν την ωσμωανθεκτικότητα της ζύμης καθώς φαίνεται ότι πράγματι η απόδοση του παραγόμενου προϊόντος ανά μονάδα καταναλωθέντος υποστρώματος αυξάνεται λόγω του ωσμωτικού στρες που προκαλείται σε περιπτώσεις πολύ υψηλής συγκέντρωσης σακχάρου. Σε έρευνα από τους Koganti *et al.* (2013) φαίνεται ότι είδος *D. hansenii* όταν καλλιεργήθηκε σε γλυκερόλη με συγκέντρωση 90 g/L η απόδοση της παραγόμενης αραβιτόλης ήταν 20%, w/w και αυξήθηκε στο 50%, w/w όταν καλλιεργήθηκε σε θρεπτικό μέσο με αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης 150 g/L. Επιπλέον, σύμφωνα με τους Kumar and Gummadi, (2011) σε συνθήκες πολύ υψηλού ωσμωτικού στρες το στέλεχος *D. nepalensis* παρήγαγε υψηλή συγκέντρωση αραβιτόλης από γλυκερόλη. Ακόμη ένα στέλεχος ζύμης, το *Zygosaccharomyces rouxii*, με αύξηση της συγκέντρωσης του υποστρώματος παρήγαγε υψηλότερη ποσότητα αραβιτόλης (Morant and Witter, 1979).

Η γλυκερόλη αποτελεί ιδανικό υπόστρωμα για πολλά στελέχη ζυμών που τη μεταβολίζουν σε αραβιτόλη, όπως αναφέρεται σε διάφορες ερευνητικές μελέτες στη βιβλιογραφία. Οι Koganti *et al.* (2011) έπειτα από καλλιέργεια 214 στελεχών ζύμης σε γλυκερόλη απέδειξαν ότι αρκετά στελέχη των γενών

Debaryomyces και *Metchnikowia* ήταν ικανά να παράξουν ικανοποιητικές ποσότητες αραβιτόλης μετά από 3 ημέρες ζύμωσης. Ακόμη, οι Yoshikawa *et al.* (2014) έπειτα από καλλιέργεια 10 στελεχών των γενών *Candida*, *Debaryomyces*, *Metchnikowia* και *Hansenula* κατέληξαν ότι η ζύμη *Candida quercitrusa* NBRC 1022 μπορεί να παράξει 41,7 g/L αραβιτόλης από 300 g/L ακάθαρτης γλυκερόλης.

Το pH μπορεί να επηρεάσει σημαντικά την αύξηση ενός μικροοργανισμού αλλά και τη μεταβολική του δραστηριότητα. Οι αναφορές στη βιβλιογραφία δείχνουν ότι οι χαμηλές τιμές pH έχουν αρνητική επίδραση στη μικροβιακή αύξηση. Πιο συγκεκριμένα, σύμφωνα με τους Koganti *et al.* (2013), η τιμή της παραγόμενης βιομάζας ήταν X=17 g/L σε pH 3, X=21 g/L σε pH 3,5, X=23 g/L σε pH 4, X= 25 g/L σε pH 5 και X=30 g/L σε pH 6. Το pH μπορεί επίσης να επηρεάσει την παραγωγή της αραβιτόλης. Στην ίδια έρευνα, στο τέλος της ζύμωσης σε pH 3,5 η απόδοση του παραγόμενου προϊόντος και η παραγωγικότητα ήταν υψηλότερες σε σχέση με τις υπόλοιπες ζυμώσεις που έγιναν στις διαφορετικές τιμές pH. Επίσης η τελική συγκέντρωση προϊόντος ήταν 38 g/L σε 120 h ζύμωσης, ενώ στις υπόλοιπες τιμές pH η συγκέντρωση της αραβιτόλης ήταν 20 g/L σε ζύμωση 5 ημερών. Οι Al-qaysi *et al.* (2017) μελέτησαν την ικανότητα του είδους *D. hansenii* να αυξάνεται σε διαφορετικές τιμές pH (4,5; 5,5; 6,5 και 7) και από τα αποτελέσματα προέκυψε ότι στην τιμή pH 4,5 η αύξηση του μικροοργανισμού είναι η μέγιστη. Σε υψηλότερες τιμές pH η παραγωγή της βιομάζας ελαττώθηκε σημαντικά. Στην παρούσα μελέτη το στέλεχος *Debaryomyces* FMCC Y₆₉ δοκιμάστηκε σε ζυμώσεις σε τρεις διαφορετικές τιμές pH (3,5; 5,5; 7,5) και από τα αποτελέσματα προέκυψε ότι η βέλτιστη τιμή pH για την αύξηση ήταν 5,5 όπου η παραγωγή της βιομάζας ήταν 15 g/L. Ωστόσο, σε αντίθεση με παρόμοιες μελέτες, η τιμή pH 3,5 δεν ευνόησε την παραγωγή αραβιτόλης αφού η τελική συγκέντρωση μειώθηκε σε 38,5 g/L από 70,9 g/L που σημειώθηκε σε pH 5,5. Το γεγονός αυτό μπορεί να αποδοθεί στο ότι το συγκεκριμένο στέλεχος απομονώθηκε από θαλάσσιο περιβάλλον και συνεπώς διαβιούσε σε pH με εύρος από 7,5-8,4. Τέλος, στη ζύμωση με pH 7,5 η τελική συγκέντρωση προϊόντος ήταν 56,7 g/L.

Πέραν από την κατανάλωση βιομηχανικής γλυκερόλης, το στέλεχος *D. prosopidis* FMCC Y₆₉ παρουσίασε ικανοποιητική απόδοση στη παραγωγή αραβιτόλης από γλυκόζη αλλά και σε ζυμώσεις όπου χρησιμοποιήθηκε μικτό υπόστρωμα γλυκόζης-γλυκερόλης. Πολλές αναφορές στη βιβλιογραφία επιβεβαιώνουν την παραγωγή αραβιτόλης από γλυκόζη από διάφορα στελέχη ζυμών. Οι Nozaki *et al.* (2003) αναφέρουν την παραγωγή 81,4 g/L αραβιτόλης με απόδοση 0,40 g/g από το είδος *Metchnikowia reukaufii* σε θρεπτικό μέσο που περιείχε 200 g/L γλυκόζης. Ακόμη, οι Saha *et al.* (2007) ανέπτυξαν το στέλεχος *Zygosaccharomyces rouxii* NRRL 27264 σε 175 g/L γλυκόζης και η παραγωγή της αραβιτόλης ήταν ίση με 83,4 g/L ενώ η τιμή της απόδοσης ήταν 0,48 g/g. Σύμφωνα με τους Zhu *et al.* (2010) το στέλεχος *Kodamae ohmeri* NH-9 παράγαγε 81,2 g/L αραβιτόλης με απόδοση 0,41 g/g όταν καλλιεργήθηκε σε θρεπτικό μέσο με αρχική συγκέντρωση γλυκόζης 200 g/L. Στην παρούσα μελέτη ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσίασε το γεγονός ότι η ζύμη *D. prosopidis* FMCC Y₆₉ σε μικτό υπόστρωμα γλυκόζης-γλυκερόλης, όταν και οι δύο πηγές άνθρακα βρίσκονται σε υψηλή συγκέντρωση, ο μικροοργανισμός καταναλώνει

πρώτα τη γλυκόζη και μετά τη γλυκερόλη επιβεβαιώνοντας και σε αυτή την περίπτωση το μηχανισμό της καταβολικής καταστολής. Σύμφωνα με τη Gancendo, (1992) η διαδικασία της καταστολής ξεκινά ως «απόκριση» σε ένα σήμα το οποίο ενεργοποιείται όταν η γλυκόζη ή συγγενικά σάκχαρα είναι παρόντα στο μέσο καλλιέργειας. Η δημιουργία αυτού του σήματος επάγει τη δραστηριότητα μιας ή περισσότερων πρωτεϊνών οι οποίες το μεταδίδουν ώστε να επιβραδυνθεί ή να σταματήσει η μεταγραφή των εμπλεκόμενων γονιδίων. Το εν λόγω σήμα δεν αλληλεπιδρά άμεσα με το DNA, αλλά αντίθετα δύναται να επηρεάσει τη δράση μιας ρυθμιστικής πρωτεΐνης, μέσω αλλοστερικής ή ομοιοπολικής τροποποίησης, η οποία μπορεί να αναστείλει τη μεταγραφή του εμπλεκόμενου γονιδίου.

Επίσης η παρουσία γλυκόζης στο θρεπτικό μέσο δεν οδήγησε σε υψηλότερη συγκέντρωση αραβιτόλης σε σχέση με τη γλυκερόλη όπου σημειώθηκε η υψηλότερη τιμή στην απόδοση του προϊόντος ανά μονάδα καταναλωθέντος υποστρώματος. Συγκεκριμένα σε υπόστρωμα γλυκερόλης με αρχική συγκέντρωση 125 g/L η παραγωγή αραβιτόλης έφτασε τα 70,9 g/L με απόδοση $Y_{Ara/Glc}=0,57$ g/g που είναι η υψηλότερη που έχει αναφερθεί βιβλιογραφικά ενώ ακολουθεί απόδοση προϊόντος $Y_{Ara/Glc}=0,55$ g/g που παρουσιάστηκε σε πείραμα των Koganti *et al.* (2011) όταν η ζύμη *D. hansenii* καλλιεργήθηκε σε υπόστρωμα γλυκερόλης. Συμπερασματικά, η γλυκερόλη αποδείχθηκε καταλληλότερο υπόστρωμα για την ανάπτυξη της ζύμης *D. prosopidis* FMCC Y₆₉ σε σχέση με τη γλυκόζη ή και μίγματα αυτών. Το εν λόγω αποτέλεσμα είναι ιδιαίτερα ενθαρρυντικό λαμβάνοντας υπόψιν το γεγονός ότι η γλυκερόλη αποτελεί ένα φθινό παραπροϊόν χαμηλότερου κόστους συγκριτικά με την εμπορική γλυκόζη.

Ποικίλες βιβλιογραφικές αναφορές τεκμηριώνουν την αντοχή που παρουσιάζει η ζύμη του γένους *Debaryomyces* σε υψηλές συγκεντρώσεις NaCl (Almagro *et al.*, 2000; Nobre *et al.*, 1999). Η επίδραση του ωσμωτικού στρες στο είδος *D. hansenii* όσον αφορά την αύξηση αλλά και την παραγωγή αραβιτόλης έχει αναφερθεί σε διάφορες επιστημονικές μελέτες. Πιο συγκεκριμένα οι Nobre *et al.* (1999) παρατήρησαν ότι η ζύμη *D. hansenii* είναι ικανή να παράγει γλυκερόλη και αραβιτόλη από την κατανάλωση γλυκόζης σε θρεπτικό μέσο που περιέχει KCl και NaCl. Τα κύτταρα παρήγαγαν μόνο αραβιτόλη κατά την αύξηση τους σε γλυκόζη αλλά παρατηρήθηκε ταυτόχρονη συσσώρευση γλυκερόλης και αραβιτόλης όταν στο θρεπτικό μέσο πέρα από τη γλυκόζη είχαν προστεθεί KCl και NaCl. Στην παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκαν ασυνεχείς ζυμώσεις σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις NaCl (2%, w/v, 5%, w/v, 8%, w/v, 12%, w/v, 16%, w/v). Για τις συγκεντρώσεις 2-12%, w/v δεν παρατηρήθηκε σημαντική επίδραση στην παραγωγή βιομάζας οι τιμές της οποίας κυμαίνονταν μεταξύ 13-16 g/L. Η καλή αντοχή του στελέχους στην ωσμωτική πίεση θα ήταν δυνατόν να οφείλεται και στο γεγονός ότι ο συγκεκριμένος μικροοργανισμός έχει απομονωθεί από ψάρια και ως εκ τούτου ήταν προσαρμοσμένος σε περιβάλλον υψηλής ώσμωσης. Τα αποτελέσματα προηγούμενων ερευνών επιβεβαιώνουν ότι δεν παρατηρείται επίδραση της συγκέντρωσης NaCl στο σχηματισμό της βιομάζας (Burke and Jennings, 1990; Koganti *et al.*, 2011). Στη ζύμωση με συγκέντρωση NaCl~16%, w/v, ωστόσο, παρατηρήθηκε σημαντική μείωση στην παραγωγή βιομάζας ($X=4,3$ g/L) και αραβιτόλης ($Ara=1,9$ g/L) ενώ και η αφομοίωση της γλυκερόλης ήταν περιορισμένη. Οι υψηλότερες τιμές

στην απόδοση αραβιτόλης σημειώθηκαν στις συγκεντρώσεις 2 και 5%, w/v NaCl, ωστόσο σε όλες τις δοκιμές η απόδοση εκτιμήθηκε σε $Y_{Ara/Glc} \sim 0,37-0,47$ g/g παρουσιάζοντας μικρή μείωση σε σχέση με τη ζύμωση-μάρτυρα (όχι παρουσία άλατος). Το ποσοστό των ενδοπολυσακχαριτών δεν διαφοροποιήθηκε από το μάρτυρα και κυμάνθηκε μεταξύ 25-30%, w/w. Σε αυτό συνηγορούν οι Koganti *et al.* (2013), όπου σε καλλιέργειες με συγκέντρωση NaCl μεγαλύτερη από 100 g/L παρατήρησαν μείωση στην παραγωγή αραβιτόλης από τη ζύμη *D. hansenii* SBP-1. Ωστόσο το γεγονός ότι το στέλεχος της παρούσας διατριβής δύναται να αναπτυχθεί σε πολύ υψηλές συγκεντρώσεις άλατος επιτρέπει τη χρήση του σε υποστρώματα υψηλής αλατότητας που θα ανέστειλαν την ανάπτυξη άλλων μικροοργανισμών.

Ένας σημαντικός παράγοντας που θα μείωνε το κόστος της βιοδιεργασίας για παραγωγή αραβιτόλης είναι η χρήση μη θερμικά επεξεργασμένου θρεπτικού μέσου. Η αποδεδειγμένη ωσμωανθεκτικότητα της ζύμης πρόσφερε τη δυνατότητα δοκιμής σε μη θερμικά επεξεργασμένο μέσο με υψηλή αλατότητα που δυσχεραίνει την ανάπτυξη μολυσματικών της διεργασίας βακτηρίων. Έτσι, πραγματοποιήθηκαν τρεις ζυμώσεις με στόχο να μελετηθεί η ικανότητα του στελέχους *D. prosopidis* FMCC Y₆₉ να αυξάνεται σε μη θερμικά επεξεργασμένο θρεπτικό μέσο και η επίδραση της δεδομένης συνθήκης στη τελική συγκέντρωση του παραγόμενου προϊόντος. Μια ζύμωση με προηγουμένως αποστειρωμένο θρεπτικό μέσο χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας και σε μία από τις δυο ζυμώσεις, σε μη θερμικά αποστειρωμένο υπόστρωμα, προστέθηκε NaCl ~5%, w/v. Από τα αποτελέσματα προέκυψε ότι το στέλεχος μπορεί να παράγει αραβιτόλη παρουσία άλλων μικροοργανισμών στο θρεπτικό μέσο, ωστόσο καλύτερα αποτελέσματα σημειώθηκαν στο υπόστρωμα με παρουσία NaCl. Αυτό μπορεί να αποδοθεί στο γεγονός ότι πολλοί μικροοργανισμοί δεν μπορούν να αναπτυχθούν σε περιβάλλον υψηλής όσμωσης. Ο περιορισμός της μόλυνσης από άλλους μικροοργανισμούς οδήγησε σε αύξηση της τελικής συγκέντρωσης του προϊόντος. Επίσης η προσθήκη NaCl είχε ως αποτέλεσμα και την αύξηση της απόδοσης αραβιτόλης ανά μονάδα καταναλωθέντος υποστρώματος καθώς και της παραγωγικότητας. Τα αποτελέσματα αυτά είναι ενθαρρυντικά καθώς καταδεικνύουν ότι το στέλεχος *D. prosopidis* FMCC Y₆₉ μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε πιο οικονομικές διαδικασίες για την παραγωγή της αραβιτόλης.

Το επόμενο αντικείμενο της πειραματικής μελέτης αφορούσε την επίδραση του λόγου C/N στην παραγωγή αραβιτόλης του στελέχους *D. prosopidis* FMCC Y₆₉. Οι Kundam *et al.* (2013) αναφέρουν ότι η αύξηση της συγκέντρωσης του αζώτου στο θρεπτικό μέσο είχε θετική επίδραση στη παραγωγή αιθανόλης και αραβιτόλης από το είδος *D. nepalensis*. Επιπλέον, η μείωση του λόγου C/N λόγω αύξησης της συγκέντρωσης αζώτου οδήγησε σε βελτίωση της απόδοσης των παραγόμενων προϊόντων. Σε μία άλλη μελέτη όπου ο λόγος C/N κυμάνθηκε μεταξύ των τιμών 23,8 moles/moles και 63,0 moles/moles, η μέγιστη παραγωγή βιομάζας ήταν 11,3 g/L και σημειώθηκε στη μεγαλύτερη συγκέντρωση της πηγής αζώτου, 0,9 g/L. Στην ίδια μελέτη, η απόδοση του παραγόμενου προϊόντος αυξήθηκε από 0,34 g/g στα 0,47 g/g με αύξηση του λόγου C/N από 23,8 moles/moles σε 63 moles/moles (Loman *et al.*, 2018). Στην παρούσα εργασία πεπτόνη και εκχύλισμα ζύμης χρησιμοποιήθηκαν ως πηγές αζώτου διαμορφώνοντας τρεις

διαφορετικούς λόγους C/N (79, 158, 246 moles/moles) για τις ζυμώσεις που πραγματοποιήθηκαν σε αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης 135 g/L. Από τους τρεις λόγους που δοκιμάστηκαν, στο λόγο C/N=79 moles/moles που περιείχε 6 g/L αζωτούχων συστατικών σημειώθηκαν τα καλύτερα αποτελέσματα όσον αφορά την παραγωγή βιομάζας καθώς η υψηλή συγκέντρωση αζώτου ευνόησε το σχηματισμό κυττάρων. Συγκεκριμένα, ~31 g/L βιομάζας παρήχθησαν στο λόγο 79 moles/moles, ~18 g/L στο λόγο 158 moles/moles και ~13 g/L στο λόγο 246 moles/moles. Ωστόσο η παραγωγή της αραβιτόλης παρουσίασε τη μέγιστη τιμή της στο λόγο C/N=158 moles/moles (~70 g/L) ενώ, εμφάνισε παρόμοια τιμή τελικής συγκέντρωσης στις ζυμώσεις με λόγους C/N=79 moles/moles και C/N=246 moles/moles φτάνοντας τα ~43 g/L και τα ~45 g/L αντίστοιχα. Η απόδοση παραγωγής αραβιτόλης παρουσίασε σημαντικές διαφορές στις τρεις δοκιμές και στο λόγο C/N=158 moles/moles, εμφάνισε τη μέγιστη τιμή της ($Y_{Ara/Glcl}=0,52$ g/g).

Λαμβάνοντας υπόψη τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τη μελέτη των διαφορετικών παραγόντων σε ασυνεχείς ζυμώσεις, στη συνέχεια της πειραματικής διαδικασίας πραγματοποιήθηκε ημι-συνεχής καλλιέργεια σε κωνικές φιάλες, χρησιμοποιώντας ως πηγή άνθρακα τη γλυκερόλη, με στόχο την αύξηση της τελικής συγκέντρωσης του προϊόντος. Η παραγωγή της αραβιτόλης μετά από 457 h ζύμωσης ήταν ~91 g/L με απόδοση ~0,53 g/g, όπου και πραγματοποιήθηκε προσθήκη θρεπτικού υποστρώματος με γλυκερόλη στο βιοαντιδραστήρα. Η τιμή της παραγωγικότητας ήταν ίση με 0,14 g/L/h καθόλη τη διάρκεια της ζύμωσης. Η τελική συγκέντρωση της αραβιτόλης ήταν 90,9 g/L και η μέγιστη απόδοση του προϊόντος ανά μονάδα καταναλωθέντος υποστρώματος ήταν ~0,53 g/g. Η παραγωγή αραβιτόλης σε ημι-συνεχείς καλλιέργειες έχει μελετηθεί εκτενώς όπως παρουσιάζεται στη βιβλιογραφία. Σε μία περίπτωση το στέλεχος *Hansenula polymorpha* DSM 70277 κατά τη διάρκεια ημι-συνεχούς ζύμωσης παρήγαγε 18,8 g/L αραβιτόλης σε 60 h ζύμωσης χρησιμοποιώντας ως πηγή άνθρακα τη γλυκόζη. Μάλιστα, η πηγή άνθρακα μετατράπηκε εξ' ολοκλήρου σε αραβιτόλη αφού κανένα άλλο οργανικό οξύ δεν ανιχνεύθηκε στο θρεπτικό μέσο στο τέλος της ζύμωσης. Το στέλεχος *Metschnikowia reukaufii* AJ14787 σε ημι-συνεχείς καλλιέργειες μετά από 100 h ζύμωσης παρήγαγε 206 g/L αραβιτόλης σε υπόστρωμα γλυκόζης.

Συγκεφαλαιώνοντας θα παρουσιάσουμε σύνθεση βιβλιογραφίας σε σχέση με την παραγωγή πολυολών από μικροοργανισμούς καλλιεργούμενους σε ποικίλες πηγές άνθρακα και τη σύγκριση τους με την παρούσα εργασία στον πιο κάτω Πίνακα:

Πίνακας 4.2. Συγκριτικά αποτελέσματα της διεθνούς βιβλιογραφίας, ζυμώσεων μικροοργανισμών σε διάφορα υποστρώματα. Παρουσιάζονται οι παραγόμενες πολυόλες και η συγκέντρωση αυτών (g/L)

Στέλεχος	Πηγή άνθρακα	Πολυόλες	Τύπος καλλιέργειας	Συγκέντρωση πολυολών (g/L)	Αναφορές
<i>Hansenula polymorpha</i> DSM 70277	Γλυκόζη	Αραβιτόλη	Ασυνεχής ζύμωση σε βιοαντιδραστήρα	18,8	Escalante <i>et al.</i> (1990)
<i>Candida succiphila</i> Y-11998	Αραβινόζη	Αραβιτόλη	Κωνικές φιάλες	81,0	Dien <i>et al.</i> (1996)

<i>Zygosaccharomyces rouxii</i> NRRL B-27,624	Γλυκόζη	Αραβιτόλη	Κωνικές φιάλες	83,4	Saha <i>et al.</i> (2007)
<i>Debaryomyces hansenii</i> NRRL Y-7483	Γλυκερόλη	Αραβιτόλη	Κωνικές φιάλες	14,5	Koganti <i>et al.</i> (2011)
<i>Debaryomyces hansenii</i> NRRL Y-7483	Γλυκερόλη	Αραβιτόλη	Ασυνεχής ζύμωση σε βιοαντιδραστήρα	40-43	Koganti and Ju (2013)
<i>Candida quercitrusa</i> NBRC 1022	Γλυκερόλη	Αραβιτόλη	Ασυνεχής ζύμωση σε βιοαντιδραστήρα	85,1	Yoshikawa <i>et al.</i> (2014)
<i>Debaryomyces hansenii</i> NRRL Y-7483	Αλεύρι σόγιας	Αραβιτόλη	Κωνικές φιάλες	11,8	Loman <i>et al.</i> (2018)
<i>Debaryomyces sp.</i> FMCC Y ₆₉	Γλυκερόλη	Αραβιτόλη	Κωνικές φιάλες	47,5	Παρούσα εργασία
<i>Debaryomyces sp.</i> FMCC Y ₆₉	Γλυκερόλη	Αραβιτόλη	Ασυνεχής ζύμωση σε βιοαντιδραστήρα	29,4	Παρούσα εργασία
<i>Yarrowia lipolytica</i> A-15	Γλυκερόλη	Ερυθριτόλη	Κωνικές φιάλες	35,5	Tomaszewska <i>et al.</i> (2012)
<i>Yarrowia lipolytica</i> A-15	Γλυκερόλη	Ερυθριτόλη	Ασυνεχής ζύμωση σε βιοαντιδραστήρα	64,9	Tomaszewska <i>et al.</i> (2012)
<i>Yarrowia lipolytica</i> A-15	Γλυκερόλη	Μαννιτόλη	Ασυνεχής ζύμωση σε βιοαντιδραστήρα	14,9	Tomaszewska <i>et al.</i> (2012)
<i>Yarrowia lipolytica</i> A-15	Γλυκερόλη	Αραβιτόλη	Ασυνεχής ζύμωση σε βιοαντιδραστήρα	2,2	Tomaszewska <i>et al.</i> (2012)
<i>Yarrowia lipolytica</i> A UV'1	Γλυκερόλη	Ερυθριτόλη	Ασυνεχής ζύμωση σε βιοαντιδραστήρα	58,9	Tomaszewska <i>et al.</i> (2012)
<i>Yarrowia lipolytica</i> A UV'1	Γλυκερόλη	Μαννιτόλη	Ασυνεχής ζύμωση σε βιοαντιδραστήρα	13,7	Tomaszewska <i>et al.</i> (2012)
<i>Yarrowia lipolytica</i> A UV'1	Γλυκερόλη	Αραβιτόλη	Ασυνεχής ζύμωση σε βιοαντιδραστήρα	5,6	Tomaszewska <i>et al.</i> (2012)
<i>Yarrowia lipolytica</i> Wratistavia K1	Γλυκερόλη	Ερυθριτόλη	Ασυνεχής ζύμωση σε βιοαντιδραστήρα	65,1	Rakicka <i>et al.</i> (2016)
<i>Yarrowia lipolytica</i> Wratistavia K1	Γλυκερόλη	Ερυθριτόλη	Ασυνεχής ζύμωση σε βιοαντιδραστήρα	155,5	Mirończuk <i>et al.</i> (2014)
<i>Yarrowia lipolytica</i> Wratistavia K1	Γλυκερόλη	Μαννιτόλη	Ασυνεχής ζύμωση σε βιοαντιδραστήρα	8,1	Mirończuk <i>et al.</i> (2014)
<i>D. prosopidis</i> FMCC Y ₆₉	Γλυκερόλη	Αραβιτόλη	Ημί-συνεχής ζύμωση σε κωνικές φιάλες	90,9	Παρούσα εργασία

5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η δραματική αύξηση της κατανάλωσης καυσίμων και συνάμα ο περιβαλλοντικός προβληματισμός που εγείρει η μείωση των αποθεμάτων αργού πετρελαίου, έχουν στρέψει το παγκόσμιο ενδιαφέρον στην εξεύρεση ανανεώσιμων πηγών ενέργειας. Το βιοντίζελ αποτελεί ένα από τα πολλά υποσχόμενα εναλλακτικά και ανανεώσιμα καύσιμα. Ωστόσο, η αλματώδης αύξηση της χρήσης του βιοντίζελ έχει ως αποτέλεσμα την ραγδαία αύξηση της γλυκερόλης ως παραπροϊόντος της διεργασίας το οποίο χρήζει περαιτέρω επεξεργασίας και αξιοποίησης. Επιπλέον η οικολογική καταστροφή που οφείλεται στην καλλιέργεια της ζάχαρης αλλά και οι αδιαμφισβήτητες επιπτώσεις που προκαλεί στην υγεία έχουν οδηγήσει στην αναζήτηση εναλλακτικών υποκατάστατων της, στη βιομηχανία τροφίμων. Τέτοια υποκατάστατα αποτελούν οι πολυόλες οι οποίες παράγονται χημικά μέσω υδρογόνωσης σακχάρων, μια διαδικασία αρκετά κοστοβόρα. Ορισμένες επιστημονικές μελέτες έχουν εστιάσει στη διερεύνηση παραγωγής πολυολών μέσω βιοδιεργασιών. Μία πολλά υποσχόμενη πολυόλη με ιδιαίτερα χαμηλό γλυκαιμικό δείκτη και υψηλό κόστος αποτελεί η αραβιτόλη. Η εν λόγω ουσία αποτελεί αντικείμενο σπουδαίου βιοτεχνολογικού ενδιαφέροντος που ελάχιστα έχει μελετηθεί προς το παρόν.

Η συγκεκριμένη ερευνητική μελέτη απέδειξε ότι ανάμεσα στα μεταβολικά προϊόντα που μπορούν να παραχθούν χρησιμοποιώντας τη γλυκερόλη ως πηγή άνθρακα είναι το ενδοκυτταρικό λίπος και η αραβιτόλη. Η παραγωγή των δύο αυτών ουσιών επετεύχθη με τη χρήση στελεχών των ζυμών *Rhodospiridium toruloides* NRRL Y-27012 και *Debaryomyces prosopidis* FMCC Y₆₉ για τη παραγωγή ενδοκυτταρικού λίπους και αραβιτόλης αντίστοιχα, χρησιμοποιώντας ως κύρια πηγή άνθρακα την ακάθαρτη γλυκερόλη προερχόμενη από τις βιομηχανικές διεργασίες παραγωγής βιοντίζελ.

Τα εν λόγω στελέχη επέδειξαν ωσμωανθεκτικότητα τόσο σε υψηλές αρχικές συγκεντρώσεις του εν λόγω αποβλήτου όσο και σε υψηλές συγκεντρώσεις NaCl καθώς και ικανότητα να αφομοιώσουν υπόστρωμα μη θερμικώς επεξεργασμένο, με απώτερο σκοπό τη διεξαγωγή ζυμώσεων σε παρόμοια μέσα και ως εκ τούτου τη μείωση τους κόστους της διεργασίας. Γενικά, αξίζει να τονιστεί ότι τα στελέχη ζυμών που χρησιμοποιήθηκαν, αποδείχθηκαν ικανά να χρησιμοποιούν την ακάθαρτη γλυκερόλη ως πηγή άνθρακα και ενέργειας, στις περισσότερες συνθήκες στις οποίες δοκιμάστηκαν.

Η ζύμη *R. toruloides* NRRL Y-27012 επέδειξε ικανότητα να μεταβολίζει την παραπάνω πηγή άνθρακα προς παραγωγή βιομάζας, ενδοπολυσακχαριτών και λιπιδίων. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η ανάκτηση των λιπιδίων της ζύμης δύναται να γίνει με τη μέθοδο μίγματος διαλυτών χλωροφορμίου (CHCl₃)–μεθανόλης (CH₃OH) χωρίς την απαίτηση της όξινης υδρόλυσης με HCl. Επιπλέον προέκυψε ότι το pH επηρεάζει την παραγωγή βιομάζας και λιπιδίων χωρίς να μεταβάλλει στη σύσταση των λιπαρών οξέων του συγκεκριμένου στελέχους. Το στέλεχος απέδωσε καλύτερα αναφορικά με τον σχηματισμό λιπιδίων όταν αναπτύχθηκε σε γλυκερόλη έναντι της εμπορικής γλυκόζης γεγονός που το καθιστά κατάλληλο για τη χρήση του στη βιοτεχνολογική αξιοποίηση της ακάθαρτης γλυκερόλης. Επιπλέον το εν λόγω στέλεχος απέδειξε ότι δύναται να αναπτυχθεί σε υποστρώματα υψηλής ώσμωσης και συνάμα παρουσία φαινολικών ουσιών (Onion Solid Wastes, OSWs). Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε ότι σε περιβάλλον υψηλής ώσμωσης,

είτε λόγω τη αύξησης της συγκέντρωσης του υποστρώματος είτε λόγω της προσθήκης χλωριούχου νατρίου (NaCl) εγείρεται η διαδικασία της λιποσυσσώρευσης. Το γεγονός αυτό είναι ιδιαίτερα σημαντικό καθώς δεικνύει τη δυνατότητα χρήσης αποβλήτων με υψηλή αλατότητα ως υποστρώματα καλλιέργειας χωρίς περαιτέρω καθαρισμό. Συμπερασματικά, η σημαντική παραγωγή μικροβιακών λιπιδίων καθώς και η σύσταση των παραγομένων ελαίων που προσομοιάζει αυτής των φυτικών ελαίων που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή βιοντίζελ, παρέχει τη δυνατότητα σύνθεσης 2^{ης} γενιάς βιοντίζελ μέσω της ζύμης *R. toruloides* NRRL Y-27012, χρησιμοποιώντας το «απόβλητο» της εν λόγω διεργασίας ως υλικό εκκίνησης, σε ένα «κλειστό» σύστημα με απώτερο στόχο την εξάλειψη των παραγόμενων αποβλήτων.

Η ζύμη *D. prosopidis* FMCC Y₆₉ επέδειξε ομοίως εξαιρετική ικανότητα μετατροπής της γλυκερόλης σε βιομάζα, ενδοπολυσακχαρίτες και αραβιτόλη. Το εν λόγω στέλεχος δύναται να καταναλώνει ακάθαρτη γλυκερόλη μετατρέποντας την σε αραβιτόλη σε υψηλές συγκεντρώσεις τόσο σε ζυμώσεις σε κωνικές φιάλες (Ara=70,9 g/L) όσο και σε βιοαντιδραστήρα (Ara=65,5 g/L). Αξίζει να τονιστεί ότι καίτοι στη δεύτερη περίπτωση (χρήση βιοαντιδραστήρα) σημειώθηκε μικρότερη παραγωγή προϊόντος, η ζύμωση ολοκληρώθηκε πολύ ταχύτερα, ενώ παράχθηκε και σε υψηλή συγκέντρωση ξηρά κυτταρική βιομάζα περιέχουσα σε ικανοποιητικά ποσά ενδοπολυσακχαρίτες. Σε κάθε περίπτωση, η απόδοση προϊόντος ως προς το αναλωθέν υπόστρωμα σημείωσε μία από τις μέγιστες τιμές που έχει αναφερθεί βιβλιογραφικά μέχρι στιγμής ($Y_{Ara/Glcl}=0,57$ g/g). Επιπλέον και σε αυτή την περίπτωση η ζύμη απέδωσε καλύτερα σε υπόστρωμα γλυκερόλης σε σχέση με την εμπορική γλυκόζη καθώς επίσης αναπτύχθηκε ικανοποιητικά σε μέσα με πολύ υψηλή αλατότητα και ταυτόχρονα χωρίς καμία θερμική επεξεργασία. Η καλή ωσμωανθεκτικότητα της ζύμης επέτρεψε τη διενέργεια πειράματος σε μέσο με υψηλή αλατότητα υπό μη ασηπτικές συνθήκες που κατέστειλε την ανταγωνιστικότητα των στελεχών απέναντι σε άλλους μικροβιακούς πληθυσμούς. Συγκεκριμένα, η παρουσία του άλατος περιόρισε τη βακτηριακή επιμόλυνση και βοήθησε την επικράτηση της ζύμης και την παραγωγή πολυόλης (Ara=43,6 g/L). Το γεγονός αυτό θα επέτρεπε σημαντική μείωση στο κόστος της βιοτεχνολογικής αξιοποίησης της ακάθαρτης γλυκερόλης προς παραγωγή ενός ακριβού και υψηλής προστιθέμενης αξίας προϊόντος όπως είναι η αραβιτόλη.

Ένα σπουδαίο εύρημα της παρούσας μελέτης διαπιστώθηκε σε ημι-συνεχή τροφοδοτούμενη καλλιέργεια σε κωνικές φιάλες όπου η παραγωγή αραβιτόλης έφτασε 90,9 g/L με απόδοση $Y_{Ara/Glcl} \sim 0,53$ g/g. Η ανωτέρω επιτευχθείσα τιμή της αραβιτόλης, ήταν από τις υψηλότερες που έχουν αναφερθεί ποτέ στη διεθνή βιβλιογραφία για άγρια (μη γενετικώς τροποποιημένα) στελέχη ζυμών κατά την αύξησή τους σε οποιαδήποτε πηγή άνθρακα η οποία να χρησιμοποιείται ως υλικό εκκίνησης της διεργασίας.

Τα αποτελέσματα της εν λόγω διατριβής συνέβαλαν στην εξεύρεση βιοτεχνολογικών εφαρμογών της γλυκερόλης ως υλικού χρησιμοποιούμενου στη Βιομηχανική Μικροβιολογία καθώς απεδείχθη ότι τα στελέχη των ζυμών *Rhodosporidium toruloides* και *Debaryomyces prosopidis* μπορούν να μεταβολίζουν την ακάθαρτη γλυκερόλη προς παραγωγή μεταβολικών προϊόντων προστιθέμενης αξίας όπως λιπίδια και

αραβιτόλη συμβάλλοντας στην επίλυση προβλημάτων που σχετίζονται με την επισιτιστική και ενεργειακή κρίση και προωθώντας ταυτόχρονα την αειφορία, την κυκλική οικονομία και την πράσινη ανάπτυξη.

ΟΝΟΜΑΤΟΛΟΓΙΑ

GloI: Γλυκερόλη (g/L)

Glc: Γλυκόζη (g/L)

X: Η παραγόμενη βιομάζα (g/L)

L: Το παραγόμενο λίπος (g/L)

Ara: Αραβιτόλη (g/L)

IPS: Παραγόμενοι ενδοπολυσακχαρίτες (g/L)

$Y_{Ara/S}$: Απόδοση αραβιτόλης ανά μονάδα καταναλωθέντος υποστρώματος (g/g)

$Y_{L/S}$: Απόδοση λίπους ανά μονάδα καταναλωθέντος υποστρώματος (g/g)

$Y_{X/S}$: Απόδοση βιομάζας ανά μονάδα καταναλωθέντος υποστρώματος (g/g)

L/X: Τιμή παραγόμενου μικροβιακού λίπους ανά παραγόμενη βιομάζα (% , w/w)

IPS/X: Τιμή παραγόμενων ενδοπολυσακχαριτών ανά παραγόμενη βιομάζα (% , w/w)

GloI_{cons}: Καταναλωθείσα γλυκερόλη (g/L)

TS: Ολικά σάκχαρα (g/L)

TS_{cons}: Κατανάλωση υποστρώματος (g/L)

Qp: Παραγωγικότητα αραβιτόλης ανά ώρα (g/L/h)

OSWs: Στερεά απόβλητα Κρεμμυδιού (Onion Solid Wastes)

DOP: Διαλυμένο οξυγόνο (Dissolved Oxygen Tension)

qO₂: Ο ειδικός ρυθμός κατανάλωσης οξυγόνου

FAN: Free Amino Nitrogen

NaCl: Χλωριούχο νάτριο

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Achten, W. M., Mathijs, E., Verchot, L., Singh, V. P., Aerts, R., & Muys, B. (2007). *Jatropha* biodiesel fueling sustainability? *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 1(4), 283-291.
- Adler, L., Pedersen, A., & Tunblad-Johansson, I. (1982). Polyol accumulation by two filamentous fungi grown at different concentrations of NaCl. *Physiologia Plantarum*, 56(2), 139-142.
- Ageitos, J. M., Vallejo, J. A., Veiga-Crespo, P., & Villa, T. G. (2011). Oily yeasts as oleaginous cell factories. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 90, 1219-1227.
- Aggelis, G., Ratomahenina, R., Aranaud, A., Galzy, P., Martin Privat, P., Perraud, J. P., Graille, J. (1988). Etude de l'influence des conditions de culture sur la teneur en acide gamma linoléique de souches de *Mucor*. *Oléagineux (Paris)* 43(7), 311-317.
- Aggelis, G., Pina, M., & Graille, J. (1990). Localisation de l'acide gamma linoléique dans les mycéliums et dans les spores chez deux mucorales. *Oléagineux (Paris)*, 45(5), 229-232.
- Ahmed, Z. (2001). The Properties of *Candida fannata* R28 for D-Arabitol Production from D-glucose. *Online Journal of Biological Sciences* 1, 1005–1008.
- Akada, R., Minomi, K., Kai, J., Yamashita, I., Miyakawa, T., & Fukui, S. (1989). Multiple genes coding for precursors of rhodotorucine A, a farnesyl peptide mating pheromone of the basidiomycetous yeast *Rhodospiridium toruloides*. *Molecular and Cellular Biology*. 9(8), 3491- 3498.
- Almagro, A., Prista, C., Castro, S., Quintas, C., Madeira-Lopes, A., Ramos, J., & Loureiro-Dias, M. C. (2000). Effects of salts on *Debaryomyces hansenii* and *Saccharomyces cerevisiae* under stress conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 56(2-3), 191-197.
- Al-Qaysi, S. A., Al-Haideri, H., Thabit, Z. A., Al-Kubaisy, W. H. A. A. R., & Ibrahim, J. A. A. R. (2017). Production, Characterization, and Antimicrobial Activity of Mycocin Produced by *Debaryomyces hansenii* DSMZ70238. *International Journal of Microbiology*, 2605382.
- Amaral, P. F. F., Ferreira, T. F., Fontes, G. C., & Coelho, M. A. Z. (2009). Glycerol valorization: new biotechnological routes. *Food and Bioproducts Processing*, 87(3), 179-186.

- 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. *Engineering in Life Sciences*, 9(6), 468-478.
- André, A., Diamantopoulou, P., Philippoussis, A., Sarris, D., Komaitis, M., & Papanikolaou, S. (2010). Biotechnological conversions of bio-diesel derived waste glycerol into added-value compounds by higher fungi: production of biomass, single cell oil and oxalic acid. *Industrial Crops and Products*, 31(2), 407-416.
- Athenaki, M., Gardeli, C., Diamantopoulou, P., Tchakouteu, S. S., Sarris, D., Philippoussis, A., & Papanikolaou, S. (2018). Lipids from yeasts and fungi: physiology, production and analytical considerations. *Journal of Applied Microbiology*, 124(2), 336-367.
- Belitz, H. D., Grosch, W., & Schieberle, P. (2009). Coffee, tea, cocoa. *Food Chemistry*, 938-970.
- Beopoulos, A., Cescut, J., Haddouche, R., Uribebarrea, J. L., Molina-Jouve, C., & Nicaud, J. M. (2009). *Yarrowia lipolytica* as a model for bio-oil production. *Progress in Lipid Research*, 48(6), 375-387.
- Bettenbrock, K., Fischer, S., Kremling, A., Jahreis, K., Sauter, T., & Gilles, E. D. (2006). A quantitative approach to catabolite repression in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, 281(5), 2578-2584.
- Bodnaruk, P. W., & Golden, D. A. (1996). Influence of pH and incubation temperature on fatty acid composition and virulence factors of *Yersinia enterocolitica*. *Food Microbiology*, 13(1), 17-22.
- Bohn, J. A., & BeMiller, J. N. (1995). (1→3)- β -D-Glucans as biological response modifiers: a review of structure-functional activity relationships. *Carbohydrate Polymers*, 28(1), 3-14.
- Bommareddy, R. R., Sabra, W., Maheshwari, G., & Zeng, A. P. (2015). Metabolic network analysis and experimental study of lipid production in *Rhodospiridium toruloides* grown on single and mixed substrates. *Microbial Cell Factories*, 14(1), 1-13.
- Bommareddy, R. R., Sabra, W., & Zeng, A. P. (2017). Glucose-mediated regulation of glycerol uptake in *Rhodospiridium toruloides*: insights through transcriptomic analysis on dual substrate fermentation. *Engineering in Life Sciences*, 17(3), 282-291.

- Bonturi, N., Matsakas, L., Nilsson, R., Christakopoulos, P., Miranda, E. A., Berglund, K. A., & Rova, U. (2015). Single cell oil producing yeasts *Lipomyces starkeyi* and *Rhodospordium toruloides*: selection of extraction strategies and biodiesel property prediction. *Energies*, 8(6), 5040-5052.
- Bren, A., Park, J. O., Towbin, B. D., Dekel, E., Rabinowitz, J. D., & Alon, U. (2016). Glucose becomes one of the worst carbon sources for *E. coli* on poor nitrogen sources due to suboptimal levels of cAMP. *Scientific Reports*, 6(1), 24834.
- Burke, R. M., & Jennings, D. H. (1990). Effect of sodium chloride on growth characteristics of the marine yeast *Debaryomyces hansenii* in batch and continuous culture under carbon and potassium limitation. *Mycological Research*, 94(3), 378-388.
- Butinar, L., Santos, S., Spencer-Martins, I., Oren, A., & Gunde-Cimerman, N. (2005). Yeast diversity in hypersaline habitats. *FEMS Microbiology Letters*, 244(2), 229-234.
- Buzzini, P., Innocenti, M., Turchetti, B., Libkind, D., van Broock, M., & Mulinacci, N. (2007). Carotenoid profiles of yeasts belonging to the genera *Rhodotorula*, *Rhodospordium*, *Sporobolomyces*, and *Sporidiobolus*. *Canadian Journal of Microbiology*, 53(8), 1024-1031.
- Calvey, C. H., Su, Y. K., Willis, L. B., McGee, M., & Jeffries, T. W. (2016). Nitrogen limitation, oxygen limitation, and lipid accumulation in *Lipomyces starkeyi*. *Bioresource Technology*, 200, 780-788.
- Carly, F., Vandermies, M., Telek, S., Steels, S., Thomas, S., Nicaud, J. M., & Fickers, P. (2017). Enhancing erythritol productivity in *Yarrowia lipolytica* using metabolic engineering. *Metabolic Engineering*, 42, 19-24.
- Certik, M., & Shimizu, S. (1999). Biosynthesis and regulation of microbial polyunsaturated fatty acid production. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 87(1), 1-14.
- Chatzifragkou, A., Makri, A., Belka, A., Bellou, S., Mavrou, M., Mastoridou, M., Mystrioti P., Onjarao G., Aggelis G., & Papanikolaou, S. (2011). Biotechnological conversions of biodiesel derived waste glycerol by yeast and fungal species. *Energy*, 36(2), 1097-1108.

- Chatzifragkou, A., Papanikolaou, S., Dietz, D., Doulgeraki, A. I., Nychas, G. J. E., & Zeng, A. P. (2011). Production of 1, 3-propanediol by *Clostridium butyricum* growing on biodiesel-derived crude glycerol through a non-sterilized fermentation process. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *91*, 101-112.
- Claude, S. (1999). Research of new outlets for glycerol-recent developments in France. *Lipid/Fett*, *101*(3), 101-104.
- Crick, R. (1961). Improvements in or relating to sweetening agents for food. vol. *US Patent*, 884.
- Davies, R. J., & Holdsworth, J. E. (1992). Synthesis of lipids in yeasts: biochemistry, physiology and production. *Adv. Appl. Lipid Res*, *1*(11).
- da Cruz, S. H., Batistote, M., & Ernandes, J. R. (2003). Effect of sugar catabolite repression in correlation with the structural complexity of the nitrogen source on yeast growth and fermentation. *Journal of the Institute of Brewing*, *109*(4), 349-355.
- da Silva, G. P., Mack, M., & Contiero, J. (2009). Glycerol: a promising and abundant carbon source for industrial microbiology. *Biotechnology Advances*, *27*(1), 30-39.
- da Silva, J., da Silva, F. L. H., Ribeiro, J. E. S., de Melo, D. J. N., Santos, F. A., & de Medeiros, L. L. (2020). Effect of supplementation, temperature and pH on carotenoids and lipids production by *Rhodotorula mucilaginosa* on sisal bagasse hydrolyzate. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, *30*, 101847.
- Dias, C., Silva, C., Freitas, C., Reis, A., & Da Silva, T. L. (2016). Effect of medium pH on *Rhodospiridium toruloides* NCYC 921 carotenoid and lipid production evaluated by flow cytometry. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, *179*, 776-787.
- Dien, B. S., Kurtzman, C. P., Saha, B. C., & Bothast, R. J. (1996). Screening for L-arabinose fermenting yeasts. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, *57*, 233-242.
- Diamantis, I., Papanikolaou, S., Michou, S., Anastasopoulos, V., & Diamantopoulou, P. (2023). Yeast Lipids from Crude Glycerol Media and Utilization of Lipid Fermentation Wastewater as Maceration Water in Cultures of Edible and Medicinal Mushrooms. *Processes*, *11*(11), 3178.

- Diamantopoulou, P., Papanikolaou, S., Kapoti, M., Komaitis, M., Aggelis, G., & Philippoussis, A. (2012). Mushroom polysaccharides and lipids synthesized in liquid agitated and static cultures. Part I: Screening various mushroom species. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, *167*, 536-551.
- Diamantopoulou, P., Papanikolaou, S., Katsarou, E., Komaitis, M., Aggelis, G., & Philippoussis, A. (2012). Mushroom polysaccharides and lipids synthesized in liquid agitated and static cultures. Part II: Study of *Volvariella volvacea*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, *167*, 1890-1906.
- Diamantopoulou, P., Filippousi, R., Antoniou, D., Varfi, E., Xenopoulos, E., Sarris, D., & Papanikolaou, S. (2020). Production of added-value microbial metabolites during growth of yeast strains on media composed of biodiesel-derived crude glycerol and glycerol/xylose blends. Part I. *FEMS Microbiology Letters*, *367*(10), fnaa063.
- Diamantopoulou, P., Stoforos, N. G., Xenopoulos, E., Sarris, D., Psarianos, D., Philippoussis, A., & Papanikolaou, S. (2020). Lipid production by *Cryptococcus curvatus* growing on commercial xylose and subsequent valorization of fermentation waste-waters for the production of edible and medicinal mushrooms. Part II. *Biochemical Engineering Journal*, *162*, 107706.
- Diamantopoulou, P., Sarris, D., Tchakouteu, S. S., Xenopoulos, E., & Papanikolaou, S. (2023). Growth Response of Non-Conventional Yeasts on Sugar-Rich Media: Part 1: High Production of Lipid by *Lipomyces starkeyi* and Citric Acid by *Yarrowia lipolytica*. *Microorganisms*, *11*(7), 1863.
- Diamantopoulou, P., & Papanikolaou, S. (2023). Biotechnological production of sugar-alcohols: Focus on *Yarrowia lipolytica* and edible/medicinal mushrooms. *Process Biochemistry*, *124*, 113-131.
- Dorado, M. P., Ballesteros, E., López, F. J., & Mittelbach, M. (2004). Optimization of alkali-catalyzed transesterification of *Brassica carinata* oil for biodiesel production. *Energy & Fuels*, *18*(1), 77-83.
- Dritsas, P., & Aggelis, G. (2023). Studies on the co-metabolism of glucose and glycerol in the fungus *Umbelopsis isabellina*. *Carbon Resources Conversion*, *6*(4), 326-333.
- Easterling, E. R., French, W. T., Hernandez, R., & Licha, M. (2009). The effect of glycerol as a sole and secondary substrate on the growth and fatty acid composition of *Rhodotorula glutinis*. *Bioresource Technology*, *100*(1), 356-361.

- Erickson, B., Nelson, & Winters, P. (2012). Perspective on opportunities in industrial biotechnology in renewable chemicals. *Biotechnology Journal*, 7(2), 176-185.
- Escalante, J., Caminal, G., Figueredo, M., & de Mas, C. (1990). Production of arabitol from glucose by *Hansenula polymorpha*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 70(4), 228-231.
- Fakas, S., Papanikolaou, S., Galiotou-Panayotou, M., Komaitis, M., & Aggelis, G. (2006). Lipids of *Cunninghamella echinulata* with emphasis to γ -linolenic acid distribution among lipid classes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 73, 676-683.
- Fan, X., Burton, R., & Zhou, Y. (2010). Glycerol (byproduct of biodiesel production) as a source for fuels and chemicals mini review. *The Open Fuels & Energy Science Journal*, 3(1).
- Fang, Q. H., & Zhong, J. J. (2002). Effect of initial pH on production of ganoderic acid and polysaccharide by submerged fermentation of *Ganoderma lucidum*. *Process Biochemistry*, 37(7), 769-774.
- Fazenda, M. L., Seviour, R., McNeil, B., & Harvey, L. M. (2008). Submerged culture fermentation of “higher fungi”: the macrofungi. *Advances in Applied Microbiology*, 63, 33-103.
- Folch, J., Lees, M., & Sloane Stanley, G. H. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem*, 226(1), 497-509.
- Galiotou-Panayotou, M., Kalantzi, O., & Aggelis, G. (1998). Modelling of simultaneous production of polygalacturonase and exopolysaccharide by *Aureobasidium pullulans* ATHUM 2915. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 73, 155-162.
- Gancedo, J. M. (1998). Yeast carbon catabolite repression. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62(2), 334-361.
- Garay, L. A., Sitepu, I. R., Cajka, T., Chandra, I., Shi, S., Lin, T., German, J., Fiehn, O., & Boundy-Mills, K. L. (2016). Eighteen new oleaginous yeast species. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 43(7), 887-900.
- Gardeli, C., Athenaki, M., Xenopoulos, E., Mallouchos, A. K. A. A., Koutinas, A. A., Aggelis, G., & Papanikolaou, S. (2017). Lipid production and characterization by *Mortierella (Umbelopsis)*

isabellina cultivated on lignocellulosic sugars. *Journal of Applied Microbiology*, 123(6), 1461-1477.

Grembecka, M. (2015). Sugar alcohols—their role in the modern world of sweeteners: a review. *European Food Research and Technology*, 241, 1-14.

Gern, R. M. M., Wisbeck, E., Rampinelli, J. R., Ninow, J. L., & Furlan, S. A. (2008). Alternative medium for production of *Pleurotus ostreatus* biomass and potential antitumor polysaccharides. *Bioresource Technology*, 99(1), 76-82.

Gianotti, A., Iucci, L., Guerzoni, M. E., & Lanciotti, R. (2009). Effect of acidic conditions on fatty acid composition and membrane fluidity of *Escherichia coli* strains isolated from Crescenza cheese. *Annals of Microbiology*, 59, 603-610.

Gierhart, D.I., *US Patent* (1984) 4485, 173.

Görke, B., & Stülke, J. (2008). Carbon catabolite repression in bacteria: many ways to make the most out of nutrients. *Nature Reviews Microbiology*, 6(8), 613-624.

Huck, J. H., Roos, B., Jakobs, C., Van Der Knaap, M. S., & Verhoeven, N. M. (2004). Evaluation of pentitol metabolism in mammalian tissues provides new insight into disorders of human sugar metabolism. *Molecular Genetics and Metabolism*, 82(3), 231-237.

Hoffman, C. S., Wood, V., & Fantes, P. A. (2015). An ancient yeast for young geneticists: a primer on the *Schizosaccharomyces pombe* model system. *Genetics*, 201(2), 403-423.

Huang, Q., Wang, Q., Gong, Z., Jin, G., Shen, H., Xiao, S., Xie, H., Ye, S., Wang, J., & Zhao, Z. K. (2013). Effects of selected ionic liquids on lipid production by the oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides*. *Bioresource Technology*, 130, 339-344.

Ito, T., Nakashimada, Y., Senba, K., Matsui, T., & Nishio, N. (2005). Hydrogen and ethanol production from glycerol-containing wastes discharged after biodiesel manufacturing process. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 100(3), 260-265.

- Jeong, S. C., Koyyalamudi, S. R., Hughes, J. M., Khoo, C., Bailey, T., Marrisudi, K., Park J., Kim J. H., & Song, C. H. (2013). Antioxidant and immunomodulating activities of exo-and endopolysaccharide fractions from submerged mycelia cultures of culinary-medicinal mushrooms. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 15(3).
- Kachrimanidou, V., Kopsahelis, N., Chatzifragkou, A., Papanikolaou, S., Yanniotis, S., Kookos, I., & Koutinas, A. A. (2013). Utilisation of by-products from sunflower-based biodiesel production processes for the production of fermentation feedstock. *Waste and Biomass Valorization*, 4, 529-537.
- Karamerou, E. E., Theodoropoulos, C., & Webb, C. (2016). A biorefinery approach to microbial oil production from glycerol by *Rhodotorula glutinis*. *Biomass and Bioenergy*, 89, 113-122.
- Karayannis, D., Vasilakis, G., Charisteidis, I., Litinas, A., Manolopoulou, E., Tsakalidou, E., & Papanikolaou, S. (2023). Screening of New Industrially Important Bacterial Strains for 1, 3-Propanediol, 2, 3-Butanediol and Ethanol Production through Biodiesel-Derived Glycerol Fermentations. *Microorganisms*, 11(6), 1424.
- Katsampa, P., Valsamedou, E., Grigorakis, S., & Makris, D. P. (2015). A green ultrasound-assisted extraction process for the recovery of antioxidant polyphenols and pigments from onion solid wastes using Box–Behnken experimental design and kinetics. *Industrial Crops and Products*, 77, 535-543.
- Kim, J. W., Pachepsky, Y. A., Shelton, D. R., & Coppock, C. (2010). Effect of streambed bacteria release on *E. coli* concentrations: Monitoring and modeling with the modified SWAT. *Ecological Modelling*, 221(12), 1592-1604.
- Kiran, E. U., Salakkam, A., Trzcinski, A. P., Bakir, U., & Webb, C. (2012). Enhancing the value of nitrogen from rapeseed meal for microbial oil production. *Enzyme and Microbial Technology*, 50(6-7), 337-342.
- Kiran, E. U., Trzcinski, A., & Webb, C. (2013). Microbial oil produced from biodiesel by-products could enhance overall production. *Bioresource Technology*, 129, 650-654.

- Koganti, S., Kuo, T. M., Kurtzman, C. P., Smith, N., & Ju, L. K. (2011). Production of arabitol from glycerol: strain screening and study of factors affecting production yield. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 90, 257-267.
- Koganti, S., & Ju, L. K. (2013). *Debaryomyces hansenii* fermentation for arabitol production. *Biochemical Engineering Journal*, 79, 112-119.
- Koller, M., Bona, R., Braunegg, G., Hermann, C., Horvat, P., Kroutil, M., Maratinz, J., Neto J., Pereira, L., & Varila, P. (2005). Production of polyhydroxyalkanoates from agricultural waste and surplus materials. *Biomacromolecules*, 6(2), 561-565.
- Korkeala, H., Alanko, T., & Tiusanen, T. (1992). Effect of sodium nitrite and sodium chloride on growth of lactic acid bacteria. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 33(1), 27.
- Kordowska-Wiater, M. (2015). Production of arabitol by yeasts: current status and future prospects. *Journal of Applied Microbiology*, 119(2), 303-314.
- Koukoumaki, D. I., Tsouko, E., Papanikolaou, S., Ioannou, Z., Diamantopoulou, P., & Sarris, D. (2024). Recent advances in the production of single cell protein from renewable resources and applications. *Carbon Resources Conversion*, 7(2), 100195.
- Koutinas, A. A., Chatzifragkou, A., Kopsahelis, N., Papanikolaou, S., & Kookos, I. K. (2014). Design and techno-economic evaluation of microbial oil production as a renewable resource for biodiesel and oleochemical production. *Fuel*, 116, 566-577.
- Kumar, S., & Gummadi, S. N. (2011). Metabolism of glucose and xylose as single and mixed feed in *Debaryomyces nepalensis* NCYC 3413: production of industrially important metabolites. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 89, 1405-1415.
- Kumar, L. R., Kaur, R., Yellapu, S. K., Zhang, X., & Tyagi, R. D. (2019). Biodiesel production from oleaginous microorganisms with wastes as raw materials. In *Biofuels: Alternative Feedstocks and Conversion Processes for the production of Liquid and Gaseous Biofuels*. Academic Press, 661-690.

- Kumdam, H., Narayana Murthy, S., & Gummadi, S. N. (2013). Production of ethanol and arabitol by *Debaryomyces nepalensis*: influence of process parameters. *AMB Express*, 3, 1-12.
- Kumdam, H., Murthy, S. N., & Gummadi, S. N. (2014). Arabitol production by microbial fermentation-biosynthesis and future applications. *International Journal of Sciences & Applied Research*, 1(1), 1–12.
- Kurtzman, C. P., & Fell, J. W. (2006). Yeast systematics and phylogeny—implications of molecular identification methods for studies in ecology. In *Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts*, 11-30.
- Lee, S. Y., Hong, S. H., Lee, S. H., & Park, S. J. (2004). Fermentative production of chemicals that can be used for polymer synthesis. *Macromolecular Bioscience*, 4(3), 157-164.
- Leiva-Candia, D. E., Tsakona, S., Kopsahelis, N., Garcia, I. L., Papanikolaou, S., Dorado, M. P., & Koutinas, A. A. (2015). Biorefining of by-product streams from sunflower-based biodiesel production plants for integrated synthesis of microbial oil and value-added co-products. *Bioresource Technology*, 190, 57-65.
- Levin, Y. (2002). Electrostatic correlations: from plasma to biology. *Reports on Progress in Physics*, 65(11), 1577.
- Lopandic, K., Rentsendorj, U., Prillinger, H., & Sterflinger, K. (2013). Molecular characterization of the closely related *Debaryomyces* species: Proposition of *D. vindobonensis* sp. nov. from a municipal wastewater treatment plant. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 59(1), 49-58.
- Liang, Y., Sarkany, N., & Cui, Y. (2009). Biomass and lipid productivities of *Chlorella vulgaris* under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic growth conditions. *Biotechnology Letters*, 31, 1043-1049.
- Li, Y., Bo, I., Zhao, Z. K., & Bai, F. (2006). Optimization of culture conditions for lipid production by *Rhodospiridium toruloides*. *Chinese Journal of Biotechnology*, 22(4), 650-656.
- Li, Y., Zhao, Z. K., & Bai, F. (2007). High-density cultivation of oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides* Y4 in fed-batch culture. *Enzyme and Microbial Technology*, 41(3), 312-317.

- Li, Q., Du, W., & Liu, D. (2008). Perspectives of microbial oils for biodiesel production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 80, 749-756.
- Li, Y., Zhao, Z. K., & Bai, F. (2007). High-density cultivation of oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides* Y4 in fed-batch culture. *Enzyme and Microbial Technology*, 41(3), 312-317.
- Liakou, V., Pateraki, C., Palaiogeorgou, A. M., Kopsahelis, N., de Castro, A. M., Freire, D. M. G., Nychas, G.-J. E., Papanikolaou, S., & Koutinas, A. (2018). Valorisation of fruit and vegetable waste from open markets for the production of 2, 3-butanediol. *Food and Bioproducts Processing*, 108, 27-36.
- Lie, S. (1973). The EBC-ninhydrin method for determination of free alpha amino nitrogen. *Journal of the Institute of Brewing*, 79(1), 37-41.
- Ligthelm, M. E., Prior, B. A., & du Preez, J. C. (1988). The oxygen requirements of yeasts for the fermentation of D-xylose and D-glucose to ethanol. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 28, 63-68.
- Loman, A. A., & Ju, L. K. (2013). Purification of arabitol from fermentation broth of *Debaryomyces hansenii* using glycerol as substrate. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 88(8), 1514-1522.
- Loman, A., & Ju, L. K. (2015). Inhibitory effects of arabitol on caries-associated microbiologic parameters of oral *Streptococci* and *Lactobacilli*. *Archives of Oral Biology*, 60(12), 1721-1728.
- Loman, A. A., Islam, S. M. M., & Ju, L. K. (2018). Production of arabitol from enzymatic hydrolysate of soybean flour by *Debaryomyces hansenii* fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102, 641-653.
- Lopandic, K., Rentsendorj, U., Prillinger, H., & Sterflinger, K. (2013). Molecular characterization of the closely related *Debaryomyces* species: Proposition of *D. vindobonensis* sp. nov. from a municipal wastewater treatment plant. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 59(1), 49-58.
- Luque, R., Herrero-Davila, L., Campelo, J. M., Clark, J. H., Hidalgo, J. M., Luna, D., Marinas, J. M., & Romero, A. A. (2008). *Energy Environ. Sci*, 1, 542-564.

- Makri, A., Fakas, S., & Aggelis, G. (2010). Metabolic activities of biotechnological interest in *Yarrowia lipolytica* grown on glycerol in repeated batch cultures. *Bioresource Technology*, *101*(7), 2351-2358.
- Matsakas, L., Bonturi, N., Miranda, E. A., Rova, U., & Christakopoulos, P. (2015). High concentrations of dried sorghum stalks as a biomass feedstock for single cell oil production by *Rhodospiridium toruloides*. *Biotechnology for Biofuels*, *8*(1), 1-6.
- McCormick, D. B., & Touster, O. (1961). Conversion of D-1-[14C] arabitol, L-1-[14C] arabitol, and D-1-[14C] ribitol to liver glycogen in the rat and guinea-pig. *Biochimica et Biophysica Acta*, *54*, 598-600.
- Miller, G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, *31*(3), 426-428.
- Mirończuk, A. M., Furgała, J., Rakicka, M., & Rymowicz, W. (2014). Enhanced production of erythritol by *Yarrowia lipolytica* on glycerol in repeated batch cultures. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, *41*(1), 57-64.
- Mitchell, H. (Ed.). (2008). *Sweeteners and sugar alternatives in food technology*. John Wiley & Sons, 1-490.
- Moran, J. W., & Witter, L. D. (1979). Effect of sugars on D-arabitol production and glucose metabolism in *Saccharomyces rouxii*. *Journal of Bacteriology*, *138*(3), 823-831.
- Moreno, R., Hernández-Arranz, S., La Rosa, R., Yuste, L., Madhushani, A., Shingler, V., & Rojo, F. (2015). The Crc and Hfq proteins of *Pseudomonas putida* cooperate in catabolite repression and formation of ribonucleic acid complexes with specific target motifs. *Environmental Microbiology*, *17*(1), 105-118.
- Moreton, R. S. (1985). Modification of fatty acid composition of lipid accumulating yeasts with cyclopropene fatty acid desaturase inhibitors. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *22*, 42-45.
- Moreton, R.S. (1988), Physiology of lipid accumulating yeasts. In Single Cell Oil ed. Longman House, Burnt Mill, Harlow and Essex: *Longman Scientific & Technical*, 1-32.

- Moustogianni, A., Bellou, S., Triantaphyllidou, I. E., & Aggelis, G. (2015). Feasibility of raw glycerol conversion into single cell oil by zygomycetes under non-aseptic conditions. *Biotechnology and Bioengineering*, *112*(4), 827-831.
- New, A. M., Cerulus, B., Govers, S. K., Perez-Samper, G., Zhu, B., Boogmans, S., Xavier, J., & Verstrepen, K. J. (2014). Different levels of catabolite repression optimize growth in stable and variable environments. *PLoS Biology*, *12*(1), e1001764.
- Nobre, A., Lucas, C., & Leão, C. (1999). Transport and utilization of hexoses and pentoses in the halotolerant yeast *Debaryomyces hansenii*. *Applied and Environmental Microbiology*, *65*(8), 3594–3598.
- Nozaki, H., Suzuki, S. I., Tsuyoshi, N., & Yokozeki, K. (2003). Production of D-arabitol by *Metschnikowia reukaufii* AJ14787. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, *67*(9), 1923-1929.
- Osorio-González, C. S., Hegde, K., Ferreira, P., Brar, S. K., Kermanshahpour, A., Soccol, C. R., & Avalos-Ramírez, A. (2019). Lipid production in *Rhodospiridium toruloides* using C-6 and C-5 wood hydrolysate: A comparative study. *Biomass and Bioenergy*, *130*, 105355.
- Pagliaro, M., Ciriminna, R., Kimura, H., Rossi, M., & Della Pina, C. (2007). From glycerol to value-added products. *Angewandte Chemie International Edition*, *46*(24), 4434-4440.
- Palaiogeorgou, A. M., Papanikolaou, S., de Castro, A. M., Freire, D. M. G., Kookos, I. K., & Koutinas, A. A. (2019). A newly isolated *Enterobacter sp.* strain produces 2, 3-butanediol during its cultivation on low-cost carbohydrate-based substrates. *FEMS Microbiology Letters*, *366*(1), fny280.
- 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. *Bioresource Technology*, *82*(1), 43-49.

- Papanikolaou, S., Sarantou, S., Komaitis, M., & Aggelis, G. (2004). Repression of reserve lipid turnover in *Cunninghamella echinulata* and *Mortierella isabellina* cultivated in multiple-limited media. *Journal of Applied Microbiology*, 97(4), 867-875.
- Papanikolaou, S., Galiotou-Panayotou, M., Fakas, S., Komaitis, M., & Aggelis, G. (2007). Lipid production by oleaginous *Mucorales* cultivated on renewable carbon sources. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 109(11), 1060-1070.
- Papanikolaou, S., Fakas, S., Fick, M., Chevalot, I., Galiotou-Panayotou, M., Komaitis, M., Marc, I., & Aggelis, G. (2008). 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*, 32(1), 60-71.
- Papanikolaou, S., & Aggelis, G. (2010). *Yarrowia lipolytica*: A model microorganism used for the production of tailor-made lipids. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 112(6), 639-654.
- Papanikolaou, S., & Aggelis, G. (2011). Lipids of oleaginous yeasts. Part I: Biochemistry of single cell oil production. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 113(8), 1031-1051.
- Papanikolaou, S., & Aggelis, G. (2011). Lipids of oleaginous yeasts. Part II: technology and potential applications. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 113(8), 1052-1073.
- Papanikolaou, S., Rontou, M., Belka, A., Athenaki, M., Gardeli, C., Mallouchos, A., Kalantzi, O., Koutinas, A. A., Kookos, I. K., Zeng, A. P., & Aggelis, G. (2017). Conversion of biodiesel-derived glycerol into biotechnological products of industrial significance by yeast and fungal strains. *Engineering in Life Sciences*, 17(3), 262-281.
- Papanikolaou, S., Kampsopoulou, E., Blanchard, F., Rondags, E., Gardeli, C., Koutinas, A. A., Chevalot I., & Aggelis, G. (2017). Production of secondary metabolites through glycerol fermentation under carbon-excess conditions by the yeasts *Yarrowia lipolytica* and *Rhodospiridium toruloides*. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 119(9), 1600507.
- Papanikolaou, S., & Aggelis, G. (2019). Sources of microbial oils with emphasis to *Mortierella (Umbelopsis) isabellina* fungus. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 35(4), 63.

- Park, Y. K., Nicaud, J. M., & Ledesma-Amaro, R. (2018). The engineering potential of *Rhodospiridium toruloides* as a workhorse for biotechnological applications. *Trends in Biotechnology*, 36(3), 304-317.
- Patel, A., Pruthi, V., Singh, R. P., & Pruthi, P. A. (2015). Synergistic effect of fermentable and non-fermentable carbon sources enhances TAG accumulation in oleaginous yeast *Rhodospiridium kratochvilovae* HIMPA1. *Bioresource Technology*, 188, 136-144.
- Prieto, M. A., Reunanen, J., Tristram, K. R. W., Neumayer, N., Fernandez-Ontiveros, J. A., Orienti, M., & Meisenheimer, K. (2010). The spectral energy distribution of the central parsecs of the nearest AGN. *Monthly Notices of the Royal Astronomical Society*, 402(2), 724-744.
- Pyle, D. J., Garcia, R. A., & Wen, Z. (2008). Producing docosahexaenoic acid (DHA)-rich algae from biodiesel-derived crude glycerol: effects of impurities on DHA production and algal biomass composition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(11), 3933-3939.
- Rahmat, N., Abdullah, A. Z., & Mohamed, A. R. (2010). Recent progress on innovative and potential technologies for glycerol transformation into fuel additives: A critical review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14(3), 987-1000.
- Rakicka, M., Rywińska, A., Cybulski, K., & Rymowicz, W. (2016). Enhanced production of erythritol and mannitol by *Yarrowia lipolytica* in media containing surfactants. *Brazilian Journal of Microbiology*, 47, 417-423.
- Rakicka, M., Biegalska, A., Rymowicz, W., Dobrowolski, A., & Mirończuk, A. M. (2017). Polyol production from waste materials by genetically modified *Yarrowia lipolytica*. *Bioresource Technology*, 243, 393-399.
- Ratledge, C. (1994). Yeasts, moulds, algae and bacteria as sources of lipids. In *Technological Advances in Improved and Alternative Sources of Lipids*, 235-291.
- Ratledge, C. (2001). Microbial lipids. *Biotechnology Set*, 133-197.

- Ratledge, C. (1988). Biochemistry, Stoichiometry, Substrates and Economics, In: Single Cell Oil, Moreton, R. S. (Ed.), *Longman Scientific & Technical*, 33-70.
- Ratledge, C., & Wynn, J. P. (2002). The biochemistry and molecular biology of lipid accumulation in oleaginous microorganisms. *Advances in Applied Microbiology*, 51, 1-52.
- Ratledge, C. (2004). Fatty acid biosynthesis in microorganisms being used for single cell oil production. *Biochimie*, 86(11), 807-815.
- Ratledge, C. (2010). Single cell oils for the 21st century. In *Single Cell Oils*. AOCS Press. 3-26.
- Ratledge, C., & Lippmeier, C. (2017). Microbial production of fatty acids. In *Fatty Acids*. AOCS Press, 237-278
- Ratledge, C., & Cohen, Z. (2008). Microbial and algal oils: do they have a future for biodiesel or as commodity oils? *Lipid Technology*, 20(7), 155-160.
- Roseiro, J. C., Peito, M. A., Gírio, F. M., & Amaral-Collaço, M. T. (1991). The effects of the oxygen transfer coefficient and substrate concentration on the xylose fermentation by *Debaryomyces hansenii*. *Archives of Microbiology*, 156(6), 484-490.
- Rymowicz, W., Rywińska, A., & Marcinkiewicz, M. (2009). High-yield production of erythritol from raw glycerol in fed-batch cultures of *Yarrowia lipolytica*. *Biotechnology Letters*, 31, 377-380.
- Saenge, C., Cheirsilp, B., Suksaroge, T. T., & Bourtoom, T. (2011). Potential use of oleaginous red yeast *Rhodotorula glutinis* for the bioconversion of crude glycerol from biodiesel plant to lipids and carotenoids. *Process Biochemistry*, 46(1), 210-218.
- Saha, B. C., Sakakibara, Y., & Cotta, M. A. (2007). Production of D-arabitol by a newly isolated *Zygosaccharomyces rouxii*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 34(7), 519-523.
- Sánchez, N. S., Calahorra, M., Ramírez, J., & Peña, A. (2018). Salinity and high pH affect energy pathways and growth in *Debaryomyces hansenii*. *Fungal Biology*, 122(10), 977-990.

- Sanahuja, I., Ruiz, A., Firmino, J. P., Reyes-López, F. E., Ortiz-Delgado, J. B., Vallejos-Vidal, E., Tort, L., Tovar-Ramírez, D., Cerezo, I. M., Moriñigo, M. A., Sarasquete, C., & Gisbert, E. (2023). *Debaryomyces hansenii* supplementation in low fish meal diets promotes growth, modulates microbiota and enhances intestinal condition in juvenile marine fish. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 14(1).
- Sampaio, F. C., Torre, P., Passos, F. M. L., Perego, P., Passos, F. J. V., & Converti, A. (2004). Xylose metabolism in *Debaryomyces hansenii* UFV-170. Effect of the specific oxygen uptake rate. *Biotechnology Progress*, 20(6), 1641-1650.
- Sarantou, S., Stoforos, N. G., Kalantzi, O., & Papanikolaou, S. (2021). Biotechnological valorization of biodiesel-derived glycerol: Trials with the non-conventional yeasts *Yarrowia lipolytica* and *Rhodospiridium* sp. *Carbon Resources Conversion*, 4, 61–75.
- 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. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 88(5), 958-969.
- Sarris, D., Stoforos, N. G., Mallouchos, A., Kookos, I. K., Koutinas, A. A., Aggelis, G., & Papanikolaou, S. (2017). Production of added-value metabolites by *Yarrowia lipolytica* growing in olive mill wastewater-based media under aseptic and non-aseptic conditions. *Engineering in Life Sciences*, 17(6), 695-709.
- Scangos, G. A., & Reiner, A. M. (1979). A unique pattern of toxic synthesis in pentitol catabolism: implications for evolution. *Journal of Molecular Evolution*, 12, 189-195.
- Seviour, R. J., Stasinopoulos, S. J., Auer, D. P. F., & Gibbs, P. A. (1992). Production of pullulan and other exopolysaccharides by filamentous fungi. *Critical Reviews in Biotechnology*, 12(3), 279-298.
- Sharma, P., Meena, N., Aggarwal, M., & Mondal, A. K. (2005). *Debaryomyces hansenii*, a highly osmo-tolerant and halo-tolerant yeast, maintains activated Dhog1p in the cytoplasm during its growth under severe osmotic stress. *Current Genetics*, 48, 162-170.
- Shen, H., Gong, Z., Yang, X., Jin, G., Bai, F., & Zhao, Z. K. (2013). Kinetics of continuous cultivation of the oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides*. *Journal of Biotechnology*, 168(1), 85-89.

- Simpson-Lavy, K., & Kupiec, M. (2019). Carbon catabolite repression in yeast is not limited to glucose. *Scientific Reports*, 9(1), 6491.
- Tang, Y. J., & Zhong, J. J. (2002). Fed-batch fermentation of *Ganoderma lucidum* for hyperproduction of polysaccharide and ganoderic acid. *Enzyme and Microbial Technology*, 31(1-2), 20-28.
- Tchakouteu, S. S., Kalantzi, O., Gardeli, C., Koutinas, A. A., Aggelis, G., & Papanikolaou, S. (2015). Lipid production by yeasts growing on biodiesel-derived crude glycerol: strain selection and impact of substrate concentration on the fermentation efficiency. *Journal of Applied Microbiology*, 118(4), 911-927.
- Tchakouteu, S. S., Kopsahelis, N., Chatzifragkou, A., Kalantzi, O., Stoforos, N. G., Koutinas, A. A., Aggelis, G., & Papanikolaou, S. (2017). *Rhodospiridium toruloides* cultivated in NaCl-enriched glucose-based media: Adaptation dynamics and lipid production. *Engineering in Life Sciences*, 17(3), 237-248.
- Tiwari, A. K., Kumar, A., & Raheman, H. (2007). Biodiesel production from jatropha oil (*Jatropha curcas*) with high free fatty acids: an optimized process. *Biomass and Bioenergy*, 31(8), 569-575.
- Tomaszewska, L., Rywińska, A., & Gładkowski, W. (2012). Production of erythritol and mannitol by *Yarrowia lipolytica* yeast in media containing glycerol. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 39(9), 1333-1343.
- Tourneau, D. L. (1966). Trehalose and acyclic polyols in sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Mycologia*, 58(6), 934-942.
- Valderrama, J. A., Shingler, V., Carmona, M., & Díaz, E. (2014). AccR is a master regulator involved in carbon catabolite repression of the anaerobic catabolism of aromatic compounds in *Azoarcus* sp. CIB. *Journal of Biological Chemistry*, 289(4), 1892-1904.
- Vandeska, E., Kuzmanova, S., & Jeffries, T. W. (1995). Xylitol formation and key enzyme activities in *Candida boidinii* under different oxygen transfer rates. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 80(5), 513-516.

- Vastaroucha, E. S., Maina, S., Michou, S., Kalantzi, O., Pateraki, C., Koutinas, A. A., & Papanikolaou, S. (2021). Bioconversions of Biodiesel-Derived Glycerol into Sugar Alcohols by Newly Isolated Wild-Type *Yarrowia lipolytica* Strains. *Reactions*, 2(4), 499-513.
- Vastaroucha, E. S., Stoforos, N. G., Aggelis, G., & Papanikolaou, S. (2024). Studies of polyol production by the yeast *Yarrowia lipolytica* growing on crude glycerol under stressful conditions. *Carbon Resources Conversion*, <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2588913323000856> (in press).
- Vijayan, S., Byskal, D. P., & Buckley, L. P. (1994). Separation of oil from fried chips by a supercritical extraction process; an overview of bench-scale test experience and process economics. *Supercritical Fluids Processing of Food and Biomaterials*, 751401846.
- Wang, Z., Zhuge, J., Fang, H., & Prior, B. A. (2001). Glycerol production by microbial fermentation: a review. *Biotechnology Advances*, 19(3), 201-223.
- Wang, Z. P., Fu, W. J., Xu, H. M., & Chi, Z. M. (2014). Direct conversion of inulin into cell lipid by an inulinase-producing yeast *Rhodospiridium toruloides* 2F5. *Bioresource Technology*, 161, 131-136.
- Werpy, T., & Petersen, G. (2004). Top Value-Added Chemicals from Biomass: Volume I -- Results of Screening for Potential Candidates from Sugars and Synthesis Gas. *National Renewable Energy Lab*. 1-76.
- Wiebe, M. G., Koivuranta, K., Penttilä, M., & Ruohonen, L. (2012). Lipid production in batch and fed-batch cultures of *Rhodospiridium toruloides* from 5 and 6 carbon carbohydrates. *BMC Biotechnology*, 12, 1-10.
- Workman, M., Holt, P., & Thykaer, J. (2013). Comparing cellular performance of *Yarrowia lipolytica* during growth on glucose and glycerol in submerged cultivations. *Amb Express*, 3, 1-9.
- Wu, S., Hu, C., Jin, G., Zhao, X., & Zhao, Z. K. (2010). Phosphate-limitation mediated lipid production by *Rhodospiridium toruloides*. *Bioresource Technology*, 101(15), 6124-6129.
- Wu, S., Zhao, X., Shen, H., Wang, Q., & Zhao, Z. K. (2011). Microbial lipid production by *Rhodospiridium toruloides* under sulfate-limited conditions. *Bioresource Technology*, 102(2), 1803-1807.

- Xenopoulos, E., Giannikakis, I., Chatzifragkou, A., Koutinas, A., & Papanikolaou, S. (2020). Lipid production by yeasts growing on commercial xylose in submerged cultures with process water being partially replaced by olive mill wastewaters. *Processes*, 8(7), 819.
- Xu, J., Oura, T., Liu, D., & Kajiwara, S. (2011). Heat-alkaline treatment of excess sludge and the potential use of hydrolysate as nitrogen source for microbial lipid production. *Chinese Journal of Biotechnology*, 27(3), 482-488.
- Xu, J., Zhao, X., Wang, W., Du, W., & Liu, D. (2012). Microbial conversion of biodiesel byproduct glycerol to triacylglycerols by oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides* and the individual effect of some impurities on lipid production. *Biochemical Engineering Journal*, 65, 30-36.
- Yang, J., Wang, Z., Zhu, N., Wang, B., Chen, T., & Zhao, X. (2014). Metabolic engineering of *Escherichia coli* and in silico comparing of carboxylation pathways for high succinate productivity under aerobic conditions. *Microbiological Research*, 169(5-6), 432-440.
- Yang, X., Jin, G., Gong, Z., Shen, H., Bai, F., & Zhao, Z. K. (2014). Recycling biodiesel-derived glycerol by the oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides* Y4 through the two-stage lipid production process. *Biochemical Engineering Journal*, 91, 86-91.
- Yazdani, S. S., & Gonzalez, R. (2007). Anaerobic fermentation of glycerol: a path to economic viability for the biofuels industry. *Current Opinion in Biotechnology*, 18(3), 213-219.
- Yoshikawa, J., Habe, H., Morita, T., Fukuoka, T., Imura, T., Iwabuchi, H., Uemura, S., Tamura, T., & Kitamoto, D. (2014). Production of D-arabitol from raw glycerol by *Candida quercitrusa*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98, 2947-2953.
- Zhao, X., Wu, S., Hu, C., Wang, Q., Hua, Y., & Zhao, Z. K. (2010). Lipid production from Jerusalem artichoke by *Rhodospiridium toruloides* Y4. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 37(6), 581-585.
- Zhu, H. Y., Xu, H., Dai, X. Y., Zhang, Y., Ying, H. J., & Ouyang, P. K. (2010). Production of D-arabitol by a newly isolated *Kodamaea ohmeri*. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 33, 565-571.

Zhu, Z., Zhang, S., Liu, H., Shen, H., Lin, X., Yang, F., Zhou, Y. J., Jin, G., Ye, M., Zou, H., & Zhao, Z. K. (2012). A multi-omic map of the lipid-producing yeast *Rhodospiridium toruloides*. *Nature Communications*, 3(1), 1112.

Zhou, W., Wang, W., Li, Y., & Zhang, Y. (2013). Lipid production by *Rhodospiridium toruloides* Y2 in bioethanol wastewater and evaluation of biomass energetic yield. *Bioresource Technology*, 127, 435-440.

«Παραγωγή μικροβιακών ελαίων, ενδοπολυσακχαριτών και πολυολών κατά την αύξηση ζυμών σε υποστρώματα με βάση την ακάθαρτη γλυκερόλη, υποπροϊόν της διεργασίας παραγωγής καυσίμου τύπου βιοντίζελ»

ORIGINALITY REPORT

6%

SIMILARITY INDEX

8%

INTERNET SOURCES

0%

PUBLICATIONS

2%

STUDENT PAPERS

PRIMARY SOURCES

1

dspace.aua.gr
Internet Source

6%

Exclude quotes On

Exclude matches < 2%

Exclude bibliography On