

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

Διδακτορική Διατριβή

Μελέτη της φυσιολογικής συμπεριφοράς της ζύμης *Yarrowia lipolytica* κατά την αύξηση της σε υποστρώματα με βάση τη γλυκερόλη

Ελένη - Σταυρούλα Θ. Βασταρούχα

Επιβλέπων Καθηγητής:

Σεραφειμ Παπανικολάου, Καθηγητής ΓΠΑ

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή:

Σεραφειμ Παπανικολάου, Καθηγητής ΓΠΑ

Νικόλαος Στοφόρος, Καθηγητής ΓΠΑ

Γεώργιος Αγγελής, Καθηγητής Πανεπιστημίου Πατρών

ΑΘΗΝΑ
2023



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

Διδακτορική Διατριβή

Μελέτη της φυσιολογικής συμπεριφοράς της ζύμης *Yarrowia lipolytica* κατά την αύξηση της σε υποστρώματα με βάση τη γλυκερόλη

Physiological behavior of *Yarrowia lipolytica* yeast during growth on glycerol-based substrates

Ελένη - Σταυρούλα Θ. Βασταρούχα

Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή:

Σεραφειμ Παπανικολάου, Καθηγητής ΓΠΑ

Νικόλαος Στοφόρος, Καθηγητής ΓΠΑ

Γεώργιος Αγγελής, Καθηγητής Πανεπιστημίου Πατρών

Απόστολος Κουτίνας, Καθηγητής ΓΠΑ

Παναγιώτα Διαμαντοπούλου, Κύρια Ερευνήτρια ΕΛΓΟ «Δήμητρα»

Δημήτριος Σαρρής, Επίκουρος Καθηγητής Πανεπιστημίου Αιγαίου

Θεοφανία Τσιρώνη, Επίκουρη Καθηγήτρια ΓΠΑ

Μελέτη της φυσιολογικής συμπεριφοράς της ζύμης *Yarrowia lipolytica* κατά την αύξηση της σε υποστρώματα με βάση τη γλυκερόλη

Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων Και Διατροφής Του Ανθρώπου

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός της παρούσας Διδακτορικής διατριβής είναι η συλλογή και επεξεργασία όλων εκείνων των χαρακτηριστικών της απόβλητης γλυκερόλης. Η ακάθαρτη γλυκερόλη είναι υποπροϊόν ποικίλων βιομηχανικών διεργασιών. Ο όγκος της παρουσιάζει αλματώδη αύξηση τα τελευταία χρόνια, συνεπώς η εξεύρεση λύσεων αναφορικά με την οικολογική και φιλική προς το περιβάλλον διαχείρισή της είναι μείζονος σημασίας. Παρουσιάζει δε το υλικό/υποπροϊόν τούτο εξαιρετικό ενδιαφέρον χρησιμοποιούμενο ως θρεπτικό υπόστρωμα για την παραγωγή προϊόντων προστιθέμενης αξίας, μέσω της μικροβιακής τεχνολογίας. Ο στόχος της παρούσας διδακτορικής διατριβής ήταν η βιοτεχνολογική αξιοποίηση αυτού του υποπροϊόντος, ως υπόστρωμα ζυμώνσεων του μικροοργανισμού *Yarrowia lipolytica*. Έτσι, άγρια (και σε πολλές περιπτώσεις μη προηγουμένως εκτενώς μελετηθέντα) στελέχη της πολυμορφικής μη-συμβατικής ζύμης *Y. lipolytica*, κυρίως απομονωμένα από Ελληνικής προέλευσης τρόφιμα (π.χ. Ελληνικό προζύμι, Ελληνικά ιχθυηρά), χρησιμοποιήθηκαν ως βιολογικό υλικό και μελετήθηκαν ως προς τη δυνατότητα αύξησής τους στην ακατέργαστη βιομηχανική γλυκερόλη. Όλες οι καλλιέργειες πραγματοποιήθηκαν σε συνθήκες περιοριστικές ως προς την πηγή αζώτου, προκειμένου να κατευθυνθεί ο μικροβιακός μεταβολισμός προς τη σύνθεση εξωκυτταρικών δευτερογενών προϊόντων (κυρίως κιτρικού οξέος και πολυολών) ή και ενδοκυτταρικών δευτερογενών μεταβολιτών (κυρίως μικροβιακών λιπιδίων και ενδοπολυσακχαριτών).

Ένας αρκετά μεγάλος αριθμός άγριων στελεχών της ζύμης *Y. lipolytica*, ήτοι τα στελέχη NRRL Y-323, NRRL Y-423, LGAM S7(1), Po1d (CLIB 139), FMCC Y-75, ACA-YC 5030, LMBF 20 και FMCC Y-74 χρησιμοποιήθηκαν ως βιολογικό υλικό των διεργασιών. Σε πρώτη φάση, χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος FMCC Y-74 προκειμένου να μελετηθεί κατά πόσο επηρεάζουν ή όχι οι προσμίξεις της βιομηχανικής γλυκερόλης την ικανότητα του μικροοργανισμού να αφομοιώσει το υπόστρωμα και να παράγει μεταβολικά προϊόντα. Στην συνέχεια, ακολούθησε επιλογή από το προηγούμενο πλήθος στελεχών της ζύμης *Y. lipolytica*, με γνώμονα τον υψηλό συντελεστή απόδοσης των πολυολών ως προς την αναλωθείσα γλυκερόλη. Διακρίθηκαν τα στελέχη NRRL Y-323, LMBF 20, ACA-YC 5030 και FMCC Y-74, ως τα πιο ελπιδοφόρα για την παραγωγή των μεταβολικών προϊόντων-στόχων. Μελετήθηκε επίσης, καθ' όλη την πειραματική πορεία, η επίδραση του pH στην παραγωγικότητα των στελεχών. Περαιτέρω, επιδιώχθηκε και μελετήθηκε η σύνθεση των μεταβολικών προϊόντων υπό συνθήκες καταπόνησης, ήτοι καλλιέργειών σε αρκετά χαμηλή θερμοκρασία επώασης (20 ± 1 °C), σε παστεριωμένο θρεπτικό υλικό, σε μη θερμικά επεξεργασμένο θρεπτικό υλικό, υπό παρουσία μεταβλητών και ενίοτε υψηλών αρχικών συγκεντρώσεων χλωριούχου νατρίου (έως ~80 g/L) και υπό συνθήκες αυξημένης αρχικής συγκέντρωσης γλυκερόλης (έως ~120 g/L). Σε όλες τις προηγούμενες καλλιέργειες η ανάπτυξη έλαβε χώρα σε αναδευόμενες φιάλες. Στην τελευταία φάση της πειραματικής διαδικασίας, τα στελέχη FMCC Y-74 και NRRL Y-323 που διακρίθηκαν από τις προαναφερθείσες συνθήκες και επέδειξαν ανθεκτικότητα συγχρόνως με υψηλή παραγωγή προϊόντων, καλλιεργήθηκαν σε εργαστηριακής κλίμακας

βιοαντιδραστήρα (ενεργού όγκου 1,5 L), σε κλειστά και ημι-συνεχή τροφοδοτούμενα συστήματα ζύμωσης, υπό διαφορετικές συνθήκες σταθερού pH και ανάδευσης, προκειμένου να μεγιστοποιηθεί κατά το δυνατόν η παραγωγή των επιδιωκόμενων μεταβολικών προϊόντων.

Πολλά από τα στελέχη που μελετήθηκαν κατά την καλλιέργειά τους στις αναδεδόμενες φιάλες, παρουσίασαν πολύ ενδιαφέροντα αποτελέσματα, ενώ η διαφοροποίηση των συνθηκών καλλιέργειας διαφοροποίησε αξιολογώμενα το προφίλ των παραγόμενων ενώσεων από τους μελετηθέντες μικροοργανισμούς. Έτσι, σε πολύ όξινες τιμές pH ($2\pm 0,3$) σημειώθηκε αξιολογώμενη μικροβιακή αύξηση και παραγωγή πολυολών, ενώ δεν παρατηρήθηκε παραγωγή κιτρικού οξέος. Όταν οι δοκιμές πραγματοποιήθηκαν σε ελαφρώς όξινη συνθήκη ($pH=6\pm 0,3$), παρατηρήθηκε και εδώ ότι το κιτρικό οξύ δεν ήταν το κύριο μεταβολικό προϊόν, ενώ οι πολυόλες ήταν οι κυρίαρχοι μεταβολίτες, συντιθέμενες όμως σε μικρότερες ποσότητες σε σύγκριση με το πολύ όξινο περιβάλλον. Περαιτέρω, οι συνθήκες παστερίωσης αναδείχθηκαν ικανοποιητικές για την παραγωγή βιομάζας, ως επίσης και η χαμηλή θερμοκρασία των 20 ± 1 °C, η οποία μέχρι πρότινος δε θεωρούνταν ικανοποιητική για την καλλιέργεια των στελεχών αυτού του είδους. Η προσθήκη χλωριούχου νατρίου στο μέσο της αύξησης είχε ως απόρροια τη στροφή του μεταβολισμού των ζυμών προς την παραγωγή κιτρικού οξέος. Τέλος, καλλιέργειες οι οποίες εγένοντο σε συστήματα φιαλών με υψηλή αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης (~120 g/L) και πολύ όξινο pH ($2\pm 0,3$), συνοδεύτηκαν από παραγωγή συνολικών πολυολών (μαννιτόλης, αραβιτόλης και ερυθριτόλης) ίση προς 79,7 g/L για το στέλεχος FMCC Y-74, για το στέλεχος NRRL Y-323 ίση με 74,8 g/L και 57 g/L συνολικών πολυολών για το στέλεχος ACA-YC 5030.

Τα πιο ενδιαφέροντα από τα στελέχη που μελετήθηκαν στα προηγούμενα εδάφια, μελετήθηκαν κατά την αύξησή τους σε εργαστηριακής κλίμακας βιοαντιδραστήρες. Το στέλεχος FMCC Y-74 καλλιεργήθηκε σε βιοαντιδραστήρες εργαστηριακής κλίμακας ενεργού όγκου 1,5 L σε ζυμώσεις ημι-συνεχούς τροφοδοτούμενης λειτουργίας υπό διάφορες τιμές σταθερού pH και ποικίλες συνθήκες ανάδευσης (και συνεπώς αερισμού) με στόχο τη μεγιστοποίηση της συγκέντρωσης των επιδιωκόμενων μεταβολικών προϊόντων στο περιβάλλον του βιοαντιδραστήρα. Σημαντικές ποσότητες κιτρικού οξέος (~50 g/L, για πρώτη φορά τόσο υψηλές συγκεντρώσεις του προϊόντος αυτού στην παρούσα μελέτη) καταγράφηκαν μόνο όταν η τιμή του pH στο μέσο ήταν κοντά στις ελαφρώς όξινη συνθήκη ($pH=6\pm 0,3$) με ταυτόχρονη σημαντική ανάδευση (750 ± 5 rpm), η οποία εξασφάλιζε υψηλό βαθμό κορεσμού οξυγόνου στο περιβάλλον της αύξησης. Από την άλλη πλευρά, η πολύ υψηλή συγκέντρωση ολικών πολυολών 89,4 g/L και απουσία κιτρικού οξέος καταγράφηκε σε ελαφρά όξινη συνθήκη ($pH=6\pm 0,3$) και υπό χαμηλή ανάδευση (250 ± 5 rpm) με απόρροια χαμηλές τιμές συγκέντρωσης διαλυμένου οξυγόνου στο μέσο της αύξησης.

Για όλα τα στελέχη που μελετήθηκαν και παρά την εφαρμογή των συνθηκών καλλιέργειας που ευνοούν τη βιοχημική διεργασία της *de novo* συσσώρευσης αποθεματικών λιπιδίων (δηλαδή θρεπτικά μέσα τα οποία είναι περιοριστικά σε άζωτο και ευρισκόμενα υπό περίσσεια άνθρακα), όλα τα στελέχη απέτυχαν να παράξουν σημαντικές ποσότητες κυτταρικών λιπιδίων, μετατοπίζοντας ως εδείχθη, το

μεταβολισμό τους προς τη σύνθεση εξωκυτταρικών προϊόντων (ήτοι πολυολών και σε μικρότερο βαθμό κιτρικού οξέος). Ως εκ τούτου, στην πλειονότητα των περιπτώσεων, η συγκέντρωση των λιπιδίων επί ξηράς μικροβιακής μάζας παρέμεινε κάτω του ~20% w/w. Επίσης, καταγράφηκαν ποσότητες (έως 30% w/w επί ξηράς ουσίας) ενδοκυτταρικών πολυσακχαριτών, ενώ σε πολλές από τις περιπτώσεις παρατηρήθηκε ανακατανάλωση του παραγόμενου λίπους κατά το στάσιμο στάδιο του αυξητικού κύκλου, που συνέβη ταυτόχρονα με την έκκριση των εξωκυτταρικών προϊόντων.

Εν κατακλείδι, θα πρέπει να τονιστεί ότι παρά το γεγονός ότι το βιοχημικό μονοπάτι σύνθεσης των πολυολών στα κύτταρα των ζυμών του είδους *Y. lipolytica* ακόμη δεν έχει ακόμη διευκρινιστεί πλήρως, η παρούσα μελέτη απέδειξε ότι οι συνθήκες αύξησης για πολλά άγρια στελέχη ζυμών του ανωτέρω είδους (π.χ. το πολύ όξινο pH, ήτοι οι τιμές $2\pm 0,3$, η σχετικά χαμηλή ανάδευση και ο συνακόλουθος χαμηλός κορεσμός σε οξυγόνο, ο υψηλός περιορισμός σε άζωτο, η υψηλή αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης, κ.λπ.) ευνοούν την παραγωγή πολυολών. Εδείχθη ότι για αρκετά στελέχη, παρά το σχετικά ελαφρώς όξινο pH του μέσου ($6\pm 0,3$) που επεβλήθη, η παραγωγή πολυολών εξακολουθούσε να είναι αρκετά σημαντική και σε αντιδιαστολή με πολλά αποτελέσματα που εμφανίζονται στη διεθνή βιβλιογραφία, ο μεταβολισμός δεν εστράφη προς την παραγωγή κιτρικού οξέος. Συνδυαστικά με τη βιοσύνθεση ενδοπολυσακχαριτών και την αλληλεπίδραση τους σε σχέση με τη συσσώρευση μικροβιακών λιπιδίων η διεργασία αυτή παρουσιάζει εξαιρετικό ακαδημαϊκό ενδιαφέρον, καίτοι αμφότεροι οι ανωτέρω ενδοκυτταρικοί μεταβολίτες δεν ήταν τα κύρια προϊόντα των ζυμώσεων οι οποίες έλαβαν χώρα. Με βάση την παρούσα εργασία συνεπώς, καθίσταται προφανές ότι είναι εφικτή η δυνατότητα εξεύρεσης ποικίλων λύσεων αναφορικά με την οικολογική και φιλική προς το περιβάλλον διαχείριση της ακάθαρτης γλυκερόλης, μέσω της μικροβιακής τεχνολογίας. Τα ευρήματα της παρούσας διδακτορικής διατριβής θα μπορούσαν να αποτελέσουν έναυσμα για μελλοντικές μελέτες, με τελικό στόχο τη μείωση του κόστους μέσω της χρήσης πράσινων και οικολογικώς φιλικών διεργασιών σχετιζόμενων με την παραγωγή πολυολών σε βιομηχανική κλίμακα.

Επιστημονική περιοχή: Παραγωγή πολυολών

Λέξεις κλειδιά: Γλυκερόλη, κιτρικό οξύ, πολυόλες

Physiological behavior of *Yarrowia lipolytica* yeast during growth on glycerol-based substrates

Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων Και Διατροφής Του Ανθρώπου
Εργαστήριο Μικροβιολογίας Και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων

ABSTRACT

The aim of the present study is the collection and the elaboration of data that are related to the glycerol. Biodiesel fuels, defined as (mostly) methyl-esters and to lesser extent ethyl- or butyl-esters of various types of fatty acids, resulting from trans-esterification of low-value natural oils and fats, already represent a very important alternative type of fuel for the various types of diesel engines and heating systems. Due to the potential exhaustion of conventional fuels and to the various environmental issues that are currently imposed (i.e., constantly increasing CO₂ emissions due to the utilization of non-renewable fuels, global warming phenomenon, etc.), the application of biofuels on a large commercial scale is strongly recommended by the various authorities and funding bodies. Given that biodiesel derives from triacylglycerol transesterification yielding in both the fatty acid alky-esters (*viz.* the biodiesel) and the side-production of glycerol, the significant expansion of biodiesel that has occurred the last years, has already resulted in the generation of very high quantities of (crude *viz.* unpurified) glycerol into the market volume, as glycerol is the main side-product of this very industrial activity. To give the magnitude of the problem, we should indicate that the synthesis of 10 portions of biodiesel generates *c.* 1 portion of glycerol (with purity ~90% w/w) as by-product of the process, while besides biodiesel production process, significant quantities of glycerol-containing waters that are composed of varying concentrations of glycerol, are also generated through bioethanol and alcoholic beverages production units and through various other oleochemical industrial activities. Therefore, glycerol valorization should have much to offer in the cost reduction of the overall industrial production cost, for the mentioned agro-industrial activities.

Within the frame of this important problem, *viz.* the discovery of eco-friendly and “green” ways of valorization of crude glycerol, is found the current thesis. In fact, it was decided to utilize various wild-type strains of the non-conventional yeast *Yarrowia lipolytica* and assess their potential related to the consumption of biodiesel-derived glycerol and produce a plethora of important metabolites of biotechnological interest. Therefore, the capability of newly isolated wild-type strains of the mentioned yeast, namely the strains NRRL Y-323, NRRL Y-423, LGAM S7(1), Po1d (CLIB 139), FMCC Y-75, ACA-YC 5030, LMBF 20 and FMCC Y-74, to consume biodiesel-derived glycerol and produce in noticeable quantities extra-cellular and intra-cellular metabolites under various culture conditions was assessed. All trials were performed under nitrogen-limited conditions in shake-flask mode and in batch and fed-batch bioreactor, and the potential for polyol production was significant for all strains at low pH values (pH=2±0,3).

In the initial phase, an examination was conducted to determine whether the addition of industrial glycerol, deriving from transesterification of “used/cooked” oils had a negative impact on one of the mentioned strains capacities to consume the substrate and synthesize metabolic products, as compared to the “pure” substrate, and indeed growth and metabolites production was not altered by the presence of the industrial feedstock. Thereafter, the strains NRRL-323, LMBF 20, ACA-YC 5030 and FMCC Y-74 were found to be the most promising for the production of the intended metabolic products. The synthesis of the metabolic products was investigated in nitrogen-limited experiments imposed in order to “boost” the production of non-growth associated metabolites like sugar-alcohols, citric acid, microbial lipids and endopolysaccharides. Besides nitrogen limitation, growth was performed under stressful conditions, therefore trials were conducted under noticeably low temperatures (*viz.* 20 ± 1 °C), under previously pasteurized conditions, under non-previously thermally treated at all conditions, in the presence of variable concentrations of sodium chloride (up to 80 g/L) and under high initial glycerol concentrations (up to ~ 120 g/L) in shake-flask experiments. Many of the studied strains presented very interesting results while the differentiation of the culture conditions notably diversified the metabolic compounds synthesized. In low pH values ($2\pm 0,3$) noticeable growth and production of polyols occurred. When trials were performed at slightly acidic conditions ($\text{pH}=6\pm 0,3$), interestingly citric acid was not the principal product, while polyols were mainly synthesized but in lower quantities compared to growth at low pH values ($2\pm 0,3$). The addition of NaCl, shifted the metabolism towards the synthesis of citric acid and to the detriment of the production of polyols. Despite the low temperature, many strains presented appreciable growth and biosynthesis of metabolites. Finally, in trials with high initial glycerol concentration (~ 120 g/L) and low incubation pH ($2\pm 0,3$), flask experiments were accompanied by the production of 79,7 g/L of total polyols (mannitol, erythritol and arabitol) for the strain FMCC Y-74, 74,8 g/L for the strain NRRL Y-323 and 57 g/L for the strain ACA-YC 5030.

During the concluding phase of the experimental procedure, the strain FMCC Y-74 that distinguished itself from the aforementioned conditions and displayed resistance on glycerol and NaCl, was cultivated in laboratory-scale bioreactors with an active volume of 1,5 L in fed-batch configurations with variable pH and stirring conditions, with the aim of maximizing the concentration of the intended metabolic products. Significant quantities of citric acid (~ 50 g/L) were recorded only when the pH value into the medium was near the neutral one ($\text{pH}=6\pm 0,3$) and significant agitation, *viz.* 750 ± 5 rpm (thus, resulting in high oxygen saturation) was imposed into the medium. The very high concentration of total polyols ~ 90 g/L with no citric acid at all synthesized was recorded in the presence of slightly acidic conditions ($\text{pH}=6\pm 0,3$) and low agitation, *viz.* 250 ± 5 rpm (that resulted in low dissolved oxygen concentration values) imposed into the medium, at fed-batch bioreactor trials.

For all strains studied, despite the implementation of culture conditions favoring the *de novo* lipid accumulation process (*viz.* trials performed under nitrogen-limited and carbon-excess media), all strains failed to produce significant amounts of cellular lipids, shifting their metabolism towards the synthesis of

extra-cellular compounds (sugar-alcohols and citric acid). Therefore, in the majority of cases, the concentration of cellular lipid in dry cell weight (DCW) values remained below the threshold of ~20% w/w. Likewise; moderate and varying quantities (up to 30% w/w) of polysaccharides in DCW values were recorded. In many of the studied strains, the values of lipids in DCW were somehow elevated at the first culture steps, decreasing afterwards, simultaneously with the secretion of extra-cellular metabolites. On the other hand, the synthesis of polysaccharides was influenced by culture parameters, like the addition of salt or the imposition of low temperature.

Overall, newly isolated wild-type strains of the yeast *Y. lipolytica* proved to be suitable candidates for the production of sugar-alcohols at increased concentrations when biodiesel-derived glycerol was employed as microbial substrate. Citric acid also was secreted in non-negligible concentrations in bioreactor experiments in which high agitation and slightly acidic pH were imposed into the medium. In contrast, the production of microbial lipid from glycerol, that has the potential to completely recycle the waste generated during the biodiesel production process, was not a very dominant phenomenon, whereas varying quantities of endopolysaccharides were synthesized. It is of great academic interest to study the biosynthesis of endopolysaccharides and their interaction with the accumulation of microbial lipids, and more studies in the future should be performed on this issue.

The potential increase of biodiesel production in the near future leads to the necessity of discovering various integrated (bio)-processes for valorization of this residue (“bio-refinery approach”). The current study provided alternative ways of valorization of this residue, by using it as substrate by natural yeast species, in order to produce added-value metabolic compounds. As it was indicated in the present thesis, numerous solutions referring to the ecological and environmentally friendly valorization of biodiesel-derived glycerol were proposed, with microbial technology being able to contribute greatly to this important direction. Findings of the current thesis, therefore, can be the basis for future studies on this very important topic, with long-range impact.

Scientific area: Production of polyols

Key words: Glycerol, citric acid, polyols

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η αναζήτηση της γνώσης είναι ένας επίπονος και συνεχής αγώνας προς την εξεύρεση νέων τρόπων καλύτερης των συνθηκών διαβίωσης. Ωστόσο, χωρίς την παρουσία, την υποστήριξη και την ανεκτικότητα κάποιων ανθρώπων δεν θα ήταν δυνατή η υλοποίηση κάθε διατριβής. Χωρίς τη συνδρομή των ανθρώπων που στάθηκαν στο πλάι μου αυτά τα χρόνια, θα ήταν δύσκολο να φτάσω ως εδώ. Οφείλω να ευχαριστήσω και να αφιερώσω την παρούσα διδακτορική διατριβή στους γονείς μου, Θεόφιλο και Γεωργία, την αδερφή μου, Μαίρη και τον Νικόλα, που αποτέλεσαν πηγή δύναμης και ήταν ουσιαστικοί σύμμαχοι σε αυτή μου την προσπάθεια, τόσο με τη στήριξη, την υπομονή, το ενδιαφέρον, όσο και με την κατανόηση τους.

Με την άδεια μου, η παρούσα εργασίαελέγχθηκε από την Εξεταστική Επιτροπή μέσα από λογισμικό ανίχνευσης λογοκλοπής που διαθέτει το ΓΠΑ και διασταυρώθηκε η εγκυρότητα και η πρωτοτυπία της

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

***ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ
ΑΝΘΡΩΠΟΥ***

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

“Μελέτη της φυσιολογικής συμπεριφοράς της ζύμης *Yarrowia lipolytica* κατά την αύξηση της σε υποστρώματα με βάση τη γλυκερόλη”

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Ελένη - Σταυρούλα Βασταρούχα

ΑΘΗΝΑ, 2023

AGRICULTURAL UNIVERSITY OF ATHENS
DEPARTMENT OF FOOD SCIENCE AND HUMAN
NUTRITION

LABORATORY OF FOOD MICROBIOLOGY AND
BIOTECHNOLOGY

“Physiological behavior of *Yarrowia lipolytica* yeast during growth on
glycerol-based substrates”

A thesis submitted for the degree of
DOCTOR OF PHILOSOPHY

by

Eleni - Stavroula Vastaroucha

ATHENS, 2023

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΉ ΔΙΑΤΡΙΒΉ

“Μελέτη της φυσιολογικής συμπεριφοράς της ζύμης *Yarrowia lipolytica* κατά την αύξηση της σε υποστρώματα με βάση τη γλυκερόλη”

Επιτροπή Διατριβής

Επιβλέπων

Σεραφείμ Παπανικολάου, Καθηγητής Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών

Μέλη Τριμελούς Επιτροπής

Σεραφείμ Παπανικολάου, Καθηγητής Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών

Νικόλαος Στοφόρος, Καθηγητής Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών

Γεώργιος Αγγελής, Καθηγητής Πανεπιστημίου Πατρών

Μέλη Εξεταστικής Επιτροπής

Σεραφείμ Παπανικολάου, Καθηγητής Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών

Νικόλαος Στοφόρος, Καθηγητής Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών

Γεώργιος Αγγελής, Καθηγητής Πανεπιστημίου Πατρών

Απόστολος Κουτίνας, Καθηγητής Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών

Παναγιώτα Διαμαντοπούλου, Κύρια Ερευνήτρια ΕΛΓΟ «Δήμητρα»

Δημήτριος Σαρρής, Επίκουρος Καθηγητής Πανεπιστημίου Αιγαίου

Θεοφανία Τσιρώνη, Επίκουρη Καθηγήτρια Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών

“Μελέτη της φυσιολογικής συμπεριφοράς της ζύμης *Yarrowia lipolytica* κατά την αύξηση της σε υποστρώματα με βάση τη γλυκερόλη”

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 στην Βιβλιοθήκη και Κέντρο Πληροφόρησης του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών.

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΣΕ ΔΙΕΘΝΗ ΠΕΡΙΟΔΙΚΑ ΠΟΥ ΠΕΡΙΕΧΟΥΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

1. **Vastaroucha E.**, Maina S., Michou S., Kalantzi O., Pateraki C., Koutinas A., Papanikolaou S. (2021). Biotechnological conversions of biodiesel-derived glycerol into secondary metabolites by newly isolated wild-type *Yarrowia lipolytica* strains. *Reactions*. 2(4):499-519
2. **Vastaroucha E.**, Stoforos N., Aggelis G., Papanikolaou S. (2023). The growth potential of selected wild-type strains of the yeast *Yarrowia lipolytica* growing on crude glycerol for the production of polyols under stressful conditions. *Carbon Resources Conversion*. Under revision
3. Michou S., Tsouko E., **Vastaroucha E.**, Diamantopoulou P, Papanikolaou S. (2022). Growth potential of selected yeast strains cultivate on xylose-based media mimicking lignocellulosic wastewater streams: high production of microbial lipids by *Rhodospiridium toruloides*. *Fermentation*. 8(12):713

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΣΕ ΔΙΕΘΝΗ ΚΑΙ ΕΘΝΙΚΑ ΣΥΝΕΔΡΙΑ ΠΟΥ ΠΕΡΙΕΧΟΥΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

1. **Vastaroucha E.**, Papanikolaou S. (2019). Μελέτη της παραγωγής πολυολών κατά την ανάπτυξη ζύμης σε διαφορετικές συγκεντρώσεις υποστρώματος γλυκερόλης και pH. Ομιλία, 12^ο Πανελλήνιο Επιστημονικό Συνέδριο Χημικής Μηχανικής, Αθήνα, Ελλάδα
2. **Vastaroucha E.**, Michou S., Kalantzi O., Papanikolaou S. (2019). «Biotechnological production of polyols through conversions of crude glycerol by newly isolated strains of the yeast *Yarrowia lipolytica*». 16th International Conference on Environmental Science and Technology, Rhodes, Greece
3. **Vastaroucha E.**, Michou S., Papanikolaou S. (2019). «Biotechnological production of polyols through conversions of crude glycerol by newly isolated strains of the yeast *Yarrowia lipolytica*». Oral presentation, 8^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Σύγχρονες Τάσεις στον Τομέα των λιπιδίων, Αθήνα, Ελλάδα
4. **Vastaroucha E.**, Michou S., Filippousi R., Papanikolaou S. (2019). «Production of polyols by newly isolated strains». Oral presentation, 15th International Conference on Renewable Resources and Biorefineries, Toulouse, France
5. **Vastaroucha E.**, Michou S., Kalantzi O., Papanikolaou S. (2019). «Biotechnological production of polyols through conversions of crude glycerol». 35th International Specialized Symposium on Yeasts, Antalya, Turkey
6. **Vastaroucha E.**, Michou S., Kalantzi O., Papanikolaou S. (2019). «Biotechnological production of polyols through conversions of crude glycerol by newly isolated strains of the yeast *Yarrowia*

- lipolytica*». Book chapter σε επιστημονικό περιοδικό για τα αποτελέσματα που παρουσιάστηκαν στο 16th International Conference on Environmental Science and Technology, Rhodes, Greece
7. **Vastaroucha E.**, Michou S., Papanikolaou S. (2020). «Physiological behavior of yeast *Yarrowia lipolytica* on crude glycerol media in batch and fed-batch cultures». 11th International Conference Biosystems Engineering, Tartu, Estonia
 8. **Vastaroucha E.**, Michou S., Papanikolaou S. (2021). «Physiological behavior of wild-type *Yarrowia lipolytica* yeast strains cultivated on crude glycerol in batch cultures». 9^o Πανελλήνιο Συνέδριο Greek lipid forum, Σύγχρονες Τάσεις στον Τομέα των λιπιδίων, Αθήνα, Ελλάδα
 9. **Vastaroucha E.**, Michou S., Papanikolaou S. (2023). «Growth potential of selected strains of yeast *Yarrowia lipolytica* cultivated on crude glycerol-based media in order to produce polyols under low and high pH and temperature conditions». 19th International Conference on Renewable Resources and Biorefineries, Riga, Latvia
 10. Michou S., **Vastaroucha E.**, Sarris D., Kalantzi O., Papanikolaou S. (2019). «Lipid production by *Rhodospiridium toruloides* growing on media presenting composition similarities with the spent sulfite liquor in batch and fed-batch cultures». 16th International Conference on Environmental Science and Technology, Rhodes, Greece
 11. 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 *Rhodospiridium toruloides*». 15th International Conference on Renewable Resources and Biorefineries, Toulouse, France
 12. Michou S, **Vastaroucha E.**, Filippousi R., Tzirita M., Papanikolaou S. (2019). «Lipid production by *Rhodospiridium toruloides* growing on renewable carbon sources in batch and fed-batch cultures». 35th International Specialized Symposium on Yeasts, Antalya, Turkey
 13. Michou S., **Vastaroucha E.**, Papanikolaou S. (2020). «Investigation of sodium lignosulfonate on lipid production by yeast *Rhodospiridium toruloides* growing on crude glycerol and xylose in batch and fed-batch cultures». 11th International Conference Biosystems Engineering, Tartu, Estonia
 14. Michou S., **Vastaroucha E.**, Papanikolaou S. (2021). «Investigation of effect of sodium lignosulfonate and sodium chloride on lipid production by yeast *Rhodotorula glutinis* growing on crude glycerol in batch and fed-batch culture». 9^o Πανελλήνιο Συνέδριο Greek lipid forum, Σύγχρονες Τάσεις στον Τομέα των λιπιδίων, Αθήνα, Ελλάδα
 15. Anastasopoulos V., Michou S., **Vastaroucha E.**, Papanikolaou S. (2022). «Enhanced lipid production by *Rhodospiridium toruloides* strains growing on crude glycerol in batch cultures». 10^o Πανελλήνιο Συνέδριο Σύγχρονες Τάσεις στον Τομέα των Λιπιδίων, Αθήνα, Ελλάδα

16. Diamanti V., Vastaroucha E., Michou S., Papanikolaou S. (2022). «Physiological behavior of wild-type *Yarrowia lipolytica* yeast strains cultivated on crude glycerol in batch cultures». 10^o Πανελλήνιο Συνέδριο Σύγχρονες Τάσεις στον Τομέα των Λιπιδίων, Αθήνα, Ελλάδα
17. Michou S., Vastaroucha E., Papanikolaou S. (2023). «Enhanced lipid production by *Rhodospiridium toruloides* strains growing on crude glycerol in batch and fed-batch cultures». 19th International Conference on Renewable Resources and Biorefineries, Riga, Latvia

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Το πειραματικό μέρος της παρούσας διπλωματικής εργασίας εκπονήθηκε εξ' ολοκλήρου στο Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων (Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων Και Διατροφής του Ανθρώπου), του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, υπό την επίβλεψη του Καθηγητή Σ. Παπανικολάου.

Η παρούσα διδακτορική διατριβή υλοποιήθηκε στα πλαίσια του ερευνητικού έργου «Προσθέτοντας αξία στην ακάθαρτη γλυκερόλη, υπόλειμμα της διεργασίας παραγωγής βιολογικού πετρελαίου (βιοντίζελ), με τη χρήση μικροβιακής και χημικής τεχνολογίας-Addvalue2glycerol», στο πλαίσιο του ΕΡΕΥΝΩ-ΔΗΜΙΟΥΡΓΩ-ΚΑΙΝΟΤΟΜΩ (κωδικός έργου ΟΠΣ 2076) στο Επιχειρησιακό Πρόγραμμα «Ανταγωνιστικότητα Επιχειρηματικότητα και Καινοτομία», που συγχρηματοδοτήθηκε από την Ευρωπαϊκή Ένωση και εθνικούς πόρους μέσω του Ε.Π. Ανταγωνιστικότητα, Επιχειρηματικότητα & Καινοτομία (ΕΠΑνΕΚ).



Η υλοποίηση της διδακτορικής συγχρηματοδοτήθηκε από την Ελλάδα και την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο) μέσω του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Ανάπτυξη Ανθρώπινου Δυναμικού, Εκπαίδευση και Διά Βίου Μάθηση», 2014-2020, το πλαίσιο της Πράξης «Ενίσχυση του ανθρωπίνου δυναμικού μέσω της υλοποίησης διδακτορικής έρευνας Υπόδραση 2: Πρόγραμμα χορήγησης υποτροφιών ΙΚΥ σε υποψήφιους διδάκτορες των ΑΕΙ της Ελλάδος».



Ολοκληρώνοντας αυτή τη μακρόχρονη, επίπονη και σημαντική διαδικασία, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά όλους όσους με βοήθησαν, με παρακίνησαν και με στήριξαν για την πραγματοποίηση της διδακτορικής αυτής διατριβής.

Πρώτα απ' όλα θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στον επιβλέποντα Καθηγητή Σ. Παπανικολάου που χωρίς την αμέριστη βοήθεια του δε θα είχε υλοποιηθεί η διατριβή αυτή. Ακόμη, να τον ευχαριστήσω για τη συνεχή συμβολή και εμπιστοσύνη του, καθ' όλη τη διάρκεια αυτών των χρόνων, για την ανάθεση του θέματος, την καθοδήγηση του, τις πολύτιμες υποδείξεις, συμβουλές και λύσεις του

κατά την εκτέλεση των πειραμάτων, καθώς και τη σημαντική συνεισφορά του στην επεξεργασία και τελική διαμόρφωση του κειμένου του διδακτορικού.

Επιπροσθέτως, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της Τριμελούς Επιτροπής, τους Καθηγητές Στοφόρο Ν. και Αγγελή Γ., καθώς και τα υπόλοιπα μέλη της Επταμελούς Επιτροπής, Κουτίνα Α. - Καθηγήτη ΓΠΑ, Διαμαντοπούλου Π. - Κύρια Ερευνήτρια ΕΛΓΟ-«Δήμητρα», Σαρρή Δ. - Επίκουρο Καθηγήτη Πανεπιστημίου Αιγαίου και Τσιρώνη Θ. - Επίκουρη Καθηγήτρια ΓΠΑ, για την προθυμία τους να συμμετάσχουν στην αξιολόγηση της προσπάθειάς μου, το ενδιαφέρον που έδειξαν, καθώς και το χρόνο που διέθεσαν για τη μελέτη της διατριβής μου, τα σχόλια-παρατηρήσεις τους που με βοήθησαν.

Ιδιαίτερα, θα ήθελα να ευχαριστήσω τις υποψήφιες διδάκτορες και συνοδοιπόρους μου σε αυτό το ταξίδι, Σαββούλα Μίχου και Ροζανίνα Φιλιπούση, για τη συμπαράσταση, τη συνεργασία, την υπομονή και τη συμβολή τους, ώστε να γίνει πιο εύκολο και ευχάριστο το ταξίδι αυτό προς την υλοποίηση του διδακτορικού.

Θα ήταν παράλειψη μου να μην εκφράσω τα θερμά μου ευχαριστώ σε όλο το ανθρώπινο δυναμικό του εργαστηρίου Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων που πέρασε κατά την διάρκεια αυτών των ετών και ιδιαίτερα στη κα Ουρανία Καλαντζή (ΕΔΙΠ) για την πολύτιμη και ανιδιοτελή βοήθεια, καθοδήγηση, υπομονή, στήριξη, για την άριστη συνεργασία μας και το ευχάριστο κλίμα που επικράτησε αυτά τα χρόνια.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω και να αφιερώσω την παρούσα διδακτορική διατριβή στους γονείς μου, Θεόφιλο και Γεωργία, την αδερφή μου, Μαίρη και τον Νικόλα, που αποτέλεσαν πηγή δύναμης και ήταν ουσιαστικοί σύμμαχοι σε αυτή μου την προσπάθεια, τόσο με τη στήριξη, την υπομονή, το ενδιαφέρον, όσο και με την κατανόηση τους.

Ελένη - Σταυρούλα Βασταρούχα

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Περίληψη	xix
Abstract	xxii
I. Γενική Εισαγωγή	1
II. Σκοπός της μελέτης	4
1. Βιβλιογραφική Σύνθεση	6
1.1 Εισαγωγή στις ζυμώσεις – Βιομηχανικές ζυμώσεις	7
1.2 Περιγραφή βιοτεχνολογικών σταδίων	8
1.3 Βιοκαύσιμα	8
1.4 Γλυκερόλη	9
1.5 <i>Yarrowia lipolytica</i>	12
1.5.1 Μορφολογία και φυσιολογία της ζύμης	12
1.5.2 Βιολογία του πολυμορφισμού	13
1.5.3 Αλληλεπίδραση με το φυσικό περιβάλλον και τον άνθρωπο	14
1.6 Πολυόλες	14
1.6.1 Μεταβολισμός ερυθριτόλης	15
1.6.2 Μεταβολισμός μαννιτόλης	16
1.6.3 Μεταβολισμός αραβιτόλης	17
1.7 Προϊόντα και εφαρμογές πολυολών	18
1.7.1 Παραγωγή και εφαρμογές ερυθριτόλης	18
1.7.2 Παραγωγή και εφαρμογές μαννιτόλης	20
1.7.3 Παραγωγή και εφαρμογές αραβιτόλης	22
1.8 Κιτρικό οξύ	23
1.9 Μικροβιακό λίπος και ελαιογόνοι μικροοργανισμοί	24
1.9.1 Αναβολισμός λίπους	25
1.10 Μεταβολισμός ενδοπολυσακχαριτών	27
2. Υλικά και μέθοδοι	30
2.1 Γενική παρουσίαση	31
2.2 Βιολογικό Υλικό	31
2.3 Θρεπτικά μέσα καλλιέργειας	33
2.4 Πειράματα υγρών ζυμώσεων σε φιάλες	35
2.4.1 Συγκριτική αξιολόγηση υποστρωμάτων	36
2.4.2 Συγκριτική αξιολόγηση των στελεχών	36
2.5 Πειράματα υγρών ζυμώσεων σε εργαστηριακό βιοαντιδραστήρα	36
2.6 Χημικές αναλύσεις	37
2.6.1 Προσδιορισμός του pH	37

2.6.2	Συλλογή κυτταρικής μάζας	37
2.6.3	Προσδιορισμός ενδοπολυσακχαριτών (IPS)	38
2.6.4	Εκχύλιση μικροβιακών λιπιδίων	39
2.6.5	Μεθυλεστεροποίηση λιπαρών οξέων	39
2.6.6	Ανάλυση αέριας χρωματογραφίας	40
2.6.7	Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης - Προσδιορισμός σακχάρων, πολυολών και οργανικών οξέων	41
3.	Αποτελέσματα και συζήτηση	42
3.1	Γενική Παρουσίαση	43
3.2	Επίδραση καθαρότητας γλυκερόλης στην παραγωγή πολυολών από το στέλεχος της ζύμης <i>Yarrowia lipolytica</i> FMCC Y-74	44
3.3	Συγκριτική αξιολόγηση χαρακτηριστικών αύξησης οκτώ στελεχών της ζύμης <i>Yarrowia lipolytica</i>	47
3.4	Κινητική μελέτη αύξησης επιλεγμένων στελεχών της ζύμης <i>Yarrowia lipolytica</i> σε συνθήκες χαμηλής θερμοκρασίας	55
3.5	Συγκριτική αξιολόγηση επιλεγμένων στελεχών της ζύμης <i>Y. lipolytica</i> σε μη ασηπτικές συνθήκες	60
3.6	Μελέτη της προσθήκης χλωριούχου νατρίου στην αύξηση επιλεγμένων στελεχών της ζύμης	67
3.7	Επίδραση αυξανόμενης αρχικής συγκέντρωσης υποστρώματος γλυκερόλης σε επιλεγμένα στελέχη της ζύμης	73
3.8	Καλλιέργειες σε εργαστηριακής κλίμακας βιοαντιδραστήρα	82
4.	Συμπεράσματα	93
	Ονοματολογία	99
	Βιβλιογραφία	101

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΟΙ ΠΙΝΑΚΕΣ

Πίνακας 2.1 Μικροβιακά στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν και εξετάστηκαν ως προς την αποδοτικότητα τους σε πληθώρα συνθηκών που εκτέθηκαν κατά τα διάφορα στάδια της μελέτης

Πίνακας 2.2 Σύσταση κυρίως καλλιέργειας για το σύνολο των πειραματικών διαδικασιών

Πίνακας 3.1 Ποσοτικά δεδομένα καλλιεργούμενων στελεχών *Y. lipolytica* σε υπόστρωμα με βάση τη γλυκερόλη (G10₀ ~40 g/L) σε διαφορετικές τιμές pH. Συνθήκες καλλιέργειας: ζύμωση σε ανακινούμενες κωνικές φιάλες των 250 mL σε ανάδευση 180±5 rpm και θερμοκρασία επώασης T=30±1 °C. Κάθε πειραματικό σημείο που παρουσιάζεται είναι η μέση τιμή δύο ανεξάρτητων προσδιορισμών από διαφορετικά αρχικά εμβόλια

Πίνακας 3.2 Ποσοτικά δεδομένα καλλιεργούμενων στελεχών *Y. lipolytica* σε υπόστρωμα με βάση τη γλυκερόλη (G10₀ ~40 g/L) σε διαφορετικές τιμές pH. Συνθήκες καλλιέργειας: ζύμωση σε ανακινούμενες κωνικές φιάλες των 250 mL σε ανάδευση 180±5 rpm και θερμοκρασία επώασης T=20±1 °C. Κάθε πειραματικό σημείο που παρουσιάζεται είναι η μέση τιμή δύο ανεξάρτητων προσδιορισμών από διαφορετικά αρχικά εμβόλια

Πίνακας 3.3 Ποσοτικά δεδομένα καλλιεργούμενων στελεχών *Y. lipolytica* σε υπόστρωμα με βάση τη γλυκερόλη (G10₀ ~40 g/L) σε διαφορετικές τιμές pH. Συνθήκες καλλιέργειας: ζυμώσεις σε παστεριωμένο υπόστρωμα (65±1 °C) και σε χωρίς θερμική επεξεργασία υπόστρωμα. Ανακινούμενες κωνικές φιάλες των 250 mL σε ανάδευση 180±5 rpm και θερμοκρασία επώασης T=30±1 °C. Κάθε πειραματικό σημείο που παρουσιάζεται είναι η μέση τιμή δύο ανεξάρτητων προσδιορισμών από διαφορετικά αρχικά εμβόλια

Πίνακας 3.4 Ποσοτικά δεδομένα καλλιεργούμενων στελεχών *Y. lipolytica* σε υπόστρωμα με βάση τη γλυκερόλη (G10₀ ~40 g/L) σε τιμή pH 6±0,3, παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων χλωριούχου νατρίου. Συνθήκες καλλιέργειας: ζύμωση σε ανακινούμενες κωνικές φιάλες των 250 mL σε ανάδευση 180±5 rpm και θερμοκρασία επώασης T=30±1 °C. Κάθε πειραματικό σημείο που παρουσιάζεται είναι η μέση τιμή δύο ανεξάρτητων προσδιορισμών από διαφορετικά αρχικά εμβόλια

Πίνακας 3.5 Παρατηρούμενος χρόνος για την κατανάλωση γλυκερόλης και τη μέγιστη παραγωγή μεταβολικών προϊόντων, των διακριθέντων στελεχών της ζύμης *Y. lipolytica*, κατά την αύξηση σε ακάθαρτη βιομηχανική γλυκερόλη. Συνθήκες καλλιέργειας: Ασυνεχείς ζυμώσεις σε ανακινούμενες κωνικές φιάλες (180±5 rpm), T=30±1 °C, αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης ~80 g/L και ~120 g/L, pH 2±0,3 υπό αερόβιες και περιοριστικές σε άζωτο συνθήκες. Κάθε πειραματικό σημείο που παρουσιάζεται είναι η μέση τιμή δύο ανεξάρτητων προσδιορισμών από διαφορετικά αρχικά εμβόλια.

Πίνακας 3.6 Παρατηρούμενος χρόνος για την κατανάλωση γλυκερόλης και τη μέγιστη παραγωγή μεταβολικών προϊόντων, των διακριθέντων στελεχών της ζύμης *Y. lipolytica*, κατά την αύξηση σε ακάθαρτη βιομηχανική γλυκερόλη. Συνθήκες καλλιέργειας: Ασυνεχείς ζυμώσεις σε ανακινούμενες κωνικές φιάλες (180±5 rpm), T=30±1 °C, αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης ~80 g/L και ~120 g/L, pH 6±0,3 υπό αερόβιες και περιοριστικές σε άζωτο συνθήκες. Κάθε πειραματικό σημείο που παρουσιάζεται είναι η μέση τιμή δύο ανεξάρτητων προσδιορισμών από διαφορετικά αρχικά εμβόλια

Πίνακας 3.7 Πειραματικά δεδομένα του μικροοργανισμού *Y. lipolytica* NRRL Y-323 τα οποία επιτεύχθηκαν σε υπόστρωμα ακάθαρτης γλυκερόλης με pH 2±0,3 και ανάδευση 750±5 rpm. Συνθήκες καλλιέργειας: Κλειστές ζυμώσεις σε βιοαντιδραστήρα (σταθερός αερισμός 1,5 vvm, θερμοκρασία

επώασης $T=30\pm 1$ °C, αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης ~40 g/L, υπό αερόβιες και περιοριστικές σε άζωτο συνθήκες)

Πίνακας 3.8 Πειραματικά δεδομένα του μικροοργανισμού *Y. lipolytica* FMCC Y-74 τα οποία επιτεύχθηκαν σε υπόστρωμα ακάθαρτης γλυκερόλης με συνδυασμό μεταβλητών τιμών pH και ανάδευσης. Συνθήκες καλλιέργειας: Ημι-συνεχείς ανατροφοδοτούμενες ζυμώσεις σε βιοαντιδραστήρα (σταθερός αερισμός 1,5 vvm, θερμοκρασία επώασης $T=30\pm 1$ °C, αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης ~40 g/L, υπό αερόβιες και περιοριστικές σε άζωτο συνθήκες)

Πίνακας 3.9 Συγκριτικά δεδομένα για τη βιοτεχνολογική παραγωγή κιτρικού οξέος μέσω αξιοποίησης της απόβλητης γλυκερόλης από διάφορα στελέχη που έχουν χρησιμοποιηθεί κατά καιρούς διεθνώς

Πίνακας 3.10 Συγκριτικά δεδομένα για τη βιοτεχνολογική παραγωγή πολυολών μέσω αξιοποίησης της απόβλητης γλυκερόλης από διάφορα στελέχη *Y. lipolytica* που έχουν χρησιμοποιηθεί κατά καιρούς διεθνώς

Πίνακας 3.11 Συγκριτικά δεδομένα για τη βιοτεχνολογική παραγωγή βιομάζας μέσω αξιοποίησης της απόβλητης γλυκερόλης από διάφορα στελέχη που έχουν χρησιμοποιηθεί κατά καιρούς διεθνώς

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΕΣ ΕΙΚΟΝΕΣ

Εικόνα 1.1 Περιγραφή της βιοτεχνολογικής διεργασίας

Εικόνα 1.2 Κύριες πηγές της γλυκερόλης ως απόβλητο που έχει προκύψει από: α) υδρόλυση, β) σαπωνοποίηση και γ) μετεστεροποίηση των λιπαρών οξέων. Προσαρμοσμένο από Monteiro et al., 2018

Εικόνα 1.3 Εφαρμογές της καθαρής γλυκερόλης

Εικόνα 1.4 Αποικίες της ζύμης *Y. lipolytica*, όπως φαίνονται σε τρυβλίο Petri με θρεπτικό υπόστρωμα γλυκόζης-πεπτόνης-yeast extract (μεγέθυνση x5, αριστερά). Αληθές μυκήλιο, ψευδομυκήλιο και κύτταρα ζύμης, όπως φαίνονται σε οπτικό μικροσκόπιο (μεγέθυνση x100, δεξιά)

Εικόνα 1.5 Βιοτεχνολογικό μονοπάτι βιοσύνθεσης της ερυθριτόλης από υπόστρωμα γλυκερόλης. Προσαρμοσμένο από Mirończuk et al., 2017

Εικόνα 1.6 Μεταβολικό μονοπάτι βιοσύνθεσης πολυολών από υπόστρωμα γλυκερόλη. Προσαρμοσμένο από Yang et al., 2014

Εικόνα 1.7 Θεωρητική απόδοση της ερυθριτόλης σε υπόστρωμα γλυκόζης

Εικόνα 1.8 Θεωρητική απόδοση της ερυθριτόλης σε υπόστρωμα γλυκερόλης

Εικόνα 1.9 Απεικόνιση της σύνθεσης λιπιδίων στη ζύμη *Y. lipolytica* με πηγή άνθρακα γλυκερόλη και περιορισμό αζώτου. Προσαρμοσμένο από Gonçaves et al., 2014

Εικόνα 1.10 Βιοσυσσώρευση λιπιδίων και ενδοπολυσακχαριτών, από Papanikolaou et al., 2009; 2011a; 2019; Diamantopoulou and Papanikolaou, 2023

Εικόνα 2.1 Ανάπτυξη στελεχών σε δοκιμαστικό σωλήνα τύπου slant και σε τρυβλίο τύπου Petri πριν από την αποθήκευσή τους στους 4 ± 1 °C

Εικόνα 2.2 Έλεγχος καθαρότητας των κυττάρων της ζύμης *Y. lipolytica* μέσω οπτικού μικροσκοπίου πριν από εμβολιασμό κύριας καλλιέργειας

Εικόνα 2.3 Πρότυπη καμπύλη αναφοράς για τον προσδιορισμό της γλυκόζης με την μέθοδο DNS

Εικόνα 2.4 Απεικόνιση πρότυπων καμπυλών αναφοράς (γλυκερόλης, μαννιτόλης, ερυθριτόλης και αραβιτόλης) για τον προσδιορισμό των σακχάρων με την HPLC

Εικόνα 3.1 Απεικόνιση της παραγωγής πολυολών για ακατέργαστη γλυκερόλη (▲), πολυολών για καθαρή γλυκερόλη (▲), βιομάζας για ακατέργαστη γλυκερόλη (*), βιομάζας για καθαρή γλυκερόλη (*) και της κατανάλωσης υποστρώματος γλυκερόλης σε συνάρτηση με τον χρόνο, από *Y. lipolytica* FMCC Y-74 κατά τη διάρκεια καλλιέργειας σε υπόστρωμα με βάση τη γλυκερόλη (Gl₁₀ ~40 g/L) pH $2\pm 0,3$. Συνθήκες καλλιέργειας: Ανακινούμενες κωνικές φιάλες των 250 mL στις 180 ± 5 rpm και θερμοκρασία επώασης $T=30\pm 1$ °C σε υπόστρωμα ακατέργαστης βιομηχανικής γλυκερόλης (◆) και καθαρής (◆). Κάθε πειραματικό σημείο που παρουσιάζεται είναι η μέση τιμή δύο ανεξάρτητων προσδιορισμών από διαφορετικά αρχικά εμβόλια

Εικόνα 3.2 Απεικόνιση της παραγωγής μικροβιακών λιπιδίων σε συνάρτηση με τον χρόνο, από *Y. lipolytica* FMCC Y-74 κατά τη διάρκεια καλλιέργειας σε υπόστρωμα με βάση τη γλυκερόλη (Glol₀ ~40 g/L) pH 2±0,3. Συνθήκες καλλιέργειας: Ανακινούμενες κωνικές φιάλες των 250 mL στις 180±5 rpm και θερμοκρασία επώασης T=30±1 °C σε υπόστρωμα ακατέργαστης βιομηχανικής γλυκερόλης (♦) και καθαρής (□). Κάθε πειραματικό σημείο που παρουσιάζεται είναι η μέση τιμή δύο ανεξάρτητων προσδιορισμών από διαφορετικά αρχικά εμβόλια

Εικόνα 3.3 Απεικόνιση της παραγωγής ενδοπολυσακχαριτών σε συνάρτηση με τον χρόνο, από *Y. lipolytica* FMCC Y-74 κατά τη διάρκεια καλλιέργειας σε υπόστρωμα με βάση τη γλυκερόλη (Glol₀ ~40 g/L) pH 2±0,3. Συνθήκες καλλιέργειας: Ανακινούμενες κωνικές φιάλες των 250 mL στις 180±5 rpm και θερμοκρασία επώασης T=30±1 °C σε υπόστρωμα ακατέργαστης βιομηχανικής γλυκερόλης (♦) και καθαρής (□). Κάθε πειραματικό σημείο που παρουσιάζεται είναι η μέση τιμή δύο ανεξάρτητων προσδιορισμών από διαφορετικά αρχικά εμβόλια

Εικόνα 3.4 Παραγόμενη κυτταρική μάζα ως συνάρτηση της καταναλωθείσας γλυκερόλης κατά την αύξηση του στελέχους FMCC Y-74 σε θρεπτικά μέσα καθαρής (♦) και ακατέργαστης γλυκερόλης (□), από *Y. lipolytica* FMCC Y-74 κατά τη διάρκεια καλλιέργειας σε υπόστρωμα με βάση τη γλυκερόλη (Glol₀ ~40 g/L) pH 2±0,3. Συνθήκες καλλιέργειας: ζύμωση σε ανακινούμενες κωνικές φιάλες των 250 mL στις 180±5 rpm και θερμοκρασία επώασης T=30±1 °C. Κάθε πειραματικό σημείο που παρουσιάζεται είναι η μέση τιμή δύο ανεξάρτητων προσδιορισμών από διαφορετικά αρχικά εμβόλια

Εικόνα 3.5 Απεικόνιση παραγωγής μαννιτόλης (♦), ερυθριτόλης (□), αραβιτόλης (▲), συνολικών πολυολών (×) και η κατανάλωση γλυκερόλης (*) σε συνάρτηση με τον χρόνο του στελέχους ACA-YC 5030 σε υπόστρωμα με βάση τη γλυκερόλη (Glol₀ ~40 g/L) σε ελαφρώς όξινη τιμή pH. Συνθήκες καλλιέργειας: ζύμωση σε ανακινούμενες κωνικές φιάλες των 250 mL στις 180±5 rpm και θερμοκρασία επώασης T=30±1 °C. Κάθε πειραματικό σημείο που παρουσιάζεται είναι η μέση τιμή δύο ανεξάρτητων προσδιορισμών από διαφορετικά αρχικά εμβόλια

Εικόνα 3.6 Σύσταση σε λιπαρά οξέα των λιπιδίων των στελέχη της ζύμης *Y. lipolytica* που συσώρευαν επαρκείς ποσότητες λιπιδίων (~20% w/w) σε συνθήκες καλλιέργειας όξινου περιβάλλοντος (2±0,3) και αρχικής συγκέντρωσης υποστρώματος ~40 g/L για πρώιμο σημείο της ζύμωσης (48h). Κάθε πειραματικό σημείο που παρουσιάζεται είναι η μέση τιμή δύο ανεξάρτητων προσδιορισμών από διαφορετικά αρχικά εμβόλια

Εικόνα 3.7 Σύσταση σε λιπαρά οξέα των λιπιδίων των στελέχη της ζύμης *Y. lipolytica* που συσώρευαν επαρκείς ποσότητες λιπιδίων (~20% w/w) σε συνθήκες καλλιέργειας όξινου περιβάλλοντος (2±0,3) και αρχικής συγκέντρωσης υποστρώματος ~40 g/L για τελικό σημείο της ζύμωσης (120h). Κάθε πειραματικό σημείο που παρουσιάζεται είναι η μέση τιμή δύο ανεξάρτητων προσδιορισμών από διαφορετικά αρχικά εμβόλια

Εικόνα 3.8 Σύσταση σε λιπαρά οξέα των λιπιδίων των στελέχη της ζύμης *Y. lipolytica* που συσσωρεύσαν επαρκείς ποσότητες λιπιδίων (~20% w/w) σε συνθήκες καλλιέργειας βασικού περιβάλλοντος ($6\pm 0,3$) και αρχικής συγκέντρωσης υποστρώματος ~40 g/L για πρώιμο σημείο της ζύμωσης (48h). Κάθε πειραματικό σημείο που παρουσιάζεται είναι η μέση τιμή δύο ανεξάρτητων προσδιορισμών από διαφορετικά αρχικά εμβόλια

Εικόνα 3.9 Σύσταση σε λιπαρά οξέα των λιπιδίων των στελέχη της ζύμης *Y. lipolytica* που συσσωρεύσαν επαρκείς ποσότητες λιπιδίων (~20% w/w) σε συνθήκες καλλιέργειας βασικού περιβάλλοντος ($6\pm 0,3$) και αρχικής συγκέντρωσης υποστρώματος ~40 g/L για τελικό σημείο της ζύμωσης (120h). Κάθε πειραματικό σημείο που παρουσιάζεται είναι η μέση τιμή δύο ανεξάρτητων προσδιορισμών από διαφορετικά αρχικά εμβόλια

Εικόνα 3.10 Συνολικές συγκεντρώσεις πολυολών για τα εξεταζόμενα στελέχη της ζύμης *Y. lipolytica*, σε συνθήκες χαμηλής θερμοκρασίας 20 ± 1 °C σε αναδευόμενες κωνικές φιάλες με αρχική συγκέντρωση υποστρώματος ~40 g/L και pH $2\pm 0,3$ και $6\pm 0,3$. Συνθήκες καλλιέργειας: ζύμωση σε ανακινούμενες κωνικές φιάλες των 250 mL στις 180 ± 5 rpm. Κάθε πειραματικό σημείο που παρουσιάζεται είναι η μέση τιμή δύο ανεξάρτητων προσδιορισμών από διαφορετικά αρχικά εμβόλια

Εικόνα 3.11 Κινητική εξέλιξη των κυτταρικών λιπιδίων προς την ξηρά βιομάζα ($Y_{L/X}$, % w/w) κατά την αύξηση του στελέχους ACA-YC 5030, σε αναδευόμενες κωνικές φιάλες σε παστεριωμένες συνθήκες στο θρεπτικό μέσο με αρχική συγκέντρωση υποστρώματος ~40 g/L, σε τιμή pH $2\pm 0,3$ (♦) και $6\pm 0,3$ (□). Συνθήκες καλλιέργειας: ζύμωση σε παστεριωμένο υπόστρωμα (65 ± 1 °C). Ανακινούμενες κωνικές φιάλες των 250 mL στις 180 ± 5 rpm και θερμοκρασία επώασης $T=30\pm 1$ °C. Κάθε πειραματικό σημείο που παρουσιάζεται είναι η μέση τιμή δύο ανεξάρτητων προσδιορισμών από διαφορετικά αρχικά εμβόλια

Εικόνα 3.12 Ποσοτικά δεδομένα των παραγόμενων πολυολών από τα καλλιεργούμενα στελέχη *Y. lipolytica* σε υπόστρωμα με βάση τη γλυκερόλη (G10l₀ ~40 g/L) σε διαφορετικές τιμές pH. Συνθήκες καλλιέργειας: ζυμώσεις σε παστεριωμένο υπόστρωμα (65 ± 1 °C) και σε μη θερμικά επεξεργασμένο. Ανακινούμενες κωνικές φιάλες των 250 mL στις 180 ± 5 rpm και θερμοκρασία επώασης $T=30\pm 1$ °C. Κάθε πειραματικό σημείο που παρουσιάζεται είναι η μέση τιμή δύο ανεξάρτητων προσδιορισμών από διαφορετικά αρχικά εμβόλια

Εικόνα 3.13 Κινητικό προφίλ μαννιτόλης (□), ερυθριτόλης (▲), αραβιτόλης (), βιομάζας (*), πολυολών (●) και κατανάλωσης γλυκερόλης (♦) από *Y. lipolytica* FMCC Y-74 κατά τη διάρκεια καλλιέργειας σε υπόστρωμα με βάση τη γλυκερόλη (G10l₀ ~40 g/L) σε pH $2\pm 0,3$. Συνθήκες καλλιέργειας: ζύμωση σε παστεριωμένο υπόστρωμα (65 ± 1 °C). Ανακινούμενες κωνικές φιάλες των 250 mL στις 180 ± 5 rpm και θερμοκρασία επώασης $T=30\pm 1$ °C. Κάθε πειραματικό σημείο που παρουσιάζεται είναι η μέση τιμή δύο ανεξάρτητων προσδιορισμών από διαφορετικά αρχικά εμβόλια

Εικόνα 3.14 Ποσοτικά δεδομένα των παραγόμενων πολυολών, κιτρικού οξέος και βιομάζας από το καλλιεργούμενο στέλεχος ACA-YC 5030 σε υπόστρωμα με βάση την γλυκερόλη (G1o₀ ~40 g/L) παρουσία μεταβλητών συγκεντρώσεων χλωριούχου νατρίου. Συνθήκες καλλιέργειας: ζυμώσεις σε ανακινούμενες κωνικές φιάλες των 250 mL στις 180±5 rpm σε pH 6±0,3 και θερμοκρασίας επώασης T=30±1 °C. Κάθε πειραματικό σημείο που παρουσιάζεται είναι η μέση τιμή δύο ανεξάρτητων προσδιορισμών από διαφορετικά αρχικά εμβόλια

Εικόνα 3.15 Ποσοτικά δεδομένα των παραγόμενων πολυολών, κιτρικού οξέος και βιομάζας από το καλλιεργούμενο στέλεχος FMCC Y-74 σε υπόστρωμα με βάση την γλυκερόλη (G1o₀ ~40 g/L) παρουσία μεταβλητών συγκεντρώσεων χλωριούχου νατρίου. Συνθήκες καλλιέργειας: ζυμώσεις σε ανακινούμενες κωνικές φιάλες των 250 mL στις 180±5 rpm σε pH 6±0,3 και θερμοκρασίας επώασης T=30±1 °C. Κάθε πειραματικό σημείο που παρουσιάζεται είναι η μέση τιμή δύο ανεξάρτητων προσδιορισμών από διαφορετικά αρχικά εμβόλια

Εικόνα 3.16 Ποσοτικά δεδομένα των παραγόμενων πολυολών από τα καλλιεργούμενα στελέχη *Y. lipolytica* σε υπόστρωμα με βάση τη γλυκερόλη (G1o₀ ~80 g/L και ~120 g/L) σε όξινη τιμή pH (2±0,3). Συνθήκες καλλιέργειας: ζυμώσεις σε ανακινούμενες κωνικές φιάλες των 250 mL στις 180±5 rpm και θερμοκρασία επώασης T=30±1 °C. Κάθε πειραματικό σημείο που παρουσιάζεται είναι η μέση τιμή δύο ανεξάρτητων προσδιορισμών από διαφορετικά αρχικά εμβόλια

Εικόνα 3.17 Ποσοτικά δεδομένα των παραγόμενων πολυολών και κιτρικού οξέος από τα καλλιεργούμενα στελέχη *Y. lipolytica* σε υπόστρωμα με βάση τη γλυκερόλη (G1o₀ ~80 g/L και ~120 g/L) σε ελαφρώς όξινες τιμές pH (6±0,3). Συνθήκες καλλιέργειας: ζυμώσεις σε ανακινούμενες κωνικές φιάλες των 250 mL στις 180±5 rpm και θερμοκρασία επώασης T=30±1 °C. Κάθε πειραματικό σημείο που παρουσιάζεται είναι η μέση τιμή δύο ανεξάρτητων προσδιορισμών από διαφορετικά αρχικά εμβόλια

Εικόνα 3.18 Κινητικό προφίλ μαννιτόλης (□), ερυθριτόλης (▲), αραβιτόλης (), βιομάζας (*) και κατανάλωσης γλυκερόλης (◆) από *Y. lipolytica* FMCC Y-74 κατά τη διάρκεια καλλιέργειας σε υπόστρωμα με βάση τη γλυκερόλη (G1o₀ ~120 g/L) σε pH 2±0,3. Συνθήκες καλλιέργειας: ζύμωση σε ανακινούμενες κωνικές φιάλες των 250 mL στις 180±5 rpm και θερμοκρασία επώασης T=30±1 °C. Κάθε πειραματικό σημείο που παρουσιάζεται είναι η μέση τιμή δύο ανεξάρτητων προσδιορισμών από διαφορετικά αρχικά εμβόλια

Εικόνα 3.19 Κινητικό προφίλ μαννιτόλης (□), ερυθριτόλης (▲), αραβιτόλης (), βιομάζας (*) και κατανάλωσης γλυκερόλης (◆) από *Y. lipolytica* NRRL Y-323 κατά τη διάρκεια καλλιέργειας σε υπόστρωμα με βάση τη γλυκερόλη (G1o₀ ~120 g/L) υπό pH 2±0,3. Συνθήκες καλλιέργειας: ζύμωση σε ανακινούμενες κωνικές φιάλες των 250 mL στις 180±5 rpm και θερμοκρασία επώασης T=30±1 °C. Κάθε πειραματικό σημείο που παρουσιάζεται είναι η μέση τιμή δύο ανεξάρτητων προσδιορισμών από διαφορετικά αρχικά εμβόλια

Εικόνα 3.20 Κινητικό προφίλ μαννιτόλης (□), ερυθριτόλης (▲), αραβιτόλης (), βιομάζας (*), κιτρικού οξέος (+) και κατανάλωσης γλυκερόλης (◆) από *Y. lipolytica* FMCC Y-74 κατά τη διάρκεια καλλιέργειας σε υπόστρωμα με βάση τη γλυκερόλη (Glol₀ ~120 g/L) σε pH 6±0,3. Συνθήκες καλλιέργειας: ζύμωση σε ανακινούμενες κωνικές φιάλες των 250 mL στις 180±5 rpm και θερμοκρασία επώασης T=30±1 °C. Κάθε πειραματικό σημείο που παρουσιάζεται είναι η μέση τιμή δύο ανεξάρτητων προσδιορισμών από διαφορετικά αρχικά εμβόλια

Εικόνα 3.21 Απεικόνιση του συντελεστή απόδοσης μικροβιακών λιπιδίων σε συνάρτηση με τον χρόνο, από *Y. lipolytica* ACA-YC 5030 κατά τη διάρκεια καλλιέργειας σε υποστρώματα με βάση τη γλυκερόλη (Glol₀ ~80 g/L (◆) και ~120 g/L (□) pH 6±0,3. Συνθήκες καλλιέργειας: Ανακινούμενες κωνικές φιάλες των 250 mL στις 180±5 rpm και θερμοκρασία επώασης T=30±1 °C σε υπόστρωμα ακατέργαστης βιομηχανικής γλυκερόλης. Κάθε πειραματικό σημείο που παρουσιάζεται είναι η μέση τιμή δύο ανεξάρτητων προσδιορισμών από διαφορετικά αρχικά εμβόλια

Εικόνα 3.22 Κινητικό προφίλ μαννιτόλης (▲), ερυθριτόλης (*), αραβιτόλης (), πολυολών (-), βιομάζας (×), κιτρικού οξέος (□) και κατανάλωσης γλυκερόλης (◆) από *Y. lipolytica* FMCC Y-74 κατά τη διάρκεια καλλιέργειας σε υπόστρωμα με βάση τη γλυκερόλη (Glol₀ ~40 g/L) υπό pH 6±0,3 στις 750±5 rpm και θερμοκρασία επώασης T=30±1 °C. Κάθε πειραματικό σημείο που παρουσιάζεται είναι η μέση τιμή δύο ανεξάρτητων προσδιορισμών από διαφορετικά αρχικά εμβόλια

Εικόνα 3.23 Κινητικό προφίλ μαννιτόλης (□), ερυθριτόλης (▲), αραβιτόλης (), πολυολών (*), βιομάζας (•) και κατανάλωσης γλυκερόλης (◆) από *Y. lipolytica* FMCC Y-74 κατά τη διάρκεια καλλιέργειας σε υπόστρωμα με βάση τη γλυκερόλη (Glol₀ ~40 g/L) υπό pH 6±0,3 στις 250±5 rpm και θερμοκρασία επώασης T=30±1 °C. Κάθε πειραματικό σημείο που παρουσιάζεται είναι η μέση τιμή δύο ανεξάρτητων προσδιορισμών από διαφορετικά αρχικά εμβόλια

Εικόνα 3.24 Κινητικό προφίλ μαννιτόλης (□), ερυθριτόλης (▲), αραβιτόλης (), πολυολών (*), βιομάζας (•) και κατανάλωσης γλυκερόλης (◆) από *Y. lipolytica* FMCC Y-74 κατά τη διάρκεια καλλιέργειας σε υπόστρωμα με βάση τη γλυκερόλη (Glol₀ ~40 g/L) σε pH 2±0,3 στις 750±5 rpm και θερμοκρασία επώασης T=30±1 °C. Κάθε πειραματικό σημείο που παρουσιάζεται είναι η μέση τιμή δύο ανεξάρτητων προσδιορισμών από διαφορετικά αρχικά εμβόλια

Εικόνα 3.25 Ποσοτικά δεδομένα των παραγόμενων πολυολών και του κιτρικού οξέος από το καλλιεργούμενο στέλεχος *Y. lipolytica* FMCC Y-74 σε υπόστρωμα με βάση τη γλυκερόλη (Glol₀ ~40 g/L) υπό μεταβλητές τιμές pH και ανάδευσης. Θερμοκρασία επώασης T=30±1 °C. Κάθε πειραματικό σημείο που παρουσιάζεται είναι η μέση τιμή δύο ανεξάρτητων προσδιορισμών από διαφορετικά αρχικά εμβόλια

Η ακάθαρτη γλυκερόλη είναι υποπροϊόν ποικίλων βιομηχανικών διεργασιών. Ο όγκος της παρουσιάζει αλματώδη αύξηση τα τελευταία χρόνια, συνεπώς η εξεύρεση λύσεων αναφορικά με την οικολογική και φιλική προς το περιβάλλον διαχείρισή της είναι μείζονος σημασίας. Παρουσιάζει δε το υλικό/υποπροϊόν τούτο εξαιρετικό ενδιαφέρον χρησιμοποιούμενο ως θρεπτικό υπόστρωμα για την παραγωγή προϊόντων προστιθέμενης αξίας, μέσω της μικροβιακής τεχνολογίας. Ο στόχος της παρούσας διδακτορικής διατριβής ήταν η βιοτεχνολογική αξιοποίηση αυτού του υποπροϊόντος, ως υπόστρωμα ζυμώνσεων του μικροοργανισμού *Yarrowia lipolytica*. Έτσι, άγρια (και σε πολλές περιπτώσεις μη προηγουμένως εκτενώς μελετηθέντα) στελέχη της πολυμορφικής μη-συμβατικής ζύμης *Y. lipolytica*, κυρίως απομονωμένα από Ελληνικής προέλευσης τρόφιμα (π.χ. Ελληνικό προζύμι, Ελληνικά ιχθυηρά), χρησιμοποιήθηκαν ως βιολογικό υλικό και μελετήθηκαν ως προς τη δυνατότητα αύξησής τους στην ακατέργαστη βιομηχανική γλυκερόλη. Όλες οι καλλιέργειες πραγματοποιήθηκαν σε συνθήκες περιοριστικές ως προς την πηγή αζώτου, προκειμένου να κατευθυνθεί ο μικροβιακός μεταβολισμός προς τη σύνθεση εξωκυτταρικών δευτερογενών προϊόντων (κυρίως κιτρικού οξέος και πολυολών) ή και ενδοκυτταρικών δευτερογενών μεταβολιτών (κυρίως μικροβιακών λιπιδίων και ενδοπολυσακχαριτών).

Ένας αρκετά μεγάλος αριθμός άγριων στελεχών της ζύμης *Y. lipolytica*, ήτοι τα στελέχη NRRL Y-323, NRRL Y-423, LGAM S7(1), Po1d (CLIB 139), FMCC Y-75, ACA-YC 5030, LMBF 20 και FMCC Y-74 χρησιμοποιήθηκαν ως βιολογικό υλικό των διεργασιών. Σε πρώτη φάση, χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος FMCC Y-74 προκειμένου να μελετηθεί κατά πόσο επηρεάζουν ή όχι οι προσμίξεις της βιομηχανικής γλυκερόλης την ικανότητα του μικροοργανισμού να αφομοιώσει το υπόστρωμα και να παράγει μεταβολικά προϊόντα. Στην συνέχεια, ακολούθησε επιλογή από το προηγούμενο πλήθος στελεχών της ζύμης *Y. lipolytica*, με γνώμονα τον υψηλό συντελεστή απόδοσης των πολυολών ως προς την αναλωθείσα γλυκερόλη. Διακρίθηκαν τα στελέχη NRRL Y-323, LMBF 20, ACA-YC 5030 και FMCC Y-74, ως τα πιο ελπιδοφόρα για την παραγωγή των μεταβολικών προϊόντων-στόχων. Μελετήθηκε επίσης, καθ' όλη την πειραματική πορεία, η επίδραση του pH στην παραγωγικότητα των στελεχών. Περαιτέρω, επιδιώχθηκε και μελετήθηκε η σύνθεση των μεταβολικών προϊόντων υπό συνθήκες καταπόνησης, ήτοι καλλιέργειών σε αρκετά χαμηλή θερμοκρασία επώασης (20 ± 1 °C), σε παστεριωμένο θρεπτικό υλικό, σε μη θερμικά επεξεργασμένο θρεπτικό υλικό, υπό παρουσία μεταβλητών και ενίοτε υψηλών αρχικών συγκεντρώσεων χλωριούχου νατρίου (έως ~80 g/L) και υπό συνθήκες αυξημένης αρχικής συγκέντρωσης γλυκερόλης (έως ~120 g/L). Σε όλες τις προηγούμενες καλλιέργειες η ανάπτυξη έλαβε χώρα σε αναδευόμενες φιάλες. Στην τελευταία φάση της πειραματικής διαδικασίας, τα στελέχη FMCC Y-74 και NRRL Y-323 που διακρίθηκαν από τις προαναφερθείσες συνθήκες και επέδειξαν ανθεκτικότητα συγχρόνως με υψηλή παραγωγή προϊόντων, καλλιεργήθηκαν σε εργαστηριακής κλίμακας βιοαντιδραστήρα (ενεργού όγκου 1,5 L), σε κλειστά και ημι-συνεχή τροφοδοτούμενα συστήματα

ζύμωσης, υπό διαφορετικές συνθήκες σταθερού pH και ανάδευσης, προκειμένου να μεγιστοποιηθεί κατά το δυνατόν η παραγωγή των επιδιωκόμενων μεταβολικών προϊόντων.

Πολλά από τα στελέχη που μελετήθηκαν κατά την καλλιέργειά τους στις αναδεδόμενες φιάλες, παρουσίασαν πολύ ενδιαφέροντα αποτελέσματα, ενώ η διαφοροποίηση των συνθηκών καλλιέργειας διαφοροποίησε αξιολογούμενα το προφίλ των παραγόμενων ενώσεων από τους μελετηθέντες μικροοργανισμούς. Έτσι, σε πολύ όξινες τιμές pH ($2\pm 0,3$) σημειώθηκε αξιολογούμενη μικροβιακή αύξηση και παραγωγή πολυολών, ενώ δεν παρατηρήθηκε παραγωγή κιτρικού οξέος. Όταν οι δοκιμές πραγματοποιήθηκαν σε ελαφρώς όξινη συνθήκη ($pH=6\pm 0,3$), παρατηρήθηκε και εδώ ότι το κιτρικό οξύ δεν ήταν το κύριο μεταβολικό προϊόν, ενώ οι πολυόλες ήταν οι κυρίαρχοι μεταβολίτες, συντιθέμενες όμως σε μικρότερες ποσότητες σε σύγκριση με το πολύ όξινο περιβάλλον. Περαιτέρω, οι συνθήκες παστερίωσης αναδείχθηκαν ικανοποιητικές για την παραγωγή βιομάζας, ως επίσης και η χαμηλή θερμοκρασία των 20 ± 1 °C, η οποία μέχρι πρότινος δε θεωρούνταν ικανοποιητική για την καλλιέργεια των στελεχών αυτού του είδους. Η προσθήκη χλωριούχου νατρίου στο μέσο της αύξησης είχε ως απόρροια τη στροφή του μεταβολισμού των ζυμών προς την παραγωγή κιτρικού οξέος. Τέλος, καλλιέργειες οι οποίες εγένοντο σε συστήματα φιαλών με υψηλή αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης (~120 g/L) και πολύ όξινο pH ($2\pm 0,3$), συνοδεύτηκαν από παραγωγή συνολικών πολυολών (μαννιτόλης, αραβιτόλης και ερυθριτόλης) ίση προς 79,7 g/L για το στέλεχος FMCC Y-74, για το στέλεχος NRRL Y-323 ίση με 74,8 g/L και 57 g/L συνολικών πολυολών για το στέλεχος ACA-YC 5030.

Τα πιο ενδιαφέροντα από τα στελέχη που μελετήθηκαν στα προηγούμενα εδάφια, μελετήθηκαν κατά την αύξησή τους σε εργαστηριακής κλίμακας βιοαντιδραστήρες. Το στέλεχος FMCC Y-74 καλλιεργήθηκε σε βιοαντιδραστήρες εργαστηριακής κλίμακας ενεργού όγκου 1,5 L σε ζυμώσεις ημισυνεχούς τροφοδοτούμενης λειτουργίας υπό διάφορες τιμές σταθερού pH και ποικίλες συνθήκες ανάδευσης (και συνεπώς αερισμού) με στόχο τη μεγιστοποίηση της συγκέντρωσης των επιδιωκόμενων μεταβολικών προϊόντων στο περιβάλλον του βιοαντιδραστήρα. Σημαντικές ποσότητες κιτρικού οξέος (~50 g/L, για πρώτη φορά τόσο υψηλές συγκεντρώσεις του προϊόντος αυτού στην παρούσα μελέτη) καταγράφηκαν μόνο όταν η τιμή του pH στο μέσο ήταν κοντά στις ελαφρώς όξινη συνθήκη ($pH=6\pm 0,3$) με ταυτόχρονη σημαντική ανάδευση (750 ± 5 rpm), η οποία εξασφάλιζε υψηλό βαθμό κορεσμού οξυγόνου στο περιβάλλον της αύξησης. Από την άλλη πλευρά, η πολύ υψηλή συγκέντρωση ολικών πολυολών 89,4 g/L και απουσία κιτρικού οξέος καταγράφηκε σε ελαφρά όξινη συνθήκη ($pH=6\pm 0,3$) και υπό χαμηλή ανάδευση (250 ± 5 rpm) με απόρροια χαμηλές τιμές συγκέντρωσης διαλυμένου οξυγόνου στο μέσο της αύξησης.

Για όλα τα στελέχη που μελετήθηκαν και παρά την εφαρμογή των συνθηκών καλλιέργειας που ευνοούν τη βιοχημική διεργασία της *de novo* συσσώρευσης αποθεματικών λιπιδίων (δηλαδή θρεπτικά μέσα τα οποία είναι περιοριστικά σε άζωτο και ευρισκόμενα υπό περίσσεια άνθρακα), όλα τα στελέχη απέτυχαν να παράξουν σημαντικές ποσότητες κυτταρικών λιπιδίων, μετατοπίζοντας ως εδείχθη, το μεταβολισμό τους προς τη σύνθεση εξωκυτταρικών προϊόντων (ήτοι πολυολών και σε μικρότερο βαθμό

κιτρικού οξέος). Ως εκ τούτου, στην πλειονότητα των περιπτώσεων, η συγκέντρωση των λιπιδίων επί ξηράς μικροβιακής μάζας παρέμεινε κάτω του ~20% w/w. Επίσης, καταγράφηκαν ποσότητες (έως 30% w/w επί ξηράς ουσίας) ενδοκυτταρικών πολυσακχαριτών, ενώ σε πολλές από τις περιπτώσεις παρατηρήθηκε ανακατανάλωση του παραγόμενου λίπους κατά το στάσιμο στάδιο του αυξητικού κύκλου, που συνέβη ταυτόχρονα με την έκκριση των εξωκυτταρικών προϊόντων.

Εν κατακλείδι, θα πρέπει να τονιστεί ότι παρά το γεγονός ότι το βιοχημικό μονοπάτι σύνθεσης των πολυολών στα κύτταρα των ζυμών του είδους *Y. lipolytica* ακόμη δεν έχει ακόμη διευκρινιστεί πλήρως, η παρούσα μελέτη απέδειξε ότι οι συνθήκες αύξησης για πολλά άγρια στελέχη ζυμών του ανωτέρω είδους (π.χ. το πολύ όξινο pH, ήτοι οι τιμές $2\pm 0,3$, η σχετικά χαμηλή ανάδευση και ο συνακόλουθος χαμηλός κορεσμός σε οξυγόνο, ο υψηλός περιορισμός σε άζωτο, η υψηλή αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης, κ.λπ.) ευνοούν την παραγωγή πολυολών. Εδείχθη ότι για αρκετά στελέχη, παρά το σχετικά ελαφρώς όξινο pH του μέσου ($6\pm 0,3$) που επεβλήθη, η παραγωγή πολυολών εξακολουθούσε να είναι αρκετά σημαντική και σε αντιδιαστολή με πολλά αποτελέσματα που εμφανίζονται στη διεθνή βιβλιογραφία, ο μεταβολισμός δεν εστράφη προς την παραγωγή κιτρικού οξέος. Συνδυαστικά με τη βιοσύνθεση ενδοπολυσακχαριτών και την αλληλεπίδραση τους σε σχέση με τη συσσώρευση μικροβιακών λιπιδίων η διεργασία αυτή παρουσιάζει εξαιρετικό ακαδημαϊκό ενδιαφέρον, καίτοι αμφότεροι οι ανωτέρω ενδοκυτταρικοί μεταβολίτες δεν ήταν τα κύρια προϊόντα των ζυμώσεων οι οποίες έλαβαν χώρα. Με βάση την παρούσα εργασία συνεπώς, καθίσταται προφανές ότι είναι εφικτή η δυνατότητα εξεύρεσης ποικίλων λύσεων αναφορικά με την οικολογική και φιλική προς το περιβάλλον διαχείριση της ακάθαρτης γλυκερόλης, μέσω της μικροβιακής τεχνολογίας. Τα ευρήματα της παρούσας διδακτορικής διατριβής θα μπορούσαν να αποτελέσουν έναυσμα για μελλοντικές μελέτες, με τελικό στόχο τη μείωση του κόστους μέσω της χρήσης πράσινων και οικολογικώς φιλικών διεργασιών σχετιζόμενων με την παραγωγή πολυολών σε βιομηχανική κλίμακα.

ABSTRACT

Biodiesel fuels, defined as (mostly) methyl-esters and to lesser extent ethyl- or butyl-esters of various types of fatty acids, resulting from trans-esterification of low-value natural oils and fats, already represent a very important alternative type of fuel for the various types of diesel engines and heating systems. Due to the potential exhaustion of conventional fuels and to the various environmental issues that are currently imposed (i.e., constantly increasing CO₂ emissions due to the utilization of non-renewable fuels, global warming phenomenon, etc.), the application of biofuels on a large commercial scale is strongly recommended by the various authorities and funding bodies. Given that biodiesel derives from triacylglycerol transesterification yielding in both the fatty acid alky-esters (*viz.* the biodiesel) and the side-production of glycerol, the significant expansion of biodiesel that has occurred the last years, has already resulted in the generation of very high quantities of (crude *viz.* unpurified) glycerol into the market volume, as glycerol is the main side-product of this very industrial activity. To give the magnitude of the problem, we should indicate that the synthesis of 10 portions of biodiesel generates *c.* 1 portion of glycerol (with purity ~90% w/w) as by-product of the process, while besides biodiesel production process, significant quantities of glycerol-containing waters that are composed of varying concentrations of glycerol, are also generated through bioethanol and alcoholic beverages production units and through various other oleochemical industrial activities. Therefore, glycerol valorization should have much to offer in the cost reduction of the overall industrial production cost, for the mentioned agro-industrial activities.

Within the frame of this important problem, *viz.* the discovery of eco-friendly and “green” ways of valorization of crude glycerol, is found the current thesis. In fact, it was decided to utilize various wild-type strains of the non-conventional yeast *Yarrowia lipolytica* and assess their potential related to the consumption of biodiesel-derived glycerol and produce a plethora of important metabolites of biotechnological interest. Therefore, the capability of newly isolated wild-type strains of the mentioned yeast, namely the strains NRRL Y-323, NRRL Y-423, LGAM S7(1), Po1d (CLIB 139), FMCC Y-75, ACA-YC 5030, LMBF 20 and FMCC Y-74, to consume biodiesel-derived glycerol and produce in noticeable quantities extra-cellular and intra-cellular metabolites under various culture conditions was assessed. All trials were performed under nitrogen-limited conditions in shake-flask mode and in batch and fed-batch bioreactor, and the potential for polyol production was significant for all strains at low pH values (pH=2±0,3).

In the initial phase, an examination was conducted to determine whether the addition of industrial glycerol, deriving from transesterification of “used/cooked” oils had a negative impact on one of the mentioned strains capacities to consume the substrate and synthesize metabolic products, as compared to the “pure” substrate, and indeed growth and metabolites production was not altered by the presence of the industrial feedstock. Thereafter, the strains NRRL-323, LMBF 20, ACA-YC 5030 and FMCC Y-74 were

found to be the most promising for the production of the intended metabolic products. The synthesis of the metabolic products was investigated in nitrogen-limited experiments imposed in order to “boost” the production of non-growth associated metabolites like sugar-alcohols, citric acid, microbial lipids and endopolysaccharides. Besides nitrogen limitation, growth was performed under stressful conditions, therefore trials were conducted under noticeably low temperatures (*viz.* 20 ± 1 °C), under previously pasteurized conditions, under non-previously thermally treated at all conditions, in the presence of variable concentrations of sodium chloride (up to 80 g/L) and under high initial glycerol concentrations (up to ~ 120 g/L) in shake-flask experiments. Many of the studied strains presented very interesting results while the differentiation of the culture conditions notably diversified the metabolic compounds synthesized. In low pH values ($2\pm 0,3$) noticeable growth and production of polyols occurred. When trials were performed at slightly acidic conditions ($\text{pH}=6\pm 0,3$), interestingly citric acid was not the principal product, while polyols were mainly synthesized but in lower quantities compared to growth at low pH values ($2\pm 0,3$). The addition of NaCl, shifted the metabolism towards the synthesis of citric acid and to the detriment of the production of polyols. Despite the low temperature, many strains presented appreciable growth and biosynthesis of metabolites. Finally, in trials with high initial glycerol concentration (~ 120 g/L) and low incubation pH ($2\pm 0,3$), flask experiments were accompanied by the production of 79,7 g/L of total polyols (mannitol, erythritol and arabitol) for the strain FMCC Y-74, 74,8 g/L for the strain NRRL Y-323 and 57 g/L for the strain ACA-YC 5030.

During the concluding phase of the experimental procedure, the strain FMCC Y-74 that distinguished itself from the aforementioned conditions and displayed resistance on glycerol and NaCl, was cultivated in laboratory-scale bioreactors with an active volume of 1,5 L in fed-batch configurations with variable pH and stirring conditions, with the aim of maximizing the concentration of the intended metabolic products. Significant quantities of citric acid (~ 50 g/L) were recorded only when the pH value into the medium was near the neutral one ($\text{pH}=6\pm 0,3$) and significant agitation, *viz.* 750 ± 5 rpm (thus, resulting in high oxygen saturation) was imposed into the medium. The very high concentration of total polyols ~ 90 g/L with no citric acid at all synthesized was recorded in the presence of slightly acidic conditions ($\text{pH}=6\pm 0,3$) and low agitation, *viz.* 250 ± 5 rpm (that resulted in low dissolved oxygen concentration values) imposed into the medium, at fed-batch bioreactor trials.

For all strains studied, despite the implementation of culture conditions favoring the *de novo* lipid accumulation process (*viz.* trials performed under nitrogen-limited and carbon-excess media), all strains failed to produce significant amounts of cellular lipids, shifting their metabolism towards the synthesis of extra-cellular compounds (sugar-alcohols and citric acid). Therefore, in the majority of cases, the concentration of cellular lipid in dry cell weight (DCW) values remained below the threshold of $\sim 20\%$ w/w. Likewise; moderate and varying quantities (up to 30% w/w) of polysaccharides in DCW values were recorded. In many of the studied strains, the values of lipids in DCW were somehow elevated at the first culture steps, decreasing afterwards, simultaneously with the secretion of extra-cellular metabolites.

On the other hand, the synthesis of polysaccharides was influenced by culture parameters, like the addition of salt or the imposition of low temperature.

Overall, newly isolated wild-type strains of the yeast *Y. lipolytica* proved to be suitable candidates for the production of sugar-alcohols at increased concentrations when biodiesel-derived glycerol was employed as microbial substrate. Citric acid also was secreted in non-negligible concentrations in bioreactor experiments in which high agitation and slightly acidic pH were imposed into the medium. In contrast, the production of microbial lipid from glycerol, that has the potential to completely recycle the waste generated during the biodiesel production process, was not a very dominant phenomenon, whereas varying quantities of endopolysaccharides were synthesized. It is of great academic interest to study the biosynthesis of endopolysaccharides and their interaction with the accumulation of microbial lipids, and more studies in the future should be performed on this issue.

The potential increase of biodiesel production in the near future leads to the necessity of discovering various integrated (bio)-processes for valorization of this residue (“bio-refinery approach”). The current study provided alternative ways of valorization of this residue, by using it as substrate by natural yeast species, in order to produce added-value metabolic compounds. As it was indicated in the present thesis, numerous solutions referring to the ecological and environmentally friendly valorization of biodiesel-derived glycerol were proposed, with microbial technology being able to contribute greatly to this important direction. Findings of the current thesis, therefore, can be the basis for future studies on this very important topic, with long-range impact.

I. ΓΕΝΙΚΗ ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το βιολογικό πετρέλαιο (βιοντίζελ) (κυρίως μεθυλεστέρες λιπαρών οξέων) έχει προσελκύσει αυξανόμενο ενδιαφέρον ως εναλλακτική πηγή ενέργειας έναντι των ορυκτών καυσίμων, καθώς είναι ανανεώσιμο και φιλικό προς το περιβάλλον. Τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του είναι όμοια με εκείνα του συμβατικού πετρελαίου. Μπορεί δε να χρησιμοποιηθεί σε πετρελαιοκινητήρες, είτε σε μείγμα με το πετρέλαιο κίνησης σε διάφορα ποσοστά, είτε αυτούσιο. Η χρήση βιοντίζελ στους πετρελαιοκινητήρες έχει σημαντικά περιβαλλοντικά οφέλη, όπως ελάττωση των συνεπειών του φαινομένου του θερμοκηπίου και μείωση των εκπομπών καυσαερίων. Επίσης, συμβάλλει ουσιαστικά στη βελτίωση της ενεργειακής ανεξαρτησίας και την ανάπτυξη της γεωργίας. Διάφορα ερευνητικά προγράμματα της Ευρωπαϊκής Επιτροπής (Ε.Ε.), αλλά και έρευνες ανεξάρτητων ιδρυμάτων παγκοσμίως, έχουν καταδείξει ότι η κατανάλωση 1 kg βιοντίζελ σε αντικατάσταση του συμβατικού πετρελαίου, έχει ως συνέπεια τη μείωση του διοξειδίου του άνθρακα, (CO₂), κατά τουλάχιστον 1 kg, ενώ στην περίπτωση εξελιγμένων βιοκαυσίμων, όπως το βιοντίζελ από απόβλητα (π.χ. τηγανέλαια, ζωικά λίπη, κ.λπ.), η μείωση ξεπερνάει τα 3 kg. Επιπλέον, το βιοντίζελ έχει σχεδόν μηδενική περιεκτικότητα σε θείο, ενώ είναι ταχέως βιοαποικοδομήσιμο. Η εκτεταμένη χρήση βιοντίζελ στην Ε.Ε. αποτελεί ένα από τα βασικά μέσα για την επίτευξη των στόχων μείωσης των αερίων του θερμοκηπίου που έχουν συμφωνηθεί με τη συνθήκη του Κιότο. Για το λόγο αυτόν, η Ε.Ε. έχει ορίσει δεσμευτικά ποσοστά χρήσης βιοκαυσίμων στα καύσιμα κίνησης στα κράτη-μέλη της.

Η ακάθαρτη-βιομηχανική γλυκερόλη αποτελεί μια σημαντική εκροή (υπόλειμμα) ποικίλων βιομηχανικών διεργασιών με κυριότερη αυτών της βιομηχανίας παραγωγής βιοντίζελ. Για περίπου 100 μέρη παραγόμενου βιοντίζελ, παράγονται 10 μέρη ακάθαρτης γλυκερόλης (καθαρότητας *c.* 85% κ.β.). Για το έτος 2021, η παγκόσμια παραγωγή βιοντίζελ από βρώσιμα φυτικά έλαια ήταν της τάξεως των 30×10⁶ t. (η αντίστοιχη παγκόσμια παραγωγή βιοντίζελ για το 2008 ήταν της τάξεως των 11,5×10⁶ t.), επομένως η αύξηση της παγκόσμιας παραγωγής βιοντίζελ είχε ως αποτέλεσμα την παραγωγή περίπου 3×10⁶ t. γλυκερόλης ως υποπροϊόντος της διεργασίας, λαμβάνοντας υπόψη μόνο τη χρησιμοποίηση εδώδιμων φυτικών ελαίων ως υλικού εκκίνησης της παραγωγής βιοντίζελ. Συνεπώς καθίσταται επιτακτική, η εξεύρεση (πολλών και ποικίλων) λύσεων αναφορικά με την οικολογική και φιλική προς το περιβάλλον διαχείριση της ακάθαρτης γλυκερόλης, με τη μικροβιακή και τη χημική τεχνολογία να μπορούν να συνεισφέρουν πολλά προς την κατεύθυνση αυτή.

Παρουσιάζει δε εξαιρετικό ενδιαφέρον το γεγονός ότι το ανωτέρω υλικό συνιστά εν δυνάμει θρεπτικό υπόστρωμα για την παραγωγή προϊόντων, ενδεχομένως πολύ υψηλής, προστιθέμενης αξίας, μέσω της μικροβιακής τεχνολογίας.

Πολλοί ερευνητές χρησιμοποιούν γλυκερόλη ως πηγή άνθρακα σε μικροβιακές ζυμώσεις. Τα παραγόμενα προϊόντα ποικίλουν ανάλογα με το είδος της ζύμωσης, αλλά και το μικροοργανισμό. Η ακάθαρτη γλυκερόλη προσφέρει σημαντικά πλεονεκτήματα σε σχέση με την καθαρή, λόγω του χαμηλότερου κόστους της. Στη διεθνή βιβλιογραφία έχουν εμφανιστεί τελευταία αρκετές αναφορές που τη χρησιμοποιούν ως υπόστρωμα μικροοργανισμών.

Η βιομετατροπή της γλυκερόλης προς προϊόντα προστιθέμενης αξίας μέσω στελεχών της ζύμης *Yarrowia lipolytica*, παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον, ειδικώς τα τελευταία χρόνια. Τα στελέχη αυτά θεωρούνται «ασφαλή» (Generally Recognized As Safe, «GRAS») και δύνανται να παραγάγουν μεταβολικά προϊόντα, όπως κιτρικό οξύ, πολυόλες, μικροβιακά λιπίδια, μικροβιακή πρωτεΐνη, πολυσακχαρίτες, κ.λπ. Το κιτρικό οξύ εμφανίζει σημαντικές εφαρμογές στη βιομηχανία τροφίμων ως βιοσυντηρητικό, μέσο όξυνσης, κ.λπ. Η παραγωγή του γίνεται σχεδόν αποκλειστικά μέσω της μικροβιακής τεχνολογίας, ενώ το οξύ αυτό είναι συστατικό της βιομηχανίας τροφίμων. Πολυόλες (αλκοόλες σημαντικές στην επιστήμη των τροφίμων και τη χημεία των πολυμερών) που παράγονται από τη ζύμη *Y. lipolytica* είναι η μαννιτόλη, η ερυθριτόλη και η αραβιτόλη. Η μαννιτόλη έχει πολλές εφαρμογές στη βιομηχανία τροφίμων και φαρμάκων και στην ιατρική. Η αραβιτόλη χρησιμοποιείται στη βιομηχανία τροφίμων ως γλυκαντικό, στην παραγωγή θεραπευτικών ουσιών και περιλαμβάνεται στη λίστα με τα δώδεκα δομικά συστατικά, που παρουσιάζουν μέγιστο οικονομικό ενδιαφέρον για τη Βιομηχανική Βιοτεχνολογία (Bozel and Petersen, 2010). Η ερυθριτόλη έχει εγκριθεί ως πρόσθετο τροφίμων σε ολόκληρο τον κόσμο. Η πρόσληψη της δεν επηρεάζει το σάκχαρο του αίματος, δεν προκαλεί τερηδόνα και απορροφάται εν μέρει από τον ανθρώπινο οργανισμό (Chung and Lee, 2013).

Οι πολυσακχαρίτες είναι υδατάνθρακες, μερικοί εκ των οποίων κατέχουν σημαντικές βιολογικές ιδιότητες (π.χ. αντικαρκινικές, άνοσο-ρυθμιστικές). Τα τελευταία χρόνια έχει δειχτεί ότι οι ελαιογόνες ζύμες πέρα από τα μικροβιακά λιπίδια, δύνανται να συνθέτουν σε αξιοσημείωτες ποσότητες και ενδοκυτταρικούς πολυσακχαρίτες. Ομοίως, ιδιαίτερο ενδιαφέρον έχει και η παραγωγή μικροβιακών λιπιδίων από ζύμες καλλιεργούμενες σε υποστρώματα γλυκερόλης, καθώς, από το κύριο «απόβλητο» της διεργασίας παραγωγής βιοντίζελ, ήτοι την ακάθαρτη γλυκερόλη, παράγεται εκ νέου βιοντίζελ σε ένα σύστημα μηδενικής εκροής αποβλήτων (Tchakouteu et al., 2015; Papanikolaou et al., 2017a; 2017b; Diamantopoulou et al., 2020; Filippousi et al., 2019; 2022).

Η βιοσύνθεση των μεταβολικών προϊόντων που πραγματοποιείται με τη χρήση της γλυκερόλης ως υπόστρωμα των διεργασιών από τη ζύμη *Y. lipolytica* αποτελεί δευτερογενή αναβολική δραστηριότητα, η οποία λαμβάνει χώρα συνήθως μετά από την εξάντληση του αζώτου στο μέσο της αύξησης. Στην πραγματικότητα, οι διεργασίες αυτές είναι ανταγωνιστικές μεταξύ τους και η καλλιέργεια σε χαμηλά pH θεωρείται, από πολλούς ερευνητές, ότι ευνοεί τη σύνθεση και έκκριση πολυολών έναντι αυτής του κιτρικού οξέος. Παρόλα αυτά, η βιοσύνθεση πολυολών στη ζύμη *Y. lipolytica* είναι μια διεργασία που δεν έχει ακόμα πλήρως διευκρινιστεί (Diamantopoulou and Papanikolaou, 2023).

Στην παρούσα εργασία θα πραγματοποιηθεί μια εκτενής φυσιολογική και κινητική μελέτη πολλών άγριων στελεχών του είδους *Y. lipolytica*, προκειμένου να αποσαφηνιστούν φαινόμενα σχετικά με την παραγωγή των ανωτέρω μεταβολικών προϊόντων (πολυόλες, κιτρικό οξύ, λιπίδια, πολυσακχαρίτες), όταν η γλυκερόλη χρησιμοποιείται ως υπόστρωμα. Βιοχημικές, τεχνολογικές και φυσιολογικές προσεγγίσεις σχετιζόμενες με τις βιοδιεργασίες μετατροπής της γλυκερόλης σε προϊόντα υψηλής προστιθέμενης αξίας, όπως τα ανωτέρω, θα αναπτυχθούν και θα συζητηθούν εκτενώς.

II. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Οι ανανεώσιμες πηγές άνθρακα καθώς και τα γεωργο-βιομηχανικά απόβλητα και υπολείμματα (βιομηχανικά λίπη, βιομηχανική γλυκερόλη, κ.λπ.) θεωρούνται πηγές άνθρακα βιοτεχνολογικών διεργασιών μεγάλης οικονομικής σημασίας και η αξιοποίησή τους μελετάται επισταμένως τα τελευταία χρόνια. Στόχος της παρούσας διδακτορικής διατριβής αποτελεί η ανάδειξη των δυνατοτήτων βιοτεχνολογικής αξιοποίησης της βιομηχανικής γλυκερόλης προς παραγωγή προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας. Η χρήση του υποστρώματος αυτού έχει οδηγήσει στην παραγωγή αξιοποιήσιμων προϊόντων με ποικίλους τρόπους τόσο σε βιοτεχνολογικές όσο και σε χημικές διεργασίες, όπως περιγράφεται εκτενώς στη βιβλιογραφία.

Ο σκοπός του διδακτορικού αυτού εστιάζεται στη μελέτη χρήσης της ακάθαρτης (απόβλητης) γλυκερόλης ως πηγής άνθρακα σε βιοτεχνολογικές εφαρμογές μέσω της χρήσης άγριων στελεχών της πολυμορφικής «ασφαλούς» («GRAS») ζύμης *Yarrowia lipolytica*. Στόχος ήταν η χρησιμοποίηση του υποστρώματος αυτού ως προτύπου για την παραγωγή μεταβολικών προϊόντων τα οποία δύνανται να έχουν μεγάλο ενδιαφέρον για τη βιομηχανία τροφίμων, τη χημική βιομηχανία, τη φαρμακοβιομηχανία και τη βιομηχανία βιοκαυσίμων. Τα προϊόντα τα οποία παρήχθησαν στην παρούσα διδακτορική διατριβή είναι τα εξής:

- i.** Εξωκυτταρικά οργανικά οξέα, κυρίως κιτρικό οξύ, με σημαντικές εφαρμογές στη βιομηχανία τροφίμων ως βιοσυντηρητικό, μέσο όξυνσης, κ.λπ.
- ii.** Εξωκυτταρικές πολυόλες, κυρίως αραβιτόλη, μαννιτόλη και ερυθριτόλη, με σημαντικές εφαρμογές στη βιομηχανία τροφίμων ως γλυκαντικές ύλες, στη φαρμακοβιομηχανία αλλά και στη χημική βιομηχανία χρησιμοποιούμενες ως υλικά εκκίνησης για παραγωγή πλείστων προϊόντων.
- iii.** Ενδοκυτταρικό μικροβιακό λίπος, το οποίο θα μπορούσε να αποτελέσει πρώτη ύλη παραγωγής μικροβιακής προέλευσης βιοντίζελ.
- iv.** Ενδοκυτταρικοί πολυσακχαρίτες, με εφαρμογές τόσο στη βιομηχανία τροφίμων, ως σταθεροποιητές ή πηκτικές ύλες, όσο και από τη βιομηχανία φαρμάκων.

Μετά από τη βιβλιογραφική σύνθεση η οποία θα παρουσιάσει ποικίλα θέματα απόμμενα με το βιοντίζελ, τη γλυκερόλη, τη ζύμη *Y. lipolytica*, τα προϊόντα αυτής, κ.λπ., θα παρουσιαστούν τα υλικά και οι μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν, τα κυριότερα αποτελέσματα που ελήφθησαν και η εργασία θα κλείσει με τη συζήτηση και τη σύγκριση των αποτελεσμάτων που ελήφθησαν με αυτά της βιβλιογραφίας και την εξαγωγή συμπερασμάτων.

1. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΣΥΝΘΕΣΗ

1.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΙΣ ΖΥΜΩΣΕΙΣ –ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΕΣ ΖΥΜΩΣΕΙΣ

Η χρήση της ζύμωσης για την επεξεργασία των τροφίμων αποτελεί την αρχαιότερη εφαρμογή της Βιοτεχνολογίας που αξιοποίησε ο άνθρωπος. Τα ευρήματα για τη χρήση των ζυμώσεων χρονολογούνται από την εποχή που εμφανίζονται τα πρώτα ανθρώπινα δείγματα πολιτισμού. Τα πρώτα προϊόντα ζυμώσεων προέρχονται από καλλιεργήσιμα φυτά και οικόσιτα ζώα. Το γεγονός ότι οι ζυμώσεις είναι άρρηκτα συνδεδεμένες με τη γεωργία και την κτηνοτροφία σχετίζεται με τα οφέλη που προκύπτουν από τα ζυμωμένα προϊόντα. Βασικό πλεονέκτημα είναι η μεγάλη περιεκτικότητα τους σε φυσικές ενώσεις, που χρησιμοποιούνται ως συντηρητικά, όπως οργανικά οξέα, καθώς και η μειωμένη περιεκτικότητα τους σε νερό. Αυτό έχει ως απόρροια, να περιορίζεται η ανάπτυξη μικροοργανισμών, να αυξάνεται ο χρόνος ζωής και η ασφάλεια των τροφίμων. Παρόλο που οι ζυμώσεις και τα προϊόντα τους αποτελούσαν κομμάτι της καθημερινότητας για χιλιάδες χρόνια, η γνώση γύρω από τα αίτια που τις προκαλούν παρέμεναν για πολλά χρόνια σχετικά έως και εντελώς άγνωστα (Chambers et al., 2010; Studies et al., 2014).

Στη σύγχρονη εποχή, η ανθρώπινη δραστηριότητα έχει αυξηθεί, γεγονός που διαταράσσει το φυσικό περιβάλλον, σε σημείο να προκαλεί μεγάλες αλλαγές. Οι έντονες αλλαγές στο φυσικό περιβάλλον τείνουν να αυξηθούν στο μέλλον λόγω της εντεινόμενης πληθυσμιακής αύξησης. Η αύξηση αυτή έχει ως συνέπεια την αύξηση σε ανάγκες, όπως ενέργεια, σίτιση και άλλους φυσικούς πόρους. Παράλληλα με την αύξηση του πληθυσμού, υπάρχει και μια αξιοσημείωτη μείωση των γόνιμων εδαφών, κατάλληλων για τη ανάπτυξη καλλιεργειών.

Η Βιοτεχνολογία (Biotechnology) είναι όρος ελληνικής προέλευσης (βίος+τεχνολογία). Περιλαμβάνει όλες τις διεργασίες που αφορούν την αξιοποίηση ιδιοτήτων ζωντανών οργανισμών και την ελεγχόμενη χρήση αυτών για την παραγωγή προϊόντων ή/και τη βελτίωση των ήδη υπαρχόντων, καθώς και την παροχή υπηρεσιών (ίαση ασθενειών, επεξεργασία αποβλήτων, κ.λπ.). Στην Βιοτεχνολογία συνεπώς, χρησιμοποιούνται βιολογικά υλικών και μέσω τεχνικών διεργασιών παράγονται προϊόντα που υπάρχουν στη φύση ή είναι νέα. Ο ορισμός αυτός δείχνει ότι η Βιοτεχνολογία είναι μία διεπιστημονική δραστηριότητα με εφαρμοσμένους στόχους. Οι βασικοί επιστημονικοί άξονές της είναι η Μικροβιολογία, η Βιοχημεία, η Μοριακή και Κυτταρική Βιολογία, η Γενετική και η Χημική Μηχανική. Περιλαμβάνει αντιδράσεις και διαδικασίες που πραγματοποιούνται από μικροβιακά, ζωικά ή φυτικά κύτταρα, από κυτταρικά οργανίδια ή από ενεργά βιομόρια, όπως λ.χ. τα ένζυμα. Ενδεικτικά, κάποιες βιοτεχνολογικές διεργασίες σχετίζονται με την παραγωγή προϊόντων, όπως ψωμί, κρασί, μύρα, ξύδι κ.λπ. Τα τελευταία 35 χρόνια, με την εξέλιξη και τις νέες δυνατότητες των μοριακών τεχνικών, έχει προωθηθεί η αξιοποίηση αυτής της γνώσης για διάφορες εφαρμογές (Mannaa et al., 2021).

1.2 ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΩΝ ΣΤΑΔΙΩΝ

Ο ορισμός για τις περισσότερες βιοτεχνολογικές διεργασίες θα μπορούσε να εκφραστεί με την Εικόνα 1.1:



Εικόνα 1.1 Περιγραφή της βιοτεχνολογικής διεργασίας.

Το υπόστρωμα, η αρχική δηλαδή πρώτη ύλη μπορεί να είναι βιολογικό υλικό, χημική ένωση ή μίγμα συστατικών, αποτελείται δε από πηγές C (άνθρακα), N (άζωτο), ανόργανα άλατα και άλλα στοιχεία. Οι βιολογικοί καταλύτες περιλαμβάνουν τα ένζυμα, τους μικροοργανισμούς, τους ιστούς, τα κύτταρα ή τμήματα κυττάρων και μετατρέπουν το υπόστρωμα σε προϊόν. Το τελικό προϊόν μπορεί να είναι κυτταρική μάζα (βιομάζα), μεταβολικό προϊόν (π.χ. πολυόλες, οξέα, κ.λπ.), ή μόριο που έχει υποστεί βιομετατροπή της χημικής του δομής. Οι τεχνικές διεργασίες περιλαμβάνουν:

- i. τη μεθοδολογία παραγωγής ή μετατροπής
- ii. τις διεργασίες ανάκτησής του στην τελική μορφή

Στην περίπτωση χρησιμοποίησης ενζύμων η διεργασία παραγωγής ή μετατροπής ονομάζεται ζύμωση και μπορεί να γίνει παρουσία αέρα (αερόβια) ή απουσία αυτού (αναερόβια). Το θρεπτικό μέσο εκκίνησης δύναται να είναι σε στερεή ή υγρή μορφή και η διεργασία να πραγματοποιείται υπό αυστηρά ελεγχόμενες συνθήκες σε κωνικές φιάλες ή βιοαντιδραστήρες. Ο σχεδιασμός και η λειτουργία των βιοαντιδραστήρων αποτελεί κρίσιμο στάδιο των βιοτεχνολογικών διαδικασιών.

1.3 ΒΙΟΚΑΥΣΙΜΑ

Τα βιοκαύσιμα είναι ανανεώσιμες πηγές ενέργειας και προέρχονται από βιολογικές διεργασίες. Οι διεργασίες αυτές, ολοκληρώνονται σε σχετικά σύντομο χρονικό διάστημα συγκριτικά με τα πιο συμβατικά ορυκτά καύσιμα που χρησιμοποιούνται. Τα ορυκτά καύσιμα προέρχονται από γεωλογικές διεργασίες που έλαβαν χώρα σε προϊστορικούς χρόνους και γι' αυτό πρακτικά θεωρούνται μη ανανεώσιμες πηγές. Θεωρητικά, τα βιοκαύσιμα μπορούν να παραχθούν από οποιασδήποτε μορφής βιομάζα, αλλά κυρίως οι πρώτες ύλες που χρησιμοποιούνται είναι γεωργικά απόβλητα και διάφορες καλλιέργειες. Η παραγωγή τους επίσης μπορεί να γίνει με τη χρήση βιομάζας μικροοργανισμών, όπως

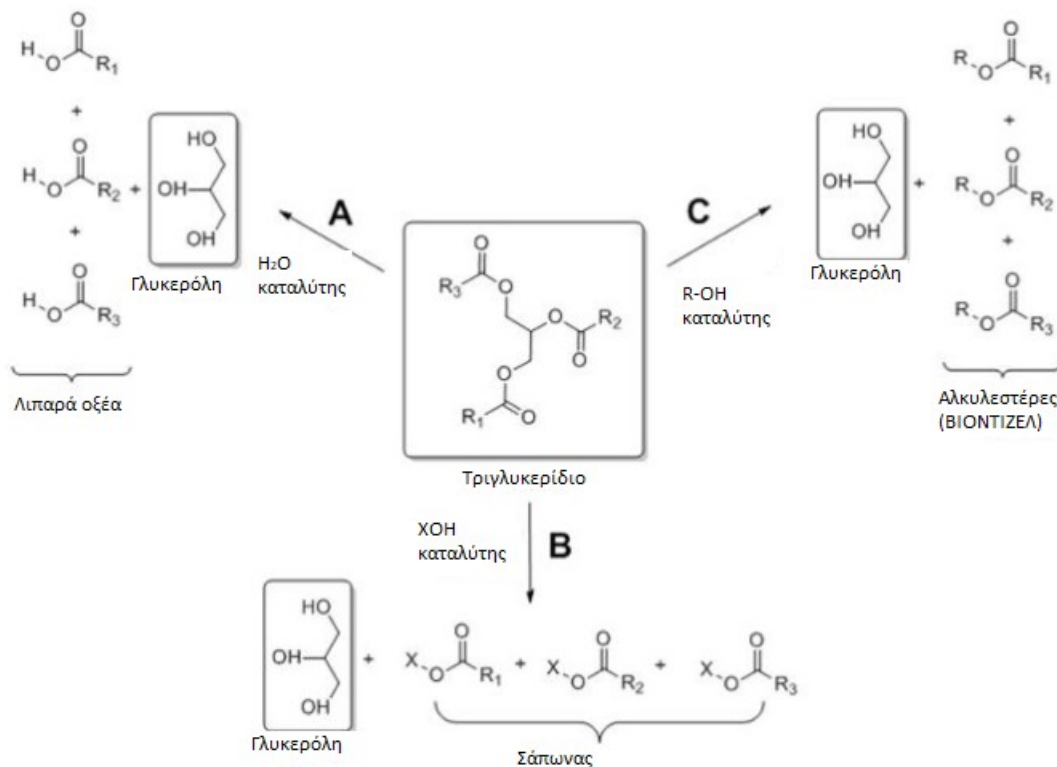
μύκητες, ζύμες, βακτήρια κ.λπ. (Zinoviev et al., 2010). Με τον όρο «βιοκαύσιμα» αναφερόμαστε σε πολλές κατηγορίες καυσίμων. Τέτοια είναι το βιολογικό πετρέλαιο (biodiesel-βιοντίτζελ), η βιοαιθανόλη και το βιοαέριο. Η ευρεία χρήση τους έχει προκύψει από την ανάγκη να βρεθεί κάποιο καύσιμο με στόχο την αντικατάσταση των ορυκτών καυσίμων και τον επιβαρυντικό αντίκτυπο που έχουν στο περιβάλλον. Τα βιοκαύσιμα ταξινομούνται ανάλογα με την πηγή της πρώτης ύλης, τη χρησιμοποιούμενη τεχνολογία, ή το μικροοργανισμό που συμμετέχει και διαχωρίζονται σε πρώτη, δεύτερη και τρίτη γενιά (Aro et al., 2016).

1.4 ΓΛΥΚΕΡΟΛΗ

Η γλυκερόλη $C_3H_8O_3$ ή αλλιώς προπανο-1,2,3-τριολη είναι μια τρισθενής αλκοόλη. Οι υδροξυλομάδες που έχει την καθιστούν διαλυτή στο νερό. Ακόμη, είναι διαλυτή και σε πολλούς διαλύτες, όπως αλκοόλες, μερικώς διαλυτή σε ακετόνη και κάποιους άλλους οργανικούς διαλύτες, όπως το χλωροφόρμιο. Είναι μια ουσία με μεγάλο ιξώδες το οποίο μειώνεται όταν διαλύεται σε νερό. Οργανοληπτικά είναι άοσμη, άχρωμη και με γλυκιά γεύση σιροπιού. Παράλληλα, δεν υφίσταται κρυστάλλωση ακόμη και σε πολύ χαμηλές θερμοκρασίες και γι' αυτό χρησιμοποιείται σαν αντιψυκτικός παράγοντας. Επιπλέον, η γλυκερόλη δεν οξειδώνεται εύκολα υπό κανονικές συνθήκες, οξειδώνεται όμως σε συνθήκες υψηλής θερμοκρασίας παρουσία οξειδίων του σιδήρου και του χαλκού (Quispe et al., 2013).

Όσον αφορά τη βιομηχανία και σύμφωνα με την Εικόνα 1.2 που παρατίθεται, η γλυκερόλη προέρχεται από τρεις κύριες επεξεργασίες:

- i. την υδρόλυση
- ii. τη σαπωνοποίηση
- iii. τη μετεστεροποίηση των λιπαρών οξέων (Monteiro et al., 2018).

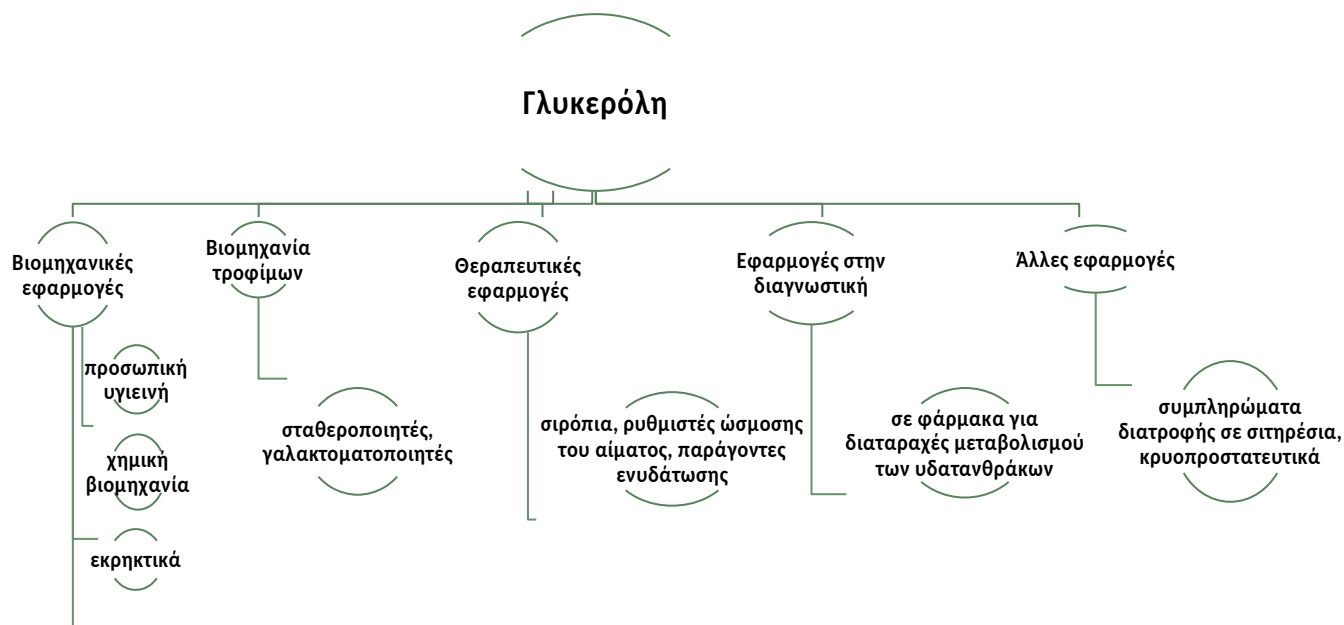


Εικόνα 1.2 Κύριες πηγές της γλυκερόλης ως απόβλητο που έχει προκύψει από: α) υδρόλυση, β) σαπωνοποίηση και γ) μετεστεροποίηση των λιπαρών οξέων. Προσαρμοσμένο από Monteiro et al., 2018.

Ο κύριος όγκος της γλυκερόλης προκύπτει από τη μετεστεροποίηση των τριγλυκερολών με σκοπό την παραγωγή βιολογικού πετρελαίου (βιοντίζελ). Στις τριγλυκερόλες, η γλυκερόλη είναι εστεροποιημένη με τρία μόρια λιπαρών οξέων. Κατά τη μετεστεροποίηση, τα μόρια αυτά των λιπαρών οξέων εστεροποιούνται με αλκοόλες χαμηλού μοριακού βάρους, όπως μεθανόλη και αιθανόλη, παρουσία κάποιου καταλύτη (Garlapati et al., 2016). Ο καταλύτης συνήθως είναι το υδροξείδιο του καλίου (KOH) ή του νατρίου (NaOH). Δεδομένης της αναλογίας προκύπτει ένα μόριο γλυκερόλης για κάθε τρία μόρια εστεροποιημένων λιπαρών οξέων. Συνολικά για κάθε 10 kg κιλά βιολογικού πετρελαίου προκύπτει 1 kg καθαρής (καθαρότητας ~90% w/w) γλυκερόλης (Chatzifragkou and Papanikolaou, 2012; Rywińska et al., 2013). Ο μεγάλος όγκος της γλυκερόλης, μειώνει την τιμή της και την καθιστά πλέον οικονομικά βιώσιμη για πολλές εφαρμογές, όπως προσθήκη στο σιτηρέσιο αγροτικών ζώων (Yang et al., 2012). Η χρήση της γλυκερόλης για σιτηρέσιο αγροτικών ζώων και η αποδέσμευση άλλων πρώτων υλών που συμμετέχουν στην τροφή για την ανθρώπινη κατανάλωση φαίνεται ιδανική, αλλά αντιμετωπίζει πολλά προβλήματα με κύριο τη σύσταση της γλυκερόλης και την παρουσία ποικίλων προσμείξεων και ακαθαρσιών στο υλικό αυτό (Yang et al., 2012).

Με βάση την καθαρότητα, από τη βιομηχανική επεξεργασία, προκύπτουν δύο κλάσματα γλυκερόλης: η καθαρή και η ακάθαρτη γλυκερόλη. Με τον όρο καθαρή γλυκερόλη, γλυκερόλη ή

γλυκερίνη αναφερόμαστε στα κλάσματα γλυκερόλης που είναι εξευγενισμένα σε σημείο, ώστε η χημική ένωση γλυκερόλης να αποτελεί τουλάχιστον το 95% w/w του διαλύματος (Monteiro et al., 2018). Τέτοια προϊόντα είναι κυρίως εμπορικά σκευάσματα και έχουν εφαρμογή σε διάφορες βιομηχανίες τροφίμων, φαρμάκων και υγιεινής του στόματος, ενδεικτικά παρουσιάζονται μερικές εφαρμογές στην Εικόνα 1.3.



Εικόνα 1.3 Εφαρμογές της καθαρής γλυκερόλης.

Σε αντίθεση, η ακάθαρτη γλυκερόλη είναι το αποτέλεσμα βιομηχανικής επεξεργασίας με χαρακτηριστικότερη αυτή της παραγωγής βιολογικού πετρελαίου. Σε τέτοια κλάσματα παραπροϊόντων ακάθαρτης γλυκερόλης, η γλυκερόλη αποτελεί μόνο το 70-80% w/w (Monteiro et al., 2018). Το υπόλοιπο εξαρτάται από τη βιομηχανία, την επεξεργασία και τους καταλύτες. Οι πιο συχνοί ρύποι στην ακάθαρτη γλυκερόλη είναι οι (αλκαλικοί) σάπωνες, η μεθανόλη, οι μεθυλεστέρες, αλλά και στοιχεία, όπως άζωτο, φώσφορο, ανόργανα άλατα και ιχνοστοιχεία (σίδηρος, ασβέστιο, μαγνήσιο και ψευδάργυρος). Ο καταλύτης που χρησιμοποιείται εμφανίζεται σε ποσοστό 6-8% (Rywińska et al., 2013). Οι κύριοι καταλύτες στην ακάθαρτη γλυκερόλη περιλαμβάνουν ευγενή μέταλλα, όπως λευκόχρυσος, ρουθίνιο, παλλάδιο, ρόδιο ή άλλα βαρέα μέταλλα, όπως νικέλιο, κοβάλτιο και χαλκός (Monteiro et al., 2018). Οι ρύποι στην ακάθαρτη γλυκερόλη δημιουργούν πολλά προβλήματα στην αξιοποίηση της, καθώς περιορίζουν το φάσμα εφαρμογής της χωρίς δαπανηρές τεχνικές εξευγενισμού. Τέτοια κλάσματα γλυκερόλης μπορούν να χρησιμοποιηθούν από μικροοργανισμούς που έχουν ανθεκτικότητα σε τέτοια περιβάλλοντα.

Η ζύμη *Yarrowia lipolytica* διαθέτει πολλούς μηχανισμούς αποτοξίνωσης από βαρέα μέταλλα. Στελέχη που απομονώνονται από υποβαθμισμένα περιβάλλοντα διαθέτουν χαρακτηριστικά που προστατεύουν τη ζύμη και συνεπώς είναι σε θέση να μπορούν να αξιοποιήσουν τέτοια επιβαρυνμένα

κλάσματα ακάθαρτης γλυκερόλης χωρίς να περιορίζεται η ανάπτυξη τους (Bankar et al., 2009; Papanikolaou and Aggelis, 2010).

1.5 *Yarrowia lipolytica*

1.5.1 ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΖΥΜΗΣ

Η *Y. lipolytica* είναι η πιο μελετημένη μη-συμβατική ζύμη. Μορφολογικά, περιγράφεται ως μονοκύτταρη ζύμη που μπορεί να εμφανίζει και μυκηλιακή μορφή, στην Εικόνα 1.4 φαίνονται αποικίες της ζύμης. Η μυκηλιακή μορφή δύναται να έχει διακλαδιζόμενες ψευδοϋφές αλλά και πραγματικές υφές με σέπτα (Jach and Malm, 2022).

Η ζύμη αναπτύσσεται σε ένα μεγάλο πλήθος περιβαλλοντικών συνθηκών με κύριο περιοριστικό παράγοντα το οξυγόνο. Είναι υποχρεωτικά αερόβια, καθώς δεν αναπτύσσεται σε συνθήκες έλλειψης οξυγόνου. Το εύρος θερμοκρασιών που εμφανίζει μέγιστη ανάπτυξη είναι μεταξύ (25-30±1 °C) και συνιστάται τούτο στα διάφορα εγχειρίδια ως βέλτιστο για τις συνθήκες καλλιέργειας του μικροοργανισμού αυτού (Abdel-Mawgoud et al., 2018). Δεν αναπτύσσεται πάνω από τους 34±1 °C (Holzschu et al., 1979), ενώ έχουν απομονωθεί και ψυχρόφιλα στελέχη με μέγιστη θερμοκρασία ανάπτυξης τους 15-20±1 °C (Bankar et al., 2009). Επιπλέον, χαρακτηρίζεται ως ωσμοφιλή ή αλλόφιλη ζύμη, επειδή αντέχει υψηλή ωσμωτική πίεση, όπως διαλύματα με μεγάλη ποσότητα σακχάρων και αλάτων (Park et al., 2016). Η ζύμη *Y. lipolytica* παράγει μεταβολίτες ανάλογα με την οξύτητα του περιβάλλοντος που αναπτύσσεται. Σε συνθήκες χαμηλού pH και υπό περιοριστικές σε άζωτο συνθήκες παράγονται μεγάλες ποσότητες πολυολών, ενώ σε ελαφρώς όξινο pH (5-6±0,3), οι συνθήκες είναι άριστες για την παραγωγή μεγάλης ποσότητας κιτρικού οξέος (Egermeier et al., 2017). Η μεταβολική αυτή «ελαστικότητα» της ζύμης *Y. lipolytica* οφείλεται σε ένα μεγάλο εύρος ενζύμων που αυτή περιέχει. Τέτοια ένζυμα περιλαμβάνουν πολλά είδη υδρολασών, όπως λιπάσες και πρωτεάσες αλλά και ένζυμα, όπως φωσφατάσες, εστεράσες κ.λπ., τα οποία εκκρίνονται στον εξωκυττάριο χώρο (Zinjarde et al., 2014). Ακόμη μπορεί να αξιοποιήσει μια πληθώρα υποστρωμάτων, όπως μονοσακχαρίτες π.χ. γλυκόζη (Yalcin et al., 2015) και φρουκτόζη (Lazar et al., 2014), γλυκερόλη (Papanikolaou and Aggelis, 2002; Papanikolaou et al., 2002a; Lazar et al., 2018), αμίδια σακχάρων, όπως N-ακέτυλο-γλυκοζαμίνη (Groenewald et al., 2014), οργανικά οξέα (Liu et al., 2016), αλλά και υδρόφοβα υποστρώματα, όπως λιπαρά οξέα (Papanikolaou et al., 2001; 2002b; 2008; Nicaud, 2012) και τριγλυκερίδια (Bati et al., 1984; Vasiliadou et al., 2018). Η ζύμη μπορεί και καθιστά διαθέσιμα τα υδρόφοβα υποστρώματα χάρις στην υδρόφοβη φύση της επιφάνειάς της. Αυτό επιτυγχάνεται είτε αλληλοεπιδρώντας με τα υδρόφοβα μόρια μέσω πρωτεϊνών και γλυκοπρωτεϊνών που εκθέτει στην μεμβράνη της, είτε απλά με εγκόλπωση (Amaral et al., 2009). Τέλος, αξίζει να σημειωθεί πως ενώ η ζύμη καταναλώνει γλυκόζη και φρουκτόζη, ο δισακχαρίτης των δύο αυτών εξοζών, η σακχαρόζη, δε μπορεί να αξιοποιηθεί από την ζύμη, καθώς δε

διαθέτει ιμβερτάση ή κάποιο αντίστοιχο ισοένζυμο για τη διάσπαση του δισακχαρίτη αυτού (Spagnuolo et al., 2018).



Εικόνα 1.4 Αποικίες της ζύμης *Y. lipolytica*, όπως φαίνονται σε τρυβλίο Petri με θρεπτικό υπόστρωμα γλυκόζης-πεπτόνης-yeast extract (μεγέθυνση x5, αριστερά). Αληθές μυκήλιο, ψευδομυκήλιο και κύτταρα ζύμης, όπως φαίνονται σε οπτικό μικροσκόπιο (μεγέθυνση x100, δεξιά).

1.5.2 ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΥ ΤΗΣ ΖΥΜΗΣ

Η ζύμη *Y. lipolytica* εμφανίζει πολυμορφισμό. Αυτό σημαίνει πως εκτός της μονοκύτταρης μορφής, εμφανίζει και μια μυκηλιακή μορφή με ψευδοϋφές και πραγματικές υφές με σέπτα (Nicaud, 2012). Οι συνθήκες κάτω από τις οποίες γίνεται αυτή η μορφολογική διαφοροποίηση επηρεάζονται από πολλές παραμέτρους του περιβάλλοντος και σε αρκετές περιπτώσεις είναι συνεργικές. Ακόμη, ο πολυμορφισμός επηρεάζεται από το στέλεχος της ζύμης. Η θερμική καταπόνηση ($37-38\pm 1$ °C) μπορεί να προκαλέσει εμφάνιση μυκηλιακής μορφής. Η έλλειψη επαρκούς συγκέντρωσης οξυγόνου εντείνει επίσης, την εμφάνιση αληθινού μυκηλίου (Bellou et al., 2014). Αυτό γίνεται γιατί με τη μυκηλιακή μορφή, η ζύμη συλλέγει πιο εύκολα οξυγόνο και μπορεί να επιβιώσει σε μη ευνοϊκές συνθήκες αερισμού (Zinjarde et al., 2014). Ένας ακόμα παράγοντας που επηρεάζει τη μορφή που θα εμφανίσει η ζύμη είναι και η πηγή άνθρακα. Κάποιες πηγές άνθρακα, όπως η γλυκερόλη, ευνοούν τη μονοκύτταρη μορφή (Zinjarde et al., 2014). Επιπροσθέτως, σε κάποια στελέχη δύναται να επηρεάσει τη μορφολογία και η συγκέντρωση του υποστρώματος. Σε καλλιέργεια με υπόστρωμα τη γλυκόζη (Papanikolaou et al., 2009), η υψηλή συγκέντρωση ευνόησε τη μυκηλιακή, ενώ η χαμηλή τη μονοκύτταρη μορφή. Ακόμη, δύναται να προκληθεί η δημιουργία ψευδοϋφών εάν επιλεγθεί ως πηγή άνθρακα η N-ακέτυλο-γλυκοζαμίνη (Herrero et al., 1999). Ο πολυμορφισμός είναι μια πολύ σημαντική ιδιότητα της ζύμης για τη χρήση της σε βιομηχανικές εφαρμογές. Η μονοκύτταρη και μυκηλιακή μορφή έχουν διαφορετικά πρότυπα ανάπτυξης κάτι που μπορεί να επηρεάσει την αύξηση της βιομάζας, την κατανάλωση υποστρώματος και την παραγωγή προϊόντων. Η μονοκύτταρη μορφή αξιοποιείται καλύτερα σε υγρές καλλιέργειες, ενώ η

μυκηλιακή σε στερεές. Το εύρος των μορφών της ζύμης επηρεάζεται διαφορετικά από ρεολογικές αλλαγές, θερμότητα και φαινόμενα μεταφοράς μάζας. Συνεπώς, θα πρέπει να είναι γνωστές οι συνθήκες που επηρεάζουν το διμορφισμό της για να αξιοποιηθεί στο μέγιστο το βιοτεχνολογικό δυναμικό της ζύμης (Timoumi et al., 2018).

1.5.3 ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΖΥΜΗΣ *Yarrowia lipolytica* ΜΕ ΤΟ ΦΥΣΙΚΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ ΚΑΙ ΤΟΝ ΑΝΘΡΩΠΟ

Η ζύμη *Y. lipolytica* είναι ένας γενικά θεωρούμενος ως «ασφαλής» μικροοργανισμός «GRAS». Έχει εγκριθεί από τη διοίκηση τροφίμων και φαρμάκων του υπουργείου υγείας και ανθρωπίνων υπηρεσιών των Ηνωμένων Πολιτειών Αμερικής (U.S. Food and Drug Administration). Στην Ευρωπαϊκή Ένωση, η ζύμη έχει εγκριθεί για την παραγωγή βιοπροϊόντων. Η χρήση της ζύμης για την παραγωγή βιοπροϊόντων, θέτει σαν προϋπόθεση την απουσία ζωντανών κυττάρων στα προϊόντα αυτά (Allende et al., 2018; Turck et al., 2019). Πρόσφατες αναλύσεις πάνω στη βιομάζα της ζύμης έδειξαν πως δεν περιέχει κάποιο αλλεργιογόνο ή κάποιο τοξικό παράγοντα. Συνεπώς, απεδείχθη ασφαλής για το γενικό πληθυσμό (Turck et al., 2019). Απόρροια αυτών είναι πως δε θεωρείται παθογόνος μικροοργανισμός. Σε μελέτες πάνω σε υγιή ποντίκια δεν υπήρχε καμία παρατήρηση προσβολής και ανάπτυξης σε βάρος του υγιούς ιστού τους. Η ζύμη δεν απομονώθηκε από τους ιστούς των ζώων στα οποία είχε γίνει η επιμόλυνση, καθώς δεν επιβίωσε (Holzschu et al., 1979). Κύριος λόγος που η ζύμη δε μπορεί να αναπτυχθεί εντός του ανθρώπινου οργανισμού είναι η αδυναμία της να επιβιώσει σε θερμοκρασία άνω των 34 ± 1 °C. Η φυσιολογική θερμοκρασία του ανθρώπινου σώματος είναι $36.5-37\pm 1$ °C. Εξαίρεση σε ό,τι αναφέρθηκε αποτελούν κάποιες δευτερογενείς, ευκαιριακές προσβολές σε ασθενείς με ανοσοανεπάρκεια ή σε ασθενείς που ακολουθούσαν φαρμακευτική αγωγή με ενδοφλέβια αντιβίωση (Groenewald et al., 2014). Γι' αυτό το λόγο, η Ευρωπαϊκή Ομοσπονδία Βιοτεχνολογίας, στην κατάταξη μικροοργανισμών σε κλάσεις επικινδυνότητας κατατάσσει τη ζύμη στην κλάση 1: Ασφαλής μικροοργανισμός, μικροοργανισμός που ποτέ δεν έχει αναγνωριστεί ως φορέας ασθενειών του ανθρώπου και δεν αποτελεί κίνδυνο για το περιβάλλον (Lelieveld et al., 1996; Groenewald et al., 2014).

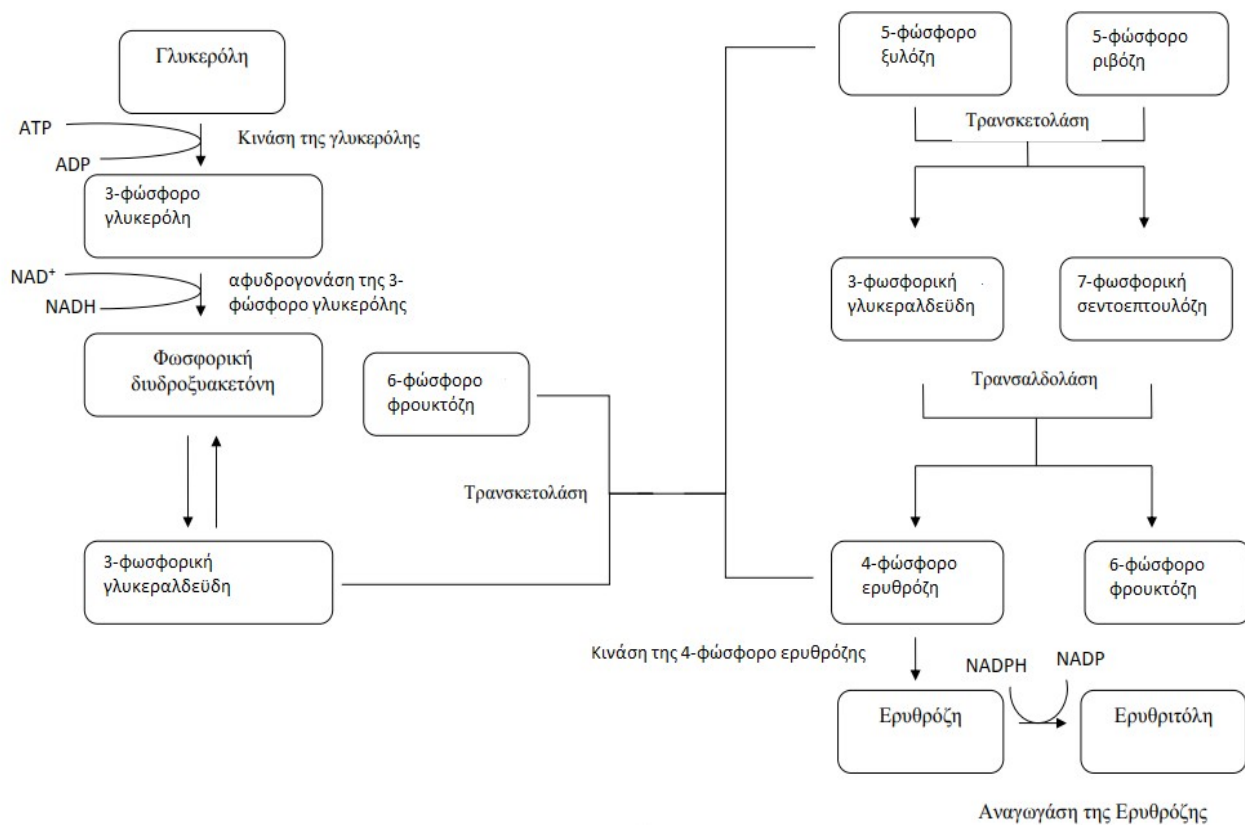
1.6 ΠΟΛΥΟΛΕΣ

Οι πολυόλες είναι οργανικές ενώσεις που περιέχουν πολλαπλά υδροξύλια. Είναι προϊόντα που παράγονται με υδρογόνωση της ελεύθερης αλδεϋδο-ομάδας ή κετονομάδας των αναγωγικών σακχάρων από τα οποία προέρχονται, παράγοντας την αντίστοιχη πολυόλη. Ένα μόριο με περισσότερες από δύο ομάδες υδροξυλίου είναι μια πολυόλη, με τρία μια τριόλη, και με τέσσερα μια τετρόλη. Οι πολυόλες φέρουν το γενικό τύπο $(\text{CHOH})_n\text{H}_2$, με $n=4-6$. Απαντώνται στη φύση και παράγονται από μικροοργανισμούς, όπως ζύμες, μύκητες, (Rakicka et al., 2017; Diamantopoulou and Papanikolaou et al.,

2023) βακτήρια και άλγη (Ortiz et al., 2013). Πολλές ζύμες παράγουν πολυόλες όταν βρεθούν σε περιβάλλον με υψηλή ωσμωτική πίεση (Rywińska et al., 2013). Οι πιο αντιπροσωπευτικές πολυόλες είναι η ξυλιτόλη, η σορβιτόλη, η ερυθριτόλη, η μαννιτόλη και η αραβιτόλη. Οι ιδιότητες των πολυολών διαφέρουν μεταξύ τους, για παράδειγμα λόγω μοριακού βάρους στην περίπτωση της ερυθριτόλης (Regnat et al., 2018). Όμως, μοιράζονται κάποιες κοινές ιδιότητες: Είναι γλυκαντικές ουσίες με μικρότερη θερμιδική αξία από αυτή της σακχαρόζης, ενώ συνήθως συνδυάζονται με ισχυρότερα γλυκαντικά για ενίσχυση της γλυκύτητάς τους. Κατά κύριο λόγο παρέχουν ωσμοπροστατευτική δράση στους μικροοργανισμούς που τις παράγουν και έχουν πολλές εφαρμογές σε διάφορους κλάδους της βιομηχανίας, όπως η βιομηχανία τροφίμων και η φαρμακευτική βιομηχανία (Diamantopoulou and Papanikolaou, 2023). Τον τελευταίο καιρό η ζήτηση για τα εναλλακτικά σάκχαρα έχει αυξηθεί λόγω των ωφέλιμων ιδιοτήτων τους. Οι κυριότερες πολυόλες που παράγονται από τα στελέχη της ζύμης *Y. lipolytica* κατά την ανάπτυξη τους σε υποστρώματα γλυκερόλης είναι η ερυθριτόλη, η μαννιτόλη και η αραβιτόλη.

1.6.1 ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΕΡΥΘΡΙΤΟΛΗΣ

Η ερυθριτόλη αποτελείται από τέσσερα άτομα άνθρακα το καθένα από τα οποία φέρει μια υδροξυλομάδα. Έχει μοριακό τύπο $C_4H_{10}O_4$ και είναι συμμετρική, που συνεπάγεται πως εμφανίζεται σε μόνο μια μορφή (Regnat et al., 2018). Στη ζύμη *Y. lipolytica* υπάρχουν ενδείξεις πως η βιοσύνθεση της ερυθριτόλης συνδέεται με το μονοπάτι των φωσφορικών πεντοζών. Τα ένζυμα που διαδραματίζουν ρόλο στη βιοσύνθεση της ερυθριτόλης περιλαμβάνουν την τρανσκετολάση, την τρανσαλδολάση, την κινάση της 4-φώσφορο-ερυθρόζης και την αφυδρογονάση της ερυθρόζης. Η τρανσκετολάση και η τρανσαλδολάση παίζουν το σημαντικό ρόλο βιοσύνθεσης του πρόδρομου μορίου της ερυθριτόλης, της 4-φώσφορο-ερυθρόζης. Η σύνθεση της 4-φώσφορο-ερυθρόζης γίνεται μέσω των μη οξειδωτικών αντιδράσεων του μονοπατιού των φωσφορικών πεντοζών. Έπειτα, η 4-φώσφορο-ερυθρόζη αποφωσφορυλιώνεται σε ερυθρόζη με ταυτόχρονη σύνθεση ATP από ADP με την κινάση της 4-φώσφορο-ερυθρόζης. Η αναγωγή της ερυθρόζης γίνεται εν τέλει από την αφυδρογονάση της ερυθρόζης. Αυτό το ένζυμο είναι εξαρτώμενο από το NADPH, το οποίο αξιοποιείται για την αναγωγή της ερυθρόζης σε ερυθριτόλη. Η ζύμη αυτή διαθέτει δυο αντίγραφα γονιδίων αφυδρογονάσης της ερυθρόζης (Mironczuk et al., 2017). Το Εικόνα 1.5 που παρατίθεται, δείχνει το ενδεχόμενο/πιθανό μεταβολικό μονοπάτι της ερυθριτόλης.



Εικόνα 1.5 Βιοτεχνολογικό μονοπάτι βιοσύνθεσης της ερυθριτόλης από υπόστρωμα γλυκερόλης. Προσαρμοσμένο από Mirończuk et al., 2017.

1.6.2 ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΜΑΝΝΙΤΟΛΗΣ

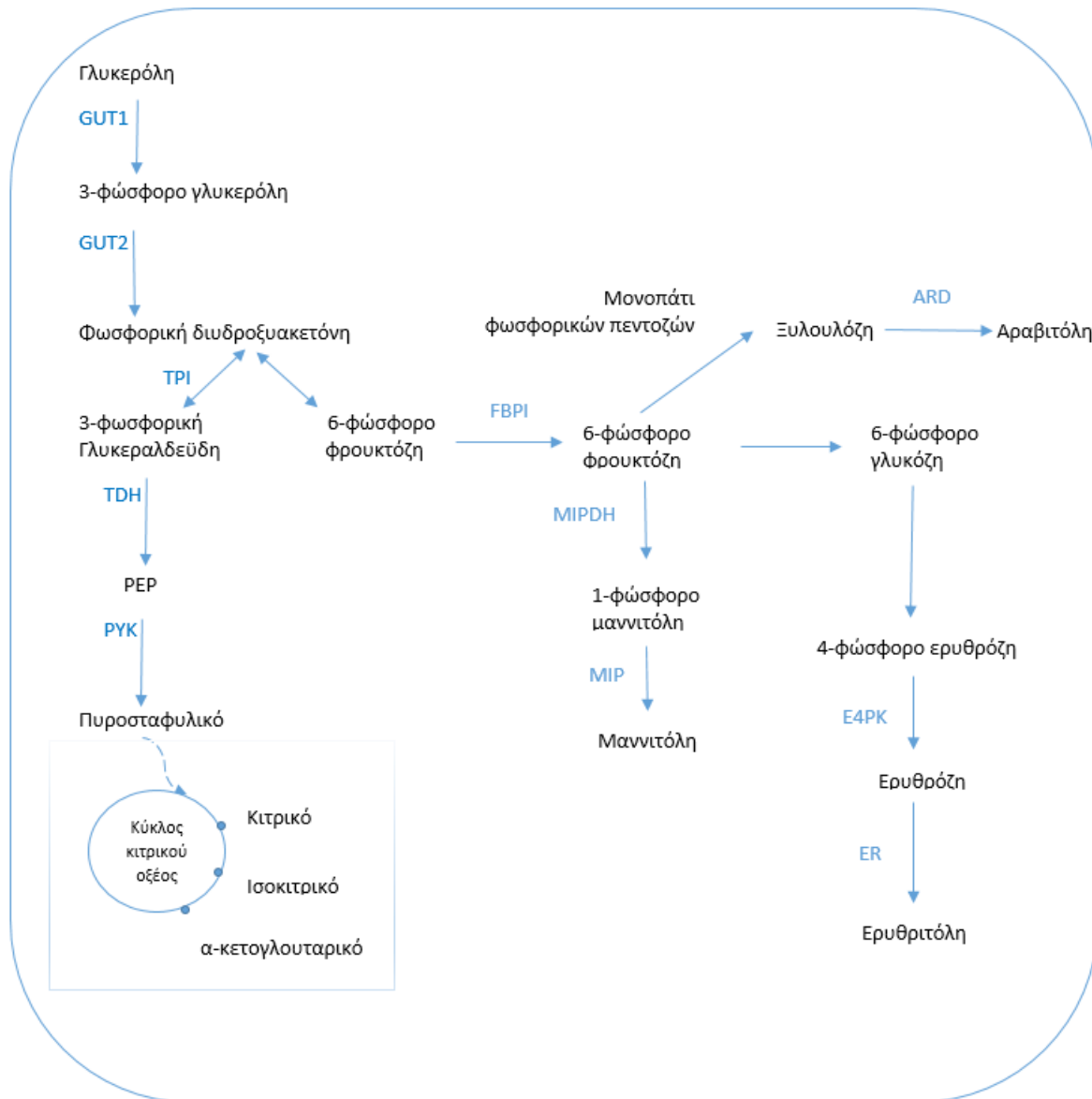
Η μαννιτόλη είναι μια πολυόλη μεγαλύτερου μοριακού βάρους από αυτού της ερυθριτόλης. Ο μεταβολισμός της μαννιτόλης στη ζύμη *Y. lipolytica* διαφέρει ακόμη και από αυτό των άλλων ασκομυκήτων από τους οποίους παράγεται. Στους περισσότερους ασκομύκητες η μαννιτόλη παράγεται μέσα από τον κύκλο της μαννιτόλης (Diamantopoulou and Papanikolaou, 2023). Αυτός ο κύκλος περιλαμβάνει τέσσερις αντιδράσεις, δύο από τις οποίες είναι πρακτικά μη αναστρέψιμες. Αρχικά, γίνεται η αναγωγή της 6-φώσφορο-φρουκτόζης σε 1-φώσφορο-μαννιτόλη από την αφυδρογονάση της 1-φώσφορο-μαννιτόλης. Αυτό το ένζυμο χρησιμοποιεί σαν αναγωγικό παράγοντα το συνένζυμο το NADH. Έπειτα, ακολουθεί η αποφωσφορυλίωση της 1-φώσφορο-μαννιτόλης σε μαννιτόλη από τη φωσφατάση της 1-φώσφορο-μαννιτόλης. Η μαννιτόλη στη συνέχεια μπορεί να οξειδωθεί σε φρουκτόζη από τη 2 αφυδρογονάση της μαννιτόλης σε φρουκτόζη. Η οξείδωση της μαννιτόλης παράγει σαν αποτέλεσμα ένα μόριο NADPH από την αναγωγή ενός μορίου NADP⁺. Η φρουκτόζη τελικά, φωσφορυλιώνεται από την εξωκινάση με τη χρήση ενός μορίου ATP. Η αποφωσφορυλίωση της 1-φώσφορο-μαννιτόλης και η φωσφορυλίωση της φρουκτόζης είναι πρακτικά μη αναστρέψιμες αντιδράσεις. Στη ζύμη *Y. lipolytica* ο μεταβολισμός της μαννιτόλης διαφέρει από τους άλλους ασκομύκητες. Δεν έχει αναγνωριστεί κάποια

φωσφατάση της 1-φώσφορο-μαννιτόλης στο γονιδίωμα της. Άλλα γονίδια ισοένζυμων που καταλύουν τις άλλες αντιδράσεις των μονοπατιών του κύκλου της μαννιτόλης που έχουν αναγνωρισθεί, αλλά, εμφανίζουν μικρές έως μεγάλες αποκλίσεις στην ομολογία με τα γονίδια άλλων ασκομυκήτων (Dulermo et al., 2015). Τέλος, η μαννιτόλη ενδεχομένως να συνδέεται με τη σύνθεση των λιπαρών οξέων. Στα δυο αυτά μονοπάτια, της σύνθεσης της μαννιτόλης και των λιπαρών οξέων υπάρχουν ενδείξεις πως ο ανταγωνισμός γίνεται όχι για το συνένζυμο NADPH, που είναι σημαντικό και για τα δύο, αλλά για την πηγή του άνθρακα. Αυτό γίνεται για να μη γίνει υπερσυσσώρευση του συνένζυμου NADPH (Dulermo et al., 2015).

1.6.3 ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΑΡΑΒΙΤΟΛΗΣ

Η αραβιτόλη ή αραβινιτόλη, είναι μια πολυόλη με μοριακό τύπο $C_5H_{12}O_5$ εμφανίζεται με δύο τύπους τη D- και την L- μορφή. Ανήκει στις πολυόλες με πέντε άτομα άνθρακα μαζί με την ξυλιτόλη και τη ριβιτόλη (Koganti et al., 2011). Ο μεταβολισμός της αραβιτόλης στις ζύμες συνδέεται με αυτόν της ξυλιτόλης. Στις ζύμες η L-αραβινόζη εισέρχεται αρχικά στο κυτταρόπλασμα μέσω της περμεάσης της γαλακτόζης, μιας πρωτεΐνης που μεταφέρει μονοσακχαρίτες. Έπειτα ανάγεται σε L-αραβιτόλη από την αναγωγή της L-αραβινόζης. Η L-αραβιτόλη μετατρέπεται σε L-ξυλόζη από την 4-αφυδρογονάση της L-αραβιτόλης και τελικά η αναγωγή της L-ξυλόζης ανάγει την ξυλόζη σε ξυλιτόλη (Spagnuolo et al., 2018). Στη ζύμη *Y. lipolytica* ο μεταβολισμός της αραβιτόλης παραμένει σε μεγάλο βαθμό άγνωστος. Οι ενδείξεις που υπάρχουν είναι πως διαθέτει ένα σύστημα που ομοιάζει με αυτό που περιγράφηκε (Spagnuolo et al., 2018). Έχει ταυτοποιηθεί μια αναγωγή της αραβινόζης που είναι εξαρτώμενη από το NADPH. Ακόμη, διαθέτει πρωτεΐνες-μεταφορείς πεντοζών κάποιοι από τους οποίους είναι εξειδικευμένοι μόνο για την ξυλόζη (Ryu et al., 2018).

Συνοψίζοντας, τα μεταβολικά μονοπάτια βιοσύνθεσης των προαναφερθέντων πολυολών (ερυθριτόλης, μαννιτόλης και αραβιτόλης) δεν έχουν αποσαφηνιστεί πλήρως. Ένα ενδεικτικό μονοπάτι του καταβολισμού τους σε υπόστρωμα γλυκερόλης, παρατίθεται στο Εικόνα 1.6.



Εικόνα 1.6 Μεταβολικό μονοπάτι βιοσύνθεσης πολυολών από υπόστρωμα γλυκερόλη. Προσαρμοσμένο από Yang et al., 2014.

1.7 ΠΡΟΪΟΝΤΑ ΚΑΙ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΠΟΛΥΟΛΩΝ

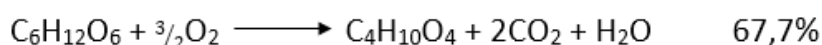
1.7.1 ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΚΑΙ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΕΡΥΘΡΙΤΟΛΗΣ

Η ερυθριτόλη διαθέτει χαρακτηριστικά κατάλληλα για να χρησιμοποιηθεί ως γλυκαντικό. Περιγράφεται ως άοσμη, λευκή κρυσταλλική ουσία, πλήρως διαλυόμενη στο νερό, μερικώς στην αιθανόλη και καθόλου σε αιθέρα. Η γλυκύτητα της είναι 60-70% συγκριτικά με τη σακχαρόζη, ενώ έχει σχεδόν μηδενική θερμιδική αξία (0,2 kcal/g). Αναφορικά, η σακχαρόζη έχει θερμιδική αξία 4 kcal/g και οι περισσότερες πολυόλες 2,4 kcal/g (Zinjarde et al., 2014). Το 60-90% της ερυθριτόλης αποβάλλεται άμεσα μέσω των ούρων, ενώ το υπόλοιπο ζυμώνεται από τη μικροχλωρίδα του εντέρου (Ortiz et al., 2013). Για την ασφάλεια της ερυθριτόλης έχουν γίνει μελέτες τόσο σε επίπεδο οξείας τοξικότητας όσο και σε επίπεδα χρόνιας τοξικότητας σε πειραματόζωα. Τα αποτελέσματα δεν υποδεικνύουν κάποια επιπλοκή στον οργανισμό πέρα από κάποια αύξηση των ούρων και αυξημένη δίψα στα τρωκτικά.

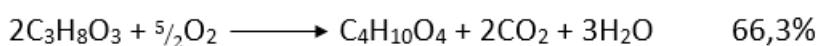
Επιπλέον, μελέτες δείχνουν πως δε συνδέεται με την εμφάνιση καρκίνου (Bernt et al., 1996). Συνεπώς, έχει εγκριθεί για χρήση σε πάνω από 60 χώρες στον κόσμο, ενώ ενδεικτικά χρησιμοποιείται σε διάφορες χώρες, όπως τις ΗΠΑ, την Ιαπωνία, την Τουρκία, τη Ρωσία, την Κίνα, την Ινδία, τη Νέα Ζηλανδία και την Αυστραλία. Στην Ευρωπαϊκή Ένωση έχει λάβει αριθμό ασφάλειας E968, με διεθνές αριθμό INS968, καθώς κρίνεται ασφαλής ουσία. Τα τρόφιμα στα οποία εμφανίζεται έχουν μεγάλο εύρος και είναι τόσο ζυμωμένα όσο και ωμά. Προϊόντα ζυμώσεων, όπως το κρασί, η μύρα, το σάκε και η σάλτσα σόγιας περιέχουν ερυθριτόλη, ενώ πολλά τρόφιμα, όπως το καρπούζι, το αχλάδι τα σταφύλια και τα μανιτάρια περιέχουν σα φυσικό συστατικό την ερυθριτόλη. Τέλος, εμφανίζεται και στον ανθρώπινο οργανισμό στο πλάσμα του αίματος και στα ούρα (Bernt et al., 1996). Εκτός από τη φυσική παρουσία σε τρόφιμα, λαχανικά και φρούτα, η ερυθριτόλη προστίθεται σε πολλά προϊόντα στη βιομηχανία. Γλυκίσματα, όπως η σοκολάτα, οι καραμέλες και τα προϊόντα αρτοποιίας μπορούν να εμπλουτιστούν με ερυθριτόλη, καθώς τούτη προσδίδει ευχάριστη γεύση. Ακόμη χρησιμοποιείται σε προϊόντα στοματικού καθαρισμού, όπως οδοντόκρεμες, αποσμητικά και καθαριστικά στόματος. Η δράση της ερυθριτόλης στο στοματικό καθαρισμό στοχεύει στον περιορισμό της ανάπτυξης του μικροοργανισμού *Streptococcus mutans*, δηλαδή στον περιορισμό της οδοντικής πλάκας στα δόντια, ενώ παράλληλα προσδίδει δροσερή αίσθηση στο στόμα (Regnat et al., 2018).

Με όλες αυτές τις ιδιότητες και εφαρμογές, η ερυθριτόλη έχει προσελκύσει το ενδιαφέρον σε ερευνητικό επίπεδο, ενώ παράγεται από βιομηχανικές μονάδες σε μεγάλη κλίμακα. Αρχικά, η παραγωγή της ερυθριτόλης γίνονταν με χημικές μεθόδους, όπως η χημική σύνθεση (2-βουτεν-1,4-διόλη). Αυτές οι μέθοδοι απαιτούσαν ακραίες θερμοκρασίες ή συνθήκες πίεσης και δεν ήταν οικονομικά βιώσιμες. Το κύριο πρόβλημα ήταν ο μετέπειτα εξευγενισμός με τεχνικές χρωματογραφίας που περιελάμβανε στάδια υψηλού κόστους. Υψηλού κόστους ήταν επίσης και οι πρώτες ύλες που χρησιμοποιούνται στις χημικές διεργασίες (Rzechonek et al., 2018; Rakicka et al., 2017; Diamantopoulou and Papanikolaou, 2023). Πλέον, η πιο αποδοτική και βιώσιμη μέθοδος είναι η βιοτεχνολογική παραγωγή της ερυθριτόλης. Το 1950, ίχνη ερυθριτόλης ανιχνεύτηκαν σε υπολείμματα μελάσας από την επεξεργασία του ζαχαροκάλαμου τα οποία είχαν ζυμωθεί από ζύμες. Έτσι, ανακαλύφθηκε πως είναι δυνατή η παραγωγή ερυθριτόλης με τη χρήση ζυμωτικών μικροοργανισμών (Regnat et al., 2018). Η ερυθριτόλη παράγεται μέσω ζύμωσης από ωσμόφιλες ζύμες, όπως *Trigonopsis variabilis*, *Trichosporon* sp., *Torula* sp., *Candida magnoliae*, *Moniliella* sp. και από βακτήρια, όπως *Leuconostoc oenos* σε υπόστρωμα εξοζών (Rymowicz et al., 2009; Diamantopoulou and Papanikolaou, 2023). Τα πλεονεκτήματα της παραγωγής ερυθριτόλης μέσω ζύμωσης είναι πως περιλαμβάνει λιγότερα και φθηνότερα στάδια κατιούσας επεξεργασίας. Η παραγωγή της ερυθριτόλης μέσω ζύμωσης δεν απαιτεί πολύπλοκα στάδια και χρησιμοποιεί σαν πρώτη ύλη κυρίως γλυκόζη από άμυλο αραβόσιτου ή σίτου. Αρχικά, αυτές οι πρώτες ύλες υδρολύονται με υδρολυτικά ένζυμα σε απλά σάκχαρα, κυρίως γλυκόζη. Στη συνέχεια, μετά από τη ρευστοποίηση του αμύλου, προστίθεται το αρχικό ενοφθάλμισμα της ωσμόφιλης ζύμης ή του μύκητα που θα τελέσει την ζύμωση. Μετά την παραγωγή της ερυθριτόλης, το μείγμα της καλλιέργειας διέρχεται από φιλτράρισμα, η

ερυθριτόλη απομονώνεται, συγκεντρώνεται και τελικά υφίσταται κρυστάλλωση. Τα στάδια του εξευγενισμού έχουν λιγότερο κόστος από αυτά της χημικής σύνθεσης και απαιτούν λιγότερη ενέργεια. Τέλος, η χρήση ωσμόφιλων ζυμών έχει ως πλεονέκτημα τη χρήση υψηλών συγκεντρώσεων υποστρώματος χωρίς αυτό να επηρεάζει την ανάπτυξη του μικροοργανισμού (Nabors et al., 2016). Οι παραπάνω εφαρμογές ωστόσο, έχουν ως υπόστρωμα πηγές άνθρακα οι οποίες θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για την ανθρώπινη διατροφή ή τη σίτιση οικόσιτων ζώων και άρα να δημιουργούν ζητήματα σχετικά με την προσπάθεια κάλυψης των παγκόσμιων αναγκών σε τρόφιμα και την παραγωγή άλλων προϊόντων και βιοκαυσίμων. Μια επίσης καινοτόμος μέθοδος παραγωγής ερυθριτόλης μέσω ζύμωσης είναι με τη μη-συμβατή ζύμη *Y. lipolytica* με υπόστρωμα άνθρακα την ακάθαρτη γλυκερόλη που προκύπτει ως παραπροϊόν από παραγωγή βιολογικού πετρελαίου (Tomaszewska et al., 2014). Η ζύμη *Y. lipolytica* παράγει αυξημένη συγκέντρωση πολυολών, όπως η ερυθριτόλη σε συνθήκες ωσμωτικής καταπόνησης και περιορισμού σε άζωτο (Rakicka et al., 2016). Ο θεωρητικός συντελεστής της ερυθριτόλης ως προς το υπόστρωμα γλυκόζης (67,7% w/w) είναι ελαφρώς μεγαλύτερος από αυτό σε υπόστρωμα γλυκερόλης (66,3% w/w) (Εικόνα 1.7 και 1.8). Η γλυκερόλη όμως, ασκεί μεγαλύτερη ωσμωτική πίεση από αυτή που ασκεί η γλυκόζη (Rywińska et al., 2013).



Εικόνα 1.7 Θεωρητική απόδοση της ερυθριτόλης σε υπόστρωμα γλυκόζης.



Εικόνα 1.8 Θεωρητική απόδοση της ερυθριτόλης σε υπόστρωμα γλυκερόλης.

1.7.2 ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΚΑΙ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΜΑΝΝΙΤΟΛΗΣ

Η μαννιτόλη είναι μια πολυόλη μεγαλύτερου μοριακού βάρους από αυτού της ερυθριτόλης. Η πιο συχνή μορφή της μαννιτόλης που απαντάται στη φύση είναι η D-μαννιτόλη, η οποία είναι η πιο διαδεδομένη πολυόλη που υφίσταται (Song et al., 2009). Σε αντίθεση όμως με την ερυθριτόλη, η μαννιτόλη έχει ένα ισομερές, τη σορβιτόλη. Διατροφικά, η μαννιτόλη αποτελεί ένα πολύ καλό υποκατάστατο της σακχαρόζης. Η θερμιδική της αξία είναι πολύ μικρή (1,6 kcal/g) συγκριτικά με τη θερμιδική αξία της σακχαρόζης (4 kcal/g). Η γλυκύτητα της είναι περίπου 50% έως 65% αυτής (Saha et al., 2011; Diamantopoulou and Papanikolaou, 2023). Ακόμη δεν προκαλεί τερηδόνα και τα επίπεδα ινσουλίνης και γλυκαγόνης στο αίμα παραμένουν αμετάβλητα μετά από τη χορήγηση της. Το 75% της ποσότητας αξιοποιείται από ζυμωτικούς μικροοργανισμούς που συμβιώνουν στο έντερο, ενώ το υπόλοιπο 25% απομακρύνεται μέσω των ούρων (Song et al., 2009). Έχει μικρή διαλυτότητα στο νερό, είναι ελαφρώς διαλυτή στους οργανικούς διαλύτες, όπως η αιθανόλη και είναι πρακτικά αδιάλυτη στον

αιθέρα, τις κετόνες και τους υδρογονάνθρακες. Εμφανίζεται στη φύση σε φυτικούς οργανισμούς και μύκητες. Σε λαχανικά, όπως κολοκύθες και κρεμμύδια, σε υδρόβια φυτά, όπως καφέ άλγη και φύκια, μπορεί το ποσοστό επί της ξηρής μάζας της να φτάσει το 10-20% w/w. Σε πολλά δε μανιτάρια αποτελεί τον κύριο αποθησαυριστικό υδατάνθρακα (Rakicka et al., 2016; Diamantopoulou and Papanikolaou, 2023). Ενδεικτικά, η αρχική πηγή της μαννιτόλης ήταν ο φλοιός του φυτού μελιάδι ή φράξος (*Fraxinus ornus*) της Οικογένειας *Oleaceae*, ο φλοιός του οποίου μπορεί να περιέχει έως και 50% του βάρους (Saha et al., 2011). Επιπροσθέτως, χρησιμοποιείται στη βιομηχανία των τροφίμων, των καλλυντικών και στη βιομηχανία των φαρμάκων. Έχει λάβει Ευρωπαϊκό Αριθμό Ασφάλειας (European Safety Number) E421 με διεθνή κωδικό INS421. Χρησιμοποιείται δε σε πολλά προϊόντα, καθώς έχει πολλές φαρμακευτικές και ιατρικές εφαρμογές σε σύγκριση με τις άλλες πολυόλες. Στη βιομηχανία των φαρμάκων συμμετέχει ως κάψουλα ή σκόνη για τη συντήρηση και τη μεταφορά της δραστικής ουσίας ή για να καλύψει τη δυσάρεστη γεύση πολλών ουσιών (Song et al., 2009). Όταν είναι συστατικό σε φαρμακευτικά σκευάσματα δεν αντιδρά με άλλα ενεργά συστατικά και είναι μια πολύ σταθερή ουσία. Επιπροσθέτως, παρουσιάζει θεραπευτικό ρόλο σε περιπτώσεις νεφρικής βλάβης χάρις στην αντιδιουρητική δράση της. Επιπλέον, είναι μη υγροσκοπική, ιδιότητα η οποία συνιστά βασική της διαφορά από τη σορβιτόλη. Ως αποτέλεσμα της προαναφερθείσας ιδιότητας, είναι να προστίθεται για να περιορίσει την κρυστάλλωση των σακχάρων σε προϊόντα πλούσια σε υδατάνθρακες αυξάνοντας το χρόνο παραμονής τους στο ράφι, καθώς προσδίδει σταθερότητα ειδικά σε τρόφιμα που περιέχουν μεγάλα ποσοστά υγρασίας (Saha et al., 2011). Η χημική μέθοδος παραγωγής της πολυόλης αυτής γίνεται με υδρογόνωση. Η υδρογόνωση απαιτεί παρουσία καταλύτη κάποιου μετάλλου, όπως νικέλιο, χαλκό ή ρουθίνιο σε συνθήκες πολύ υψηλής θερμοκρασίας και πίεσης. Το υπόστρωμα συνήθως είναι η φρουκτόζη. Η μαννιτόλη διαχωρίζεται από τη σορβιτόλη λόγω της μικρότερης διαλυτότητας της. Κατά συνέπεια κρυσταλλώνει πιο εύκολα από τη σορβιτόλη (Saha et al., 2011). Η χημική μέθοδος, όμως, παρουσιάζει πολλά προβλήματα κατά την εφαρμογή της. Αρχικά, λόγω σύστασης της φρουκτόζης, τα προϊόντα της αντίδρασης είναι μαννιτόλη:σορβιτόλη σε θεωρητική αναλογία 1:1, διότι η α μορφή μετατρέπεται σε μαννιτόλη και η β σε σορβιτόλη. Για την αύξηση της ποσότητας της μαννιτόλης έχει προταθεί η χρήση ενζύμων και πιο φθηνών υποστρωμάτων, όπως η γλυκόζη και κλάσματα δεξτρανών για τη μείωση του κόστους. Η γλυκόζη μετατρέπεται με ισομεράσες σε φρουκτόζη, η οποία αναπόφευκτα μετατρέπεται σε μαννιτόλη και σορβιτόλη. Η τελική απομόνωση της μαννιτόλης γίνεται με ψυχρή κρυστάλλωση και ηλεκτροδιάλυση (Kiviharju et al., 2008).

Μια πιο αποδοτική μέθοδος παραγωγής της μαννιτόλης περιλαμβάνει την εφαρμογή βιοτεχνολογικών διεργασιών με την παραγωγή της από διάφορους χρησιμοποιούμενους ζυμωτικούς μικροοργανισμούς. Η μαννιτόλη μπορεί να παραχθεί από πολλούς μικροοργανισμούς, όπως ποικίλες ζύμες, μύκητες, καθώς και (συνήθως γαλακτικά) βακτήρια. Τα πλεονεκτήματα των βιοτεχνολογικών διεργασιών είναι πως το αρχικό υπόστρωμα το οποίο χρησιμοποιείται από τους εμπλεκόμενους μικροοργανισμούς μπορεί να περιλαμβάνει φθηνά υλικά ως πηγή άνθρακα, όπως μελάσσες, εμπορική

σακχαρόζη και γλυκόζη. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί και το άμυλο ως υλικό εκκίνησης, προαπαιτούμενη όμως είναι η προσθήκη αμυλασών για την προηγούμενη υδρόλυση του πολυμερούς, όπως και στην περίπτωση της ερυθριτόλης (Saha et al., 2011). Η μαννιτόλη παράγεται επίσης από τη ζύμη *Y. lipolytica* με πηγή άνθρακα τη γλυκερόλη. Η σχέση της όμως με την ωσμωτική καταπόνηση δεν έχει πλήρως διασαφηνιστεί και φαίνεται να διαφέρει από την περίπτωση της ερυθριτόλης. Αύξηση της ωσμωτικής πίεσης με προσθήκη άλατος NaCl είχαν μείωση της παραγωγής της μαννιτόλης, ενώ ενδεχομένως να συνδέεται με τον μεταβολισμό των λιπαρών οξέων (Diamantopoulou and Papanikolaou, 2023; Dulermo et al., 2015; Tomaszewska et al., 2012).

1.7.3 ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΚΑΙ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΑΡΑΒΙΤΟΛΗΣ

Η αραβιτόλη παρουσιάζει γλυκύτητα όμοια με αυτής της σακχαρόζης με εξαιρετικά μικρή θερμιδική αξία (0,2 kcal/g) και μικρή απορρόφηση από το πεπτικό σύστημα. Η L-αραβιτόλη είναι διαλυτή στο νερό και συμπεριφέρεται σαν πολύ ασθενές οξύ. Έχει θερμοκρασία τήξης 103 ± 1 °C και σχηματίζει λευκούς κρυστάλλους όταν απομονώνεται σε καθαρή μορφή (Koganti et al., 2011). Όμοια με άλλες πολυόλες η L-αραβιτόλη δεν προκαλεί τερηδόνα και η χορήγηση της έχει εμφανίσει να μειώνει το λιπώδη ιστό και περιορίζει την εναπόθεση λίπους (Kordowska-Wiater, 2015). Παράλληλα, η D-αραβιτόλη χρησιμοποιείται ως υπόστρωμα για την παραγωγή πολλών προϊόντων σε πολλούς κλάδους βιομηχανιών, όπως λόγου χάρη στη χημική βιομηχανία για την παραγωγή οργανικών οξέων, στη φαρμακευτική βιομηχανία και στην παραγωγή ζιζανιοκτόνων (Kordowska-Wiater, 2015). Εμφανίζεται στη φύση σε πολλά τρόφιμα, όπως η γλυκοπατάτα, το φασόλι και το ευρωπαϊκό κάστανο. Επιπλέον, βρίσκεται σε ζυμωμένα προϊόντα, όπως η σάλτσα σόγιας (Ahmed, 2001). Ανιχνεύεται σε πολλά βιολογικά υγρά, όπως το αίμα, τα ούρα, το σάλιο και το εγκεφαλονωτιαίο υγρό. Παρόμοια με τις άλλες πολυόλες, η παραγωγή της αραβιτόλης σε βιομηχανική κλίμακα γίνεται σε συνθήκες υψηλής θερμοκρασίας παρουσία ακριβών καταλυτών, ενώ μετά από το πέρας της χημικής διεργασίας παραγωγής ακολουθεί μια ακριβή διαδικασία απομόνωσης και εξευγενισμού (Kordowska-Wiater, 2015). Η L-αραβιτόλη παράγεται και μέσω ζύμωσης με πρώτη ύλη λιγνοκυτταρινούχα υλικά από κατάλοιπα ξυλείας ή παραπροϊόντα επεξεργασίας αραβόσιτου. Με τη βιοτεχνολογική παραγωγή είναι πιο εύκολη η κατιούσα επεξεργασία για τον εξευγενισμό της (Kordowska-Wiater, 2015). Το γένος *Candida* spp. παράγει αραβιτόλη δια μέσου των φωσφορικών πεντοζών. Ομοίως με πολλές άλλες πολυόλες, η παραγωγή αυτής είναι αποτέλεσμα ωσμωτικής καταπόνησης, όπως η υψηλή αλατότητα. Αραβιτόλη παράγεται και από άλλους μικροοργανισμούς, όπως στελέχη του γένους *Debaryomyces*, ενίοτε χρησιμοποιώντας τη γλυκερόλη ως υλικό εκκίνησης (Diamantopoulou and Papanikolaou, 2023).

1.8 ΚΙΤΡΙΚΟ ΟΞΥ

Το κιτρικό οξύ είναι ένα ασθενές οργανικό οξύ με μοριακό τύπο $C_6H_8O_7$. Χρησιμοποιείται ευρέως στη βιομηχανία τροφίμων ως μέσο όξυνσης και ενισχυτικής γεύσης, ενώ βρίσκει και εφαρμογές σε φάρμακα, καλλυντικά και καθαριστικά. Η αγορά του κιτρικού οξέος ολοένα επεκτείνεται, λόγω των εφαρμογών του στα πεδία της βιο- και νανο- ιατρικής καθώς και της μηχανικής ιστών. Σε αυτούς τους τομείς, το κιτρικό οξύ κερδίζει την προσοχή, ως ένα ακίνδυνο μόριο που είναι βιοδιασπώμενο, βιοσυμβατό και μη τοξικό (Dhillon et al., 2011). Αποτελεί το πιο βιομηχανικά παραγόμενο χημικό προϊόν μικροβιακής προέλευσης και το πλέον χρησιμοποιούμενο οργανικό οξύ (Papanikolaou and Aggelis, 2009; Diamantopoulou and Papanikolaou, 2023).

Η ζύμη *Y. lipolytica* είναι ικανή να παράγει σημαντικές ποσότητες κιτρικού οξέος μεταβολίζοντας πληθώρα υποστρωμάτων, όπως αιθανόλη, γλυκόζη, γλυκερόλη και n-αλκάνια. Το κιτρικό οξύ αποτελεί ενδιάμεσο προϊόν του κύκλου TCA, με αποτέλεσμα να συσσωρεύεται στα μιτοχόνδρια και να εξέρχεται στο κυτταρόπλασμα, όταν στο μέσο της καλλιέργειας περιορίζεται το άζωτο και υπάρχει περίσσεια άνθρακα. Η έλλειψη αζώτου προκαλεί μείωση των επιπέδων του ενδοκυτταρικού AMP, το οποίο διασπάται προς παραγωγή αμμωνιακών ιόντων (NH_4^+), με την όλη διεργασία να έχει ως απόρροια την απενεργοποίηση του ενζύμου NAD^+ και $NADP^+$ -ισοκιτρική αφυδρογονάση (ICDH) (Papanikolaou et al., 2009; 2013). Το ένζυμο κλειδί της βιοσύνθεσης του κιτρικού οξέος είναι η συνθετάση του κιτρικού (CS) που συνθέτει κιτρικό οξύ από οξαλοξικό οξύ και ακετυλο-CoA. Έτσι για την ενδοκυτταρική παραγωγή κιτρικού οξέος είναι απαραίτητη η υψηλή δραστηριότητα του ενζύμου CS και η χαμηλή δραστηριότητα άλλων ενζύμων του κύκλου των τρικαρβοξυλικών οξέων (TCA), ώστε να αποφευχθεί πιθανή αποικοδόμηση του κιτρικού οξέος (Kamzolova et al., 2011). Η παραγωγή κιτρικού οξέος επηρεάζεται από το γονότυπο της ζύμης και τους περιβαλλοντικούς παράγοντες της διεργασίας, όπως η πηγή άνθρακα και αζώτου, η θερμοκρασία, η τιμή pH και ο αερισμός. Τέλος σημαντική επίδραση στην τελική απόδοση σε κιτρικό οξύ έχει και η μέθοδος ζύμωσης που ακολουθείται (Liu et al., 2015), ενώ πολύ σημαντική παράμετρος σχετικά με την παραγωγή του ανωτέρω οξέος είναι η χρήση ή όχι γενετικά τροποποιημένων / μεταλλαγμένων στελεχών, καθόσον αυτά θεωρούνται ως πολύ πιο δυναμικά σε σχέση με την παραγωγή του ανωτέρω οξέος συγκρινόμενα με τα άγρια τοιούτα (Cavallo et al., 2017; Diamantopoulou and Papanikolaou 2023; Diamantopoulou et al., 2023). Έτσι, σε μεταλλαγμένα/γενετικώς τροποποιημένα στελέχη, η παραγωγή του κιτρικού οξέος μπορεί άνετα να ξεπεράσει την τιμή των 100 g/L (τιμές 140 - 160 g/L αναφέρονται σε αρκετές εργασίες στη βιβλιογραφία), ενώ για τα άγρια στελέχη, η παραγωγή κιτρικού οξέος σε τιμές ≥ 70 g/L θεωρείται ως σπάνια και δυσκόλως επιτεύξιμη (Cavallo et al., 2017; Diamantopoulou and Papanikolaou 2023; Diamantopoulou et al., 2023).

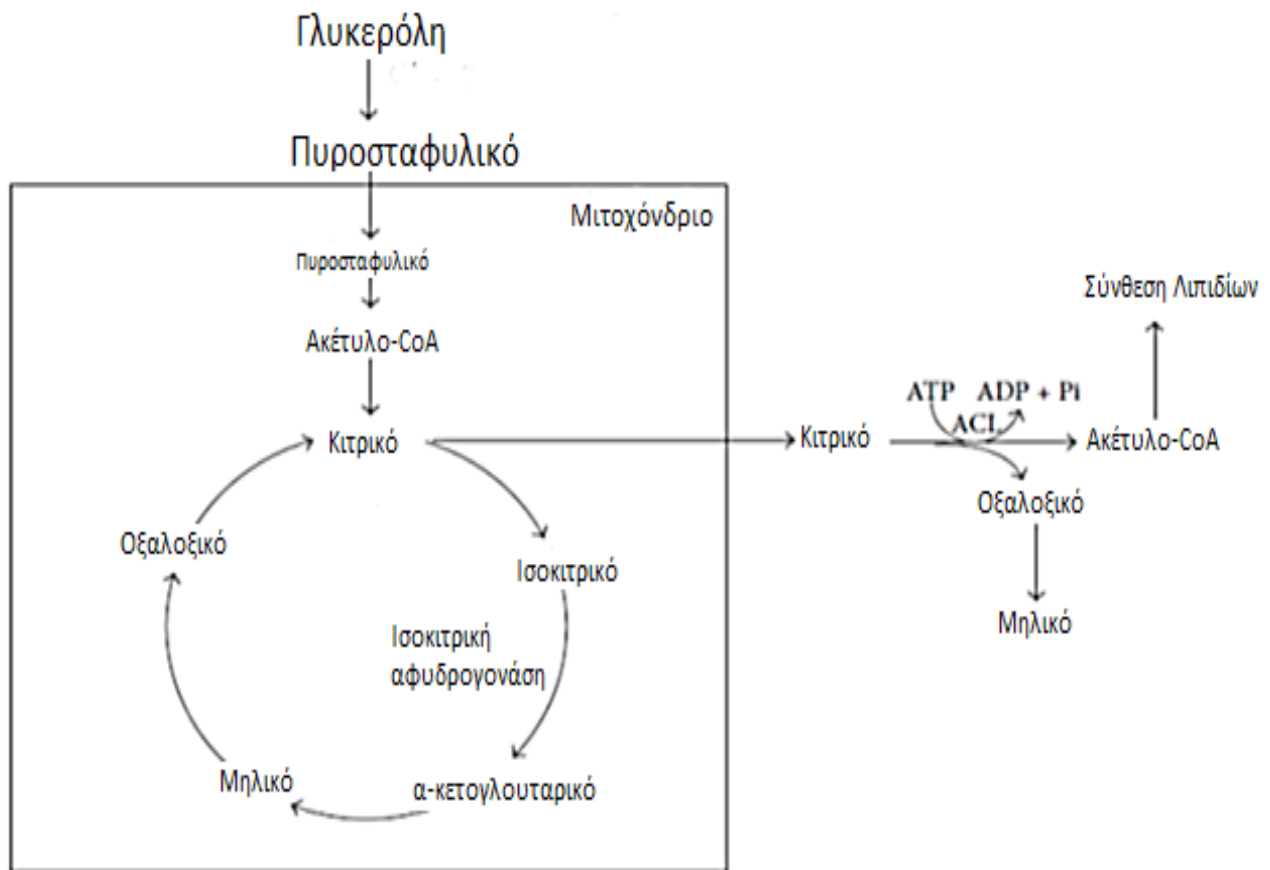
1.9 ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΟ ΛΙΠΟΣ \ ΕΛΑΙΟΓΟΝΟΙ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ

Ο όρος μικροβιακό λίπος ή μονοκυτταρικό έλαιο (Single Cell Oil, SCO) ή μικροβιακό έλαιο, χρησιμοποιείται για να περιγράψει το σύνολο των λιπαρών ουσιών που συσσωρεύουν οι μικροοργανισμοί.

Ορισμένοι μικροοργανισμοί στη φύση παράγουν και συσσωρεύουν υδρόφοβα μακρομόρια ως απόκριση σε συνθήκες καταπόνησης. Τέτοιες συνθήκες είναι λόγου χάρη, η έλλειψη κάποιου βασικού στοιχείου για την ανάπτυξη τους, όπως για παράδειγμα το άζωτο. Υπό συνθήκες έλλειψης αζώτου, πολλά προκαρυωτικά κύτταρα (βακτήρια) παράγουν πολυεστέρες-βιοπολυμερή, όπως το πολυ-υδροξυ βουτυρικό (PHB), αντιθέτως ποικίλοι ευκαρυωτικοί μικροοργανισμοί παράγουν και συσσωρεύουν ουδέτερα λίπη, όπως τριγλυκερόλες (TAG) και εστέρες στερολών (SE). Σε αυτούς τους μικροοργανισμούς περιλαμβάνονται οι ζύμες, οι μύκητες και τα μικροφύκη (Papanikolaou and Aggelis 2010; 2011a; 2011b; 2019; Ratledge, 2004). Στους μύκητες και τις ζύμες, η κύρια στερόλη είναι η εργοστερόλη (Beopoulos et al., 2012). Τέλος, αξίζει να σημειωθεί πως από τις ελαιογόνες ζύμες, η ζύμη *Y. lipolytica* συσσωρεύει σε σχετικά μεγάλο ποσοστό και ελεύθερα λιπαρά οξέα, ειδικά όταν η αύξηση τελείται σε υδρόφοβα υποστρώματα («*ex novo*» σύνθεση μικροβιακών ελαίων), χωρίς να προκαλούν τοξικότητα στο μικροοργανισμό (Papanikolaou et al., 2001; Papanikolaou and Aggelis, 2010; 2019; Beopoulos et al., 2012).

Οι ελαιογόνες ζύμες έχουν τη δυνατότητα να συσσωρεύουν λίπος από 20% (Adrio, 2017) επί της ξηρής μάζας με αναφορές να προσεγγίζουν ακόμα και το 70% w/w (Li et al., 2007), ή και 80% w/w (Papanikolaou et al., 2017b). Παράλληλα, εκτός από τη διαφορετική ποσότητα μικροβιακού λίπους ποικίλει και το είδος των λιπαρών οξέων που συσσωρεύει η εκάστοτε ελαιογόνος ζύμη. Αυτά τα λιπαρά οξέα, που είναι εστεροποιημένα στις τριγλυκερόλες, μπορεί να διαφέρουν τόσο σε μήκος αλειφατικής αλυσίδας όσο και σε βαθμό κορεσμού (ήτοι παρουσία διπλών δεσμών στην αλειφατική αλυσίδα). Η ποσότητα και το είδος του μικροβιακού λίπους εκτός από το είδος του μικροοργανισμού, επηρεάζεται και από άλλους παράγοντες, όπως ο αερισμός, το pH και η θερμοκρασία.

Το ποσοστό για τη ζύμη *Y. lipolytica* είναι μικρό συγκριτικά με άλλες ελαιογόνες ζύμες. Όμως, αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι αποτελεί τη μοναδική ζύμη που συσσωρεύει μεγάλες ποσότητες λινελαϊκού οξέος, που δύναται να φτάσουν έως και το 50% του συνόλου των λιπαρών οξέων (Beopoulos et al., 2009). Στο Εικόνα 1.9 διαφαίνεται η σύνθεση λιπιδίων της ζύμης *Y. lipolytica* σε υπόστρωμα γλυκερόλης.



Εικόνα 1.9 Απεικόνιση της σύνθεσης λιπιδίων στη ζύμη *Y. lipolytica* με πηγή άνθρακα γλυκερόλη και περιορισμό αζώτου. Προσαρμοσμένο από Gonçaves et al., 2014.

1.9.1 ΑΝΑΒΟΛΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΛΙΠΟΥΣ ΣΤΙΣ ΕΛΑΙΟΓΟΝΕΣ ΖΥΜΕΣ

Η συσσώρευση του μικροβιακού λίπους όταν η γλυκόζη ή παρομοίως καταβολιζόμενα υλικά χρησιμοποιούνται ως υλικά εκκίνησης («*de novo*» διεργασία) γίνεται σε τέσσερα βήματα: αρχικά γίνεται η παραγωγή και η συσσώρευση του ακέτυλο-CoA (acetyl-CoA) και του NADPH, έπειτα λαμβάνει χώρα η σύνθεση και επιμήκυνση των λιπαρών οξέων, ακολουθεί η κατανομή τους σε λιπαρά οξέα που θα χρησιμοποιηθούν για πολικά και μη πολικά λίπη και τέλος, τα μη πολικά λίπη σχηματίζονται με την εστεροποίηση των λιπαρών οξέων και συσσωρεύονται ανάμεσα στη διπλοστιβάδα του ενδοπλασματικού δικτύου. Εκεί, σχηματίζουν δομές, τα ελαιώματα (Garay et al., 2014). Σχετικά με τη συσσώρευση ακέτυλο-CoA και NADPH, η κύρια πηγή ακέτυλο-CoA είναι αντίδραση που καταλύεται από τη λύση του κιτρικού οξέος, ένα ένζυμο που εμφανίζεται μόνο στις ελαιογόνες ζύμες και όχι στις μη ελαιογόνες.

Το ATP παράγεται κυρίως κατά την οξειδωτική φωσφορλίωση, στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων, μιας διαδικασίας που είναι συντηρημένη σε όλους τους αερόβιους μικροοργανισμούς. Το κιτρικό οξύ από την άλλη πλευρά, συσσωρεύεται με έναν πολύ εξειδικευμένο για τις ελαιογόνες ζύμες τρόπο. Αποτελεί το τελικό προϊόν μιας αλυσίδας αντιδράσεων και μεταβολών που ξεκινούν με την έλλειψη θρεπτικών συστατικών και ειδικά αζώτου στο μέσο της αύξησης (Ratledge, 2004; Papanikolaou

and Aggelis, 2011a). Η έλλειψη αζώτου προκαλεί τη συσσώρευση του κιτρικού οξέος. Το ισοκιτρικό οξύ, υπό κανονικές συνθήκες (ισόρροπη αύξηση), μεταβολίζεται σε α-κετογλουταρικό από την ισοκιτρική αφυδρογονάση. Στην περίπτωση των ελαιογόνων ζυμών όμως, η ισοκιτρική αφυδρογονάση είναι εξαρτώμενη από το AMP. Εφόσον υπάρχει έλλειψη AMP, η ισοκιτρική αφυδρογονάση αδυνατεί να μεταβολίσει το ισοκιτρικό οξύ, το οποίο αρχίζει να συσσωρεύεται στα μιτοχόνδρια, με τον κύκλο των TCA να μη μπορεί να λειτουργήσει. Έπειτα, το ισοκιτρικό οξύ αρχίζει και μετατρέπεται ξανά, σε κιτρικό οξύ μέσω του ενζύμου ακονιτάση. Εν τέλει, το κιτρικό οξύ συσσωρεύεται εντός του μιτοχονδρίου. Το κιτρικό οξύ έπειτα εξέρχεται στο κυτταρόπλασμα με ένα ένζυμο μεταφοράς, την κιτρική/μηλική τρανσλοκάση (Garay et al., 2014). Στο κυτταρόπλασμα, το κιτρικό οξύ διασπάται σε οξαλοξικό οξύ και ακέτυλο-CoA από την ATP:κιτρική λυάση, ένα ένζυμο που εμφανίζεται αποκλειστικά στις ελαιογόνες ζύμες και όχι σε άλλα είδη ζυμών (Garay et al., 2014; Papanikolaou and Aggelis 2009; 2011a; 2011b; 2019). Το οξαλοξικό ανάγεται σε μηλικό και υπεισέρχεται στο μιτοχόνδριο ως αντίβαρο στο εξερχόμενο κιτρικό (Ratledge, 2004; Papanikolaou and Aggelis 2010; 2011a; 2011b; 2019).

Εκτός από το ακέτυλο-CoA, ένα σημαντικό μόριο για την βιοσύνθεση λίπους στις ελαιογόνες ζύμες είναι το συνένζυμο NADPH. Το μόριο αυτό συμμετέχει σε αναγωγικές αντιδράσεις αναβολισμού, όπως η επιμήκυνση των αλειφατικών αλυσίδων των λιπαρών οξέων (Ratledge et al., 2002).

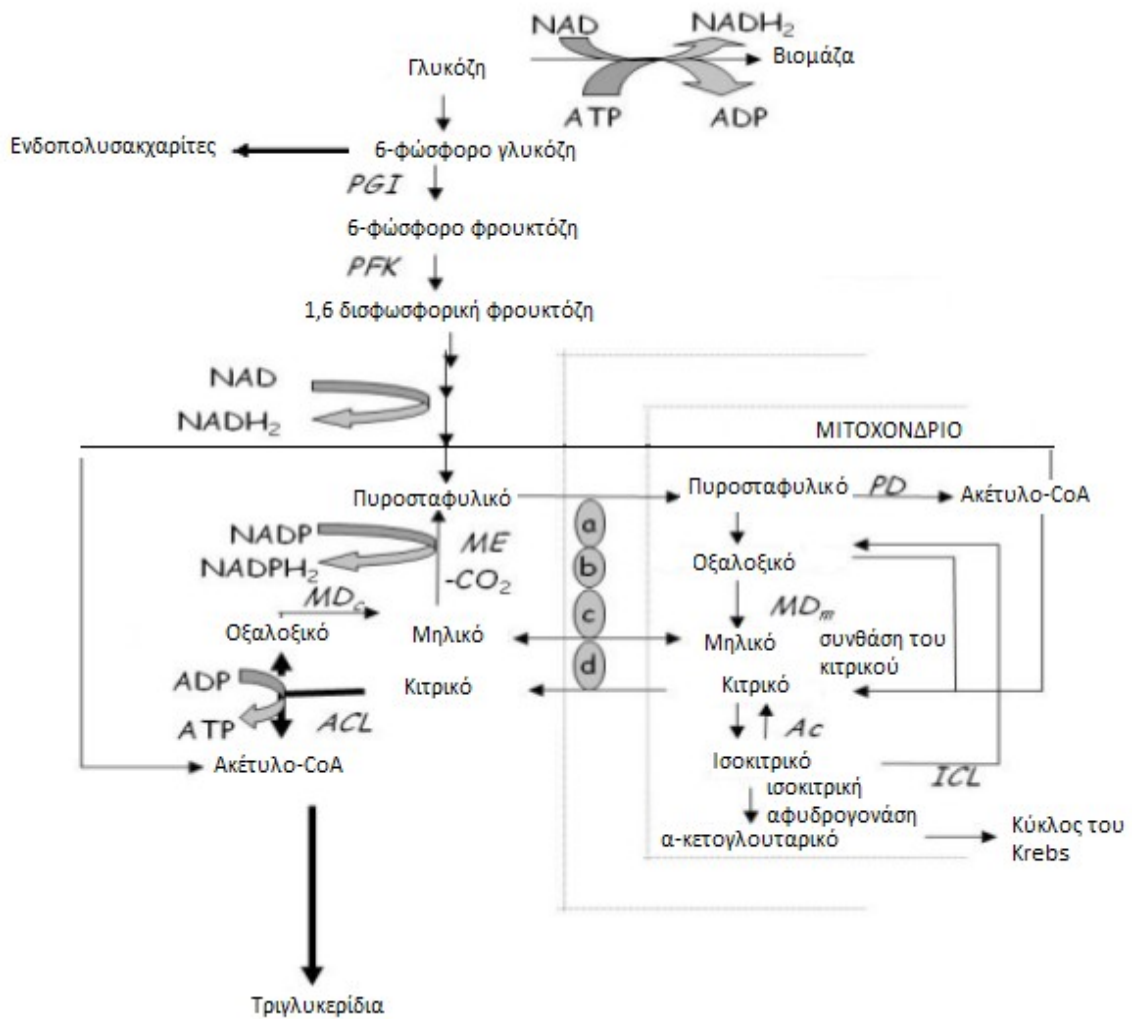
Όμως, σε μελέτες της ζύμης *Y. lipolytica* με υπόστρωμα τη γλυκόζη (Wasylenko et al., 2015) και ακετονικό οξύ (Liu et al., 2016) η κύρια πηγή NADPH ήταν οι αντιδράσεις του μονοπατιού των φωσφορικών πεντοζών. Αυτό το γεγονός καθιστά τη ζύμη *Y. lipolytica* μια ιδιαίτερη ζύμη ακόμη και συγκριτικά με άλλες ελαιογόνες ζύμες. Περαιτέρω, η βιοσύνθεση των λιπαρών οξέων ξεκινάει με την καρβοξυλίωση του ακέτυλο-CoA που καταλύεται από το ένζυμο καρβοξυλάση του ακέτυλο-CoA. Το ακέτυλο-CoA μετατρέπεται σε μηλότυλο-CoA με καρβοξυλίωση στην οποία συμμετέχει η βιοτίνη που λειτουργεί ως δότης ενός ατόμου άνθρακα. Τόσο το ακέτυλο-CoA, όσο και το μηλότυλο-CoA μεταφέρονται με την πρωτεΐνη μεταφοράς ακυλίου (*acyl carrier protein*, ACP) στη συνθάση των λιπαρών οξέων. Ενώ το ακέτυλο-CoA είναι συνδεδεμένο πάνω σε μια υποομάδα του ενζύμου, το μηλότυλο-CoA είναι συνδεδεμένο με την ACP που σχηματίζει σύμπλοκο με τη συνθάση. Η συνθάση των λιπαρών οξέων είναι ένα ένζυμο με δυο ειδών υποομάδες: β και α. Το ένζυμο αυτό έχει πρωτεϊνική δομή α₆β₆ με έξι περιοχές στις οποίες μπορεί να γίνει η βιοσύνθεση των λιπαρών οξέων. Επίσης, διαθέτει σαράντα δύο ενεργά κέντρα στα οποία καταλύονται οι διάφορες ενζυμικές αντιδράσεις της βιοσύνθεσης των λιπαρών οξέων.

Το ακέτυλο-ACP μεταφέρεται και συμπυκνώνεται με το μηλότυλο-ACP σε μια αντίδραση κατά την οποία απελευθερώνεται ένα μόριο διοξειδίου του άνθρακα (CO₂). Το μηλότυλο-ACP διαθέτει τρία άτομα άνθρακα, το ακέτυλο-ACP διαθέτει δυο, συνεπώς το προϊόν της συμπύκνωσης διαθέτει τέσσερα άτομα άνθρακα με ένα άτομο απώλεια, λόγω της απορροής του διοξειδίου του άνθρακα. Το προϊόν της συμπύκνωσης έπειτα ανάγεται δυο φορές με τη βοήθεια δυο αναγωγικών μορίων NADPH, με μια ενδιάμεση αφυδάτωση. Το αποτέλεσμα όλων αυτών των βιομετατροπών είναι η δημιουργία ενός μορίου

τεσσάρων ανθράκων. Αυτό το μόριο, το βουτυρύλο-ACP συνεχίζει την ίδια κυκλική διαδικασία συμπύκνωσης-αναγωγής-αφυδάτωσης-αναγωγής μέχρι να σχηματιστεί ένα μόριο λιπαρού οξέος με δεκαέξι άτομα άνθρακα, το παλμιτικό οξύ. Σε κάθε κύκλο, προστίθενται δυο άτομα άνθρακα. Μετά τα δεκαέξι άτομα όμως, η επιμήκυνση της αλυσίδας μπορεί να συνεχιστεί με δότη, όπως το ακέτυλο-CoA (Garay et al., 2014).

1.10 ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ ΕΝΔΟΠΟΛΥΣΑΚΧΑΡΙΤΩΝ

Η ζύμη *Y. lipolytica* είναι γνωστή για τη συσσώρευση του λίπους, ενώ συγχρόνως σε συνθήκες περιορισμού οξυγόνου και αζώτου, τελευταίες εργασίες έχουν δείξει ότι δύναται να συσσωρεύει διάφορους ενδοπολυσακχαρίτες (Papanikolaou and Aggelis, 2019). Τα μεταβολικά δρώμενα τα οποία επισυμβαίνουν, μοιάζουν αρκετά με αυτά της συσσώρευσης λιπιδίων. Έτσι, όπως και στην περίπτωση των λιπιδίων, διασπάται το ενδοκυτταρικό AMP και με την έλλειψή του υφίσταται αλλοστερική παρεμπόδιση το ένζυμο της φωσφο-φρουκτοκινάσης, με απόρροια συσσώρευση φρουκτόζης στο κυτταρόπλασμα και συνακόλουθη μετατροπή της σε γλυκόζη μέσω της ισομεράσης και πολυμερισμό της τελευταίας προς συσσώρευση των ενδοπολυσακχαριτών (σύνθεση/συνδυασμός από: Papanikolaou and Aggelis, 2009; 2011a; 2019; Diamantopoulou and Papanikolaou, 2023) (Εικόνα 1.10).



Εικόνα 1.10 Βιοσυσσώρευση λιπιδίων και ενδοπολυσακχαριτών, από Papanikolaou et al., 2009; 2009; 2011a; 2019; Diamantopoulou and Papanikolaou, 2023.

Ο κύριος ενδοπολυσακχαρίτης που παράγεται, τουλάχιστον για το μικροοργανισμό *Y. lipolytica*, είναι το γλυκογόνο το οποίο μπορεί να φτάσει έως και το 16% w/w επί ξηράς ουσίας της παραγόμενης βιομάζας (Bhutada et al., 2017). Το γλυκογόνο αποτελεί έναν πολυσακχαρίτη που αποτελείται από πολλά μόρια γλυκόζης. Είναι ένα μεγάλο και διακλαδιζόμενο μόριο. Οι γλυκόζες συνδέονται με δεσμούς α-1,4-γλυκοσιδικούς στο ευθύ τμήμα του μακρομορίου, ενώ οι διακλαδώσεις σχηματίζονται με α-1,6-γλυκοσιδικούς δεσμούς. Αυτές οι διακλαδώσεις συμβαίνουν συνήθως σε κάθε δέκα μόρια γλυκόζης.

Η σύνθεση του γλυκογόνου ξεκινάει με τη 6-φώσφορο-γλυκόζη. Η 6-φώσφορο-γλυκόζη μετατρέπεται σε 1-φώσφορο-γλυκόζη και τελικά σε γλυκόζη-UDP με τη χρήση ενός μορίου UTP. Έπειτα το ένζυμο συνθάση του γλυκογόνου επιμηκώνει με αυτό το μόριο της γλυκόζης-UDP την αλυσίδα του γλυκογόνου. Στη διαμόρφωση του γλυκογόνου συμμετέχει και το ένζυμο διακλάδωσης το οποίο απομακρύνει έναν αριθμό 6-10 ατόμων γλυκόζης από το άκρο μια ευθείας αλυσίδας σε πιο εσωτερική θέση στο μόριο (Wilson et al., 2011). Εν κατακλείδι και συνοψίζοντας για τη σύνθεση των ενδοπολυσακχαριτών, η Εικόνα 1.10 που παρουσιάστηκε, απεικονίζει τη βιοσυσσώρευση των

ενδοπολυσακχαριτών, καθώς και αυτή των μικροβιακών λιπιδίων, που όπως αναφέρθηκε, στα πρώτα στάδιά τους είναι εξαιρετικά συναφείς.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 ΓΕΝΙΚΗ ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ

Στα κεφάλαια που ακολουθούν, περιγράφεται το βιολογικό υλικό, η σύσταση των θρεπτικών μέσων που χρησιμοποιήθηκαν ως υπόστρωμα για τη μικροβιακή αύξηση, καθώς και οι συνθήκες καλλιέργειας που εφαρμόστηκαν στην παρούσα διδακτορική έρευνα. Επιπλέον, γίνεται εκτενής αναφορά στα πρωτόκολλα που βασίστηκαν οι αναλύσεις για τον προσδιορισμό τόσο των παραγόμενων μεταβολικών προϊόντων, όσο και της μικροβιακής αύξησης. Ολοκληρώνοντας την ενότητα αυτή, δίνονται αναλυτικές πληροφορίες σχετικά με τις συνθήκες λειτουργίας των συσκευών και του λοιπού εργαστηριακού εξοπλισμού που χρησιμοποιήθηκε και στόχευε στην μέγιστη παραγωγή μεταβολικών προϊόντων και κυρίως των πολυολών.

Στα πλαίσια της μελέτης πραγματοποιήθηκαν πειράματα ως εξής:

- i. υγρές καλλιέργειες σε κωνικές φιάλες των στελεχών της ζύμης *Yarrowia lipolytica*
- ii. κλειστές και ημι-συνεχείς καλλιέργειες σε βιοαντιδραστήρα εργαστηριακής κλίμακας ενεργού όγκου 1,5 L
- iii. προσδιορισμός βιομάζας
- iv. αναλύσεις μικροβιακών λιπιδίων
- v. αναλύσεις ενδοπολυσακχαριτών
- vi. προσδιορισμός παραγόμενων σακχάρων, πολυολών και οργανικών οξέων με χρήση υγρής χρωματογραφίας υψηλής πίεσης
- vii. παρακολούθηση των καταναλισκόμενων υποστρωμάτων

2.2 ΒΙΟΛΟΓΙΚΟ ΥΛΙΚΟ

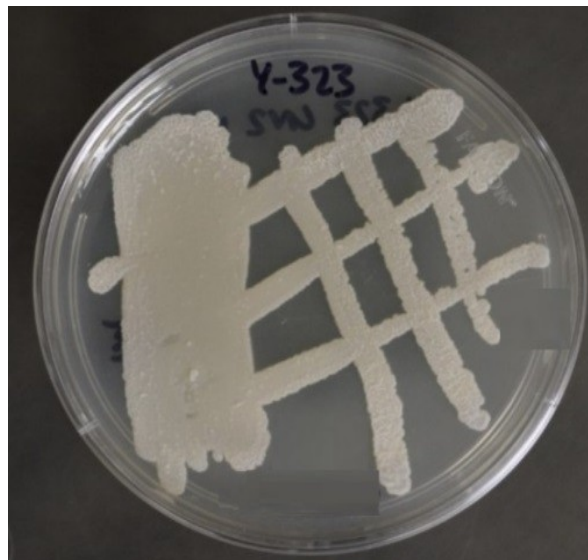
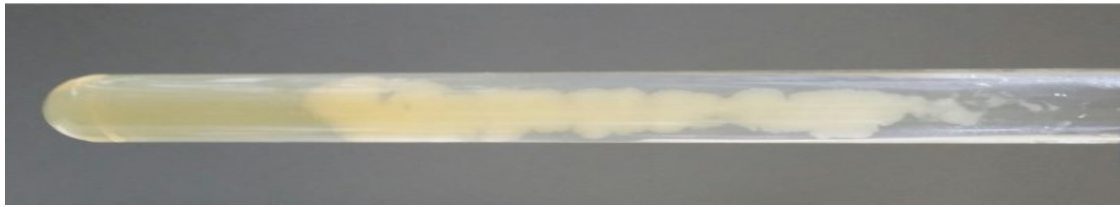
Τα στελέχη που μελετήθηκαν ανήκουν σχεδόν αποκλειστικά στη ζύμη *Y. lipolytica*. Συνολικά μελετήθηκαν οκτώ στελέχη ως προς την ικανότητα τους να αφομοιώνουν υπόστρωμα γλυκερόλης προς παραγωγή μεταβολιτών. Πιο αναλυτικά, στον Πίνακα 2.1 παρατίθενται τα στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν και η προέλευση τους.

Πίνακας 2.1 Μικροβιακά στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν και εξετάστηκαν ως προς την αποδοτικότητα τους σε πληθώρα συνθηκών που εκτέθηκαν κατά τα διάφορα στάδια της μελέτης.

ΌΝΟΜΑ	ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ
1. FMCC Y-74, <i>Yarrowia lipolytica</i>	*Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών
2. FMCC Y-75, <i>Yarrowia lipolytica</i>	*Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών
3. LGAM S7 (1), <i>Yarrowia lipolytica</i>	Ομάδα Μικροβιολογίας, Πανεπιστήμιο Πατρών
4. LMBF 20, <i>Yarrowia lipolytica</i>	*Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών
5. ACA-YC 5030, <i>Yarrowia lipolytica</i>	*Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών
6. Po1d (CLIB 139), <i>Yarrowia lipolytica</i> , άγριο στέλεχος	AgroParisTech - Paris Grignon
7. NRRL Y-323, <i>Yarrowia lipolytica</i>	Agricultural Research Service Culture Collection, Peoria, USA
8. NRRL Y-423, <i>Yarrowia lipolytica</i>	Agricultural Research Service Culture Collection, Peoria, USA

*Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

Όλες οι καλλιέργειες που έλαβαν χώρα κατά τη διάρκεια αυτής της διατριβής αναπτύχθηκαν σε δοκιμαστικούς σωλήνες (slants) με στερεό θρεπτικό υπόστρωμα. Η σύσταση του υποστρώματος αποτελείτο από 10 g/L γλυκόζης, 10 g/L πεπτόνη, 10 g/L yeast extract και 20 g/L άγαρ, τα οποία επώαση στους 30±1 °C για 3-5 ημέρες. Στη συνέχεια αποθηκεύτηκαν σε κεκλιμένα επίπεδα και διατηρήθηκαν υπό ψύξη στους 4±1 °C. Τα slants ανανεώθηκαν πριν από κάθε εμβολιασμό του θρεπτικού μέσου της καλλιέργειας, ώστε να έχουν την απαιτούμενη καθαρότητα και να εξασφαλισθεί η ζωτικότητα των ζυμών. Επιπροσθέτως, πριν από κάθε εμβολιασμό του θρεπτικού μέσου της καλλιέργειας πραγματοποιείτο ανανέωση των στελεχών, καθώς επιστρώνοντο σε τρυβλία Petri με στερεό θρεπτικό υπόστρωμα ίδιας σύστασης με των slants και επώαζοντο για 24 ώρες στους 30±1 °C, ώστε πριν τον εμβολιασμό της υγρής καλλιέργειας να ήταν στην εκθετική φάση ανάπτυξης. Η Εικόνα 2.1 απεικονίζει την ανάπτυξη των στελεχών τόσο σε slant, όσο και σε τρυβλίο Petri, μετά από την επώαση τους.



Εικόνα 2.1 Ανάπτυξη στελεχών σε δοκιμαστικό σωλήνα τύπου slant και σε τρυβλίο τύπου Petri πριν από την αποθήκευσή τους στους 4 ± 1 °C.

2.3 ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΜΕΣΑ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ

Για τη διεξαγωγή των πειραματικών ζυμώσεων ήταν αναγκαία η παρασκευή υγρού εμβολίου. Οι ζύμες επωάζοντο σε υγρές προκαλλιέργειες μέσα σε κωνικές φιάλες Erlenmeyer των 250 mL, πληρωμένες κατά το $\frac{1}{5}$ του όγκου τους (50 mL). Το θρεπτικό μέσο που χρησιμοποιήθηκε ήταν YPD (Yeast, Peptone, D-glucose) με σύσταση: 10 g/L yeast extract, 10 g/L πεπτόνη και 10 g/L γλυκόζη. Έπειτα από αποστείρωση του μέσου στους 121 ± 1 °C για 20 λεπτά, οι φιάλες εμβολιάζοντο ασηπτικά με κύτταρα των στελεχών που προέρχονταν από στερεές 24ωρες καλλιέργειες σε τρυβλία. Στη συνέχεια η προκαλλιέργεια επωάζοντο σε ανακινούμενο επωαστικό θάλαμο (New Brunswick Sc, USA) για

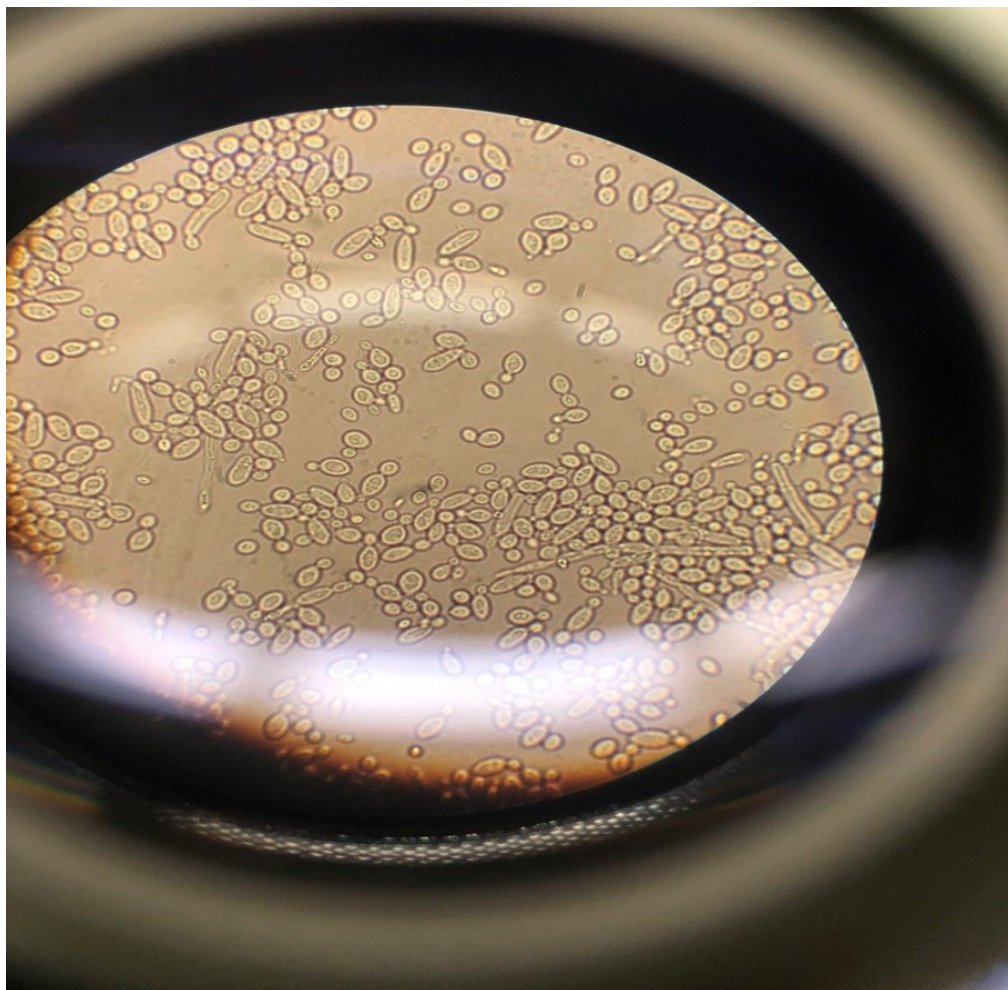
τουλάχιστον 24 ώρες σε σταθερές συνθήκες ανάδευσης και θερμοκρασίας (180 ± 5 rpm, 30 ± 1 °C). Η παραπάνω διαδικασία επαναλαμβανόταν κάθε φορά πριν τον εμβολιασμό κυρίως καλλιέργειας, για την παρασκευή υγρού εμβολίου. Για τις κυρίως καλλιέργειες που παρασκευάστηκαν στα πλαίσια της εκτέλεσης των πειραματικών δοκιμών χρησιμοποιήθηκε ως μοναδική πηγή άνθρακα και ενέργειας, η βιομηχανική γλυκερόλη. Η προέλευση της ήταν από τη μονάδα παραγωγής βιοντίζελ της «ΕΛΙΝ ΒΕΡΝΤ Α.Ε.» (Βελεστίνο, Μαγνησίας) και δημιουργήθηκε αποκλειστικά από μετεστεροποίηση χρησιμοποιημένων/μαγειρεμένων ελαίων. Η σύσταση της περιείχε 85% γλυκερόλη, 9% νερό, 4% χλωριούχο νάτριο, 1% λιπίδια (μονογλυκερίδια, διγλυκερίδια και ελεύθερα λιπαρά οξέα) και <0,1% μεθανόλη (pH του αποβλήτου= $5 \pm 0,3$). Σημαντική διευκρίνιση για τις περιπτώσεις της ακάθαρτης γλυκερόλης ήταν ότι λήφθηκε υπόψη η καθαρότητα της για τους υπολογισμούς των αρχικών συγκεντρώσεων του υποστρώματος στις πειραματικές δοκιμές που έλαβαν χώρα. Όσον αφορά τις πηγές αζώτου χρησιμοποιήθηκε αποκλειστικά πεπτόνη και yeast extract και για την ολοκλήρωση του μέσου προστίθετο και ένα μίγμα αλάτων, μακροστοιχείων και ιχνοστοιχείων. Τα θρεπτικά υποστρώματα και οι αναλογίες παρατίθενται στον Πίνακα 2.2.

Πίνακας 2.2 Σύσταση κυρίως καλλιέργειας για το σύνολο των πειραματικών διαδικασιών.

Γλυκερόλη (πηγή άνθρακα)	~40 g/L, ~80 g/L και ~120 g/L
Yeast extract (πηγή αζώτου)	1 g/L
Peptone (πηγή αζώτου)	2 g/L
KH₂PO₄ (ένυδρο δισόξινο φωσφορικό κάλιο)	7 g/L
Na₂HPO₄ (ένυδρο όξινο φωσφορικό νάτριο)	2,5 g/L
MgSO₄×7H₂O (ένυδρο θειικό μαγνήσιο)	1,5 g/L
FeCl₃×6H₂O (ένυδρος τριχλωριούχος σίδηρος)	0,15 g/L
ZnSO₄×7H₂O (ένυδρος θειικός ψευδάργυρος)	0,02 g/L
MnSO₄×H₂O (ένυδρο θειικό μαγγάνιο)	0,06 g/L
CaCl₂×2H₂O (ένυδρο χλωριούχο ασβέστιο)	0,15 g/L

Όλες οι ζυμώσεις πραγματοποιήθηκαν σε δύο επίπεδα pH, $2 \pm 0,3$ και $6 \pm 0,3$. Το pH ρυθμίστηκε με διαλύματα HCl και NaOH συγκέντρωσης 5 M, τόσο στο αρχικό θρεπτικό μέσο, όσο και κατά τη διάρκεια της ζύμωσης. Οι καλλιέργειες διαμοιράστηκαν ισόποσα σε κωνικές φιάλες των 250 mL και εν συνεχεία στις περισσότερες περιπτώσεις αποστειρώθηκαν στους 121 ± 1 °C για 20 λεπτά, σε άλλες περιπτώσεις παστεριώθηκαν στους 65 ± 1 °C για 30 λεπτά, ενώ άλλες παρέμειναν μη θερμικώς επεξεργασμένες και εμβολιάστηκαν ασηπτικά με 1 mL υγρού εμβολίου, προερχόμενο από προκαλλιέργειες, για κάθε 50 mL θρεπτικού μέσου. Πριν τον εμβολιασμό της εκάστοτε κυρίως καλλιέργειας ελέγχθηκε σε κάθε περίπτωση η καθαρότητα του στελέχους, ώστε να διασφαλιστεί ότι δεν υπήρχε επιμόλυνση. Στην Εικόνα 2.2

απεικονίζονται τα κύτταρα του μικροοργανισμού και επιβεβαιώνεται η καθαρότητα του, ώστε να πραγματοποιηθεί ο εμβολισμός και να σημάνει την έναρξη της ζύμωσης.



Εικόνα 2.2 Έλεγχος καθαρότητας των κυττάρων της ζύμης *Y. lipolytica* μέσω οπτικού μικροσκοπίου πριν από εμβολιασμό κύριας καλλιέργειας.

2.4 ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΥΓΡΩΝ ΖΥΜΩΣΕΩΝ ΣΕ ΦΙΑΛΕΣ

Η πλειοψηφία των πειραματικών δοκιμών πραγματοποιήθηκε σε κωνικές φιάλες και αφορούσε την επίδραση ποικίλων συνθηκών με σκοπό τη μελέτη της μεταβολικής παραγωγικότητας των στελεχών. Βασικός κοινός παρονομαστής όλων των ζυμώσεων ήταν τα συστατικά της κυρίως καλλιέργειας, που αποτελείτο από βιομηχανική γλυκερόλη που προήρχετο από μετεστεροποίηση χρησιμοποιημένων/μαγειρεμένων ελαίων. Επιπλέον, η περιεκτικότητα της κυρίως καλλιέργειας συμπληρωνόταν με εκχύλισμα ζύμης, πεπτόνης και τέλος προστίθετο ρυθμιστικό διάλυμα για το pH και διάλυμα μετάλλων.

2.4.1 ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΗ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΩΝ

Στο πρώτο στάδιο συγκρίθηκαν υποστρώματα απόβλητης βιομηχανικής γλυκερόλης με γλυκερόλη χωρίς προσμίξεις σε ίδιες συνθήκες με σκοπό να διευκρινιστεί ότι είναι όλα αφομοιώσιμα από τους μικροοργανισμούς και δεν παρεμπόδισαν ή καθυστέρησαν την αύξηση τους.

2.4.2 ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΗ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ

Σε επόμενο εδάφιο και αφού πρότινος είχε επιλεγθεί το ποσοστό καθαρότητας που ευνόησε την παραγωγικότητα των στελεχών, τα οκτώ στελέχη της ζύμης *Y. lipolytica* εκτέθηκαν σε όμοιες συνθήκες, ώστε να συγκριθούν ως προς την ικανότητα τους να αφομοιώσουν πλήρως το υπόστρωμα και να παράξουν επαρκείς ποσότητες μεταβολιτών. Όλα τα στελέχη εξετάστηκαν ξεχωριστά σε «χαμηλό» και «υψηλό» pH ($2\pm 0,3$ και $6\pm 0,3$, αντιστοίχως). Οι παράμετροι που μελετήθηκαν αφορούσαν την επίδραση της θερμοκρασίας που επικρατούσε στη ζύμωση, την αρχική συγκέντρωση της γλυκερόλης στο θρεπτικό μέσο, τις συνθήκες θερμικής επεξεργασίας και μη, καθώς και την προσθήκη ποικίλων συγκεντρώσεων χλωριούχου νατρίου στο μέσο της αύξησης. Επισημαίνεται ότι η ανάδευση ήταν ίδια σε όλες τις ζυμώσεις βυθού, όπως επίσης και οι αρχικές συγκεντρώσεις των πηγών αζώτου (ήτοι του εκχυλίσματος ζύμης και της πεπτόνης – βλ. Πίνακα 2.2), ως εκ τούτου όταν αυξήθηκε η αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης (GI_{10}), αυξήθηκε και ο περιορισμός σε άζωτο. Συνελόντι ειπείν, όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε συνθήκες περιοριστικές ως προς την πηγή αζώτου, οι δε επαναλήψεις των πειραματικών δοκιμών έγιναν εις διπλούν και οι τιμές που παρατίθενται στα επόμενα εδάφια, στους πίνακες ή και στις εικόνες, είναι ο μέσος όρος δυο ανεξάρτητων μετρήσεων.

2.5 ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΥΓΡΩΝ ΖΥΜΩΣΕΩΝ ΣΕ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟ ΒΙΟΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΑ

Για την υλοποίηση αυτού του πειραματικού σταδίου και με γνώμονα τις προαναφερθείσες συνθήκες έκθεσης, επιλέχθηκε το πιο ανθεκτικό, αποδοτικό και παραγωγικό στέλεχος όλων, ώστε να μελετηθεί περαιτέρω σε ζυμώσεις εργαστηριακού βιοαντιδραστήρα (INFORS HT Labfors; Bottmingen, Switzerland). Το εμβόλιο αποτέλεσε το 10% του ενεργού όγκου της ζύμωσης. Ο ενεργός όγκος της ζύμωσης ήταν 1,5 L, ο δε συνολικός όγκος του βιοαντιδραστήρα ήταν 3 L. Ο αερισμός ορίστηκε στο 1,5 vvm (vessel volume per minute). Επιπρόσθετα, ο βιοαντιδραστήρας ήταν εξοπλισμένος με αισθητήρες για προσδιορισμό του pH, της θερμοκρασία και του διαλυτού οξυγόνου. Ο αέρας τροφοδοτήθηκε με έγχυση μέσω αποστειρωμένου φίλτρου (0,2 μm), με τη βοήθεια ενός δακτυλίου ψεκασμού στον πυθμένα του δοχείου. Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν στους 30 ± 1 °C. Η τιμή του pH διατηρήθηκε στο $2\pm 0,3$

και $6\pm 0,3$ αντίστοιχα και όταν χρειάστηκε πραγματοποιήθηκε προσθήκη 10 M NaOH ή HCl για τη διατήρηση των εκάστοτε συνθηκών, επίσης όποτε κρίθηκε αναγκαίο χρησιμοποιήθηκε αντιαφριστικό 204 (Sigma). Η συμπλήρωση υποστρώματος στην περίπτωση των ημι-συνεχών τροφοδοτούμενων ζυμών έγινε με αποστειρωμένη συμπυκνωμένη βιομηχανική γλυκερόλη συγκέντρωσης ~ 400 g/L, με την προσθήκη να γίνεται όταν η συγκέντρωση του υποστρώματος στο βιοαντιδραστήρα ήταν περίπου 5-10 g/L. Απώτερος σκοπός ήταν η επίτευξη των μέγιστων παραγόμενων μεταβολικών προϊόντων και των πολυολών. Οι συνθήκες έκθεσης των στελεχών ποικίλουν και σε αυτό το εδάφιο, καθώς τα επιλέξιμα στελέχη εκτέθηκαν τόσο σε υποστρώματα πλήρως θερμικώς επεξεργασμένα όσο και σε μη θερμικά επεξεργασμένα, καθώς και σε υψηλές (750 ± 5 rpm) και χαμηλές (250 ± 5 rpm) στροφές ανάδευσης σε συνδυασμό με όξινα και ελαφρώς όξινα περιβάλλοντα pH. Τα πειράματα ήταν κλειστά και ημι-συνεχή, με σταθερές συνθήκες θερμοκρασίας και αερισμού.

2.6 ΧΗΜΙΚΕΣ ΑΝΑΛΥΣΕΙΣ

2.6.1 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ pH

Πρώτο βήμα πριν τη δειγματοληψία αποτελούσε ο έλεγχος της καθαρότητας της καλλιέργειας σε οπτικό μικροσκόπιο (BA210, Motic, Barcelona, Spain), ώστε να εξασφαλιστεί πως δεν υπάρχει επιμόλυνση. Στη συνέχεια προσδιορίστηκε η τιμή pH της καλλιέργειας με πεχάμετρο (pH/mV meter HI 8014-Hanna Instruments, Woonsocket, RI, USA). Εάν η τιμή ήταν διαφορετική από το προβλεπόμενο εύρος, τότε ακολούθησε διόρθωση αυτής σε όλο τον όγκο της καλλιέργειας με αποστειρωμένο διάλυμα NaOH 5 M εάν η τιμή έπρεπε να αυξηθεί, ή HCl 5 M στην αντίθετη περίπτωση.

2.6.2 ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΜΑΖΑΣ

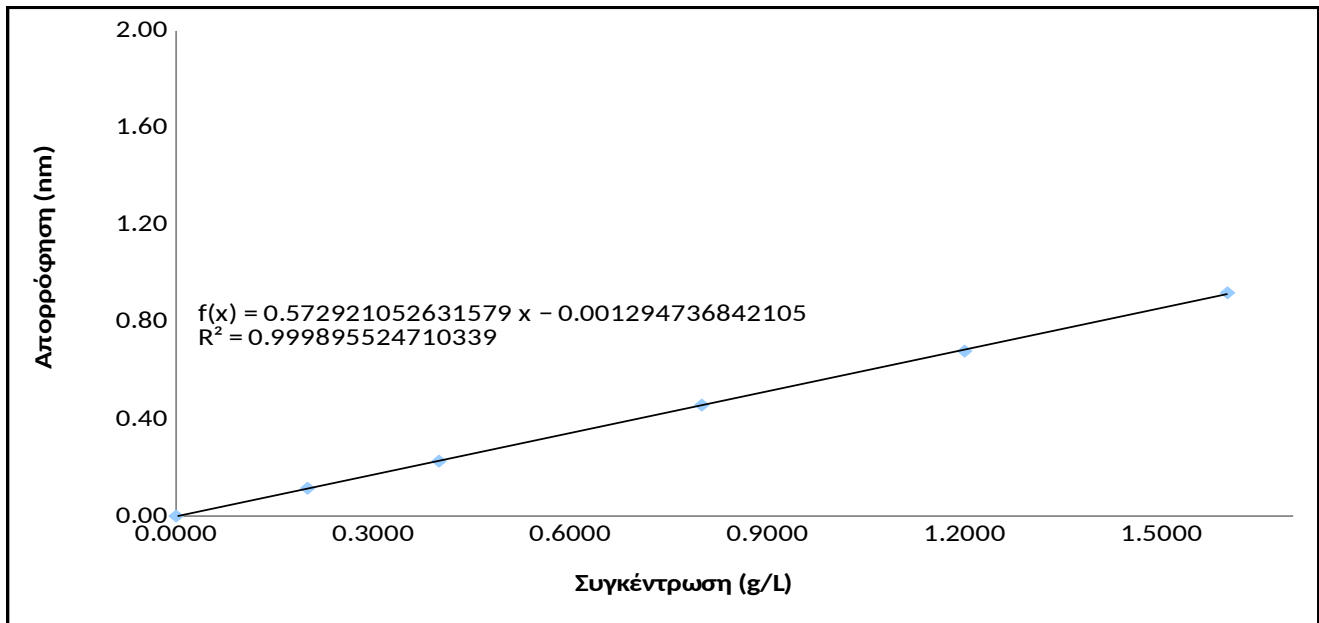
Η βιομάζα συλλέχθηκε έπειτα από φυγοκέντρηση σε φυγόκεντρο (Universal 320, Hettich, Kirchleugern, Germany) και στη συνέχεια για ξήρανση. Πιο αναλυτικά, η διαδικασία ξεκίνησε με φυγοκέντρηση καλλιέργειας για 10 λεπτά στους 4 ± 1 °C στα 9.000 ± 5 rpm, ώστε να παραληφθεί το υπερκείμενο. Ακολούθως, τα κύτταρα ξεπλύθηκαν από τα υπολείμματα του θρεπτικού μέσου με απιονισμένο νερό και η διαδικασία ολοκληρώθηκε με επανάληψη της φυγοκέντρησης και του ξεπλύματος για ακόμη δυο φορές. Η βιομάζα που παραλήφθηκε τελικώς, μεταφέρθηκε σε προζυγισμένα φιαλίδια McCartney, στη συνέχεια έγινε καταγραφή του νωπού βάρους και τοποθέτηση σε ξηραντήριο (UN, Memmert, Büchenbach, Germany) στους 80 ± 1 °C για περίπου 48-72 ώρες ή μέχρι να επιτευχθεί η σταθεροποίηση του βάρους. Τέλος τα φιαλίδια μετά την ξήρανση, τοποθετήθηκαν και παραμείναν για 1-3 ώρες σε αφυγραντήρα, με σκοπό την απομάκρυνση οποιασδήποτε υγρασίας και εν συνεχεία ζυγίστηκαν σε ζυγό ακριβείας τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων (ADB 100-4, Kern, Balingen, Germany). Ο

προσδιορισμός της ξηρής βιομάζας υπολογίστηκε από τη διαφορά με το νωπό προζυγισμένο φιαλίδιο και τα αποτελέσματα εκφράστηκαν σε g/L.

2.6.3 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΝΔΟΠΟΛΥΣΑΚΧΑΡΙΤΩΝ (IPS)

Οι παραγόμενοι ενδοπολυσακχαρίτες προσδιορίστηκαν ποσοτικά βασισμένοι σε ένα τροποποιημένο πρωτόκολλο μεθόδου των Liang et al. (2010) και Argyropoulos et al. (2022). Αρχικά παραλήφθηκαν 0,05 g ξηρής βιομάζας και τοποθετήθηκαν σε δοκιμαστικό σωλήνα. Έπειτα ακολουθούσε προσθήκη 10 mL υδροχλωρικού οξέος (HCl) συγκέντρωσης 2 M και υδρόλυση του διαλύματος στους 80 ± 1 °C για 30 λεπτά. Στη συνέχεια, προστέθηκαν 10 mL υδροξειδίου του νατρίου (NaOH) συγκέντρωσης 2 M, προκειμένου να πραγματοποιηθεί εξουδετέρωση του HCl και ακολουθούσε διήθηση με διπλό διηθητικό χαρτί, που αποσκοπούσε στην απομάκρυνση της βιομάζας, ώστε το διήθημα που παραλήφθηκε να ήταν διαυγές.

Τέλος για τον ποσοτικό προσδιορισμό των ενδοπολυσακχαριτών εφαρμόστηκε η μέθοδος για τον προσδιορισμό των αναγόντων σακχάρων με χρήση του 3,5-δινιτροσαλικυλικού οξέος (DNS) (Miller, 1959). Σε δοκιμαστικούς σωλήνες προστέθηκαν 0,5 mL αντιδραστηρίου DNS και 0,5 mL δείγματος. Ακολουθούσε ανάδευση και τοποθέτηση των δοκιμαστικών σωλήνων για βρασμό (100 ± 1 °C) για 5 λεπτά. Στη συνέχεια οι δοκιμαστικοί σωλήνες αφέθηκαν να κρυώσουν μέχρι να φτάσουν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και έπειτα προστέθηκαν 5 mL απιονισμένου νερού. Μετά από ανάδευση του διαλύματος, πραγματοποιήθηκε μέτρηση της απορρόφησης, στα 540 nm με φασματοφωτόμετρο (U-2000, Hitachi, Tokio, Japan). Η συγκέντρωση αναγόντων σακχάρων σε κάθε δείγμα στηρίχθηκε στον υπολογισμό της πρότυπης καμπύλης αναφοράς, που δεικνύεται στην Εικόνα 2.3 και εκφράστηκε σε ισοδύναμη συγκέντρωση γλυκόζης (g/L). Ο υπολογισμός του συντελεστή ενδοπολυσακχαριτών βασίστηκε στον λόγο της συγκέντρωσης των ενδοπολυσακχαριτών ως προς την παραγόμενη βιομάζα και εκφράστηκε ως % w/w.



Εικόνα 2.3 Πρότυπη καμπύλη αναφοράς για τον προσδιορισμό της γλυκόζης με την μέθοδο DNS.

2.6.4 ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΩΝ ΛΙΠΙΔΙΩΝ

Τα ενδοκυτταρικά λιπίδια εκχυλίστηκαν σε μίγμα οργανικών διαλυτών και συγκεκριμένα σε αναλογία 2:1 v/v, χλωροφόρμιο:μεθανόλη (Folch et al., 1957; Papanikolaou et al., 2001; Sarantou et al., 2021). Το προαναφερθέν μίγμα προστίθετο σε φιαλίδια McCartney που περιείχαν την ξηρή βιομάζα. Με αυτό το μίγμα στόχος ήταν να επιτευχθεί η εκχύλιση του συνολικού λίπους, δηλαδή των αποθηκευτικών και των δομικών λιπιδίων. Τα φιαλίδια έπειτα διατηρούνταν για τουλάχιστον 72 ώρες αεροστεγώς κλεισμένα σε συνθήκες σκότους, ώστε να αποφευχθεί η οξείδωση των λιπαρών υλών.

Εν συνεχεία το μίγμα βιομάζας-διαλυτών διηθείτο μέσω χάρτινου ηθμού (Whatman No 2) και εξατμίστηκε σε περιστροφικό εξατμιστήρα (Flash Evaporator–Rotavapor R-114, Büchi®, Flawil, Switzerland) υπό κενό, σε θερμοκρασία $45-50\pm 1$ °C, ώστε να απομακρυνθούν μέσω της εξάτμισης οι οργανικοί διαλύτες και να παραληφθεί το καθαρό λίπος σε προζυγισμένη φιάλη εξάτμισης. Το εναπομείναν μικροβιακό λίπος ζυγίζοταν σε ζυγό ακριβείας τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων και εκφραζόταν σε g/L. Ο υπολογισμός του συντελεστή μικροβιακού λίπους βασίστηκε στο λόγο της συγκέντρωσης των μικροβιακών λιπιδίων ως προς την παραγόμενη βιομάζα και εκφράστηκε ως % w/w.

2.6.5 ΜΕΘΥΛΕΣΤΕΡΟΠΟΙΗΣΗ ΛΙΠΑΡΩΝ ΟΞΕΩΝ

Ο προσδιορισμός της σύστασης των λιπιδίων σε λιπαρά οξέα υλοποιείτο μετά από μεθανόληση των λιπιδίων και μετατροπή των λιπαρών οξέων στους αντίστοιχους μεθυλεστέρες, προκειμένου να επιτευχθεί ανάλυση μέσω αέριας χρωματογραφίας. Οι μεθυλεστέρες είναι μόρια περισσότερο πτητικά και λιγότερο πολικά από τα λιπαρά οξέα. Η αντίδραση της μεθυλεστεροποίησης πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τη μέθοδο AFNOR (AFNOR, 1984). Η διαδικασία εστεροποίησης περιελάμβανε δυο

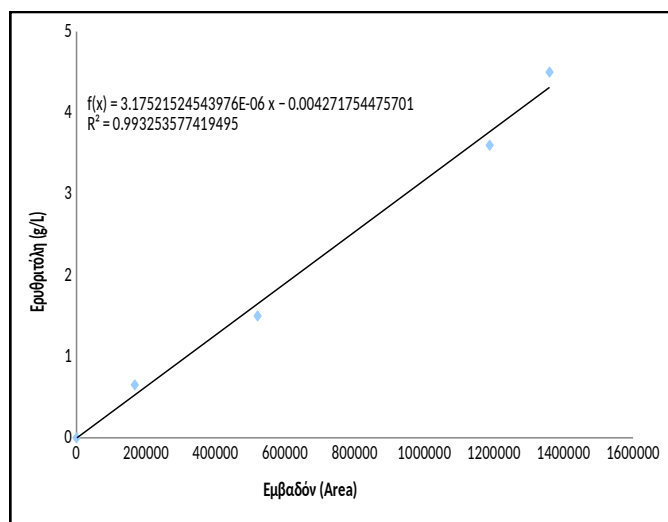
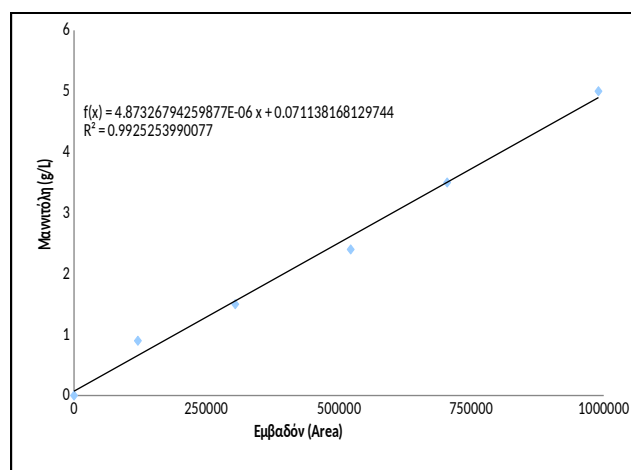
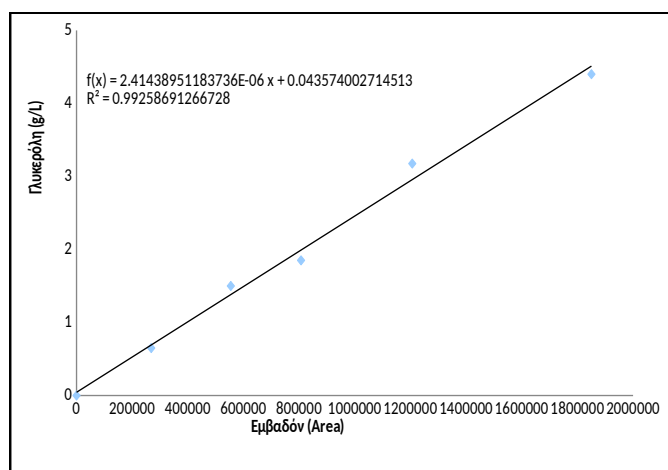
στάδια, το αλκαλικό περιβάλλον στην αρχή και εν συνεχεία το όξινο. Στο πρώτο σκέλος, πραγματοποιείτο η πυρηνόφιλη υποκατάσταση στο μόριο των τριγλυκεριδίων και των φωσφολιπιδίων που οδηγούσε στο τελικό προϊόν, τους αντίστοιχους μεθυλικούς εστέρες των λιπαρών οξέων. Συγχρόνως, τα ελεύθερα λιπαρά οξέα αντέδρασαν με το διάλυμα μεθοξειδίου του νατρίου και προέκυψαν οι αντίστοιχοι σάπωνες. Στο επόμενο σκέλος, πραγματοποιήθηκε μετατροπή των σαπώνων των λιπαρών οξέων στους αντίστοιχους μεθυλικούς εστέρες. Η προσθήκη νερού οδήγησε στη λήξη της αντίδρασης και οι μεθυλεστέρες παραλήφθηκαν με εκχύλιση εξανίου. Πιο αναλυτικά, η μέθοδος εφαρμόστηκε, ύστερα από την ανάλυση του προσδιορισμού του μικροβιακού λίπους. Στις σφαιρικές φιάλες με περιεχόμενο περίπου 100 mg λιπιδίων, προστίθεντο μερικές πέτρες βρασμού και 10 mL μεθοξειδίου του νατρίου, που περιείχε φαινολοφθαλεΐνη ως δείκτη pH και το μίγμα θερμάνθηκε σε κάθετους ψυκτήρες εωσότου επιτευχθεί ήπιος βρασμός. Μετά από 20 λεπτά προστέθηκε διάλυμα υδροχλωρικής μεθανόλης (περίπου 5-10 mL), μέχρις ότου το pH του μίγματος έγινε όξινο, αποχρωματίστηκε (αλλαγή χρώματος δείκτη από ερυθρό σε λευκό) και παράμεινε για βρασμό άλλα 20 λεπτά. Η αντίδραση διακόπηκε με την προσθήκη νερού και οι μεθυλεστέρες των λιπαρών οξέων παρελήφθησαν μετά από εκχύλιση με εξάνιο (προσθήκη 6 mL). Εν συνεχεία, εγένετο μεταφορά του δείγματος σε διαχωριστική χοάνη, ακολούθησε έντονη ανάδευση και έπειτα αφέθηκε σε ηρεμία, με απώτερο σκοπό το διαχωρισμό των φάσεων (η πάνω φάση ήταν η οργανική που συλλέχθηκε, καθώς περιείχε τους μεθυλεστέρες και η κάτω ήταν η υδάτινη που απορρίφθηκε). Η συλλογή της οργανικής φάσης πραγματοποιήθηκε σε ειδικά φιαλίδια, στη συνέχεια έγινε προσθήκη άνυδρου θειικού νατρίου για απορρόφηση της υγρασίας έως ότου δρομολογηθεί στον αέριο χρωματογράφο για περαιτέρω ανάλυση (Papanikolaou et al., 2009; Fakas et al., 2009; Diamantopoulou et al., 2023).

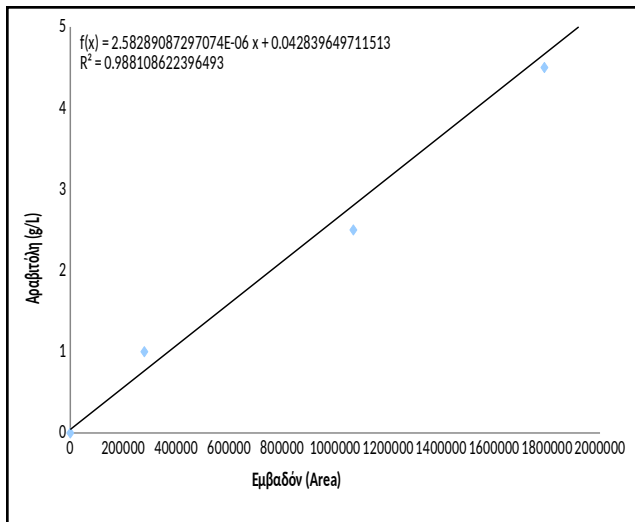
2.6.6 ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΕΡΙΑΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ

Οι μεθυλεστέρες των λιπιδίων αναλύθηκαν στα επιμέρους λιπαρά οξέα μέσω αέριου χρωματογράφου (GC8000, Fisons Instruments, Manchester, UK) που φέρει τριχοειδή στήλη CPWAX 52 CB διαστάσεων 32 m x 0.25 mm με ανιχνευτή Flame Ionization Detector. Ως φέρον αέριο χρησιμοποιήθηκε το ήλιο (He) με ροή 2 mL/min και ανάφλεξη H₂ (60 kPa), O₂ (110 kPa). Οι συνθήκες της ανάλυσης ήταν: θερμοκρασία στήλης 200±1 °C (ισόθερμη), θερμοκρασία εισαγωγέα 250±1 °C και ανιχνευτή 300±1 °C. Ο όγκος του δείγματος που εγχύθηκε στον εισαγωγέα ήταν 1 μL μέσω ειδικής σύριγγας. Η διάρκεια της ανάλυσης ολοκληρώθηκε σε 20 λεπτά, ενώ τα λιπαρά οξέα ταυτοποιήθηκαν με τη βοήθεια πρότυπου διαλύματος μεθυλεστέρων (F.A.M.E. Mix C8-C22, Supelco Analytical, USA) που περιελάμβανε τα βασικότερα εξ' αυτών. Η αναγνώριση εγένετο με βάση το χρόνο κατακράτησης τους. Ο όγκος του δείγματος που εγχύθηκε στον εισαγωγέα ήταν 1 μL και έγινε μέσω ειδικής σύριγγας.

2.6.7 ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΥΨΗΛΗΣ ΑΠΟΔΟΣΗΣ – ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΣΑΚΧΑΡΩΝ, ΠΟΛΥΟΛΩΝ ΚΑΙ ΟΡΓΑΝΙΚΩΝ ΟΞΕΩΝ

Το καταναλισκόμενο υπόστρωμα, το κιτρικό οξύ και οι παραγόμενες πολυόλες προσδιοριστήκαν μέσω της υγρή χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC). Η στήλη (Phenomenex®, Rezex™ ROA-Organic Acid H+ 8,0%) με την οποία πραγματοποιήθηκε ο διαχωρισμός των ουσιών και διέθετε συνδυασμό διαθλασιμέτρων (UV και RI), ώστε να ανιχνεύονται ξεχωριστά τα σάκχαρα, οι πολυόλες και τα οργανικά οξέα. Ως κινητή φάση (mobile phase) χρησιμοποιήθηκε διάλυμα θεικού οξέος (H₂SO₄) συγκέντρωσης 0,005 M, ο ρυθμός ροής (flow rate) ήταν 0,5 mL/min, η θερμοκρασία 60±1 °C με διάρκεια ανάλυσης 30 λεπτών και ο όγκος δείγματος δεν ξεπερνούσε τα 20 µL. Και σε αυτή την ανάλυση δεν έλειψε η ταυτοποίηση των σακχάρων μέσω ειδικών πρότυπων δειγμάτων που βασίστηκαν στο χρόνο κατακράτησης. Οι κύριες καμπύλες αναφοράς που τέθηκαν σε χρήση παρατίθενται στο σύμπλεγμα Εικόνων 2.4 που ακολουθεί.





Εικόνα 2.4 Απεικόνιση πρότυπων καμπυλών αναφοράς (γλυκερόλης, μαννιτόλης, ερυθριτόλης και αραβιτόλης) για τον προσδιορισμό των σακχάρων με την HPLC.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

3.1 ΓΕΝΙΚΗ ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ

Στόχος αυτής της διδακτορικής διατριβής ήταν η έρευνα της βιοχημικής και φυσιολογικής συμπεριφοράς διαφόρων στελεχών της ζύμης *Yarrowia lipolytica*. Η μελέτη επικεντρώθηκε στα πλαίσια της αύξησης των στελεχών σε υπόστρωμα απόβλητης γλυκερόλης προς παραγωγή κυρίως πολυολών, ομάδας υδατανθράκων με χαμηλή θερμική αξία και συγχρόνως σημαντικές για τη βιομηχανία των τροφίμων. Στο πρώτο πειραματικό σκέλος, επιλέχθηκε ενδεικτικά το στέλεχος FMCC Y-74, με σκοπό να δοκιμαστεί σε καθαρή (100 % w/w) και ακάθαρτη βιομηχανική γλυκερόλη (85% w/w) ως πηγή άνθρακα, στοχεύοντας στην επιλογή υποστρώματος που ευνοεί περισσότερο την παραγωγή μεταβολικών προϊόντων. Εν συνεχεία, όλα στελέχη που αποτέλεσαν το βιολογικό υλικό της ερευνητικής πορείας (FMCC Y-74, FMCC Y-75, LGAM S7(1), Po1d (CLIB 139), ACA-YC 5030, LMBF 20, NRRL Y-323 και NRRL Y-423) καλλιεργήθηκαν σε αναδευόμενες φιάλες με υπόστρωμα γλυκερόλης, αρχικής συγκεντρώσεως ~40 g/L, σε θερμοκρασία 30 ± 1 °C και σε έκθεση δυο επιπέδων pH ($2 \pm 0,3$ και $6 \pm 0,3$), ώστε να αξιολογηθούν βάσει του δυναμικού παραγωγής τους. Με το πέρας των ζυμώνσεων ελέγχου και αφού αξιολογήθηκαν τα στελέχη με βάση την παραγωγή πολυολών και του συντελεστή τους, επιλέχθηκαν τέσσερα από τα άνωθεν, τα οποία όταν εκτέθηκαν στις συνθήκες αξιολόγησης υποστρώματος, διακρίθηκαν, καθώς παρήγαγαν πολύ ικανοποιητικές ποσότητες πολυολών και μελετήθηκαν εκτενέστερα σε επιδράσεις ποικίλων συνθηκών καταπόνησης. Συμπληρωματικά των παραπάνω πραγματοποιήθηκαν πειράματα σε εργαστηριακό βιοαντιδραστήρα, με τα στελέχη που ξεχώρισαν για την απόδοσή τους, στο πλήθος των πειραματικών σταδίων που έλαβαν χώρα προηγουμένως και εκτέθηκαν περαιτέρω σε συνθήκες θερμικής και μη επεξεργασίας υποστρώματος, καθώς και σε συνδυαστικές συνθήκες pH και ανάδευσης, στοχεύοντας εξ' ολοκλήρου και αμείωτα στη μέγιστη παραγωγή πολυολών.

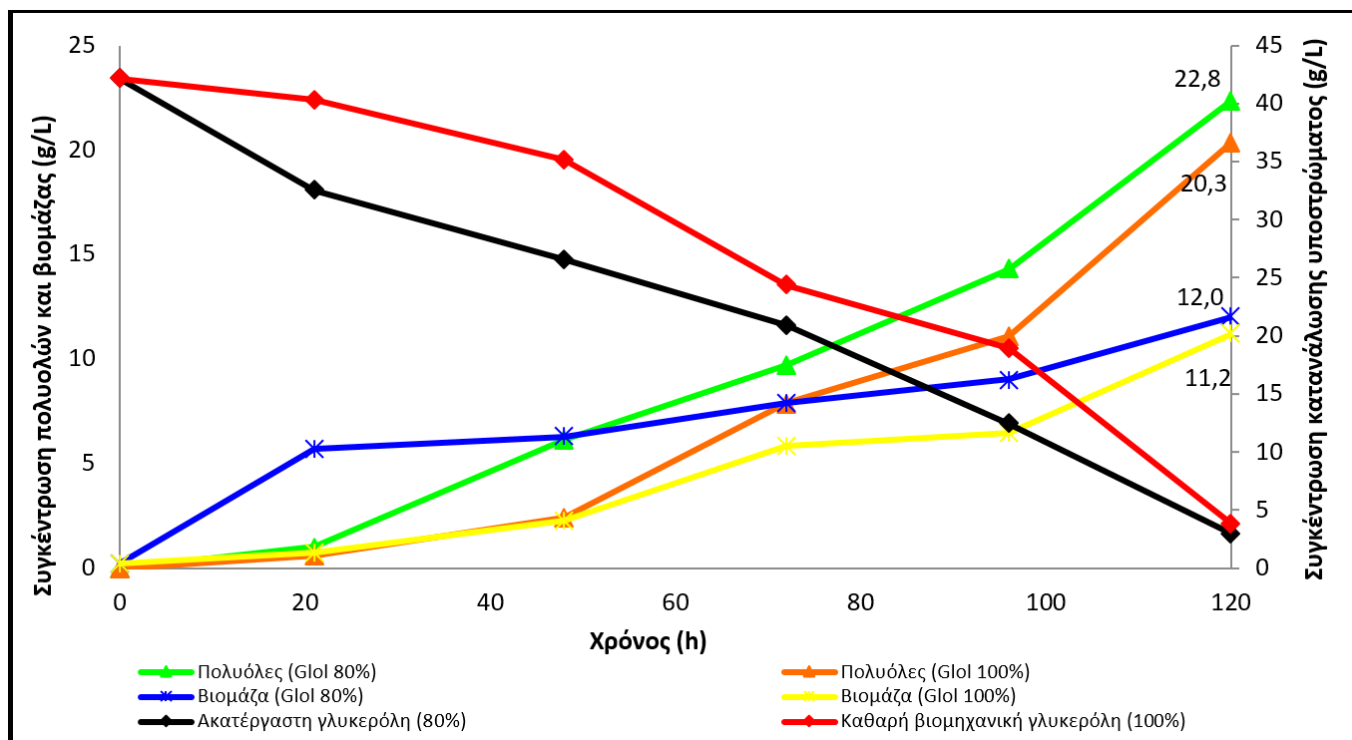
3.2 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΚΑΘΑΡΟΤΗΤΑΣ ΓΛΥΚΕΡΟΛΗΣ ΣΤΗΝ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΠΟΛΥΟΛΩΝ ΑΠΟ ΤΟ ΣΤΕΛΕΧΟΣ ΤΗΣ ΖΥΜΗΣ *Yarrowia lipolytica* FMCC Y-74

Σε αυτό το μέρος της μελέτης, ήταν επιθυμητό να αξιολογηθεί η επίδραση της καθαρότητας του υποστρώματος (χρήση είτε καθαρής βιομηχανικής γλυκερόλης, είτε ακατέργαστης γλυκερόλης, που προέρχεται από μετεστεροποίηση χρησιμοποιημένων/μαγειρεμένων ελαίων) στη φυσιολογική συμπεριφορά του στελέχους. Λαμβάνοντας υπόψη ότι το στέλεχος FMCC Y-74 αφομοιώνει αποτελεσματικά τη γλυκερόλη για την παραγωγή πολυολών (κυρίως, μαννιτόλης) με υψηλές αποδόσεις μετατροπής, επιλέχθηκε για διερεύνηση της αφομοίωσης και της απόδοσης του υποστρώματος προς παραγωγή σημαντικών μεταβολιτών.

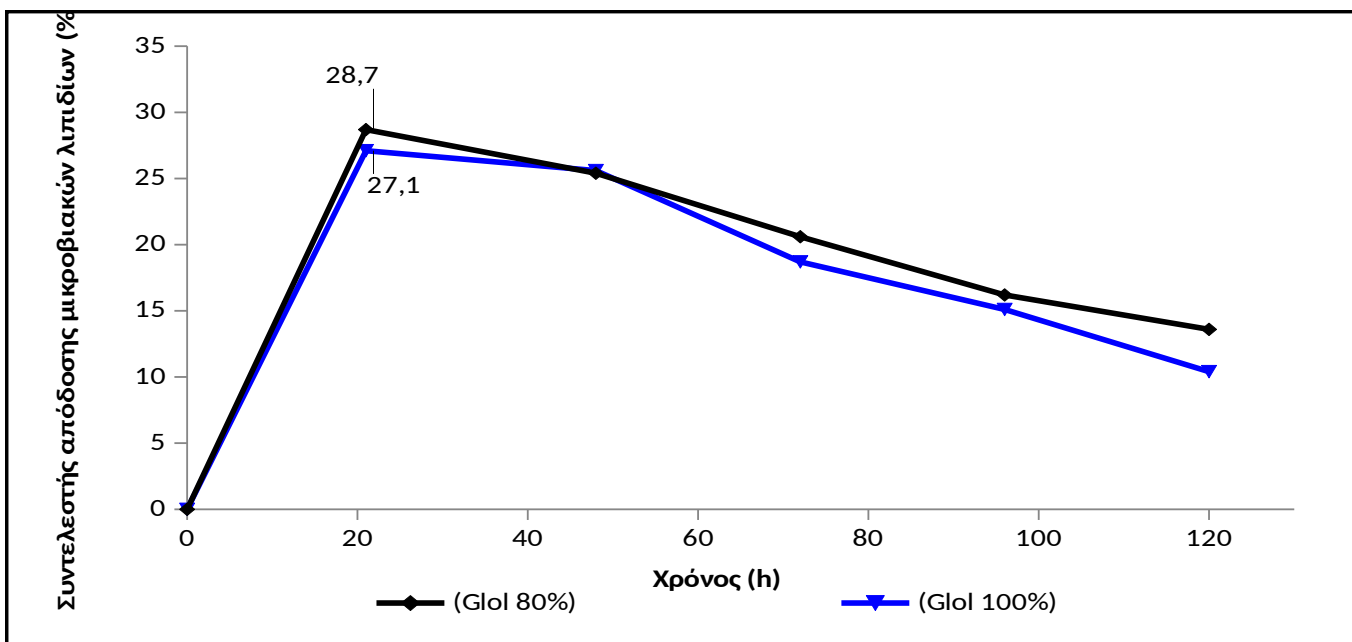
Στόχος ήταν να εκτεθεί σε υπόστρωμα καθαρής βιομηχανικής γλυκερόλης, ώστε να συγκριθεί με όμοιο πείραμα που είχε διεξαχθεί σε υπόστρωμα ακατέργαστης γλυκερόλης. Αυτή η απόφαση λήφθηκε για να εξακριβωθεί ότι όλες οι πιθανές αλλαγές που παρατηρήθηκαν στον κυτταρικό μεταβολισμό οφείλονταν μόνο στους μεταβλητούς παράγοντες συνθηκών που ορίστηκαν στο μέσο και όχι στην πιθανή συσσώρευση ακατέργαστων ακαθαρσιών γλυκερόλης στο μέσο. Η τιμή pH που επιλέχθηκε για τις δοκιμές ήταν $2\pm 0,3$, καθώς σε τιμή pH $2\pm 0,3$ το στέλεχος FMCC Y-74 παρουσιάζει αξιόλογη παραγωγή μαννιτόλης, ενώ η παραγωγή της βιομάζας και η αφομοίωση της γλυκερόλης είναι εξίσου σημαντικές. Η αρχική συγκέντρωση υποστρώματος ορίστηκε στα $\text{Glol}_0 \sim 40 \text{ g/L}$ και η θερμοκρασίας της ζύμωσης στους $30\pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$, συνθήκες που ενδείκνυνται για το στέλεχος (Papanikolaou et al., 2002b; Papanikolaou et al., 2020; Wierzchowska et al., 2021). Επομένως, η αποτελεσματικότητα του στελέχους στη μετατροπή διαφόρων πρώτων υλών γλυκερόλης για την παραγωγή πολυολών και βιομάζας αξιολογήθηκε και οι αναλύσεις απέδωσαν ότι η παραγωγή βιομάζας που παράχθηκε έφτασε τα 12 g/L σε καλλιέργεια με χρήση ακατέργαστης γλυκερόλης που προήλθε από μετεστεροποίηση χρησιμοποιημένων/μαγειρεμένων ελαίων. Στην περίπτωση της καθαρής βιομηχανικής γλυκερόλης, η μέγιστη συγκέντρωση βιομάζας κινήθηκε σε παρόμοια επίπεδα $11,2 \text{ g/L}$, υποδεικνύοντας ότι η παραγωγή βιομάζας δεν επηρεάστηκε από την παρουσία (ή την απουσία) ακαθαρσιών που βρέθηκαν στο μέσο της καλλιέργειας. Συνεπώς, η αφομοίωση της γλυκερόλης δεν επηρεάστηκε από τη χρήση καθαρής ή ακατέργαστης γλυκερόλης. Επιπροσθέτως, παρατηρήθηκε ότι σχεδόν όλη η συγκέντρωση υποστρώματος ($90\text{-}95\% \text{ w/w}$ επί του συνόλου) είχε καταναλωθεί $144\text{-}151$ ώρες μετά τον εμβολιασμό. Η συνολική παραγωγή πολυολών ήταν $22,8 \text{ g/L}$ με αντίστοιχο συντελεστή απόδοσης ($Y_{\text{POL/GlOl}}$) $57,1\% \text{ w/w}$ στην ακατέργαστη γλυκερόλη. Συγκρίσιμες τιμές και ελαφρώς χαμηλότερες ελήφθησαν χρησιμοποιώντας καθαρή βιομηχανική γλυκερόλη ($20,3 \text{ g/L}$ και $53,1\% \text{ w/w}$, αντίστοιχα). Η κυρίαρχη πολυόλη ήταν η μαννιτόλη και στις δύο περιπτώσεις.

Τα προαναφερθέντα αποτελέσματα παρουσιάζουν ότι τα κύτταρα του στελέχους FMCC Y-74 δεν επηρεάστηκαν σημαντικά από την καθαρότητα της γλυκερόλης. Άξιο προσοχής έγκειται ότι η αφομοίωση της ακατέργαστη γλυκερόλη παρήγαγε ελαφρώς καλύτερες συγκεντρώσεις, όπως διαφαίνεται

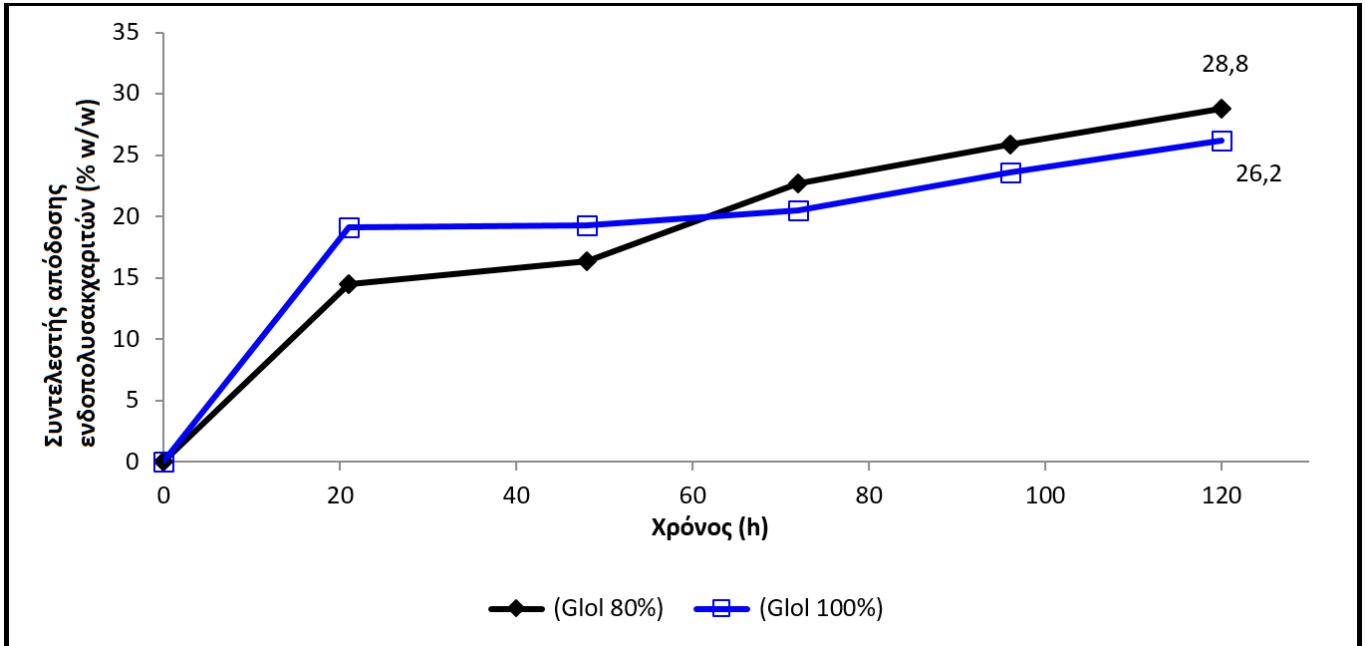
στις Εικόνες 3.1, 3.2, 3.3 και 3.4, που παρουσιάζεται η κατανάλωση γλυκερόλης, η παραγωγή πολυολών και βιομάζας, καθώς και οι συντελεστές των ενδοκυτταρικών προϊόντων.



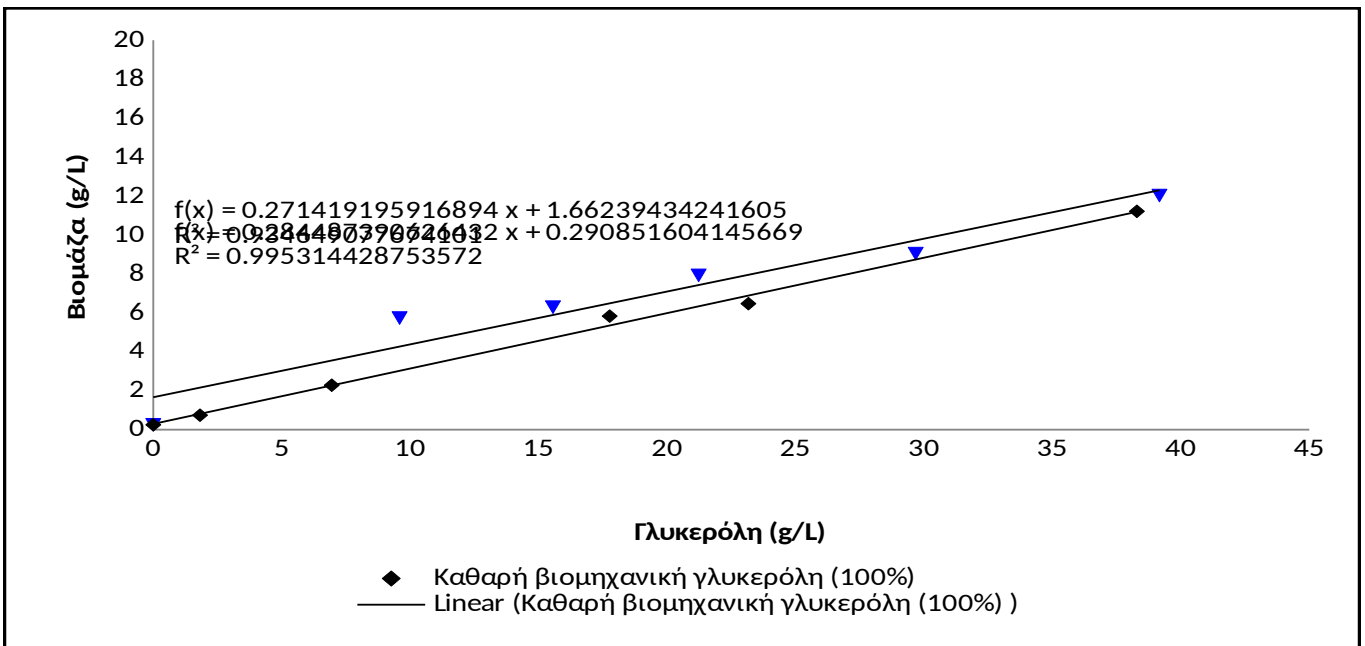
Εικόνα 3.1 Απεικόνιση της παραγωγής πολυολών για ακατέργαστη γλυκερόλη (▲), πολυολών για καθαρή γλυκερόλη (▲), βιομάζας για ακατέργαστη γλυκερόλη (*), βιομάζας για καθαρή γλυκερόλη (*) και της κατανάλωσης υποστρώματος γλυκερόλης σε συνάρτηση με τον χρόνο, από *Y. lipolytica* FMCC Y-74 κατά τη διάρκεια καλλιέργειας σε υπόστρωμα με βάση τη γλυκερόλη (GloI₀ ~40 g/L) pH 2±0,3. Συνθήκες καλλιέργειας: Ανακινούμενες κωνικές φιάλες των 250 mL στις 180±5 rpm και θερμοκρασία επώασης T=30±1 °C σε υπόστρωμα ακατέργαστης βιομηχανικής γλυκερόλης (◆) και καθαρής (♦). Κάθε πειραματικό σημείο που παρουσιάζεται είναι η μέση τιμή δύο ανεξάρτητων προσδιορισμών από διαφορετικά αρχικά εμβόλια.



Εικόνα 3.2 Απεικόνιση της παραγωγής μικροβιακών λιπιδίων σε συνάρτηση με τον χρόνο, από *Y. lipolytica* FMCC Y-74 κατά τη διάρκεια καλλιέργειας σε υπόστρωμα με βάση τη γλυκερόλη (GloI₀ ~40 g/L) pH 2±0,3. Συνθήκες καλλιέργειας: Ανακινούμενες κωνικές φιάλες των 250 mL στις 180±5 rpm και θερμοκρασία επώασης T=30±1 °C σε υπόστρωμα ακατέργαστης βιομηχανικής γλυκερόλης (◆) και καθαρής (□). Κάθε πειραματικό σημείο που παρουσιάζεται είναι η μέση τιμή δύο ανεξάρτητων προσδιορισμών από διαφορετικά αρχικά εμβόλια.



Εικόνα 3.3 Απεικόνιση της παραγωγής ενδοπολυσακχαριτών σε συνάρτηση με τον χρόνο, από *Y. lipolytica* FMCC Y-74 κατά τη διάρκεια καλλιέργειας σε υπόστρωμα με βάση τη γλυκερόλη (Glol₀ ~40 g/L) pH 2±0,3. Συνθήκες καλλιέργειας: Ανακινούμενες κωνικές φιάλες των 250 mL στις 180±5 rpm και θερμοκρασία επώασης T=30±1 °C σε υπόστρωμα ακατέργαστης βιομηχανικής γλυκερόλης (♦) και καθαρής (□). Κάθε πειραματικό σημείο που παρουσιάζεται είναι η μέση τιμή δύο ανεξάρτητων προσδιορισμών από διαφορετικά αρχικά εμβόλια.



Εικόνα 3.4 Παραγόμενη κυτταρική μάζα ως συνάρτηση της καταναλωθείσας γλυκερόλης κατά την αύξηση του στελέχους FMCC Y-74 σε θρεπτικά μέσα καθαρής (♦) και ακατέργαστης γλυκερόλης (□), από *Y. lipolytica* FMCC Y-74 κατά τη διάρκεια καλλιέργειας σε υπόστρωμα με βάση τη γλυκερόλη (Glol₀ ~40 g/L) pH 2±0,3. Συνθήκες καλλιέργειας: ζύμωση σε ανακινούμενες κωνικές φιάλες των 250 mL στις 180±5 rpm και θερμοκρασία επώασης T=30±1 °C. Κάθε πειραματικό σημείο που παρουσιάζεται είναι η μέση τιμή δύο ανεξάρτητων προσδιορισμών από διαφορετικά αρχικά εμβόλια.

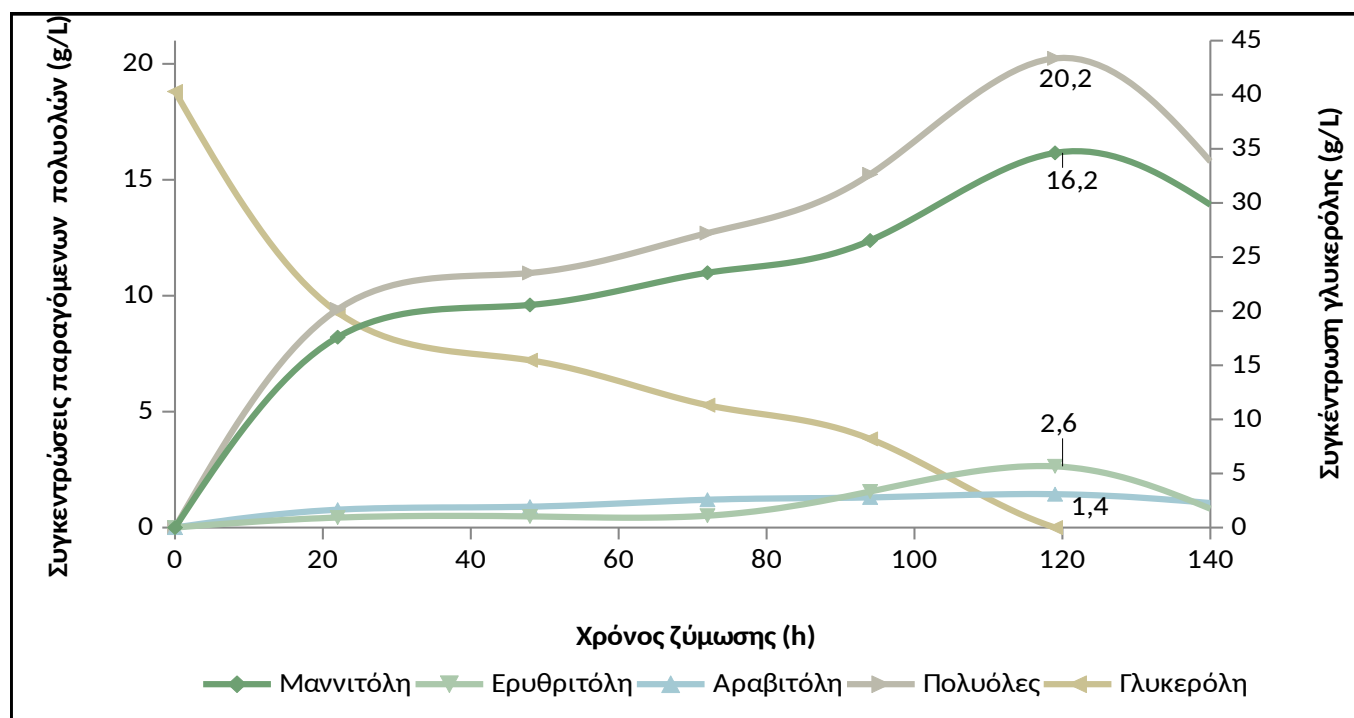
3.3 ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΗ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΩΝ ΑΥΞΗΣΗΣ ΟΚΤΩ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΤΗΣ ΖΥΜΗΣ *Yarrowia lipolytica*

Σε αυτό το πειραματικό στάδιο, διερευνήθηκε ένας αρκετά σημαντικός αριθμός στελεχών της ζύμης *Y. lipolytica* ως προς την ικανότητα τους να μεταβολίσουν την απόβλητη γλυκερόλη, προϊόν μετεστεροποίησης χρησιμοποιημένων/μαγειρεμένων ελαίων. Αρχικώς, εξετάστηκε η επάρκεια τους να καταναλώσουν πλήρως το υπόστρωμα και έπειτα ακολούθησαν χημικές αναλύσεις και προσδιορισμός μεταβολικών προϊόντων. Κατά τη διάρκεια της κινητικής των καλλιεργειών μελετήθηκαν τα δεδομένα της μικροβιακής αύξησης: παραγωγή βιομάζας, παραγωγή πολυολών (μαννιτόλης, αραβιτόλης και ερυθριτόλης), καταναλισκόμενη πηγή άνθρακα (γλυκερόλη), παραγωγή ενδοπολυσακχαριτών (IPS), καθώς και παραγωγή μικροβιακών λιπιδίων συνοδευόμενα από την ποσοστιαία ανάλυση των λιπαρών οξέων.

Τα στελέχη της ζύμης *Y. lipolytica* (FMCC Y-74, FMCC Y-75, LGAM S7(1), Po1d (CLIB 139), ACA-YC 5030, LMBF 20, NRRL Y-423 και NRRL Y-323) καλλιεργήθηκαν υπό συνθήκες περιοριστικές ως προς την πηγή αζώτου, σε υπόστρωμα βιομηχανικής γλυκερόλης με αρχική συγκέντρωση ~40 g/L, θερμοκρασία 30±1 °C σε ανακινούμενες φιάλες. Το μεταβολικό προϊόν που υπερίσχυσε ήταν οι πολυόλες, με κυρίαρχη άλλοτε την ερυθριτόλη και άλλοτε τη μαννιτόλη, κάτι το οποίο εξαρτήθηκε από τις συνθήκες καλλιέργειας και το στέλεχος.

Τα στελέχη της ζύμης *Y. lipolytica* καλλιεργήθηκαν σε δύο διαφορετικές αρχικές τιμές του pH (2±0,3 και 6±0,3). Παρατηρήθηκε γενικά, πως στα στελέχη της ζύμης, η χαμηλή τιμή του pH ευνοεί τη συγκέντρωση των πολυολών, σε αντίθεση με την παραγόμενη βιομάζα που αυξάνεται κατά κύριο λόγο στην υψηλότερη τιμή pH. Όλα τα στελέχη αντέδρασαν ικανοποιητικά στην κατανάλωση του υποστρώματος βιομηχανικής γλυκερόλης, αλλά δεν παρήγαγαν ικανοποιητικές ποσότητες μικροβιακού λίπους και ενδοπολυσακχαριτών, καθόσον θεωρείται ότι οι ενδοπολυσακχαρίτες, όπως και τα λιπίδια, συσσωρεύονται κατά τη στάσιμη φάση της αύξησης, όταν η συγκέντρωση του αζώτου έχει κατέλθει ενός κρίσιμου ορίου (Papanikolaou and Aggelis et al., 2009). Ωστόσο, παρήχθησαν ικανοποιητικές ποσότητες ξηρής βιομάζας, με τα στελέχη FMCC Y-74 και NRRL Y-323 να ξεχωρίζουν για τις τιμές τους σε ελαφρώς όξινο pH (11,4 g/L και 11,1 g/L, αντίστοιχα). Από τον Πίνακα 3.1 επιβεβαιώνεται ότι η υψηλή τιμή pH που αναπτύχθηκαν τα στελέχη προήγαγε την παραγωγή της βιομάζας σε σύγκριση με το πολύ όξινο περιβάλλον (2±0,3).

Στις εκκρινόμενες πολυόλες φάνηκε να υπερισχύει η παραγωγή κυρίως της μαννιτόλης. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι παρατηρήθηκε ανακατανάλωση των πολυολών, μετά την πλήρη αποζύμωση του αρχικού υποστρώματος, όπως δείχνει η Εικόνα 3.5. Εντούτοις, η σειρά με την οποία φαίνεται να επηρεάζεται η έναρξη της ανακατανάλωσης εικάζεται ότι εξαρτάται από το πλήθος των ατόμων άνθρακα. Συγκεκριμένα, ενδέχεται η ανακατανάλωση των πολυολών να ξεκινάει από την πολυόλη με τα λιγότερα άτομα άνθρακα.



Εικόνα 3.5 Απεικόνιση παραγωγής μαννιτόλης (♦), ερυθριτόλης (□), αραβιτόλης (▲), συνολικών πολυολών (×) και η κατανάλωση γλυκερόλης (*) σε συνάρτηση με τον χρόνο του στελέχους ACA-YC 5030 σε υπόστρωμα με βάση τη γλυκερόλη (G10₀ ~40 g/L) σε ελαφρώς όξινες τιμές pH. Συνθήκες καλλιέργειας: ζύμωση σε ανακινούμενες κωνικές φιάλες των 250 mL στις 180±5 rpm και θερμοκρασία επώασης T=30±1 °C. Κάθε πειραματικό σημείο που παρουσιάζεται είναι η μέση τιμή δύο ανεξάρτητων προσδιορισμών από διαφορετικά αρχικά εμβόλια.

Με βάση τα αποτελέσματα του Πίνακα 3.1, ξεχώρισαν τέσσερα στελέχη με γνώμονα τις αποδόσεις τους στο σύνολο της παραγωγής των μεταβολικών προϊόντων. Τα στελέχη ήταν το FMCC Y-74, ACA-YC 5030, LMBF 20 και NRRL Y-323 και χρησιμοποιήθηκαν ως βιολογικό υλικό στα επόμενα στάδια της πειραματικής διαδικασίας, καθώς σημείωσαν εξίσου υψηλές τιμές ξηρής βιομάζας και πολυολών. Πιο αναλυτικά, σε συνθήκες όξινου περιβάλλοντος (2±0,3), το στέλεχος FMCC Y-74 παράγαγε συνολικές πολυόλες 26 g/L με κυρίαρχη την μαννιτόλη (21,2 g/L), ακολούθησε το στέλεχος ACA-YC 5030 με παραγωγή πολυολών στα ίδια επίπεδα (25,9 g/L), το στέλεχος LMBF 20 παράγαγε 22,2 g/L, ενώ το στέλεχος NRRL Y-323 σημείωσε την υψηλότερη τιμή που καταγράφηκε σε αυτό το πειραματικό στάδιο για την παραγωγή της ερυθριτόλης (9,9 g/L) παρόλο που δεν ήταν η επικρατούσα πολυόλη και μέγιστη τιμή πολυολών 25,6 g/L. Τα υπόλοιπα στελέχη έδωσαν ικανοποιητικές ποσότητες μεταβολιτών χωρίς ωστόσο να ξεχωρίσουν για τις επιδόσεις τους. Συγκεκριμένα, η παραγωγή των πολυολών κυμάνθηκε σε συγκεντρώσεις <20 g/L, συνθήκη που επαληθεύεται και από τους συντελεστές απόδοσης ($Y_{POL/G10_0}$, % w/w), όπως φαίνεται και στον Πίνακα 3.1 που έπεται.

Σημαντική ήταν η παραγωγή πολυολών για τιμές pH 6±0,3, η οποία ενδείκνυται κυρίως για παραγωγή κιτρικού οξέος, ενδοπολυσακχαριτών και μικροβιακού λίπους (Rymowicz et al., 2006; Tomaszewska et al., 2012; Diamantopoulou et al., 2023). Ωστόσο, παρά το γεγονός της παρουσίας σχετικά υψηλής τιμής του pH, η οποία θεωρητικά δεν ευνοεί τη βιοσύνθεση και έκκριση πολυολών (Papanikolaou et al., 2017a; 2017b; Diamantopoulou et al., 2023), τα στελέχη FMCC Y-74, ACA-YC

5030, NRRL Y-323 και LMBF 20 ανταπεξήλθαν και στάθηκαν ικανά να παράξουν ποσότητες πολυολών άνω των ~20 g/L. Συγκεκριμένα το στέλεχος FMCC Y-74 παράγαγε 21,9 g/L, το ACA-YC 5030 πέτυχε παραγωγή 20,2 g/L και μετά την αφομοίωση του υποστρώματος ξεκίνησε την ανακατανάλωση τους, το NRRL Y-323 έφτασε τα 22 g/L και τέλος το LMBF 20 παράγαγε 20,3 g/L. Οι αντίστοιχοι συντελεστές απόδοσης πολυολών προς την αναλωθείσα γλυκερόλη κυμάνθηκαν περίπου 49-54,5% w/w. Η μεγαλύτερη τιμή σημειώθηκε από το στέλεχος FMCC Y-74. Ακόμα, παρατηρήθηκε από το στέλεχος Po1d (CLIB 139) υψηλή παραγωγή πολυολών (16,4 g/L) σε σύγκριση με την τιμή που πάρθηκε κατά τη ζύμωση σε πολύ όξινο περιβάλλον (pH=2±0,3, 10 g/L), δεδομένο που δε συνάδει τόσο με τη βιβλιογραφία, καθώς και την ενίσχυση παραγωγής της αραβιτόλης κάτω από ελαφρώς όξινες συνθήκες. Τα υπόλοιπα στελέχη (δηλαδή τα FMCC Y-75, LGAM S7 (1) και NRRL Y-423) επιβεβαίωσαν τη μείωση της παραγωγής πολυολών σε συνθήκες ελαφρώς όξινου pH (6±0,3) (σε συμφωνία με: Rywińska et al., 2013; Tomaszewska et al., 2014).

Όσον αφορά την παραγωγή λιπιδίων τα στελέχη δεν έδειξαν αξιοσημείωτες ποσότητες, παρόλο που η ζύμη *Y. lipolytica* χαρακτηρίζεται ως ελαιογόνος ζύμη. Η πλειοψηφία των στελεχών συσσωρεύσε ποσοστά μικρότερα του ~20% w/w. Η πορεία της λιποσυσσωρεύσης ήταν αύξουσα κατά τα πρώιμα στάδια των ζυμώσεων όταν υπήρχε η επάρκεια του αζώτου και στη συνέχεια ακολούθησαν φθίνουσα πορεία (σε συμφωνία με τα αποτελέσματα από: Makri et al., 2010; Filippousi et al., 2019; Sarantou et al., 2021). Εξάιρεση αποτέλεσε το στέλεχος NRRL Y-323 που είχε ποσοστό 37,4% w/w για υψηλή τιμή pH (6±0,3) και 27,5% w/w για το αντίστοιχο χαμηλό pH (2±0,3), όπως φαίνεται στον Πίνακα 3.1 με τα ποσοτικά δεδομένα των στελεχών σε διαφορετικές τιμές pH.

Μια ακόμα παράμετρος που μελετήθηκε ήταν ο συντελεστής ενδοπολυσακχαριτών βάσει της παραγόμενης βιομάζας. Η παραγωγή ενδοπολυσακχαριτών ξεχώρισε για το στέλεχος LGAM S7 (1) με ποσοστό 29,3 % w/w και 30,9% w/w και στις δυο συνθήκες pH (2±0,3 και 6±0,3, αντίστοιχα). Τα υπόλοιπα στελέχη δεν κατάφεραν να σχηματίσουν ποσοστά μεγαλύτερα του ~22% w/w, υποδεικνύοντας γενικότερα μια σταθερή εικόνα στην παραγωγή των ενδοπολυσακχαριτών.

Πίνακας 3.1. Ποσοτικά δεδομένα καλλιεργούμενων στελεχών *Y. lipolytica* σε υπόστρωμα με βάση τη γλυκερόλη (Glo₀ ~40 g/L) σε διαφορετικές τιμές pH. Συνθήκες καλλιέργειας: ζύμωση σε ανακινούμενες κωνικές φιάλες των 250 mL σε ανάδευση 180±5 rpm και θερμοκρασία επώασης T=30±1°C. Κάθε πειραματικό σημείο που παρουσιάζεται είναι η μέση τιμή δύο ανεξάρτητων προσδιορισμών από διαφορετικά αρχικά εμβόλια.

	Strains	Time (h)	Glo ₀ (g/L)	X (g/L)	MI (g/L)	Ery (g/L)	Ara (g/L)	POL (g/L)	Y _{POL/Glo₀} (% w/w)	Y _{IPS/X} (% w/w)	Y _{L/X} (% w/w)	CA (g/L)	
pH 2±0,3	FMCC Y-74	48	ε	26,2	6,6	13,9	1,8	nd	15,7	59,8	19,8	16,6	nd
		144	α,β,γ,δ,ζ	43,5	9,8	21,2	3,5	1,4	26	59,8	11,4	19,7	nd
	FMCC Y-75	48	δ	32,8	8,6	8,1	0,2	2,5	10,8	33,1	14,7	14,8	nd
		96	ε,ζ	37,1	8,9	10,5	1	1,4	12,9	34,7	14,6	18,9	nd
	LGAM S7 (1)	144	α,β,γ	39,5	9	10,9	1,2	0,8	12,9	32,8	11,8	4,1	nd
		92	ζ	21,2	2,9	4,2	1,8	2,3	8,3	39	22,9	19,5	nd
		140	δ	42,5	3,8	10,5	3,6	3,8	17,9	42,1	27,3	19,4	nd
	Polid (CLIB 139)	164	α,β,γ,ε	42,5	3,9	11,1	4,2	2,5	17,8	41,8	29,3	14	nd
		76	ζ	18,6	2,3	6,7	0,4	nd	7,1	38,3	5,7	18,4	nd
	ACA-YC 5030	140	α,β,γ	22,6	3,6	8,9	1,2	nd	10	44,2	6,1	4,2	nd
		22	ζ	16,1	2,4	7,3	0,3	0,4	7,9	49,1	14,2	9,6	nd
	LMBF 20	141	α,β,γ,δ,ε	43,3	7,1	16	3,9	5,9	25,9	59,7	14,7	4,1	nd
		52	ζ	224	4,3	11,1	2,2	0,1	13,3	59,6	18,2	14,5	nd
		121	ε	30,9	5,1	12,5	3,6	2,2	18,3	59,1	20,3	10,6	nd
	NRRL Y-423	140	α,β,γ,δ	40,8	6,4	14,2	4,5	3,5	22,2	54,3	14,1	5,6	nd
53		ζ	12,1	1,1	3,1	1,2	0,2	4,5	36,9	8,9	12,3	nd	
120		ε	31,4	6,5	7,2	5,8	0,6	13,5	43,2	11,7	8,8	nd	
NRRL Y-323	144	α,β,γ,δ	40,2	8,1	10,4	6,1	1,2	17,7	44	11,2	7,7	nd	
	120	ε,ζ	28,9	8,1	10,9	4,9	1,1	16,8	58,3	9,5	27,5	nd	
		164	α,β,γ,δ	42,9	10,5	14	9,9	1,8	25,8	59,7	7,5	15,6	nd
pH 6±0,3	FMCC Y-74	48	ε	23,8	8,5	8,1	0,2	0,3	8,5	36	22,2	15,1	5,2
		144	α,β,γ,δ,στ,ζ	40,3	11,4	15,5	4,8	1,7	21,9	54,5	17,7	19,2	6,9
	FMCC Y-75	48	ε,ζ	22,1	9,1	6,2	0,9	1,6	8,7	39,3	20,8	19,9	nd
		144	α,β,γ,δ	40,4	9,7	8,8	0,9	1,1	9,9	24,5	18,2	10,9	nd
	LGAM S7 (1)	92	ζ	17,7	3,3	5,7	0,9	0,3	6,9	39	19,1	19,9	nd
		140	α	28,7	4,3	6,8	2,1	1,8	10,7	37,4	25,2	17,9	3,7
		164	β,γ,δ,ε,στ	35,8	4,3	7,4	3,2	2,2	12,7	35,6	30,9	13,3	15,2
	Polid (CLIB 139)	118	α,β,ζ	35,7	3,4	10,9	3,7	nd	14,6	40,8	9,4	19	nd
		140	γ,δ	37,9	3,4	10,9	4	1,5	16,4	43,2	12,4	10,8	nd
	ACA-YC 5030	22	ε,ζ	20,4	3,7	8,2	0,4	0,8	9,4	46	15,6	12,8	4,6
		119	β,γ,δ	41,3	7,1	16,2	2,6	1,4	20,2	49	12,6	5,1	10,4
		141	α,στ	41,3	9,4	13,7	0,7	1	15,4	37,3	7,7	2,9	10,8
	LMBF 20	52	ε	21,9	5,4	9,5	0,6	1,8	11,9	54,2	11,8	8,4	3,4
		121	α,β,γ,δ,στ,ζ	39,8	6,9	16,5	1	2,7	20,3	50,9	1,9	13,2	6,2
	NRRL Y-423	120	ε,ζ	23,2	5,3	6,1	2,5	0,9	9,5	41,1	14,4	15,2	nd
144		α,β,γ,δ	34,5	9,7	8,9	4,5	0,7	14,1	40,9	9,2	13	nd	
NRRL Y-323	72	ε	17,6	5,1	5,5	2,5	0,5	8,4	47,9	11,7	25,9	1,4	
	172	ζ	31,5	7,1	11,7	4,7	0,6	17,1	54,3	9,3	37,4	1,4	
	216	α,β,γ,δ,στ	42,7	11,1	14,5	6,5	1,1	22	51,5	1,8	16,6	1,5	

α: Μέγιστη συγκέντρωση βιομάζας (g/L), β: Μέγιστη συγκέντρωση μαννιτόλης (g/L), γ: Μέγιστη συγκέντρωση ερυθριτόλης (g/L), δ: Μέγιστη συγκέντρωση αραβιτόλης (g/L), ε: Μέγιστο ποσοστό ενδοκυτταρικών πολυσακχαριτών επί ξηράς ουσίας (Y_{IPS/X}, % w/w), στ: Μέγιστη συγκέντρωση κιτρικού οξέος (g/L), ζ: Μέγιστο ποσοστό λιπιδίων επί ξηράς ουσίας (Y_{L/X}, % w/w).

nd: Δεν έχει προσδιοριστεί (≤0,3 g/L).

Αξίζει να τονιστεί ότι τα στελέχη του μικροοργανισμού που χρησιμοποιήθηκαν, στάθηκαν ικανά να αποικοδομήσουν τη βιομηχανική γλυκερόλη, ως πηγή άνθρακα και ενέργειας, με απώτερο στόχο την παραγωγή πολυολών και άλλων μεταβολικών προϊόντων. Όλα τα στελέχη πλην του στελέχους Po1d (CLIB 139) κατάφεραν να αποζυμώσουν πλήρως το υπόστρωμα και για τις δύο τιμές pH. Συγκεκριμένα, το στέλεχος Po1d (CLIB 139) σε τιμή pH $2\pm 0,3$, δεν κατάφερε να αποζυμώσει, αφήνοντας αρκετά σημαντική υπολειπόμενη ποσότητα υποστρώματος (19 g/L). Θα πρέπει να σημειωθεί ότι κατά την καλλιέργεια του μικροοργανισμού αυτού, εμφανίστηκαν χαρακτηριστικές λευκές υφές πιθανώς λόγω καταπόνησης, οι οποίες ήταν ορατές με γυμνό μάτι.

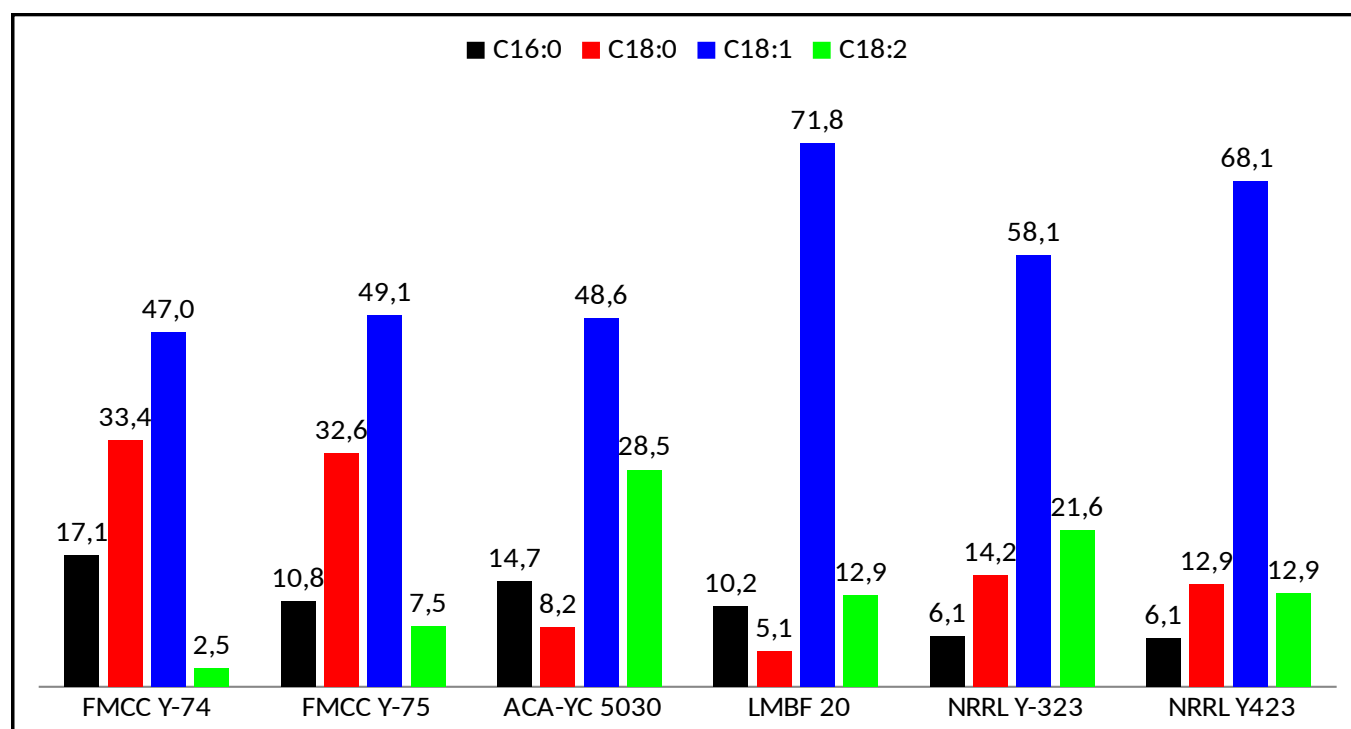
Ενδιαφέρουσα ήταν και η παραγωγή κιτρικού οξέος σε συνθήκες ελαφρώς όξινου pH ($6\pm 0,3$), αποτέλεσμα που συνάδει και επιβεβαιώνει τη διεθνή βιβλιογραφία, που υποστηρίζει την εμφάνιση παραγωγής κιτρικού οξέος σε συνθήκες pH μεγαλύτερες του $5\pm 0,3$ (Rymowicz et al., 2006; Makri et al., 2010; Tomaszewska et al., 2012; Diamantopoulou and Papanikolaou, 2023). Όσον αφορά στα οκτώ στελέχη που μελετήθηκαν, σχετικά σημαντικές συγκεντρώσεις κιτρικού οξέος εντοπίστηκαν από τα στελέχη LMBF 20 με παραγωγή 6,2 g/L, ακολούθησε το FMCC Y-74 που συσώρευσε 6,9 g/L κιτρικού οξέος, το ACA-YC 5030 με την παραγωγή στα 10,8 g/L και τέλος το στέλεχος LGAM S7 (1) με μέγιστη παραγωγή 15,2 g/L.

Τα ενδιαφέροντα στελέχη που επιλέχθηκαν για περαιτέρω ανάλυση, διακρίθηκαν με γνώμονα το συντελεστή απόδοσης συνολικών πολυολών ως προς το καταναλωθέν υπόστρωμα να ορίζεται πάνω από το ~50%, καθώς στόχος ήταν η εύρεση του συνδυασμού των ιδανικών συνθηκών για τη μέγιστη δυνατή παραγωγή πολυολών. Τα στελέχη που ξεχώρισαν και χρησιμοποιήθηκαν στα επόμενα εδάφια για περαιτέρω μελέτη ήταν τα ACA-YC 5030, NRRL Y-323, LMBF 20 και FMCC Y-74. Η επιλογή τους προέκυψε κατά κύριο λόγο από το ποσοστό απόδοσης του συντελεστή πολυολών σε όξινο περιβάλλον ($2\pm 0,3$) που κυμάνθηκε 57,6-59,8% w/w, εύρος που θεωρείται υψηλό και συγκρίσιμο με αντίστοιχα πειράματα των διεθνών βιβλιογραφικών αναφορών (Tomaszewska et al., 2012; Rzechonek et al., 2018; Fickers et al., 2020; Rice et al., 2020).

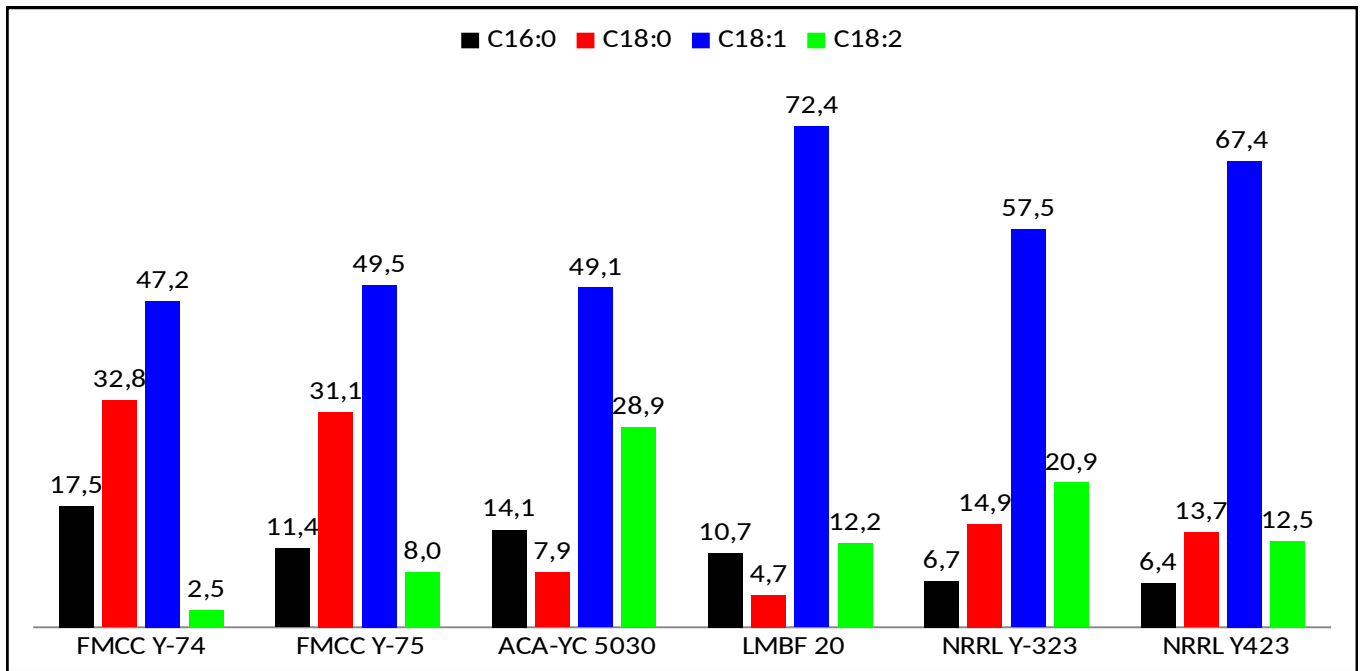
Συνοψίζοντας, τα δεδομένα του Πίνακα 3.1 επιβεβαιώνεται ότι η επιβολή ενός ελαφρώς όξινου περιβάλλοντος στην καλλιέργεια ενισχύσε την παραγωγή βιομάζας και ευνοήσε σε αρκετά στελέχη την εμφάνιση κιτρικού οξέος, ενώ αντίθετα η παραγωγή πολυολών απαιτεί συνθήκες πολύ όξινου περιβάλλοντος ($2\pm 0,3$), ως αναφέρεται και επιβεβαιώνεται και στη διεθνή βιβλιογραφία (Rymowicz et al., 2006; Makri et al., 2010; Tomaszewska et al., 2012; Papanikolaou et al., 2017; Diamantopoulou and Papanikolaou, 2023; Diamantopoulou et al., 2023).

Ολοκληρώνοντας αυτή την πειραματική ενότητα, έλαβε χώρα η ανάλυση κυτταρικών λιπιδίων, ώστε να μετατραπούν στους αντίστοιχους μεθυλεστέρες τους και πραγματοποιήθηκε ανάλυση της σύνθεσης των κυτταρικών λιπαρών οξέων. Συγκεκριμένα, τα λιπίδια των μελετώμενων στελεχών της ζύμης αποτελούνταν κυρίως από ελαϊκό (C18:1), παλμιτικό (C16:0), στεατικό (C18:0) και λινελαϊκό οξύ (C18:2), όπως διαφαίνεται στις Εικόνες 3.6, 3.7, 3.8 και 3.9 που έπονται. Δεν ανιχνεύθηκαν ποσότητες

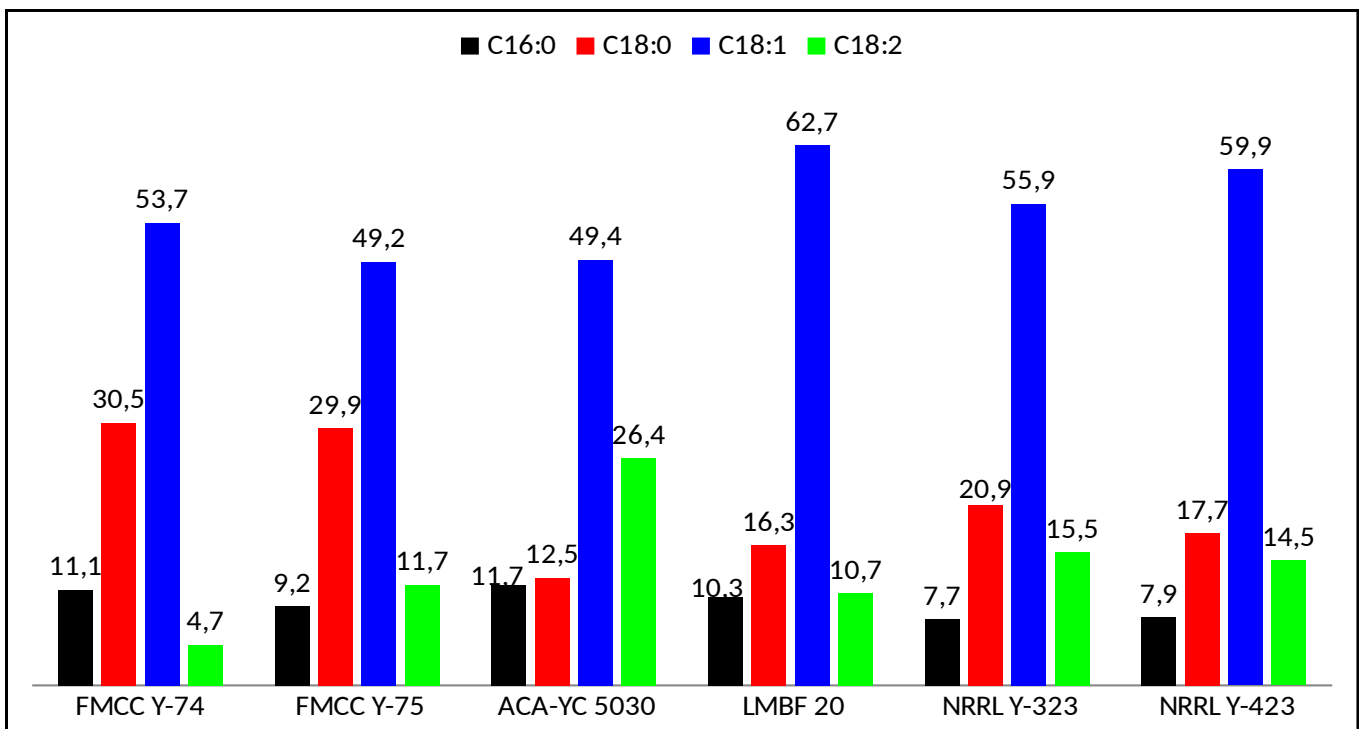
άλλων πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (π.χ. α-λινολενικό οξύ C18:3) εντός των λιπιδίων του ζυμομύκητα. Στα πειράματα παρατηρήθηκε, ότι τα κυτταρικά λιπίδια ήταν κατά κάποιο τρόπο πιο κορεσμένα (κυρίως πιο πλούσια στα C18:0 και C18:1). Παρατηρήθηκε επιπροσθέτως ότι σε γενικές γραμμές δε μεταβλήθηκε ιδιαίτερα η ποσοστιαία κατανομή των λιπαρών οξέων κατά τη διάρκεια των ζυμώσεων στα στελέχη. Πιο αναλυτικά, το ποσοστό ελαϊκού οξέος ενισχύθηκε από το όξινο pH επισκιάζοντας τα υπόλοιπα λιπαρά οξέα που ανιχνεύτηκαν. Η επίδραση του pH διαπιστώθηκε στα ποσοστά παλμιτικού και στεατικού οξέος από τα στελέχη ACA-YC 5030 και LMBF 20, καθώς το ελαφρώς όξινο pH ($2\pm 0,3$) ενίσχυσε το ποσοστό του στεατικού, ενώ στο όξινο είχε μεγαλύτερο ποσοστό το παλμιτικό. Το λιπαρό οξύ που επικράτησε σε όλα τα στελέχη ήταν το ελαϊκό, σε μεγάλες ως επί το πλείστον περιεκτικότητες ($>50\%$ w/w επί των συνολικών λιπαρών οξέων), γεγονός που το καθιστά κατάλληλο για παραγωγή 2^{ης} γενιάς βιοντίζελ. Περαιτέρω, δεν ταυτοποιήθηκαν λιπαρά οξέα με αντιδιατροφικές ιδιότητες (π.χ. ελαϊδικό οξύ), με απόρροια, η παραγόμενη βιομάζα να μπορεί να χρησιμοποιηθεί, τουλάχιστον σε ό,τι αφορά τα λιπαρά της οξέα, ως συμπλήρωμα της διατροφής αγροτικών ζώων ή ιχθύων (Koukoumaki et al., 2023).



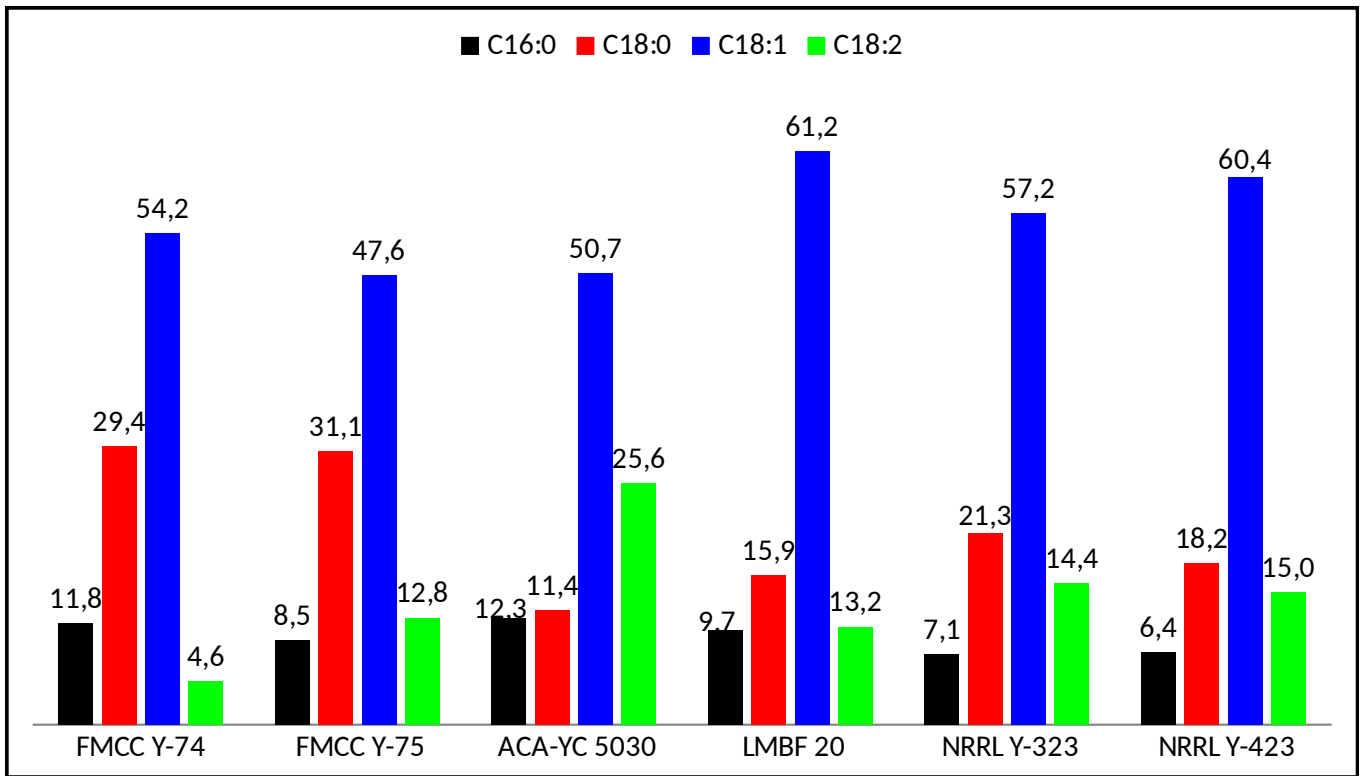
Εικόνα 3.6 Σύσταση σε λιπαρά οξέα των λιπιδίων των στελέχη της ζύμης *Y. lipolytica* που συσώρευσαν επαρκείς ποσότητες λιπιδίων (~20% w/w) σε συνθήκες καλλιέργειας όξινου περιβάλλοντος ($2\pm 0,3$) και αρχικής συγκέντρωσης υποστρώματος ~40 g/L για πρώιμο σημείο της ζύμωσης (48h). Κάθε πειραματικό σημείο που παρουσιάζεται είναι η μέση τιμή δύο ανεξάρτητων προσδιορισμών από διαφορετικά αρχικά εμβόλια.



Εικόνα 3.7 Σύσταση σε λιπαρά οξέα των λιπιδίων των στελέχη της ζύμης *Y. lipolytica* που συσώρευσαν επαρκείς ποσότητες λιπιδίων (~20% w/w) σε συνθήκες καλλιέργειας όξινού περιβάλλοντος ($2\pm 0,3$) και αρχικής συγκέντρωσης υποστρώματος ~40 g/L για τελικό σημείο της ζύμωσης (120h). Κάθε πειραματικό σημείο που παρουσιάζεται είναι η μέση τιμή δύο ανεξάρτητων προσδιορισμών από διαφορετικά αρχικά εμβόλια.



Εικόνα 3.8 Σύσταση σε λιπαρά οξέα των λιπιδίων των στελέχη της ζύμης *Y. lipolytica* που συσώρευσαν επαρκείς ποσότητες λιπιδίων (~20% w/w) σε συνθήκες καλλιέργειας βασικού περιβάλλοντος ($6\pm 0,3$) και αρχικής συγκέντρωσης υποστρώματος ~40 g/L για πρώιμο σημείο της ζύμωσης (48h). Κάθε πειραματικό σημείο που παρουσιάζεται είναι η μέση τιμή δύο ανεξάρτητων προσδιορισμών από διαφορετικά αρχικά εμβόλια.



Εικόνα 3.9 Σύσταση σε λιπαρά οξέα των λιπιδίων των στελέχη της ζύμης *Y. lipolytica* που συσώρευαν επαρκείς ποσότητες λιπιδίων (~20% w/w) σε συνθήκες καλλιέργειας βασικού περιβάλλοντος ($6 \pm 0,3$) και αρχικής συγκέντρωσης υποστρώματος ~40 g/L για τελικό σημείο της ζύμωσης (120h). Κάθε πειραματικό σημείο που παρουσιάζεται είναι η μέση τιμή δύο ανεξάρτητων προσδιορισμών από διαφορετικά αρχικά εμβόλια.

3.4 ΚΙΝΗΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΑΥΞΗΣΗΣ ΕΠΙΛΕΓΜΕΝΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΤΗΣ ΖΥΜΗΣ *Yarrowia lipolytica* ΣΕ ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΧΑΜΗΛΗΣ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑΣ

Σε αυτό το εδάφιο τα τέσσερα στελέχη (NRRL Y-323, ACA-YC 5030, LMBF 20 και FMCC Y-74) που ξεχώρισαν και διακρίθηκαν προηγουμένως για την υψηλή παραγωγικότητα τους σε πολυόλες και βιομάζα, εκτέθηκαν τόσο σε χαμηλές (20 ± 1 °C) όσο και σε υψηλές (40 ± 1 °C) θερμοκρασίες, τιμές αρκετά μακριά σε σχέση με αυτές που θεωρούνται ιδανικές στη βιβλιογραφία ($25-31$ °C) (Wierzchowska et al., 2021). Συγχρόνως συγκρίθηκαν ως προς την αποτελεσματικότητά τους σε χαμηλές και υψηλές τιμές pH. Στη διεθνή βιβλιογραφία δεν έχει συζητηθεί εκτενώς η επίδραση της θερμοκρασίας επώασης στη βιοσύνθεση των μεταβολιτών και συγκεκριμένα στο σχηματισμό πολυολών (Barth et al., 1996; Timoumi et al., 2018). Αυτό στάθηκε ως έναυσμα για περαιτέρω έρευνα και μελέτη των προαναφερθέντων διακριθέντων στελεχών. Γενικώς συνίσταται οι θερμοκρασίες ανάπτυξης των στελεχών *Y. lipolytica* να κυμαίνονται μεταξύ των ορίων $25-31\pm 1$ °C (Papanikolaou et al., 2002b; Papanikolaou et al., 2020; Wierzchowska et al., 2021). Κρίθηκε σαφώς ενδιαφέρον και πρωτότυπο να μελετηθεί η μεταβολική συμπεριφορά τους σε άλλο θερμοκρασιακό εύρος.

Οι πειραματικές διαδικασίες και αναλύσεις που ακολούθησαν σε θερμοκρασίες 40 ± 1 °C, επιβεβαίωσαν την αδυναμία των στελεχών να αναπτυχθούν και κατ' επέκταση να αφομοιώσουν το υπόστρωμα γλυκερόλης προς παραγωγή μεταβολιτών (Papanikolaou et al., 2002b; Papanikolaou et al., 2020; Wierzchowska et al., 2021). Τούτο εν αντιθέσει με το θερμοκρασιακό περιβάλλον των 20 ± 1 °C, στο οποίο τα στελέχη σημείωσαν αύξηση κυτταρικής σύνθεσης και ενίοτε πλήρη αφομοίωση του υποστρώματος (Πίνακας 3.2), γεγονός που δε συνάδει με τα περισσότερα από τα βιβλιογραφικά δεδομένα, καθώς αυτές οι τιμές θερμοκρασίας θεωρείται ότι δεν επιτρέπουν την επαρκή μικροβιακή αύξηση της ζύμης *Y. lipolytica* (Wierzchowska et al., 2021). Αυτή η πειραματική εξέλιξη κρίθηκε ενδιαφέρουσα, καθώς αποτελεί μια από τις πρώτες αναφορές σημαντικής παραγωγής βιομάζας σε χαμηλές θερμοκρασίες για το μικροοργανισμό αυτό σε διεθνές επίπεδο. Τα στελέχη εκτέθηκαν σε όξινες και σε ελαφρώς όξινες τιμές pH ($2\pm 0,3$ και $6\pm 0,3$) στο μέσο της καλλιέργειας και αξιολογήθηκε η παραγωγικότητα τους σε σύγκριση με τη θερμοκρασιακή κλίμακα των 20 ± 1 °C (Πίνακας 3.2).

Γενικά παρατηρήθηκε ότι η παραγωγή πολυολών ευνοήθηκε από τη χαμηλή τιμή pH ($2\pm 0,3$) στο μέσο αύξησης, προάγοντας τη μετατροπή της γλυκερόλης σε επαρκείς ποσότητες μαννιτόλης, ερυθριτόλης και αραβιτόλης. Εν αντιθέσει, η βιομάζα ενισχύθηκε από το συνδυασμό χαμηλής θερμοκρασίας επώασης με το ελαφρώς όξινο περιβάλλον ($6\pm 0,3$), με το στέλεχος ACA-YC 5030 να επιτυγχάνει τη μέγιστη παραγωγή βιομάζας των $12,4$ g/L για pH επώασης $6\pm 0,3$. Σε παρόμοια επίπεδα κινήθηκαν τα στελέχη LBMF 20 και FMCC Y-74, σε συνθήκες καλλιέργειας ελαφρώς όξινου περιβάλλοντος ($6\pm 0,3$), με παραγωγή $11,2$ g/L και $12,2$ g/L ξηράς κυτταρικής μάζας αντίστοιχα, ενώ το στέλεχος NRRL Y-323 δεν παρουσίασε ικανοποιητικές ποσότητες βιομάζας. Αυτή η σημαντική παραγωγή από την πλειοψηφία των στελεχών, αποτελεί ένα αρκετά πρωτότυπο αποτέλεσμα,

λαμβάνοντας υπόψη την αδυναμία των περισσότερων στελεχών αυτής της ζύμης να αναπτυχθούν σε θερμοκρασίες χαμηλότερες των 24±1 °C (Papanikolaou et al., 2002b). Στον Πίνακα 3.2 παρουσιάζεται η αποτελεσματικότητα της ζύμωσης όταν τα στελέχη εκτέθηκαν στις ανωτέρω συνδυαστικές συνθήκες, θερμοκρασίας και pH.

Πίνακας 3.2 Ποσοτικά δεδομένα καλλιεργούμενων στελεχών *Y. lipolytica* σε υπόστρωμα με βάση τη γλυκερόλη (Glo₀ ~40 g/L) σε διαφορετικές τιμές pH. Συνθήκες καλλιέργειας: ζύμωση σε ανακινούμενες κωνικές φιάλες των 250 mL σε ανάδευση 180±5 rpm και θερμοκρασία επώασης T=20±1 °C. Κάθε πειραματικό σημείο που παρουσιάζεται είναι η μέση τιμή δύο ανεξάρτητων προσδιορισμών από διαφορετικά αρχικά εμβόλια.

	Strains	Time (h)		Glo _{cons} (g/L)	X (g/L)	MI (g/L)	Ery (g/L)	Ara (g/L)	POL (g/L)	Y _{POL/Glo} (% w/w)	Y _{IPS/X} (% w/w)	Y _{L/X} (% w/w)
pH 2±0,3	FMCC Y-74	46	στ	11,2	3,3	5	0,6	0,3	5,9	52,2	14,8	17,7
		124	δ,ε	36,6	9,7	12,7	3,1	2,5	18,3	49,9	17,5	7,4
		149	α,β,γ	41,3	11,5	14,3	3,5	2	19,8	47,9	13,7	7,3
	LMBF 20	70	στ	18,2	6,1	8,6	0,6	1,1	10,3	56,6	9,8	4,9
		120	α,β,γ,δ,ε	31,8	7,4	10	1,5	1,9	13,4	42,4	15,5	2,4
	ACA-YC 5030	45	στ	12,6	4,7	5,2	0,7	1	6,9	55,4	7,5	18,3
		95	ε	33,7	9,6	9,6	4,5	2,2	16,3	48,5	14	2
		120	α,β,γ,δ	38	9,8	10,5	6,4	2,7	19,6	51,7	12,1	1,2
	NRRL Y-323	120	β,γ,ε	15,6	5,9	0,5	1,8	nd	2,3	14,5	4	2,4
		168	α,	16,7	6	0,5	1,8	nd	2,3	13,5	3,7	2,1
pH 6±0,3	Strains	Time (h)		Glo _{cons} (g/L)	X (g/L)	MI (g/L)	Ery (g/L)	Ara (g/L)	POL (g/L)	Y _{POL/Glo} (% w/w)	Y _{IPS/X} (% w/w)	Y _{L/X} (% w/w)
	FMCC Y-74	46	στ	10,9	5,2	2,6	1,3	nd	3,9	36,5	19,5	18,2
		71	ε	17,4	7,3	4,3	1,6	0,6	6,5	37,2	21,6	10,4
		149	α,β,γ,δ	39	12,2	11,5	2,2	1,4	15,1	38,8	13,2	3,4
	ACA-YC 5030	70	ε	18,7	9,4	6,7	1,3	1,3	9,3	49,7	16,6	12,2
		120	α,β,γ,δ,στ	34,7	12,4	10,2	4,5	2,1	16,8	48,3	14,8	19,9
	LMBF 20	22	στ	5,6	3,2	nd	nd	nd	0	0	2,7	28,4
		120	α,β,γ,δ,ε	35,5	11,2	10,6	0,6	1,9	13,1	36,9	19,2	4,6
	NRRL Y-323	120	β,γ	8,8	1,7	1,6	2	0,3	3,9	44,2	7,7	2,5
		144	α,ε	8,9	3	1,6	2	0,3	3,9	44,3	6,1	2,3
168		δ	9,1	3	1,6	2	0,4	4	44,6	4,7	1,8	

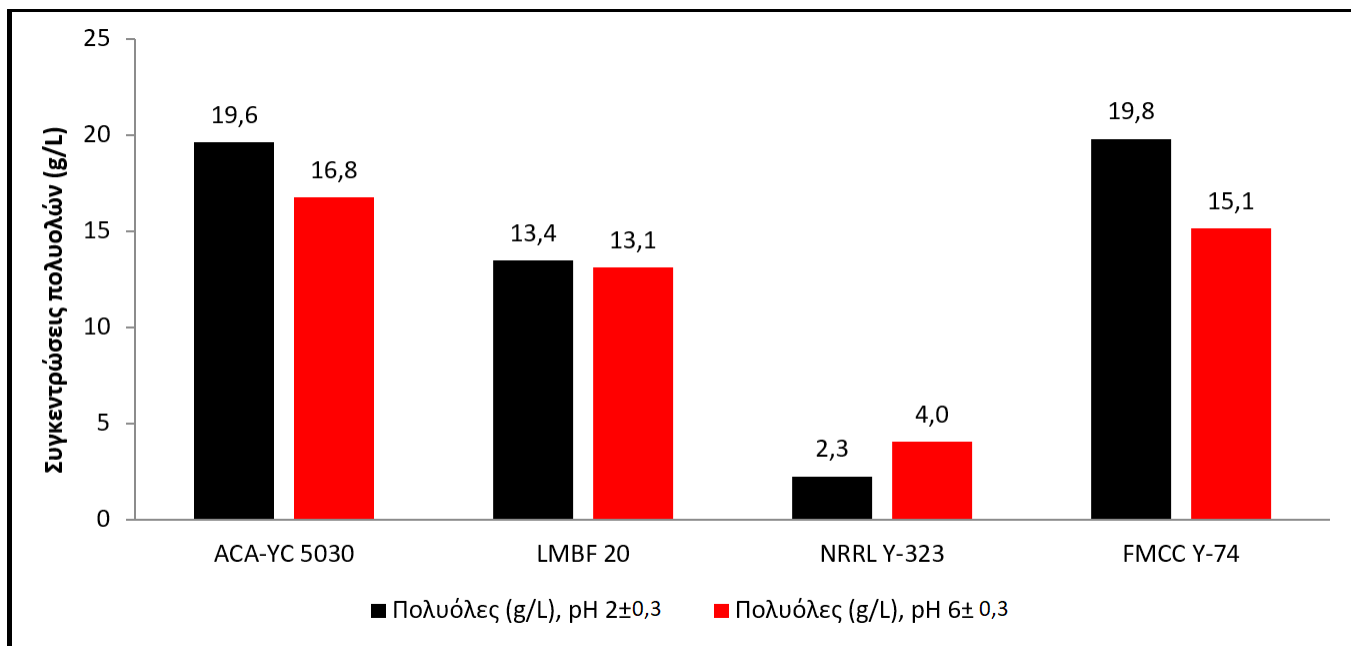
α: Μέγιστη συγκέντρωση βιομάζας (g/L), β: Μέγιστη συγκέντρωση μαννιτόλης (g/L), γ: Μέγιστη συγκέντρωση ερυθριτόλης (g/L), δ: Μέγιστη συγκέντρωση αραβιτόλης (g/L), ε: Μέγιστο ποσοστό ενδοκυτταρικών πολυσακχαριτών επί ξηράς ουσίας (Y_{IPS/X}, % w/w), στ: Μέγιστο ποσοστό λιπιδίων επί ξηράς ουσίας (Y_{L/X}, % w/w).

nd: Δεν έχει προσδιοριστεί (≤0,3 g/L).

Όλα τα ανωτέρω πειράματα έλαβαν χώρα σε ανακινούμενες φιάλες και αναπτύχθηκαν σε υπόστρωμα που περιείχε βιομηχανική γλυκερόλη αρχικής συγκέντρωσης ~40 g/L, υπό συνθήκες περιορισμού αζώτου. Ωστόσο, τα στελέχη δεν υπέδειξαν παρόμοια κινητικά προφίλ. Το στέλεχος NRRL Y-323, σε αυτές τις συνθήκες, δε μπόρεσε να μεταβολίσει πλήρως τη συγκέντρωση του υποστρώματος προς παραγωγή μικροβιακών λιπιδίων και άλλων μεταβολιτών, ανεξάρτητα από την τιμή pH που επιβλήθηκε στη ζύμωση. Όσον αφορά την αφομοίωση του υποστρώματος και την παραγωγή βιομάζας από αυτό το στέλεχος, ήταν σημαντικά χαμηλότερη σε σύγκριση με τα υπόλοιπα τέσσερα επιλεγθέντα (και σε προηγούμενες δοκιμές διακριθέντα) στελέχη. Επιπροσθέτως και αναφορικά με τις πολυόλες, έχει παρατηρηθεί ότι η κυρίαρχη πολυόλη που συντίθεται από τη ζύμη *Y. lipolytica* εξαρτάται από τις

συνθήκες ζύμωσης στις οποίες εκτίθεται το εκάστοτε στέλεχος. Ως εκ τούτου, η ροή της πηγής άνθρακα στη βιοσύνθεση των πολυολών παρουσίασε αλλαγή, φαινόμενο που αποκαλείται ως «απόκριση οσμωτικής πίεσης» (Tomaszewska et al., 2012; Rice et al., 2020). Υπό συνθήκες υψηλής οσμωτικής καταπόνησης, οι ζυμομύκητες παράγουν περισσότερη ερυθριτόλη για να μειώσουν την εκροή νερού από το ενδοκυτταρικό στο εξωκυτταρικό περιβάλλον. Επιπλέον, το όξινο pH ($2\pm 0,3$) παίζει καθοριστικό ρόλο στη σύνθεση και έκκριση πολυολών, καθώς γενικά θεωρείται ότι η ανάπτυξη υπό εξαιρετικά όξινες συνθήκες (pH $3\pm 0,3$) διοχετεύει τη ροή του άνθρακα προς τη σύνθεση των πολυολών, ενώ η ανάπτυξη σε ελαφρά όξινες τιμές pH (το pH που κυμαίνεται μεταξύ $5\pm 0,3$ και $6\pm 0,3$) ευνοεί την παραγωγή κιτρικού οξέος, εις βάρος της παραγωγής πολυολών (Rymowicz et al., 2006; Tomaszewska et al., 2012; Diamantopoulou et al., 2023; Diamantopoulou and Papanikolaou, 2023).

Όλα τα εμπλεκόμενα στελέχη στην παρούσα μελέτη παρήγαγαν αξιοσημείωτες ποσότητες πολυολών σε ελαφρώς όξινη τιμή pH ($6\pm 0,3$), σε αντίθεση με πολλές βιβλιογραφικές αναφορές που έχουν δείξει ότι η παραγωγή πολυολών ενισχύεται αποκλειστικά σε εξαιρετικά χαμηλές τιμές pH στο μέσο της καλλιέργειας (Rymowicz et al., 2006; Tomaszewska et al., 2012; Diamantopoulou and Papanikolaou, 2023). Τρία από τα τέσσερα στελέχη υπέδειξαν την μαννιτόλη ως κυριαρχούσα πολυόλη, εφόσον το στέλεχος NRRL Y-323 δεν ακολούθησε την ίδια μεταβολική οδό και παρήγαγε ελαφρώς περισσότερη ποσότητα ερυθριτόλης κάτω από συνθήκες χαμηλής θερμοκρασίας επώασης και όξινου περιβάλλοντος, με τις ποσότητες συνολικών πολυολών που παράχθηκαν από αυτό το στέλεχος υπό τις παρούσες συνθήκες αύξησης ($T=20\pm 1$ °C) να είναι συνολικά πολύ χαμηλές (βλ. Πίνακα 3.2). Συνολικά η εικόνα του έδειξε ότι απέτυχε να μεταβολίσει μέρος της αρχικής συγκέντρωσης του υποστρώματος στους 20 ± 1 °C και ως αποτέλεσμα, δεν παρήγαγε επαρκείς ποσότητες πολυολών, όπως απεικονίζεται στην Εικόνα 3.10. Τα στελέχη που παρήγαγαν τις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις πολυολών όταν υποβλήθηκαν στις συνθήκες χαμηλής θερμοκρασίας ήταν το FMCC Y-74 και το ACA-YC 5030. Ενδεικτικά τα δυο αυτά στελέχη παρήγαγαν ~20 g/L συνολικών πολυολών. Το στέλεχος FMCC Y-74 ξεχώρισε για την παραγωγή μαννιτόλης, καθώς από τα 19,8 g/L που παρήγαγε συνολικά τα 14,3 g/L αντιστοιχούν στην μαννιτόλη, ακολούθησε η ερυθριτόλη και η αραβιτόλη με σημαντικά μικρότερες ποσότητες. Από τα άνωθεν προκύπτει ότι τα στελέχη FMCC Y-74, ACA-YC 5030 και LMBF 20 σε χαμηλό pH ($2\pm 0,3$) δημιούργησαν αξιόλογες ποσότητες πολυολών, συγκρίσιμες με τα πειράματα αναφοράς που προηγήθηκαν στο Κεφάλαιο 3.3. Η απόδοση μετατροπής των συνολικών πολυολών που παρήχθησαν ανά μονάδα γλυκερόλης που καταναλώθηκε ($Y_{POL/GLIC}$, % w/w), ήταν αρκετά υψηλή για τις συνθήκες όξινου pH (άγγιξε το 52,2% w/w για το στέλεχος FMCC Y74, 55,4% w/w για το στέλεχος ACA-YC 5030 και το 56,6% w/w για το LMBF 20), ενώ για το ελαφρώς όξινο pH κανένα στέλεχος δεν παρουσίασε συντελεστή απόδοσης μεγαλύτερο του ~50% w/w, γεγονός που έχει αποδειχθεί βιβλιογραφικά ουκ ολίγες φορές (Filippousi et al., 2019; Diamantopoulou and Papanikolaou, 2023).



Εικόνα 3.10 Συνολικές συγκεντρώσεις πολυολών για τα εξεταζόμενα στελέχη της ζύμης *Y. lipolytica*, σε συνθήκες χαμηλής θερμοκρασίας 20 ± 1 °C σε αναδευόμενες κωνικές φιάλες με αρχική συγκέντρωση υποστρώματος ~ 40 g/L και pH $2\pm 0,3$ και $6\pm 0,3$. Συνθήκες καλλιέργειας: ζύμωση σε ανακινούμενες κωνικές φιάλες των 250 mL στις 180 ± 5 rpm. Κάθε πειραματικό σημείο που παρουσιάζεται είναι η μέση τιμή δύο ανεξάρτητων προσδιορισμών από διαφορετικά αρχικά εμβόλια.

Από τα στελέχη FMCC Y-74, ACA-YC 5030 και LMBF 20 ελήφθησαν σημαντικές ποσότητες βιομάζας σε σύγκριση με την αντίστοιχη ζύμωση στους 30 ± 1 °C, γεγονός το οποίο κρίνεται άξιο μνείας, καθότι δεν αναφέρεται συχνά βιβλιογραφικά τόσο σημαντική παραγωγή ξηρά κυτταρικής μάζας σε τόσο χαμηλές θερμοκρασίες επώασης όσο στην παρούσα εργασία (Rymowicz et al., 2006; Tomaszewska et al., 2012; Diamantopoulou et al., 2023).

Η ενδοκυτταρική περιεκτικότητα σε λιπίδια για τους εξεταζόμενους μικροοργανισμούς παρουσίασε σημαντικές διαφοροποιήσεις που σχετίζονται με το εκάστοτε στέλεχος, το pH του μέσου και τη θερμοκρασία επώασης. Αναλυτικότερα, παρατηρήθηκαν διακυμάνσεις στις οποίες η παραγωγή κυτταρικών λιπιδίων ως προς τη βιομάζα κυμάνθηκε από σχεδόν ανύπαρκτες τιμές (0,5% w/w) έως οριακά ικανοποιητικές (19,5% w/w). Σε αρκετές περιπτώσεις στη βιβλιογραφία τα στελέχη άγριου τύπου αυτού του είδους ζυμομύκητα, έχει δειχθεί ότι παρουσιάζουν έναν «άτυπο» ελαιογόνο χαρακτήρα. Στην πραγματικότητα, τα περιεχόμενα λιπίδια, συνήθως κυμαίνονται από 4 % έως 19% w/w επί ξηράς ουσίας, όταν καλλιεργούνται σε γλυκόζη ή παρόμοια καταβολιζόμενα υποστρώματα (γλυκερόλη) σε συνθήκες καλλιέργειας που επιτρέπουν τη σημαντική *de novo* βιοσύνθεση και συσσώρευση αποθηκετικών λιπιδίων (δηλαδή καλλιέργειες υπό συνθήκες περιορισμού αζώτου, όπως αυτές της παρούσας μελέτης). Σπάνια για άγριου τύπου στελέχη της ζύμης *Y. lipolytica*, έχουν καταγραφεί λιπίδια με τιμές μεγαλύτερες από $\sim 20\%$ w/w επί ξηράς ουσίας που είναι οι τιμές «όρια» («thresholds») για να χαρακτηριστεί ένας μικροοργανισμός ως ελαιογόνος (Papanikolaou and Aggelis, 2011a; 2011b; Papanikolaou et al., 2017a; 2020; Diamantopoulou et al., 2023). Περαιτέρω λεπτομέρειες των αποτελεσμάτων επιβεβαιώνουν ότι τα κυτταρικά λιπίδια, είτε απέτυχαν παντελώς να παραχθούν, είτε παρήχθησαν σε μικρές ποσότητες επί της ξηρής βιομάζας. Καθοριστικός παράγοντας σε αυτή την προσέγγιση ήταν οι συνθήκες της μικροβιακής

καλλιέργειας και ειδικά ο χρόνος ζύμωσης, καθώς ανιχνεύθηκαν αυξημένες ποσότητες λιπιδίων κατά τα πρώιμα στάδια ανάπτυξης, οι οποίες στην πορεία της ζύμωσης υπέδειξαν πτωτική τάση, με ταυτόχρονη παραγωγή των εξωκυτταρικών προϊόντων. Συνεπώς, το ποσοστό των λιπιδίων επί της ξηράς βιομάζας των ζυμών σε πολλές από τις περιπτώσεις έβαινε μειούμενο, ενώ ταυτόχρονα με τη μείωση της συγκέντρωσης των λιπιδίων επί της ξηράς ουσίας, στις περισσότερες περιπτώσεις παρατηρήθηκε η έκκριση στο μέσο της καλλιέργειας των πολυολών. Στην περίπτωση του μικροοργανισμού NRRL Y-323, η συσσώρευση λιπιδίων απουσίαζε σχετικά και στις δυο τιμές του pH. Τα υπόλοιπα στελέχη πέτυχαν τις καλύτερες αποδόσεις τους στην παραγωγή λιπιδίων σε συνδυασμό με την υψηλή τιμή pH. Η παραγωγή λιπιδίων ήταν μια αρκετά περιορισμένη διαδικασία στην περίπτωση των όξινων συνθηκών pH.

Ένα άλλο ενδιαφέρον αποτέλεσμα έγκειται στο γεγονός της παραγωγής ενδοπολυσακχαριτών που συσσωρεύτηκαν σε σχετικά ικανοποιητικές ποσότητες στα κάπως πρώιμα στάδια της ανάπτυξης, παρουσία αζώτου ή μόλις μετά την εξάντλησή του από το μέσο. Η παραγωγή ενδοπολυσακχαριτών από το στέλεχος FMCC Y-74 παρουσίασε τις υψηλότερες τιμές επί ξηράς κυτταρικής βιομάζας (21,6% w/w) σε τιμές pH $6\pm 0,3$, ακολούθησε το LMBF 20 με ελαφρώς χαμηλότερο ποσοστό (19,2% w/w), ενώ τα υπόλοιπα στελέχη κυμάνθηκαν σε μη αξιόλογες ποσότητες με τη μείωση της θερμοκρασίας να μην ευνοεί τη διεργασία σύνθεσης πολυσακχαριτών. Από τον Πίνακα 3.2 συνεπάγεται το συμπέρασμα ότι οι ενδοπολυσακχαρίτες αυξάνονται με αύξηση του pH, που επιβεβαιώνεται και από τη διεθνή βιβλιογραφία (Gao et al., 2020).

Συμπερασματικά, ο κυτταρικός μεταβολισμός μετατοπίστηκε κυρίως προς τη σύνθεση βιομάζας και πολυολών, όταν η θερμοκρασία επώασης ρυθμίστηκε σε χαμηλότερη από την ιδανική (30 ± 1 °C), αναστέλλοντας σχετικά τη βιοσύνθεση κυτταρικών λιπιδίων και ενδοπολυσακχαριτών. Το εδάφιο αυτό μπορεί να σταθεί προάγγελος περαιτέρω μελέτης των στελεχών. Ενδεχομένως, μελλοντικά το αποτέλεσμα της αύξησης και παραγωγής προϊόντων σε σχετικά χαμηλές θερμοκρασίες επώασης (20 ± 1 °C) αξιολογηθεί καλύτερα και οδηγήσει σε μερική εξοικονόμηση ενέργειας που διοχετεύεται για τη διατήρηση των συνθηκών της ζύμωσης σε υψηλά επίπεδα θερμοκρασίας κάτω από βιομηχανικής κλίμακας διεργασίες. Ολοκληρώνοντας, επαληθεύεται ότι και σε αυτές τις συνθήκες επώασης οι μεγαλύτερες ποσότητες ενδοπολυσακχαριτών παρήχθησαν σε ελαφρώς όξινη συνθήκη pH, κάτι το οποίο συνάδει με τη διεθνή βιβλιογραφία (Yang et al., 2014; Tomaszewska et al., 2014; Rzechonek et al., 2018; Gao et al., 2020).

3.5 ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΗ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΕΠΙΛΕΓΜΕΝΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΤΗΣ ΖΥΜΗΣ *Y. lipolytica* ΣΕ ΜΗ ΑΣΗΠΤΙΚΕΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ

Στην ακόλουθη προσέγγιση και προκειμένου να αξιολογηθεί βαθύτερα ο μεταβολισμός των πιο ικανοποιητικών στελεχών της ζύμης *Y. lipolytica*, πραγματοποιήθηκε ένα σύνολο ζυμώσεων βυθού που δεν ακολούθησαν το πρωτόκολλο θερμικής επεξεργασίας του υποστρώματος σε θερμοκρασία 121 ± 1 °C, που στοχεύει στην απαλλαγή από επιβλαβείς μικροοργανισμούς, οι οποίοι ανταγωνίζονται το βιολογικό υλικό που μελετάται. Συγκεκριμένα, διεξήχθη μια παστεριωμένη ζύμωση και μια δοκιμή χωρίς θερμική επεξεργασία του υποστρώματος για κάθε στέλεχος. Τα στελέχη που μελετήθηκαν ήταν τα ίδια με το προηγούμενο εδάφιο (FMCC Y-74, ACA-YC 5030, LMBF 20 και NRRL Y-323). Οι ζυμώσεις έγιναν σε περιοριστικές σε άζωτο συνθήκες. Τα στελέχη αποδείχθηκαν ανταγωνιστικά και κατάφεραν να αναπτυχθούν και να παράξουν μεταβολίτες χωρίς να επηρεαστούν από τις συνθήκες καταπόνησης της μη αποστείρωσης του μέσου της αύξεσης. Άξιο σχολιασμού αποτέλεσε η μηδενική παραγωγή κιτρικού οξέος στο ισοζύγιο των μεταβολικών προϊόντων στις παστεριωμένες καλλιέργειες, γεγονός που καταδεικνύει πως το μεταβολικό μονοπάτι στις ελαφρώς όξινες συνθήκες pH, στράφηκε στην παραγωγή βιομάζας, ενδοπολυσακχαριτών και λιπιδίων, που αποτελούν αποθησαυριστικές ουσίες. Η αύξηση της παραγωγής της βιομάζας φανέρωσε εντόνως την ευνοϊκή επίδραση της παστερίωσης τόσο σε χαμηλό όσο και υψηλό pH ($2 \pm 0,3$ και $6 \pm 0,3$). Η παραγωγικότητα των στελεχών εξετάστηκε και σε μη θερμικά επεξεργασμένο υπόστρωμα, όπως επιδεικνύεται στον Πίνακα 3.3.

Πίνακας 3.3 Ποσοτικά δεδομένα καλλιιεργούμενων στελεχών *Y. lipolytica* σε υπόστρωμα με βάση τη γλυκερόλη (Glo₀ ~40 g/L) σε διαφορετικές τιμές pH. Συνθήκες καλλιέργειας: ζυμώσεις σε παστεριωμένο υπόστρωμα (65±1 °C) και σε χωρίς θερμική επεξεργασία υπόστρωμα. Ανακινούμενες κωνικές φιάλες των 250 mL σε ανάδευση 180±5 rpm και θερμοκρασία επώασης T=30±1 °C. Κάθε πειραματικό σημείο που παρουσιάζεται είναι η μέση τιμή δύο ανεξάρτητων προσδιορισμών από διαφορετικά αρχικά εμβόλια.

Strains	Time (h)		Glo _{cons} (g/L)	X (g/L)	MI (g/L)	Ery (g/L)	Ara (g/L)	POL (g/L)	Y _{POL/GloI} (% w/w)	Y _{IPS/X} (% w/w)	Y _{L/X} (% w/w)	CA (g/L)	
Παστεριωμένο υπόστρωμα	ACA-YC 5030	24	ζ	7,5	0,3	1,5	0,5	nd	2	26,7	1,2	17	nd
		72	ε	24,9	10,4	6,8	5,1	2,6	14,5	58,2	13,8	9,4	nd
		120	α,β,γ,δ	38,9	12,9	10,7	9,1	3,2	23	53,8	12,9	2,7	nd
	LMBF 20	70	ζ	21,6	4,9	7,9	1,6	1,4	10,9	50,5	14,1	13,7	nd
		93	ε	29	9,6	8,4	2,6	2,5	13,5	46,6	15,2	11	nd
		146	α,β,γ,δ	41,6	13,3	12,2	3,7	4	19,9	47,8	13	8,7	nd
	FMCC Y-74	70	ε,ζ	27,3	8,4	9,7	4	2,6	16,3	59,7	17,4	15	nd
		146	α,β,γ,δ	43,9	10,8	15,2	7,1	3,1	25,4	57,9	15,1	5,6	nd
		93	ζ	32,1	9	11,3	3,4	3,1	17,8	55,6	12	12,3	nd
	NRRL Y-323	122	α,β,γ,ε	41,8	13,5	14	4,3	3,6	21,9	52,4	12,8	10,2	nd
		146	δ	41,8	13,5	13,7	4	4,4	22,1	52,8	12,4	7,2	nd
		72	ε	25	7,3	nd	nd	nd	nd	nd	18,3	12,4	nd
ACA-YC 5030	96	α	30,6	7,6	nd	nd	nd	nd	nd	11,9	13,9	nd	
	120	ζ	36,8	7,6	nd	nd	nd	nd	nd	10,4	21,3	nd	
	70	ε,ζ	22,2	12,9	9,7	1	2	12,7	57,2	25,2	14,6	nd	
LMBF 20	146	α,β,γ,δ	37,7	16,6	11,6	2,7	2,9	17,2	45,6	20,8	9,5	nd	
	24	ζ	8,7	3,7	2,8	nd	nd	2,8	32,2	16,3	16,6	nd	
FMCC Y-74	70	ε	21,3	5,1	4,9	3,9	0,6	9,4	44,1	20,6	10,2	nd	
	146	α,β,γ,δ	41,2	12,8	7,5	6,9	1,7	16,1	39,1	15,7	1,4	nd	
	93	ζ	35,7	12,1	11,5	1,8	4	17,3	48,5	19,5	14	nd	
NRRL Y-323	122	δ,ε	37,6	12,7	11,6	2,1	4,1	17,8	47,3	20,1	13,8	nd	
	146	α,β,γ	39,6	13	12,1	2,3	4,1	18,5	46,7	17,9	13,5	nd	
	196	ζ	41	15,4	8	6,9	1	15,9	38,8	16	15,3	nd	
NRRL Y-323	216	δ,ε	44	16	8,5	7,8	1,5	17,8	40,5	17	7,1	nd	
	240	α,β,γ	44,7	16,1	9,1	8,4	1,5	19	42,5	16,8	4,6	nd	
	72	ζ	18,1	7,3	5,9	1,4	0,3	7,6	42	12,9	14,1	nd	
FMCC Y-74	125	ε	33,5	12,3	8,6	3,9	3,6	16,1	48,1	16,3	5	nd	
	166	α,β,γ,δ	43,4	13,9	11,5	5,5	4,2	21,2	48,8	14	2,1	nd	
	172	ζ	25,5	13,1	6,8	3	0,3	10,2	40	12,4	17,6	3,1	
NRRL Y-323	196	ε	33,8	16,8	8	5,2	0,6	13,8	40,8	12,6	10,5	4,7	
	240	α,β,γ,δ,στ	40,2	17,6	9	8	1,1	18,1	45	10,5	3,5	5,1	
	72	ζ	20,3	6,1	5,8	1,8	nd	7,6	37,4	13,7	18,3	2,2	
FMCC Y-74	96	ε	25,2	7	6	1,9	nd	7,9	31,3	16,7	14,9	3,9	
	166	α,β,γ,στ	42,8	15,6	7,2	3,4	nd	10,6	24,8	11,2	1,7	5,9	

α: Μέγιστη συγκέντρωση βιομάζας (g/L), β: Μέγιστη συγκέντρωση μαννιτόλης (g/L), γ: Μέγιστη συγκέντρωση ερυθριτόλης (g/L), δ: Μέγιστη συγκέντρωση αραβιτόλης (g/L), ε: Μέγιστο ποσοστό ενδοκυτταρικών πολυσακχαριτών επί ξηράς ουσίας (Y_{IPS/X}, % w/w), στ: Μέγιστη συγκέντρωση κιτρικού οξέος (g/L), ζ: Μέγιστο ποσοστό λιπιδίων επί ξηράς ουσίας (Y_{L/X}, % w/w).

nd: Δεν έχει προσδιοριστεί (≤0.3 g/L).

Το στέλεχος FMCC Y-74, σε πολύ όξινο pH (2±0,3) και σε παστεριωμένο θρεπτικό μέσο παράγαγε 25,4 g/L συνολικών πολυολών (15,2 g/L μαννιτόλης, 7,1 g/L ερυθριτόλης και 3,1 g/L αραβιτόλης), συγκέντρωση σχεδόν ταυτόσημη με το πείραμα αναφοράς στους 30±1 °C (26 g/L, βλέπε Πίνακα 3.1), δείχνοντας ότι η παστερίωση του υποστρώματος δεν επηρέασε την παραγωγή των

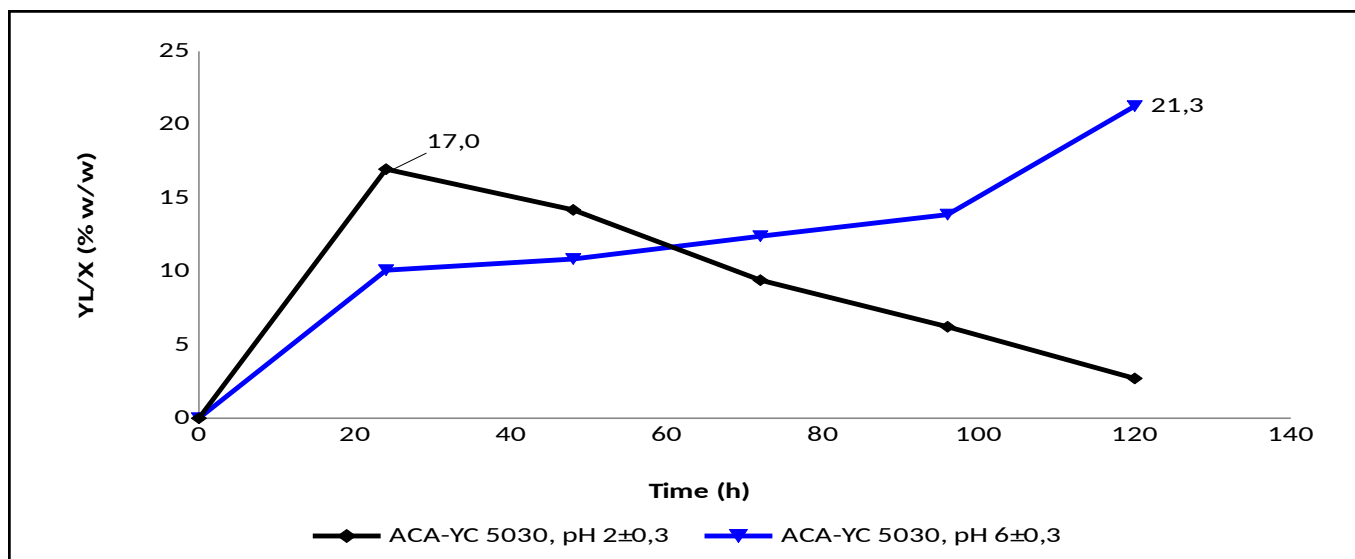
πολυολών. Ακολούθησε με μικρή διαφορά το στέλεχος ACA-YC 5030 με την παραγωγή συνολικών πολυολών να φτάνει τα 23,2 g/L.

Στην παραγωγή της βιομάζας διακρίθηκε το στέλεχος LMBF 20 που κατόρθωσε να παράξει τη μέγιστη ποσότητα των 16,6 g/L σε συνθήκες ελαφρώς όξινου pH ($6\pm 0,3$), υποδηλώνοντας τη θετική επίδραση του pH σε συνδυασμό με την παστερίωση (Makri et al., 2010; Papanikolaou et al., 2017). Όταν τα αποτελέσματα συγκρίθηκαν ως προς το συντελεστή απόδοσης της βιομάζας προς το καταναλωθέν υπόστρωμα ($Y_{x/s}$, % w/w), το υψηλότερο ποσοστό (~46% w/w με μέγιστη βιομάζα 16,6 g/L) ελήφθη για το στέλεχος LMBF 20 σε τιμή pH $6\pm 0,3$ υπό συνθήκες παστερίωσης, με τα υπόλοιπα στελέχη να ακολουθούν με όχι και τόσο σημαντικά ποσοστά. Η παστερίωση σε γενικές γραμμές ευνόησε τα στελέχη στην παραγωγή κυτταρικής μάζας και συγχρόνως περιορίσε την ανάπτυξη βακτηρίων, τα οποία ανιχνεύθηκαν μικροσκοπικά μόνο τις πρώτες 48 ώρες της καλλιέργειας. Η συμβολή του ελαφρώς όξινου pH ($6\pm 0,3$) στην παραγωγή βιομάζας επιβεβαιώθηκε και κάτω από τις συνθήκες παστερίωσης.

Στις ζυμώσεις βυθού με τη χρήση μη θερμικώς επεξεργασμένου υποστρώματος βιομηχανικής γλυκερόλης φάνηκε να επηρεάστηκε θετικά η κυτταρική παραγωγή σε σύγκριση με το πείραμα αναφοράς (Κεφάλαιο 3.3). Τα στελέχη NRRL Y-323 και FMCC Y-74 ήταν τα μόνα που κατάφεραν να αντέξουν τις συνθήκες καταπόνησης και την παρουσία μολυσματικών μικροοργανισμών, σε συνδυασμό με το χαμηλό και το υψηλό pH της καλλιέργειας. Παρατηρήθηκε η ενίσχυση του συντελεστή $Y_{x/s}$ (~43,8% w/w) για το στέλεχος NRRL Y-323, με αντίστοιχη μέγιστη παραγόμενη βιομάζα 17,6 g/L σε τιμή pH $6\pm 0,3$. Οι τιμές της βιομάζας φάνηκαν να επηρεάζονται σχεδόν θετικά από τη συνθήκη του μη θερμικώς επεξεργασμένου υποστρώματος κάτι που το επιβεβαίωσαν και τα δύο στελέχη που κατόρθωσαν να ανταγωνιστούν τις βακτηριακές μολύνσεις, ώστε να αναπτυχθούν στοχεύοντας στην παραγωγή μεταβολιτών. Η αύξηση του pH από $2\pm 0,3$ σε $6\pm 0,3$ επηρέασε θετικά την κυτταρική ανάπτυξη και βελτίωσε την τελική συγκέντρωση βιομάζας. Η κατανάλωση βιομηχανικής γλυκερόλης αυξήθηκε ελαφρώς υπό αυτές τις συνθήκες. Δεν υπήρξε σχετική επίδραση της παραγωγής στην απόδοση και την κατανάλωση βιομάζας και οι τιμές αυτών των παραμέτρων ήταν παρόμοιες για όλες τις συνθήκες που εκτελέστηκαν. Επιπλέον, τα αποτελέσματα της βιομάζας για συνθήκες ελαφρώς όξινου pH ήταν εμφανώς υψηλά και αξιόλογα (15,6 g/L από το στέλεχος FMCC Y-74 και 17,6 g/L για το στέλεχος NRRL Y-323) συγκριτικά με τη μελέτη που έγινε από τους Papanikolaou et al. (2017b), όπου αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης ~40 g/L έδωσε τιμές βιομάζας που κυμάνθηκαν μεταξύ 10 και 12 g/L.

Πέραν της βιομάζας, αυτή η ενότητα εξέτασε για τα τέσσερα αυτά στελέχη τη σύνθεση πολυολών, ενδοπολυσακχαριτών και μικροβιακών λιπιδίων, τόσο σε συνθήκες παστερίωσης όσο και σε απολύτως μη θερμικώς επεξεργασμένο υπόστρωμα με βάση τη γλυκερόλη, επιδεικνύοντας ενδιαφέρουσα παραγωγή προϊόντων και σημαντική αφομοίωση γλυκερόλης, για όσα από τα στελέχη κατόρθωσαν να αναπτυχθούν.

Είναι ενδιαφέρον ότι για το στελέχος ACA-YC 5030 φάνηκε να ευνοείται ο συντελεστής απόδοσης $Y_{L/X}$ από το ελαφρώς όξινο περιβάλλον στο μέσο, προάγοντας την συσσώρευση λιπιδίων υπό παστερίωση (21,3% w/w λιπιδίων επί ξηρής βιομάζας) (βλέπε Εικόνα 3.11).



Εικόνα 3.11 Κινητική εξέλιξη των κυτταρικών λιπιδίων προς την ξηρά βιομάζα ($Y_{L/X}$, % w/w) κατά την αύξηση του στελέχους ACA-YC 5030, σε αναδεδυόμενες κωνικές φιάλες σε παστεριωμένες συνθήκες στο θρεπτικό μέσο με αρχική συγκέντρωση υποστρώματος ~40 g/L, σε τιμή pH $2\pm 0,3$ (♦) και $6\pm 0,3$ (◻). Συνθήκες καλλιέργειας: ζύμωση σε παστεριωμένο υπόστρωμα (65 ± 1 °C). Ανακινούμενες κωνικές φιάλες των 250 mL στις 180 ± 5 rpm και θερμοκρασία επώασης $T=30\pm 1$ °C. Κάθε πειραματικό σημείο που παρουσιάζεται είναι η μέση τιμή δύο ανεξάρτητων προσδιορισμών από διαφορετικά αρχικά εμβόλια.

Διαφαίνεται ότι σε όξινο περιβάλλον ο συντελεστής των λιπιδίων εκφρασμένος ως προς τη βιομάζα παρουσίασε τη μέγιστη τιμή του σε σχετικά πρώιμο στάδιο της ζύμωσης και στη συνέχεια ακολούθησε πτωτική πορεία, τουναντίον στο ελαφρώς όξινο περιβάλλον παρουσιάζεται ανοδική πορεία εωσότου αφομοιώνεται πλήρως το απόβλητο υπόστρωμα της γλυκερόλης, όπου και ολοκληρώνεται η ζύμωση.

Μέγιστες ποσότητες λιπιδίων έως 1,5 g/L ελήφθησαν από το στελέχος NRRL Y-323, που αντιστοιχεί σε ποσοστό λιπιδίων επί ξηρού έως 17,6% w/w. Οι ποσότητες του στελέχους που ανιχνεύτηκαν σε μη θερμικά επεξεργασμένο υπόστρωμα σε pH $6\pm 0,3$, υπέδειξαν σχετική διέγερση της διαδικασίας λιποσυσσώρευσης. Συνεπώς, επαληθεύτηκε ότι η υψηλή τιμή pH ενισχύει την παραγωγή ενδοκυτταρικών προϊόντων (κυρίως μικροβιακών λιπιδίων) χωρίς να παρεμποδίζεται από το μη θερμικώς επεξεργασμένο υπόστρωμα.

Λαμβάνοντας υπόψη ότι τα στελέχη παρουσίασαν σχετικά υψηλές συγκεντρώσεις βιομάζας (16,6-17,6 g/L), μπορεί να υποτεθεί ότι δυνητικά παρήγαγαν αποθησαυριστικές ενδοκυτταρικές ενώσεις πέραν των λιπιδίων (π.χ. πολυσακχαρίτες). Ο Πίνακας 3.3 επιβεβαιώνει την ύπαρξη παραγωγής ενδοπολυσακχαριτών. Οι τιμές $Y_{IPS/X}$ επηρεάστηκαν σημαντικά από την τιμή του pH, καθώς υποστρώματα με ελαφρώς όξινο pH δύναται να οδηγήσουν σε υψηλότερες αποδόσεις μετατροπής, όπως προκύπτει και από τη βιβλιογραφία (Gao et al., 2020; Diamantopoulou et al., 2023). Για παράδειγμα, η κυτταρική ανάπτυξη του στελέχους *Y. lipolytica* LMBF 20 συνοδεύτηκε από υψηλό ποσοστό

πολυσακχαριτών (25,2% w/w εκφρασμένο επί της ξηράς ουσίας) σε pH $6\pm 0,3$ υπό παστερίωση, ενώ τα άλλα στελέχη παρήγαγαν ποσότητες, που κυμάνθηκαν από 18,3 έως 20,6% w/w κάτω από τις ίδιες συνθήκες έκθεσης.

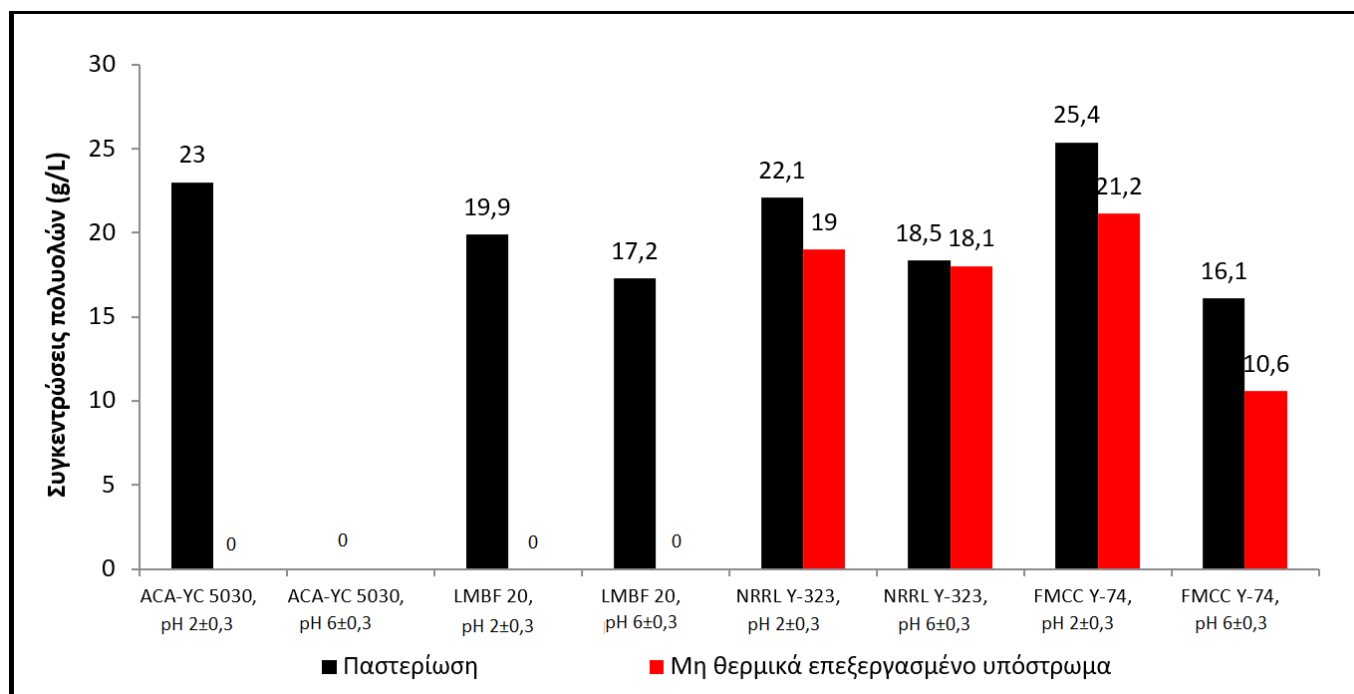
Από την άλλη πλευρά, υπήρξαν στελέχη τα οποία όταν εκτέθηκαν σε μη θερμικώς επεξεργασμένα υποστρώματα, απέτυχαν να αναπτυχθούν και να αφομοιώσουν τη γλυκερόλη. Στην πραγματικότητα, μόνο τα στελέχη NRRL Y-323 και FMCC Y-74 άντεξαν στις συνθήκες καταπόνησης της παρουσίας μολυσματικών μικροοργανισμών και έδωσαν αύξηση και παραγωγή μεταβολιτών. Οι τιμές για το συντελεστή $Y_{IPS/X}$ κυμάνθηκαν σε σχετικά χαμηλότερα επίπεδα, μεταξύ 10,5-17% w/w και στις δύο συνθήκες pH. Τα ποσοστά της παραγωγής ενδοκυτταρικών πολυσακχαριτών στο μικροοργανισμό *Y. lipolytica* υπό μη ασηπτικές συνθήκες, είναι ικανά να συγκριθούν με αρκετά άλλα άγρια στελέχη του είδους *Y. lipolytica* και άλλα είδη/γένη ζυμών που ανήκουν στο γένος *Rhodotorula* sp., στο γένος *Metschnikowia* sp. και στα είδη *Rhodosporidium toruloides* και *Lipomyces starkeyi* κατά την αύξησή τους σε γλυκερόλη ή σε παρομοίως καταβολιζόμενα συστατικά (π.χ. γλυκόζη) (Daskalaki et al., 2019; Filippousi et al., 2019; Diamantopoulou et al., 2020; Sarantou et al., 2021; Diamantopoulou et al., 2020; 2023).

Υπάρχουν αρκετές μελέτες σχετικά με την παραγωγή κιτρικού οξέος από τη ζύμη *Y. lipolytica*. Η επίδραση του pH στην παραγωγή κιτρικού οξέος αξιολογήθηκε σε συνδυασμό με τις άνωθεν συνθήκες θερμικής επεξεργασίας και μη, για ζυμώσεις βυθού που πραγματοποιήθηκαν Ωστόσο, παρατηρήθηκε ότι η παραγωγή κιτρικού οξέος ενεργοποιήθηκε μόνο με αυξημένη τιμή pH, η οποία βρέθηκε κοντά στην ουδέτερη ζώνη (pH= $6\pm 0,3$), όπως αναφέρεται και στη βιβλιογραφία (Papanikolaou et al., 2017a; 2017b; Timoumi et al., 2019; Papanikolaou et al., 2020; Diamantopoulou et al., 2023). Το ελαφρώς όξινο pH ($6\pm 0,3$) είχε ως αποτέλεσμα την εμφανιζόμενη συγκέντρωση κιτρικού οξέος στα υποστρώματα που δεν είχαν προηγουμένως επεξεργαστεί θερμικά, ενώ όλα τα στελέχη δεν παρήγαγαν ποσότητες υπό παστερίωση. Επιπροσθέτως, θεάθηκε μείωση της μέγιστης συγκέντρωσης κιτρικού οξέος σε σύγκριση με τα πειράματα αναφοράς, γεγονός που βεβαιώνει ότι η παραγωγή κιτρικού οξέος ευνοείται πλήρως από θερμικά επεξεργασμένα υποστρώματα, καθ' όσον δεν υπάρχει ο ανασταλτικός παράγοντας της μικροβιακής μόλυνσης, όπου στις περισσότερες από τις περιπτώσεις ήταν αερόβιοι Gram⁺ βάκιλοι. Τα κύτταρα του στελέχους NRRL Y-323 συνέθεσαν 5,1 g/L κιτρικού οξέος από βιομηχανική γλυκερόλη μετά από 240 ώρες καλλιέργειας. Το στέλεχος FMCC Y-74 σε όμοιες συνθήκες παρήγαγε τη μέγιστη ποσότητα κιτρικού οξέος 5,9 g/L σε 166 ώρες καλλιέργειας.

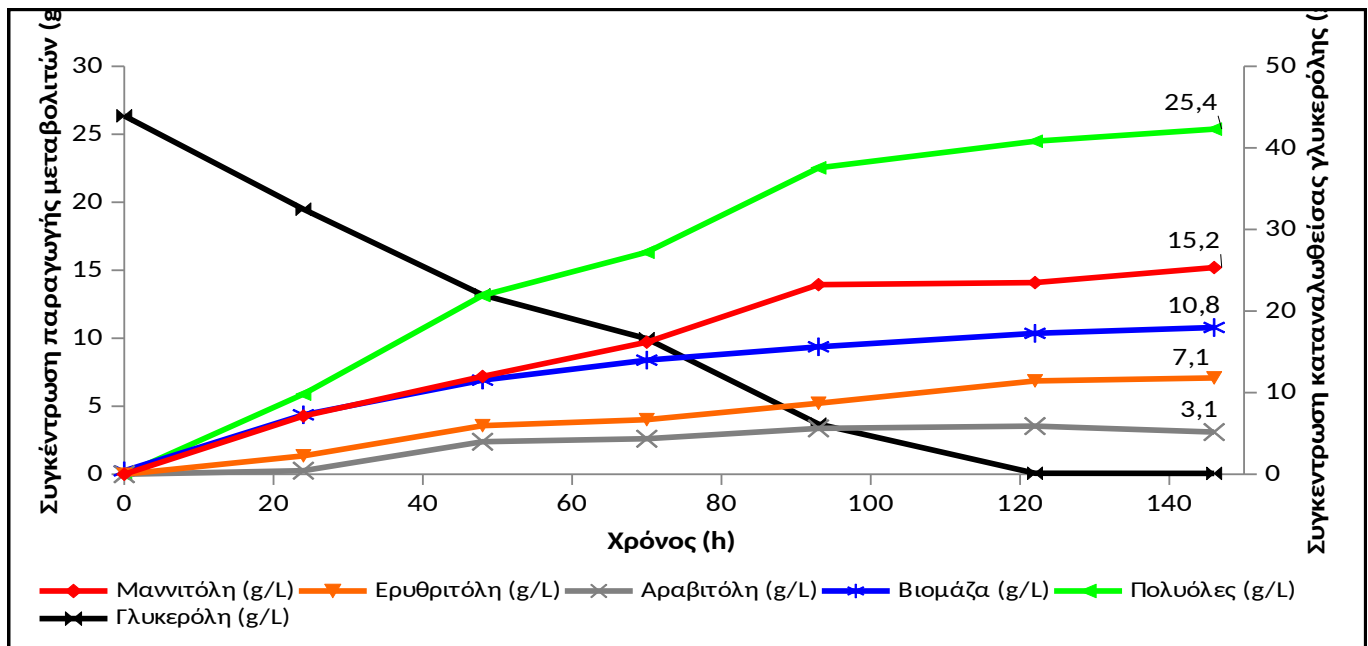
Το μεταβολικό προϊόν που παράχθηκε σε μεγαλύτερα ποσά ήταν οι πολυόλες, η συγκέντρωση των οποίων, παρατίθεται σε συγκριτική Εικόνα 3.12. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.13 που έπεται, το στέλεχος FMCC Y-74 πέτυχε τη μέγιστη τιμή των 25,4 g/L, υπό συνθήκες παστερίωσης σε όξινο pH $2\pm 0,3$, με τον αντίστοιχο συντελεστή να σημειώνει ποσοστό αρκετά υψηλό ($Y_{POL/Glcl}$ 57,9% w/w), όντας πολύ ικανοποιητικό συγκρινόμενο με τη διεθνή βιβλιογραφία (Tomaszewska et al., 2012; Rzechonek et al., 2018; Fickers et al., 2020; Rice et al., 2020). Ακολούθησε το στέλεχος ACA-YC 5030 με 23 g/L, το

NRRL Y-323 με 22,1 g/L και, τέλος, το στέλεχος LMBF 20 με συνολική παραγωγή πολυολών στα 19,9 g/L.

Αξίζει να σημειωθεί ότι η κυρίαρχη πολυόλη ήταν η μαννιτόλη, με μέγιστη παραγόμενη τιμή να φτάνει τα 15,7 g/L, ακολουθούμενη σε αρκετά υψηλή ποσότητα από την ερυθριτόλη που φτάνει τα 9,1 g/L και τέλος η αραβιτόλη με σημαντικά χαμηλές ποσότητες γύρω στα 4,4 g/L. Οι υψηλότερες τιμές για κάθε πολυόλη επιτεύχθηκαν υπό συνθήκες όξινου pH ($2\pm 0,3$). Συγκρίσιμες τιμές των συνολικών πολυολών ελήφθησαν και υπό τα μη θερμικά επεξεργασμένα υποστρώματα. Η μαννιτόλη ήταν επίσης η κυρίαρχη πολυόλη που συντέθηκε σε μέγιστη ποσότητα 11,5 g/L από το στέλεχος FMCC Y-74 σε όξινο pH ($2\pm 0,3$). Αντιθέτως, οι υπόλοιπες πολυόλες που συντέθηκαν σε ελαφρώς μικρότερες ποσότητες ήταν η ερυθριτόλη (8,4 g/L) και σε πολύ μικρότερο βαθμό, η αραβιτόλη (4,2 g/L) συνθήκη που παρατηρήθηκε σε όλες τις πειραματικές δοκιμές αυτών των συνθηκών. Ως αναφέρθηκε και στα προηγούμενα εδάφια, ο βιοχημικός μηχανισμός της βιοσύνθεσης μαννιτόλης από στελέχη του μικροοργανισμού *Y. lipolytica* που αναπτύσσονται στη γλυκερόλη δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως (Kets et al., 1996). Η παραγωγή αυτή πιθανώς συμβαίνει ως απόκριση των μικροοργανισμών λόγω της έκθεσης των στελεχών σε σχετικά υψηλές συγκεντρώσεις γλυκερόλης στο μέσον (Rywińska et al., 2008; André et al., 2009; Rywińska et al., 2009; Chatzifragkou et al., 2011; Tomaszewska et al., 2012; Tomaszewska et al., 2014). Αυτό ήταν το έναυσμα για περαιτέρω μελέτη σχετικά με την αυξημένη αρχική συγκέντρωση υποστρώματος, η οποία μελετήθηκε σε ακόλουθη προσέγγιση.



Εικόνα 3.12 Ποσοτικά δεδομένα των παραγόμενων πολυολών από τα καλλιεργούμενα στελέχη *Y. lipolytica* σε υπόστρωμα με βάση τη γλυκερόλη (Gl₀ ~40 g/L) σε διαφορετικές τιμές pH. Συνθήκες καλλιέργειας: ζυμώσεις σε παστεριωμένο υπόστρωμα (65 ± 1 °C) και σε μη θερμικά επεξεργασμένο. Ανακινούμενες κωνικές φιάλες των 250 mL στις 180 ± 5 rpm και θερμοκρασία επώασης $T=30\pm 1$ °C. Κάθε πειραματικό σημείο που παρουσιάζεται είναι η μέση τιμή δύο ανεξάρτητων προσδιορισμών από διαφορετικά αρχικά εμβόλια.



Εικόνα 3.13 Κινητικό προφίλ μαννιτόλης (◻), ερυθριτόλης (▲), αραβιτόλης (×), βιομάζας (*), πολυολών (●) και κατανάλωσης γλυκερόλης (◆) από *Y. lipolytica* FMCC Y-74 κατά τη διάρκεια καλλιέργειας σε υπόστρωμα με βάση τη γλυκερόλη (GIo₀ ~40 g/L) σε pH 2±0,3. Συνθήκες καλλιέργειας: ζύμωση σε παστεριωμένο υπόστρωμα (65±1 °C). Ανακινούμενες κωνικές φιάλες των 250 mL στις 180±5 rpm και θερμοκρασία επώασης T=30±1 °C. Κάθε πειραματικό σημείο που παρουσιάζεται είναι η μέση τιμή δύο ανεξάρτητων προσδιορισμών από διαφορετικά αρχικά εμβόλια.

Εν κατακλείδι και με βάση τα προαναφερθέντα, τα ευρήματα υποδηλώνουν ότι η παραγωγή πολυολών δε φαίνεται να σχετίζεται με την παραγωγή βιομάζας, δεδομένου ότι και με βάση τη σύγχρονη βιβλιογραφία, η σύνθεση αυτή θεωρείται ότι είναι μια μη-συνδεδεμένη με την αύξηση διεργασία («non-growth coupled process») (Diamantopoulou and Papanikolaou, 2023). Η παραγωγή κυτταρικής μάζας ευνοήθηκε σε παστερίωση και σε μη θερμικά επεξεργασμένο υπόστρωμα. Το σύνολο των κυτταρικών μεταβολιτών (πολυόλες) σε συνθήκες παστερίωσης κρίθηκε ιδανικό σε σύγκριση με τα εντελώς μη θερμικά επεξεργασμένα υποστρώματα, τα οποία έδειξαν ότι μόνο το στέλεχος FMCC Y-74 παράγαγε ποσότητες πολυολών (σε μικρότερες συγκεντρώσεις από το πείραμα αναφοράς), ακολουθούμενο με αρκετά μικρότερη παραγωγή πολυολών από το στέλεχος NRRL Y-323. Σε αντίθεση, τα υπόλοιπα στελέχη δεν στάθηκε δυνατόν να υπερνικήσουν την παρουσία των μολυσματικών μικροοργανισμών (ως ειπώθηκε, στις περισσότερες από τις περιπτώσεις ήταν αερόβιοι Gram⁺ βάκλιοι) και να παραχθεί ικανή ποσότητα βιομάζας της ζύμης μαζί με τη σύνθεση πολυολών.

3.6 ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΠΡΟΣΘΗΚΗΣ ΧΛΩΡΙΟΥΧΟΥ ΝΑΤΡΙΟΥ ΣΤΗΝ ΑΥΞΗΣΗ ΕΠΙΛΕΓΜΕΝΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΤΗΣ ΖΥΜΗΣ

Σε αυτό το εδάφιο, στελέχη αγρίου τύπου που ξεχώρισαν σε προηγούμενες συνθήκες, αξιολογήθηκαν περαιτέρω σε πειράματα διερεύνησης ως προς την ανθεκτικότητα τους σε καλλιέργειες με συνθήκες περιοριστικές ως προς την πηγή αζώτου, παρουσία χλωριούχου νατρίου, ώστε να εξεταστεί αν είναι εφικτή η αφομοίωση του υποστρώματος, τόσο σε πολύ όξινο ($\text{pH}=2\pm 0,3$) όσο και σε ελαφρώς όξινο ($\text{pH}=6\pm 0,3$) περιβάλλον αύξησης. Σε δεύτερο χρόνο και εφόσον αποζυμώθηκε το υπόστρωμα μελετήθηκε η μετατροπή του σε 2^{ης} γενιάς μεταβολίτες (βιομάζα, πολυόλες, κιτρικό οξύ, ενδοπολυσακχαρίτες και μικροβιακά λιπίδια), δεδομένου ότι τα στελέχη της ζύμης *Y. lipolytica* θεωρούνται ως ωσμοανθεκτικά, ενώ η προσθήκη NaCl στο περιβάλλον της ζύμωσης και η συνακόλουθη αύξηση της ωσμωτικής πίεσης του μέσου θεωρείται σε πολλές περιπτώσεις που έχουν αναφερθεί στη βιβλιογραφία ότι ευνοεί την παραγωγή πολυολών από το μικροοργανισμό αυτό (για άρθρα ανασκόπησης βλέπε: Rywińska et al., 2013; Diamantopoulou and Papanikolaou, 2023). Τα στελέχη FMCC Y-74, ACA-YC 5030, LMBF 20 και NRRL Y-323 εκτέθηκαν σε ζυμώσεις βυθού παρουσία χλωριούχου νατρίου (NaCl) μεταβλητών αρχικών συγκεντρώσεων (~10 g/L, ~30 g/L, ~50 g/L και ~80 g/L) και τα αποτελέσματα των βιοδιεργασιών εκτίθενται στον Πίνακα 3.4.

Σε συνθήκες πολύ όξινο pH η προσθήκη χλωριούχου νατρίου, ακόμη και σε σχετικά χαμηλές συγκεντρώσεις (π.χ. ~10 g/L), δεν επέτρεψε σε κανένα από τα χρησιμοποιηθέντα στελέχη να αναπτυχθούν, καθώς το άλας έδρασε ανασταλτικά στην αφομοίωση του υποστρώματος και η συνέχεια με το πολύ όξινο pH του μέσου είχε ως αποτέλεσμα την μη-παραγωγή μεταβολικών προϊόντων. Υπό συνθήκες ελαφρώς όξινο pH ($6\pm 0,3$), κατάφεραν να αναπτυχθούν τα στελέχη ACA-YC 5030 και FMCC Y-74. Από την άλλη πλευρά, ακόμη και υπό ελαφρώς όξινες συνθήκες καλλιέργειας ($\text{pH}=6\pm 0,3$), η προσθήκη άλατος, ακόμη και σε χαμηλές συγκεντρώσεις (π.χ. ~10 g/L) κατέστη απολύτως απαγορευτική για την αύξηση των στελεχών LMBF 20 και NRRL Y-323. Με μια πρώτη ματιά, παρατηρήθηκε ότι όσο αυξανόταν η συγκέντρωση χλωριούχου νατρίου επήλθε καθυστέρηση στο ρυθμό κατανάλωσης του υποστρώματος (Πίνακας 3.4), ενώ μετά από την εξάντληση του αζώτου ενισχύθηκε η έκκριση εξωκυτταρικών μεταβολιτών, συνθήκες που έχουν αναφερθεί και σε άλλες έρευνες με τη ζύμη *Y. lipolytica* (Papanikolaou et al., 2002a; 2008; 2017a; 2017b; Rymowicz et al., 2009; Rakicka et al., 2016a; 2016b; Sarris et al., 2017).

Από τα αποτελέσματα δείχθηκε η ενίσχυση της παραγωγής βιομάζας με την αύξηση της συγκέντρωσης του χλωριούχου νατρίου για το στέλεχος ACA-YC 5030 και ακριβώς η αντίθετη μεταβολική συμπεριφορά για το άλλο στέλεχος της ζύμης *Y. lipolytica* FMCC Y-74. Συγκρινόμενα με τα μέχρι πρότινος βιβλιογραφικά δεδομένα, το στέλεχος ACA-YC 5030 παρουσιάζει μια ενδιαφέρουσα οπτική σχετικά με την παραγωγή βιομάζας που ευνοείται από την παρουσία χλωριούχου νατρίου, αναδεικνύοντας την υψηλή αντοχή και παραγωγικότητα του στελέχους σε αντίξοες συνθήκες. Αντιθέτως,

το στέλεχος FMCC Y-74 επιβεβαιώνει τη συνήθη μεταβολική πορεία που κυριαρχεί ως επί το πλείστον για τους περισσότερους μικροοργανισμούς, υποβαθμίζοντας την παραγωγικότητα κυτταρικής βιομάζας όσο αυξάνεται η παρουσία χλωριούχου νατρίου στρέφοντας τον μεταβολισμό προς την παραγωγή άλλων μεταβολιτών (κυρίως κιτρικού οξέος, ενδοπολυσακχαριτών και μικροβιακών λιπιδίων) (Papanikolaou et al., 2008; 2017a; 2017b; Rymowicz et al., 2009; Rakicka et al., 2016a; 2016b; Sarris et al., 2017; Tzirita et al., 2019).

Σε γενικές γραμμές, η βιοσύνθεση των πολυολών φάνηκε να παρεμποδίζεται όσο προστίθεται συγκέντρωση χλωριούχου νατρίου, ενώ παράλληλα η παραγωγή κιτρικού οξέος ενισχύθηκε αρκετά από την αυξανόμενη παρουσία του άλατος, σε αντιδιαστολή με ποικίλες εργασίες που αναφέρονται στη βιβλιογραφία (Rymowicz et al., 2009; Tomaszewska et al., 2014). Τα αποτελέσματα των ζυμώνσεων του παρόντος εδαφίου, που φαίνονται στον Πίνακα 3.4, δεικνύουν την ανωτέρω παρατήρηση. Σε συμφωνία με τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας, έχει δειχθεί σε ένα περιορισμένο αριθμό μελετών της βιβλιογραφίας (π.χ. χρήση της ζύμης *Y. lipolytica* ACA-YC 5031) αντίστοιχα αποτελέσματα, σχετικά με την προσθήκη NaCl στο περιβάλλον της αύξησης του μικροοργανισμού *Y. lipolytica*. Έτσι, σε πείραμα το οποίο εγένετο, με αραιωμένα υγρά απόβλητα ελαιουργιών (OMWs, που περιείχαν ~2 g/L ολικών φαινολικών ενώσεων) αναμίχθηκαν με περίπου 70 g/L ακατέργαστης γλυκερόλης που χρησιμοποιήθηκε ως υπόστρωμα, σε συνθήκες περιορισμού αζώτου, ευνοώντας την παραγωγή 2^{ns} γενιάς μεταβολιτών (δηλ. κιτρικό οξύ, πολυόλες, μικροβιακά λιπίδια, πολυσακχαρίτες). Πιο συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκαν καλλιέργειες σε φιάλες και μελετήθηκε η επίδραση της προσθήκης διαφορετικών συγκεντρώσεων χλωριούχου νατρίου (NaCl) (~1%, ~3%, ~5% w/v) στη βιοχημική συμπεριφορά του αναφερθέντος στελέχους. Παρατηρήθηκε αξιοσημείωτη παραγωγή βιομάζας σε όλες τις δοκιμές, ενώ στη ζύμωση αναφοράς (χωρίς OMWs και χωρίς προσθήκη αλατιού), ο μεταβολισμός μετατοπίστηκε προς τη σύνθεση πολυολών (ήτοι μαννιτόλη+αραβιτόλη+ερυθριτόλη >20 g/L) με μέγιστη συνολική τιμή κιτρικού οξέος (CA) ίση προς 10,5 g/L. Η προσθήκη OMWs οδήγησε σε μεταβολική μετάπτωση και αύξηση της παραγόμενης τιμής CA ($CA_{max}=32,7$ g/L), ενώ η συγκέντρωση των συνολικών πολυολών έπεσε σε τιμές <15 g/L. Η προσθήκη χλωριούχου νατρίου στο θρεπτικό μέσο που περιείχε OMW μείωσε ελαφρά την παραγόμενη βιομάζα, ενώ η παραγωγή CA αυξήθηκε δραστικά, φτάνοντας την τελική τιμή των 54 g/L (απόδοση μετατροπής CA που παράγεται ανά μονάδα γλυκερόλης που καταναλώθηκε ίση προς 0,82 g/g, τιμή από τις υψηλότερες της διεθνούς βιβλιογραφίας) στο πείραμα με προσθήκη ~5% w/v NaCl (Tzirita et al., 2019).

Τα μικροβιακά λιπίδια και οι ενδοπολυσακχαρίτες είχαν αντιστρόφως ανάλογη αύξηση κατά τη διάρκεια της ζύμωσης, ενώ αναφορικά με την αύξηση της συγκέντρωσης του άλατος παρουσίασαν ταύτιση μεταβολικής συμπεριφοράς, προάγοντας την παραγωγικότητα και των δύο προϊόντων. Τα ποσοστά της συσσώρευσης των λιπιδίων δεν κατόρθωσαν να ξεπεράσουν το ~20% w/w, ενώ η παραγωγή ενδοπολυσακχαριτών σημείωσε τις υψηλότερες τιμές σε σύγκριση με τα πειράματα αναφοράς (Κεφάλαιο 3.3). Ως αναφέρθηκε, στον Πίνακα 3.4 παρουσιάζονται τα δεδομένα της κινητικής αύξησης των

στελεχών που καλλιιεργήθηκαν σε υποστρώματα γλυκερόλης με αυξανόμενη παρουσία άλατος και τα οποία υπέδειξαν αντοχή στις μεταβλητές συγκεντρώσεις άλατος και παρήγαγαν μεταβολίτες σε σημαντικές ποσότητες.

Πίνακας 3.4 Ποσοτικά δεδομένα καλλιιεργούμενων στελεχών *Y. lipolytica* σε υπόστρωμα με βάση τη γλυκερόλη (Glo₀ ~40 g/L) σε τιμή pH 6±0,3, παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων χλωριούχου νατρίου. Συνθήκες καλλιιεργείας: ζύμωση σε ανακινούμενες κωνικές φιάλες των 250 mL σε ανάδευση 180±5 rpm και θερμοκρασία επώασης T=30±1 °C. Κάθε πειραματικό σημείο που παρουσιάζεται είναι η μέση τιμή δύο ανεξάρτητων προσδιορισμών από διαφορετικά αρχικά εμβόλια.

	NaCl (g/L)	Time (h)		Glo _l cons (g/L)	X (g/L)	MI (g/L)	Ery (g/L)	Ara (g/L)	POL (g/L)	Y _{POL/Glo_l} (% w/w)	Y _{IPS/X} (% w/w)	Y _{LX} (% w/w)	CA (g/L)
ACA-YC 5030	~10	114	στ	19,7	6,1	3,2	2,7	1,4	7,3	37,2	12,5	12,2	2,9
		184	α,β,γ,δ,ε,ζ	40,9	11,7	6,6	5	1,6	13,2	32,3	23,5	7,1	5,1
	~30	114	στ	22,6	13	1,5	4,6	1,5	7,5	33,1	13,5	13,2	6,2
		240	α,β,γ,δ,ε,ζ	34,7	13,1	2,7	6,5	2,2	11,5	33,1	24,1	4,9	7,9
	~50	140	στ	28,9	13	0,9	5,8	1,1	7,8	27	10,8	13,9	7,2
		284	α,β,γ,δ,ε,ζ	37,8	14,5	1,8	7,5	1,6	10,9	28,8	24,7	3,3	8,3
	~80	140	στ	26,7	12,1	0,6	4,9	0,2	5,6	21,1	11,9	14,2	7,7
		168	ε	33,6	13,5	1	7,5	0,7	9,1	27,2	25	13,1	9,1
		356	α,β,γ,δ	41,6	14,6	1,1	8,1	1	10,2	24,5	13,4	7,1	10,6
FMCC Y-74	~10	48	στ	22,1	8,1	8,5	1,4	1,9	11,7	53,1	22,8	14,1	1,6
		96	α,β,γ,δ,ε,ζ	41,6	14,1	11,9	4,3	3,4	19,6	47,1	24,9	13	2,4
	~30	72	β,στ	27,8	6,9	9,6	5,2	1,9	16,7	60	21,4	14,4	2,9
		144	α,γ,δ,ε,ζ	42,8	14	9,6	7,4	2,4	19,4	45,4	25,2	4,5	4
	~50	72	στ	21,2	7,6	4,1	3,8	nd	7,9	37,3	25,9	15,3	2,7
		182	α,β,γ,δ,ε,ζ	41,1	13,6	7,8	9,4	1,8	19	43,3	26,1	11,5	4,1
	~80	72	στ	20,5	5,7	3,1	5	0,9	9	43,9	17,6	20,4	1,8
		96	β	28,5	6,1	7,1	7	1	15,2	53,1	22,4	19,4	3,1
		214	α,γ,δ,ε,ζ	41,3	9	7,1	9,7	1,4	18,2	44	27,6	17	5,5

α: Μέγιστη συγκέντρωση βιομάζας (g/L), β: Μέγιστη συγκέντρωση μαννιτόλης (g/L), γ: Μέγιστη συγκέντρωση ερυθριτόλης (g/L), δ: Μέγιστη συγκέντρωση αραβιτόλης (g/L), ε: Μέγιστο ποσοστό ενδοκυτταρικών πολυσακχαριτών επί ξηράς ουσίας (Y_{IPS/X}, % w/w), στ: Μέγιστο ποσοστό λιπιδίων επί ξηράς ουσίας (Y_{LX}, % w/w), ζ: Μέγιστη συγκέντρωση κιτρικού οξέος (g/L).

nd: Δεν έχει προσδιοριστεί (≤0.3 g/L).

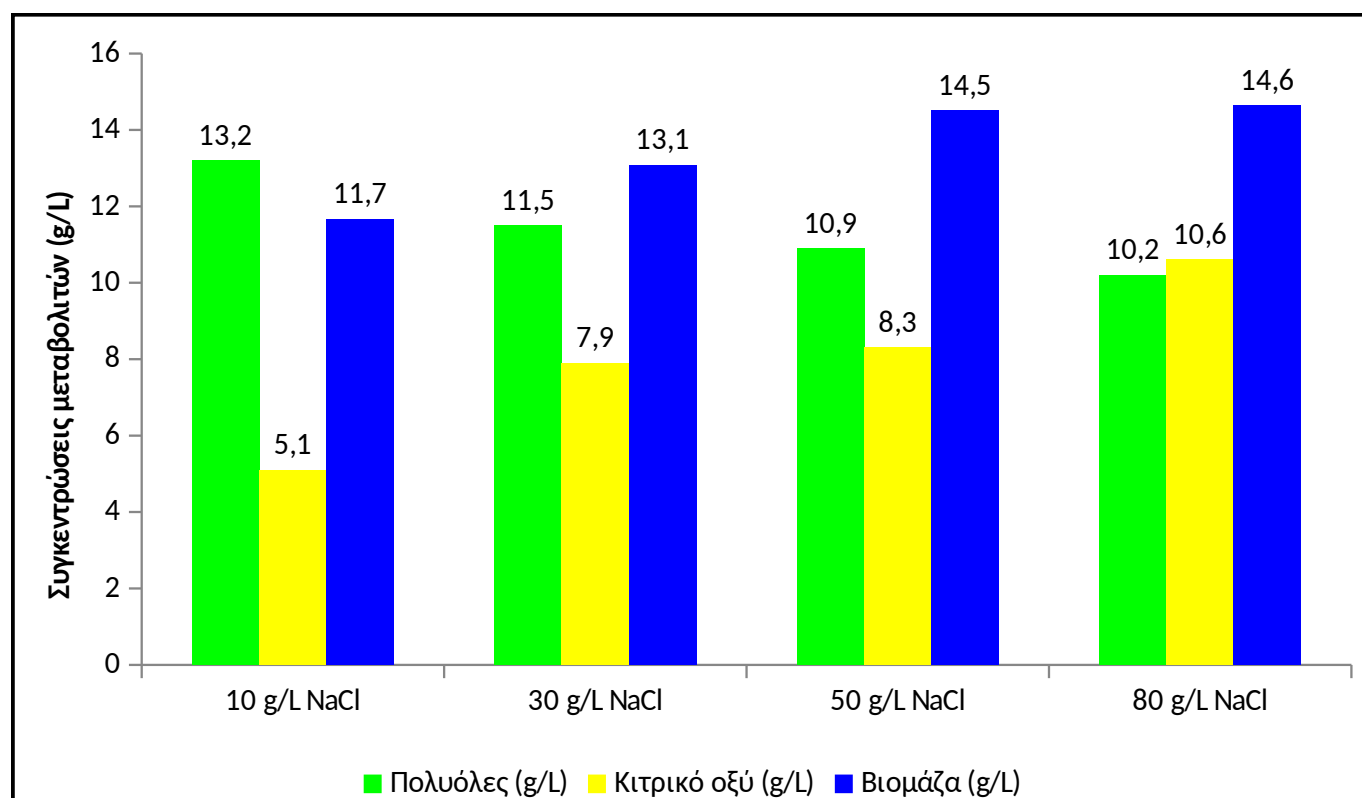
Πιο αναλυτικά, η μέγιστη συγκέντρωση της βιομάζας 14,6 g/L παρατηρήθηκε από το στέλεχος ACA-YC 5030 με αρχική συγκέντρωση βιομηχανικής γλυκερόλης ~40 g/L και συγκέντρωση χλωριούχου νατρίου ~80 g/L. Αντιθέτως, το στέλεχος FMCC Y-74 παρήγαγε όμοια ποσότητα ξηρής βιομάζας (14,1 g/L) σε διαφορετική συγκέντρωση χλωριούχου νατρίου ~10 g/L, με την τιμή της βιομάζας να μειώθηκε όταν αυξήθηκε η συγκέντρωση άλατος, υποδεικνύοντας ότι η μεγάλη συγκέντρωση χλωριούχου νατρίου αναστέλλει σχετικά την παραγωγή βιομάζας. Διαπιστώνεται ότι τα δυο στελέχη δεν ακολούθησαν την ίδια μεταβολική συμπεριφορά, αλλά ταυτίστηκαν στον ρυθμό κατανάλωσης του υποστρώματος, ο οποίος μειώθηκε δραματικά με την προσθήκη του χλωριούχου νατρίου, γεγονός που δύναται να αποδειχθεί από τη χρονική διάρκεια που χρειάστηκε μέχρι την πλήρη αφομοίωση του υποστρώματος.

Με αφορμή τη στροφή του μεταβολισμού προς άλλους μεταβολίτες, μελετήθηκε η απόδοση του συντελεστή ενδοπολυσακχαριτών επί ξηράς ουσίας που σημείωσε σημαντικά ποσοστά σε σύγκριση με

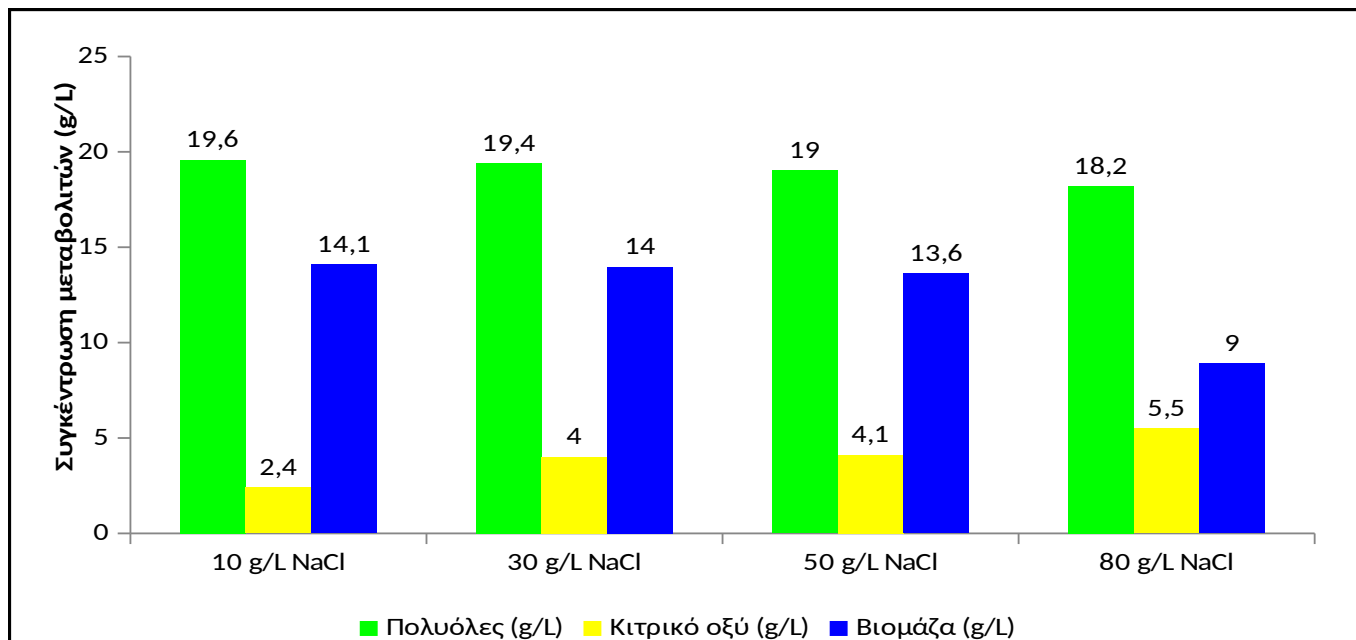
όλες τις προαναφερθείσες συνθήκες έκθεσης των στελεχών, καθώς κυμάνθηκε από ~20% w/w έως ~28% w/w. Η μείωση της κυτταρικής ανάπτυξης σε συνδυασμό με την υψηλή συγκέντρωση χλωριούχου νατρίου, οδήγησε τους ενδοπολυσακχαρίτες να επιτύχουν σχετικά υψηλές τιμές, το οποίο θα μπορούσε να οφείλεται και στις συνθήκες οσμωτικής καταπόνησης, οι οποίες υπήρχαν σε αυξανόμενες τιμές χλωριούχου νατρίου στο περιβάλλον της αύξησης. Ο μέγιστος συντελεστής πολυσακχαριτών επί ξηράς μικροβιακής μάζας επιτεύχθηκε σε συγκέντρωση χλωριούχου νατρίου ~80 g/L και δεν παρουσίασε μεγάλη απόκλιση για τα δυο στελέχη που αναπτύχθηκαν. Συγκεκριμένα, το στέλεχος ACA-YC 5030 σημείωσε ~25% w/w επί ξηράς ουσίας και το FMCC Y-74 έφτασε τα ~28% w/w αντίστοιχα. Η πορεία της παραγωγής των ενδοπολυσακχαριτών παρουσίασε αυξητική τάση ως την ολοκληρωτική αφομοίωση του υποστρώματος σχεδόν για όλες τις δοκιμές που έλαβαν χώρα (βλέπε Πίνακα 3.4). Απεναντίας, η παραγωγή μικροβιακών λιπιδίων ενισχύθηκε κατά τις πρώιμες ώρες της ζύμωσης από την εξάντληση του αζώτου και στην πορεία μειώθηκε σταδιακά, σε συμφωνία με αρκετές δημοσιεύσεις της διεθνούς βιβλιογραφίας (Paranikolaou et al., 2009; 2010; 2013; 2017a; 2017b; Makri et al., 2010; Tchakouteu et al., 2015). Η παρουσία αυξανόμενου χλωριούχου νατρίου ευνόησε την λιποσυσσώρευση με τιμές που δεν κρίθηκαν αξιόλογες, καθώς δεν ξεπέρασαν το ~20% w/w, τιμή η οποία, ως έχει αναφερθεί, θεωρείται το κατώτατο όριο, ώστε κάποιος μικροοργανισμός να θεωρηθεί ως ελαιογόνος (Paranikolaou and Aggelis, 2011a; 2011b; 2019). Από την άλλη πλευρά, για μικροβιακά είδη τα οποία ακολουθούν το τυπικό προφίλ των ελαιογόνων μικροοργανισμών σχετικά με τη δυνατότητα παραγωγής λιπιδίων μέσω της *de novo* διεργασίας συσσώρευσης αυτών (π.χ. στελέχη του μικροοργανισμού *Rhodospiridium toruloides* καλλιεργούμενα σε υποστρώματα με βάση τη γλυκόζη, τα οποία τυπικά συσσωρεύουν αποθεματικά λιπίδια μετά από το πέρας της παρουσίας αφομοιώσιμου αζώτου στο μέσο της καλλιέργειας), έχει δειχθεί ότι η προσθήκη χλωριούχου νατρίου μέχρι κάποιου ορίου (π.χ. σε συγκεντρώσεις εντός των ορίων 3-5% w/v) ευνοεί τη συσσώρευση λιπιδίων, τόσο σε απόλυτες τιμές (σε g/L) όσο και σε σχετικές τιμές (σε % w/w επί ξηράς μικροβιακής μάζας) σε σχέση με το «μάρτυρα» (καλλιέργεια χωρίς προσθήκη άλατος) (Tchakouteu et al., 2017).

Αξίζει να σημειωθεί ότι η παραγωγή πολυολών μειώθηκε με την προσθήκη αυξανόμενης συγκέντρωσης χλωριούχου νατρίου, στρέφοντας το μεταβολισμό προς την παραγωγή κιτρικού οξέος, που, ως αναφέρθηκε, σε ορισμένες περιπτώσεις και για κάποια στελέχη του μικροοργανισμού *Y. lipolytica* μπορεί να ευνοηθεί από την παρουσία άλατος (Tzirita et al., 2019). Κατά κύριο λόγο, η παραγωγή κιτρικού οξέος δε συνάδει με την παραγωγή πολυολών, γεγονός που δεικνύεται και από τον Πίνακα 3.4. Το στέλεχος FMCC Y-74 διακρίθηκε για τη μέγιστη τιμή πολυολών (19,6 g/L) που επιτεύχθηκε σε συγκέντρωση άλατος ~10 g/L, ενώ το στέλεχος ACA-YC 5030 για την ίδια συγκέντρωση χλωριούχου νατρίου σημείωσε 13,2 g/L. Σημαντικό και άξιο προσοχής είναι το γεγονός ότι η αναλογία της μαννιτόλης και της ερυθριτόλης μεταβάλλονταν με την παρουσία του χλωριούχου νατρίου. Συγκεκριμένα, όταν αυξήθηκε η συγκέντρωση χλωριούχου νατρίου άλλαξε η κυρίαρχη πολυόλη που παράχθηκε. Στις χαμηλές συγκεντρώσεις (~10 g/L) υπερίσχυσε η μαννιτόλη με 11,9 g/L έναντι της

ερυθριτόλης με 4,3 g/L για το στέλεχος FMCC Y-74, ενώ αντίστοιχα στις υψηλές συγκεντρώσεις NaCl (~80 g/L) κυριάρχησε η ερυθριτόλη με 9,7 g/L έναντι της μαννιτόλης που μειώθηκε η παραγωγή της στα 7,1 g/L. Ομοίως κινήθηκε και το στέλεχος ACA-YC 5030, με ελαφρώς μειωμένη σύνθεση πολυολών. Το κομβικό σημείο καμψής για την εναλλαγή του μεταβολισμού προς την παραγωγή ερυθριτόλης φάνηκε να ορίζεται στα ~30 g/L με ~50 g/L προσθήκης χλωριούχου νατρίου. Όσον αφορά τη σύνθεση αραβιτόλης, δείχθηκε ότι η παρουσία του χλωριούχου νατρίου ανέστειλε την παραγωγή της. Από την άλλη πλευρά, ως αναφέρθηκε και προηγουμένως, η αύξηση ωσμωφιλων στελεχών ζυμομύκητα σε υπόστρωμα γλυκερόλης σε συνδυασμό με όξινα pH προωθούν την παραγωγή ερυθριτόλης, συνθήκη η οποία δεν επιβεβαιώθηκε από τα τρέχοντα πειραματικά δεδομένα (Rymowicz et al., 2008; 2009). Επιπλέον παρατηρήθηκε η ενίσχυση παραγωγής της ερυθριτόλης, γεγονός που συνδέεται άρρηκτα με την υψηλή ωσμωτική πίεση από την προσθήκη χλωριούχου, στοχεύοντας στην εξισορρόπηση ωσμωτικής πίεσης εξωκυτταρικά και ενδοκυτταρικά (Rymowicz et al., 2010). Στον αντίποδα, πολλές μελέτες υποστηρίζουν ότι η μαννιτόλη παράγεται από το στέλεχος με απώτερο σκοπό να προστατευτεί από το ωσμωτική καταπόνηση (Yang et al., 2014). Ακολουθούν οι Εικόνες 3.14 και 3.15 που παρουσιάζουν ευκρινώς τις παραχθείσες ποσότητες των μεταβολικών προϊόντων σε όλες τις μεταβλητές συγκεντρώσεις της προσθήκης χλωριούχου νατρίου και για τα δύο στελέχη.



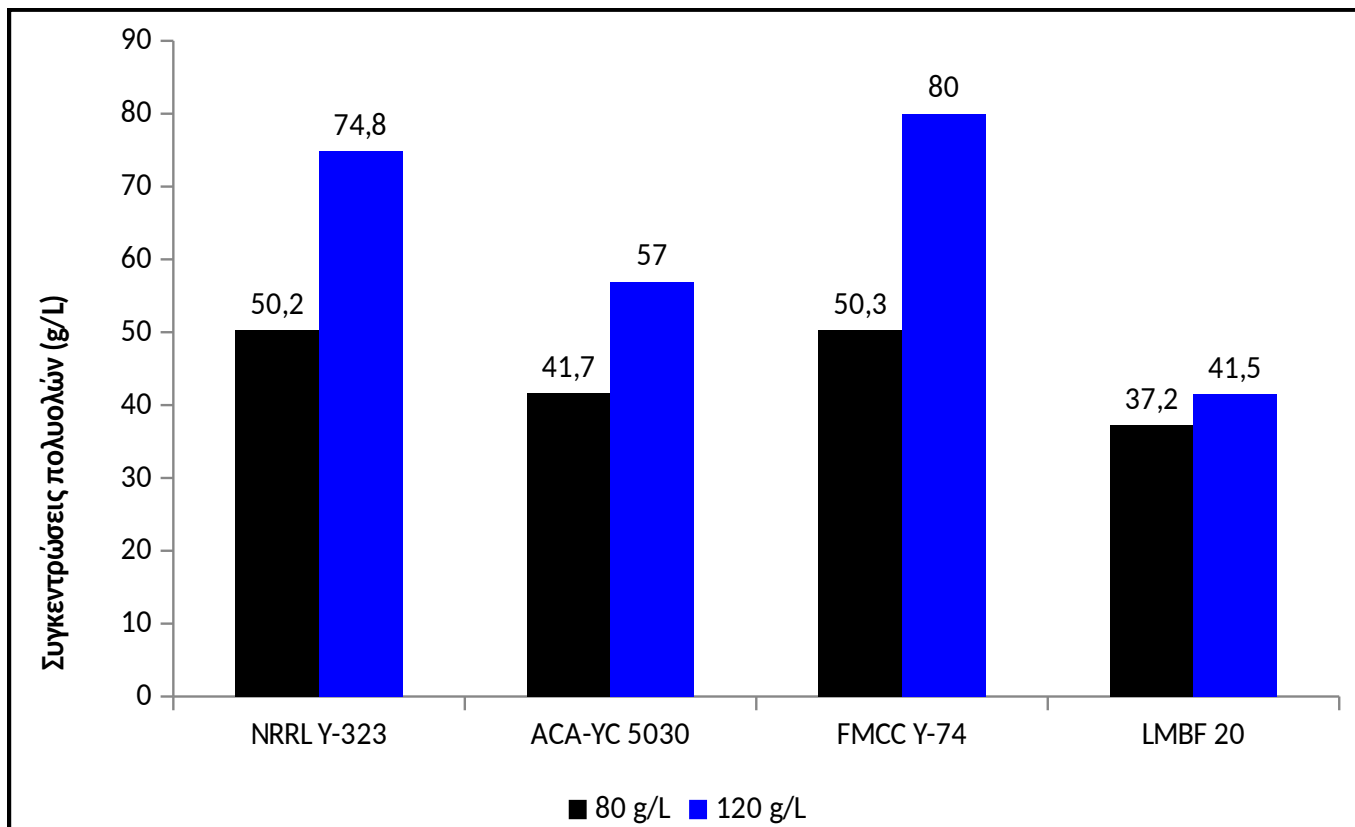
Εικόνα 3.14 Ποσοτικά δεδομένα των παραγόμενων πολυολών, κιτρικού οξέος και βιομάζας από το καλλιεργούμενο στέλεχος ACA-YC 5030 σε υπόστρωμα με βάση την γλυκερόλη (Glo₀ ~40 g/L) παρουσία μεταβλητών συγκεντρώσεων χλωριούχου νατρίου. Συνθήκες καλλιέργειας: ζυμώσεις σε ανακινούμενες κωνικές φιάλες των 250 mL στις 180±5 rpm σε pH 6±0,3 και θερμοκρασίας επώασης T=30±1 °C. Κάθε πειραματικό σημείο που παρουσιάζεται είναι η μέση τιμή δύο ανεξάρτητων προσδιορισμών από διαφορετικά αρχικά εμβόλια.



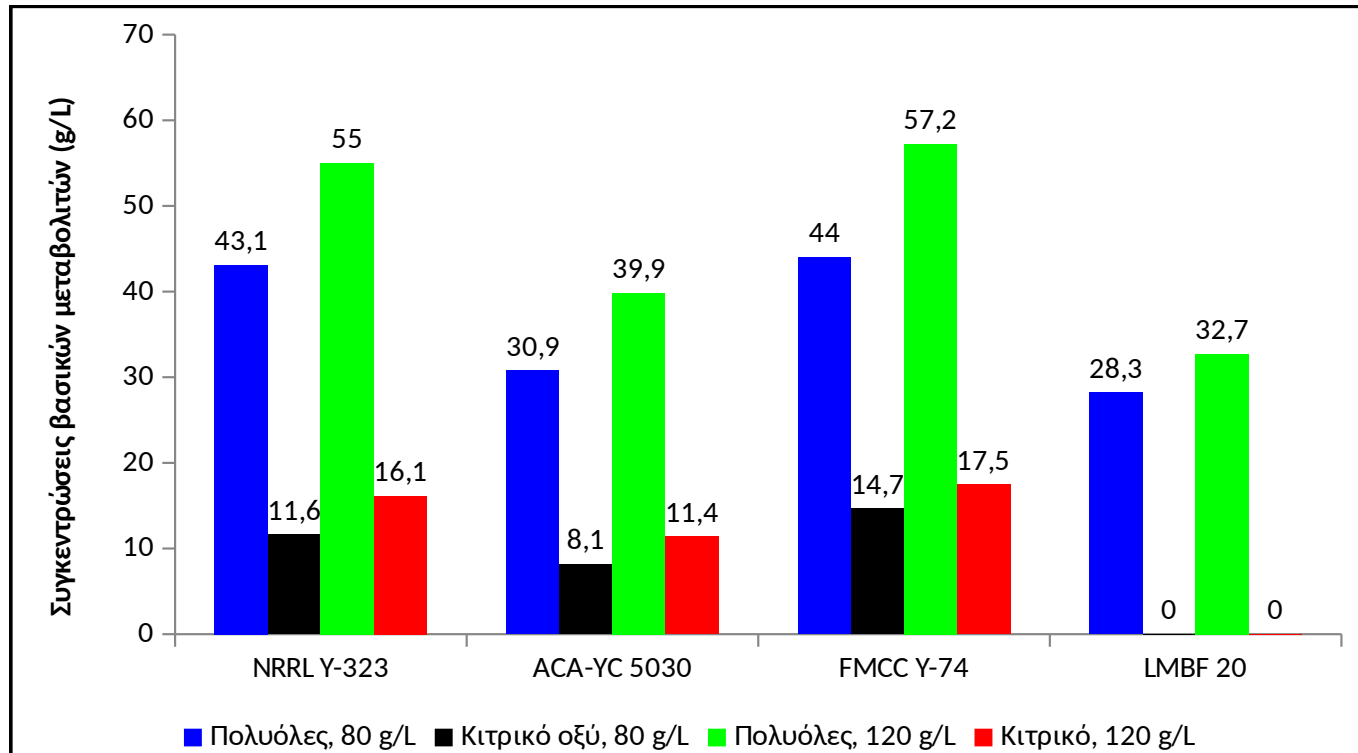
Εικόνα 3.15 Ποσοτικά δεδομένα των παραγόμενων πολυολών, κιτρικού οξέος και βιομάζας από το καλλιεργούμενο στέλεχος FMCC Y-74 σε υπόστρωμα με βάση την γλυκερόλη (Glo₀ ~40 g/L) παρουσία μεταβλητών συγκεντρώσεων χλωριούχου νατρίου. Συνθήκες καλλιέργειας: ζυμώσεις σε ανακινούμενες κωνικές φιάλες των 250 mL στις 180±5 rpm σε pH 6±0,3 και θερμοκρασίας επώασης T=30±1 °C. Κάθε πειραματικό σημείο που παρουσιάζεται είναι η μέση τιμή δύο ανεξάρτητων προσδιορισμών από διαφορετικά αρχικά εμβόλια.

3.7 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΑΥΞΑΝΟΜΕΝΗΣ ΑΡΧΙΚΗΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΟΣ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΗΣ ΓΛΥΚΕΡΟΛΗΣ ΣΕ ΕΠΙΛΕΓΜΕΝΑ ΣΤΕΛΕΧΗ ΤΗΣ ΖΥΜΗΣ

Έτερο βήμα, πολύ ενδιαφέρον προς διερεύνηση, ήταν τα αποτελέσματα της επίδρασης της αυξανόμενης αρχικής συγκέντρωσης του υποστρώματος (αρχικές συγκεντρώσεις ~80 g/L και ~120 g/L) για τα στελέχη FMCC Y-74, ACA-YC 5030, LMBF 20 και NRRL Y-323, σε ζυμώσεις βυθού υπό ανάδευση, διατηρώντας σταθερή την αρχική συγκέντρωση των αζωτούχων ενώσεων και του pH. Σε αυτό το στάδιο, μελετήθηκε σε βάθος η επίδραση της αρχικής συγκέντρωσης γλυκερόλης στη μικροβιακή αύξηση των στελεχών, με την επίδραση του χαμηλού και υψηλού pH της καλλιέργειας. Όπως φαίνεται και στον Πίνακα 3.5, σε πολύ όξινο περιβάλλον αύξησης (pH=2±0,3) παρήχθησαν κυρίως πολυόλες και βιομάζα, ενώ το ελαφρώς όξινο προς ουδέτερο pH (6±0,3) ενίσχυσε σχετικά τη βιοσύνθεση κιτρικού οξέος (σε συμφωνία με: Papanikolaou et al., 2017a; Diamantopoulou et al., 2023). Παρόλα αυτά και σε αντιδιαστολή με ένα αρκετά σημαντικό μέρος της διεθνούς βιβλιογραφίας (για άρθρα ανασκόπησης βλέπε: Rywińska et al., 2013; Diamantopoulou and Papanikolaou, 2023) και στις περιπτώσεις των ζυμώσεων σε ελαφρώς όξινο προς ουδέτερο pH στο μέσο της καλλιέργειας (6±0,3), ο περιορισμός σε άζωτο έστρεψε τον κυτταρικό μεταβολισμό των στελεχών της ζύμης *Y. lipolytica* κυρίως προς τη βιοσύνθεση πολυολών, δεδομένου του γεγονότος ότι η παρουσία των πολυολών ήταν αρκετά υψηλή για όλα τα μελετηθέντα στελέχη, αφού σχεδόν σε όλες τις περιπτώσεις το κιτρικό οξύ δεν ήταν το κυρίαρχο μεταβολικό προϊόν των βιοδιεργασιών (Πίνακας 3.6). Η παρουσία προσμίξεων της βιομηχανικής γλυκερόλης ουδόλως επηρέασε την εξωκυτταρική έκκριση δευτερογενών προϊόντων που συνοδεύτηκε από αύξηση, κάτι το οποίο συνάδει με την αντίστοιχη βιβλιογραφία (Rywińska et al., 2013; Carly and Fickers, 2018; Diamantopoulou and Papanikolaou, 2023). Θα πρέπει να αναφερθεί σε αυτό το εδάφιο, ότι όλες οι πραγματοποιηθείσες ζυμώσεις εγένοντο σε βιομηχανική γλυκερόλη η οποία προήρχετο από μετεστεροποίηση χρησιμοποιημένων («used-cooked») μαγειρικών ελαίων, με σαφώς μεγαλύτερο ποσοστό προσμίξεων σε σχέση με τη γλυκερόλη προερχόμενη από μετεστεροποίηση τυπικών φυτικών ελαίων (Chatzifragkou and Papanikolaou, 2012), δεικνύοντας ακόμη περισσότερο τη «δυναμική» της «ανθεκτικότητας» των χρησιμοποιηθέντων ζυμών στις βιοδιεργασίες που πραγματοποιήθηκαν. Επιπλέον, να σημειωθεί ότι η συγκέντρωση διαλυτού οξυγόνου για όλα τα στελέχη δεν υπερέβη καθ' όλη τη διάρκεια των ζυμώσεων το κρίσιμο όριο των ~30% v/v. Προκειμένου δε να αξιολογηθεί περαιτέρω η βιοχημική συμπεριφορά των εμπλεκόμενων στελεχών, οι ζύμες καλλιεργήθηκαν και σε υψηλότερη τιμή pH (6±0,3), με τα αποτελέσματα για τις δυο αρχικές τιμές γλυκερόλης (~80 g/L και ~120 g/L) και το πολύ όξινο pH (2±0,3) να εμφανίζονται στον Πίνακα 3.5. Στις Εικόνες 3.16 και 3.17 φαίνονται οι διακυμάνσεις που σημείωσαν όλα τα στελέχη αναφορικά με τη βιοσύνθεση πολυολών και κιτρικού οξέος στο σύνολο των εκτιθέμενων συνθηκών.

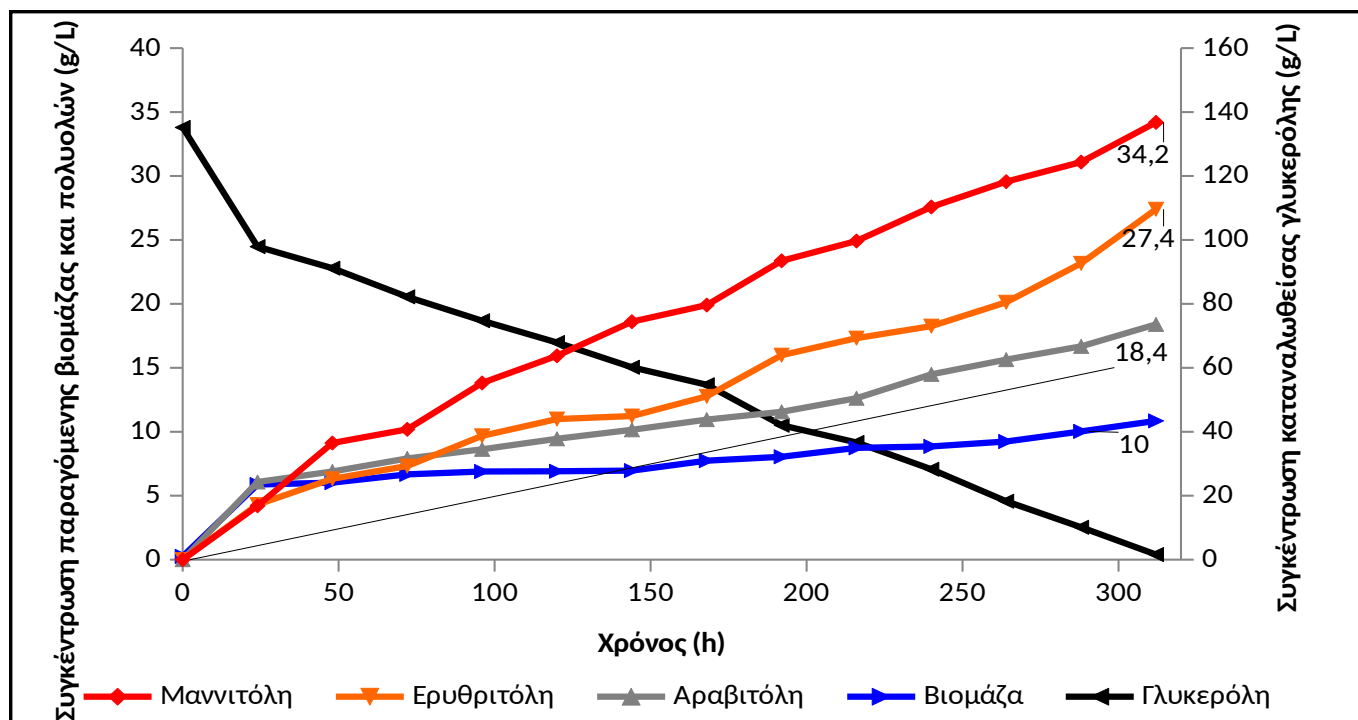


Εικόνα 3.16 Ποσοτικά δεδομένα των παραγόμενων πολυολών από τα καλλιεργούμενα στελέχη *Y. lipolytica* σε υπόστρωμα με βάση τη γλυκερόλη (Glo₀ ~80 g/L και ~120 g/L) σε όξινη τιμή pH (2±0,3). Συνθήκες καλλιέργειας: ζυμώσεις σε ανακινούμενες κωνικές φιάλες των 250 mL στις 180±5 rpm και θερμοκρασία επώασης T=30±1 °C. Κάθε πειραματικό σημείο που παρουσιάζεται είναι η μέση τιμή δύο ανεξάρτητων προσδιορισμών από διαφορετικά αρχικά εμβόλια.

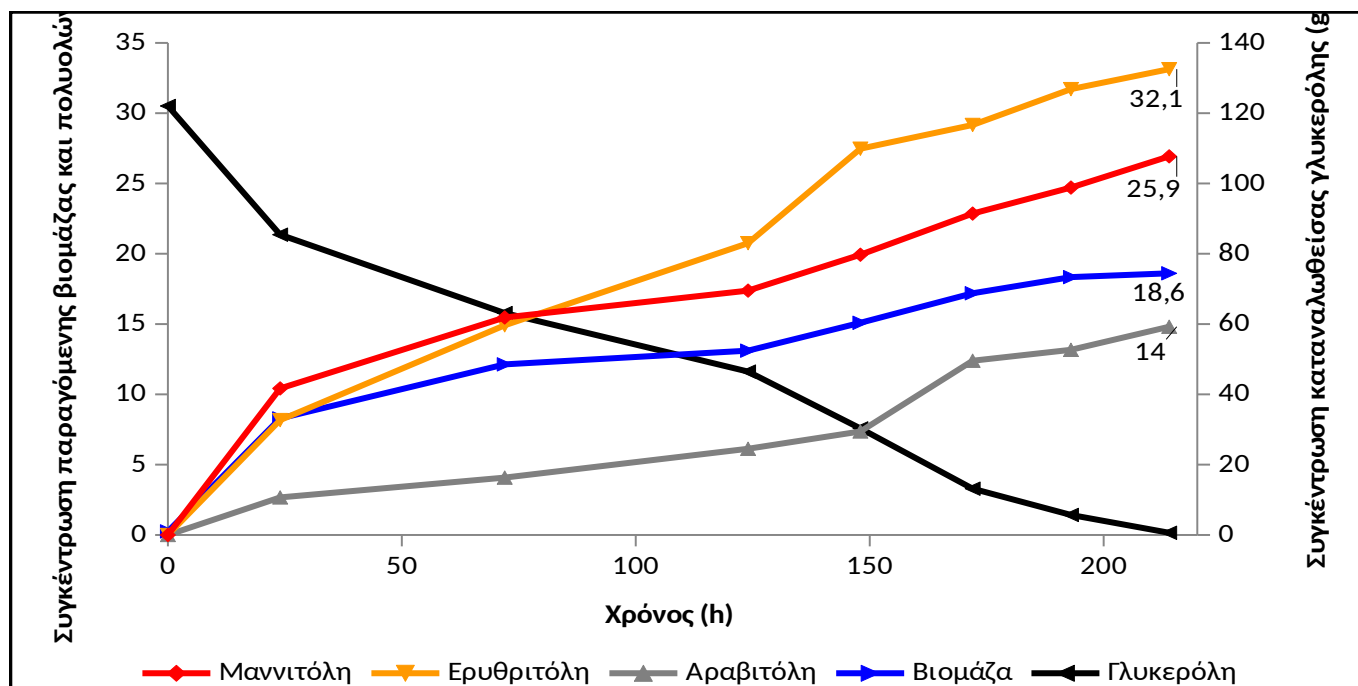


Εικόνα 3.17 Ποσοτικά δεδομένα των παραγόμενων πολυολών και κιτρικού οξέος από τα καλλιεργούμενα στελέχη *Y. lipolytica* σε υπόστρωμα με βάση τη γλυκερόλη (Glo₀ ~80 g/L και ~120 g/L) σε ελαφρώς όξινες τιμές pH (6±0,3). Συνθήκες καλλιέργειας: ζυμώσεις σε ανακινούμενες κωνικές φιάλες των 250 mL στις 180±5 rpm και θερμοκρασία επώασης T=30±1 °C. Κάθε πειραματικό σημείο που παρουσιάζεται είναι η μέση τιμή δύο ανεξάρτητων προσδιορισμών από διαφορετικά αρχικά εμβόλια.

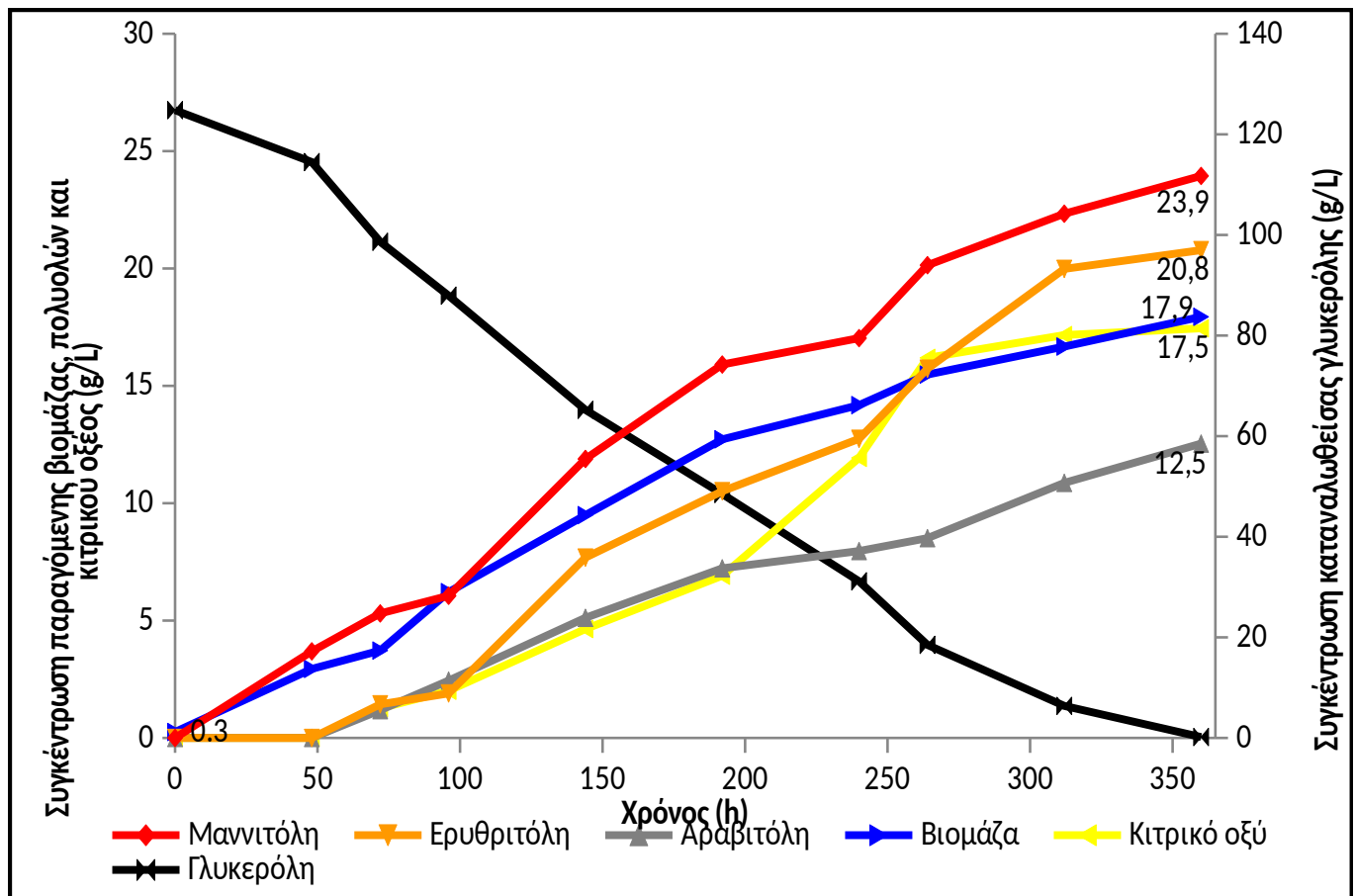
Στις Εικόνες 3.18 και 3.19 εμφανίζονται οι κινητικές για τα στελέχη που σημείωσαν τις μέγιστες παραγωγές πολυολών σε όξινα pH, καθώς και η Εικόνα 3.20 που απεικονίζει τη μέγιστη παραγωγή κιτρικού οξέος σε σχέση με τα υπόλοιπα παραγόμενα προϊόντα.



Εικόνα 3.18 Κινητικό προφίλ μαννιτόλης (□), ερυθριτόλης (▲), αραβιτόλης (×), βιομάζας (*) και κατανάλωσης γλυκερόλης (♦) από *Y. lipolytica* FMCC Y-74 κατά τη διάρκεια καλλιέργειας σε υπόστρωμα με βάση τη γλυκερόλη (GI₀ ~120 g/L) σε pH 2±0,3. Συνθήκες καλλιέργειας: ζύμωση σε ανακινούμενες κωνικές φιάλες των 250 mL στις 180±5 rpm και θερμοκρασία επώασης T=30±1 °C. Κάθε πειραματικό σημείο που παρουσιάζεται είναι η μέση τιμή δύο ανεξάρτητων προσδιορισμών από διαφορετικά αρχικά εμβόλια.



Εικόνα 3.19 Κινητικό προφίλ μαννιτόλης (□), ερυθριτόλης (▲), αραβιτόλης (×), βιομάζας (*) και κατανάλωσης γλυκερόλης (♦) από *Y. lipolytica* NRRL Y-323 κατά τη διάρκεια καλλιέργειας σε υπόστρωμα με βάση τη γλυκερόλη (GI₀ ~120 g/L) υπό pH 2±0,3. Συνθήκες καλλιέργειας: ζύμωση σε ανακινούμενες κωνικές φιάλες των 250 mL στις 180±5 rpm και θερμοκρασία επώασης T=30±1 °C. Κάθε πειραματικό σημείο που παρουσιάζεται είναι η μέση τιμή δύο ανεξάρτητων προσδιορισμών από διαφορετικά αρχικά εμβόλια.



Εικόνα 3.20 Κινητικό προφίλ μαννιτόλης (□), ερυθριτόλης (▲), αραβιτόλης (×), βιομάζας (*), κιτρικού οξέος (+) και κατανάλωσης γλυκερόλης (♦) από *Y. lipolytica* FMCC Y-74 κατά τη διάρκεια καλλιέργειας σε υπόστρωμα με βάση τη γλυκερόλη (G10₀ ~120 g/L) σε pH 6±0,3. Συνθήκες καλλιέργειας: ζύμωση σε ανακινούμενες κωνικές φιάλες των 250 mL στις 180±5 rpm και θερμοκρασία επώασης T=30±1 °C. Κάθε πειραματικό σημείο που παρουσιάζεται είναι η μέση τιμή δύο ανεξάρτητων προσδιορισμών από διαφορετικά αρχικά εμβόλια.

Ως αναφέρθηκε, σημαντικό είναι το γεγονός ότι σε όλες τις περιπτώσεις και ανεξάρτητα από τις τιμές του pH στο μέσο της καλλιέργειας, ο καταβολισμός της γλυκερόλης διοχετεύτηκε κυρίως προς την έκκριση πολυολών, λόγω του επιβαλλόμενου περιορισμού ως προς την πηγή αζώτου. Η επιρροή του pH, όπως αναμενόταν ήταν καθοριστική για την παραγωγικότητα των στελεχών (Rywińska et al., 2013; Carly and Fickers, 2018; Diamantopoulou and Papanikolaou, 2023). Επίσης, ενδιαφέρουσα και άξια αναφοράς η παραγωγή πολυολών που καταγράφηκε για σχεδόν ουδέτερες τιμές pH (6±0,3), καθώς εκκρίθηκαν σημαντικές ποσότητες τους στο μέσο της καλλιέργειας. Συγκεκριμένα, σε αρχική συγκέντρωση υποστρώματος ~120 g/L ξεχώρισαν τα στελέχη NRRL Y-323 με παραγωγή 55 g/L και ακολούθησε το στέλεχος FMCC Y-74 που σημείωσε 57,2 g/L. Όπως έχει αναφερθεί και στα προηγούμενα εδάφια, αυτή η συμπεριφορά μπορεί να θεωρηθεί εν δυνάμει ασυνήθιστη για τα διάφορα στελέχη της ζύμης *Y. lipolytica* που κατά κύριο λόγο παράγουν κιτρικό οξύ σε σχετικά υψηλές τιμές pH (Rymowicz et al., 2006; 2008; 2009; Tomaszewska et al., 2014). Στις περισσότερες αναφορές για αντιστοίχου τύπου πειραματικές διεργασίες έχει δειχθεί ότι σε σχεδόν ουδέτερα pH μικροβιακής καλλιέργειας, κυριαρχεί η βιοσύνθεση του οργανικών οξέων και δη του κιτρικού, επιτυγχάνοντας σημαντικές συγκεντρώσεις έναντι της παραγωγής των πολυολών (Rymowicz et al., 2006; 2008; 2009; Tomaszewska et al., 2014). Ωστόσο, σύμφωνα με τα αποτελέσματα της τρέχουσας μελέτης, διαφαίνεται ότι τα στελέχη FMCC Y-74, LMBF

20, NRRL Y-323 και ACA-YC 5030 στάθηκαν αδύναμα να παράξουν κιτρικό οξύ σε ποσότητες αντίστοιχες των πολυολών τουλάχιστον κατά την καλλιέργειά τους στις φιάλες, καθώς φανερώθηκε ότι ο μεταβολισμός στράφηκε επιτακτικά προς την έκκριση πολυολών, υποβαθμίζοντας αυτή του κιτρικού οξέος, σε συμφωνία με ένα σχετικά περιορισμένο αριθμό κάποιων τελευταίων μελετών της διεθνούς βιβλιογραφίας (βλέπε: Papanikolaou et al., 2017b; 2020; Sarantou et al., 2021). Το γεγονός αυτό οφείλεται στην αυξημένη συγκέντρωση αρχικού υποστρώματος που στρέφει το μεταβολισμό προς την παραγωγή πολυολών. Οι τιμές του κιτρικού οξέος που παράχθηκαν στο παρόν κεφάλαιο κυμάνθηκαν από 8,1 g/L έως 14,7 g/L για αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης ~80 g/L και από 11,4 g/L έως 17,5 g/L για αρχική συγκέντρωση υποστρώματος ~120 g/L, τιμές που και στις δύο περιπτώσεις ήταν σημαντικά χαμηλότερες από τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις συνολικών πολυολών. Ενδιαφέρον στάθηκε και το γεγονός ότι το στέλεχος LMBF 20 δεν παρήγαγε καθόλου ποσότητες κιτρικού οξέος ακόμα και σε pH 6±0,3.

Πίνακας 3.5 Παρατηρούμενος χρόνος για την κατανάλωση γλυκερόλης και τη μέγιστη παραγωγή μεταβολικών προϊόντων, των διακριθέντων στελεχών της ζύμης *Y. lipolytica*, κατά την αύξηση σε ακάθαρτη βιομηχανική γλυκερόλη. Συνθήκες καλλιέργειας: Ασυνεχείς ζυμώσεις σε ανακινούμενες κωνικές φιάλες (180±5 rpm), T=30±1 °C, αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης ~80 g/L και ~120 g/L, pH=2±0,3 υπό αερόβιες και περιοριστικές σε άζωτο συνθήκες. Κάθε πειραματικό σημείο που παρουσιάζεται είναι η μέση τιμή δύο ανεξάρτητων προσδιορισμών από διαφορετικά αρχικά εμβόλια.

	Strains	Time (h)		GloI _{cons} (g/L)	X (g/L)	MI (g/L)	Ery (g/L)	Ara (g/L)	POL (g/L)	Y _{POL/GloI} (% w/w)	Y _{IPS/X} (% w/w)	Y _{L/X} (% w/w)
80 g/L Γλυκερόλης	ACA-YC 5030	148	στ	39,1	14,7	8,2	5,8	3,1	17,1	43,7	8,8	12,8
		364	α,β,γ,δ,ε	73,5	19,6	18,2	15,4	8,1	41,7	56,7	14,1	6,1
	LMBF 20	144	γ	72,3	11,4	16,8	13,4	2,9	33,1	45,8	16,8	6,9
		196	α,β,δ,ε,στ	79,5	12,2	17,4	13,4	6,4	37,2	46,8	17,3	7,7
	NRRL Y-323	192	ε,στ	72,9	13,1	15,8	21,8	6,1	43,7	59,9	14,5	7
		216	α,β,γ,δ	84,4	15,6	17,4	25,5	7,3	50,2	59,5	13,6	4,7
	FMCC Y-74	168	στ	63,1	6,5	16,1	13,6	6,9	36,6	58	19,7	16,4
		240	ε	76,7	7,1	21,1	16,6	8,2	45,9	59,8	23,9	10,2
		264	α,β,γ,δ	82,8	7,8	23,2	17,7	9,4	50,3	60,7	22,4	8,8
	120 g/L Γλυκερόλης	ACA-YC 5030	24	στ	39,3	12,6	8,7	8,8	4,2	21,7	55,2	8,7
124			ε	69,3	17,1	20,5	10,2	6,4	37,1	53,5	15,9	10,9
172			α,β,γ,δ	117	19,5	24,3	22,6	10	57	48,7	13,6	9,2
LMBF 20		144	ε	88,5	9,3	15	7,2	0,7	22,9	25,9	23,4	8,1
		216	στ	113,6	12,4	20,5	13,3	4,7	38,5	33,9	15	9,7
		240	α,β,γ,δ	120,1	13,4	20,7	15,5	5,2	41,5	34,6	13,9	2,6
NRRL Y-323		24	στ	36,6	5,3	10,4	8,2	2,7	21,3	58,2	5,8	17,6
		148	ε	91,7	15,1	19,9	27,5	7,4	54,8	59,8	7,1	12,1
		214	α,β,γ,δ	121,4	18,6	25,9	32,1	14	74,8	61,7	6,3	5,6
FMCC Y-74		192	ε,στ	93,2	8	23,4	16	11,6	50,9	54,7	26	16,5
	312	α,β,γ,δ	133,6	10,9	34,2	27,4	18,4	80	59,9	20,5	3,4	

α: Μέγιστη συγκέντρωση βιομάζας (g/L), β: Μέγιστη συγκέντρωση μαννιτόλης (g/L), γ: Μέγιστη συγκέντρωση ερυθριτόλης (g/L), δ: Μέγιστη συγκέντρωση αραβιτόλης (g/L), ε: Μέγιστο ποσοστό ενδοκυτταρικών πολυσακχαριτών επί ξηράς ουσίας (Y_{IPS/X}, % w/w), στ: Μέγιστο ποσοστό λιπιδίων επί ξηράς ουσίας (Y_{L/X}, % w/w).

nd: Δεν έχει προσδιοριστεί (≤0.3 g/L).

Τα αντίστοιχα αποτελέσματα για τις ίδιες αρχικές τιμές γλυκερόλης (~80 g/L και ~120 g/L) και το ελαφρώς όξινο pH των ζυμώσεων (6±0,3) παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.6. Όπως ήταν αναμενόμενο, για Glol₀ ~120 g/L δημιουργήθηκε μεγαλύτερη ποσότητα βιομάζας, πολυολών και κιτρικού οξέος σε σχέση με τα πειράματα με τις χαμηλότερες αρχικές συγκεντρώσεις γλυκερόλης. Από την άλλη πλευρά, ως αναφέρθηκε και στα προηγούμενα εδάφια, σε σχέση με τα πειράματα τα οποία έλαβαν χώρα σε χαμηλότερο pH της μικροβιακής καλλιέργειας (pH=2±0,3), στο πείραμα το οποίο έλαβε χώρα στο ελαφρώς όξινο προς ουδέτερο pH, παρήχθησαν σαφώς μικρότερες ποσότητες πολυολών (βλέπε Πίνακα 3.5 και 3.6).

Πίνακας 3.6 Παρατηρούμενος χρόνος για την κατανάλωση γλυκερόλης και τη μέγιστη παραγωγή μεταβολικών προϊόντων, των διακριθέντων στελεχών της ζύμης *Y. lipolytica*, κατά την αύξηση σε ακάθαρτη βιομηχανική γλυκερόλη. Συνθήκες καλλιέργειας: Ασυνεχής ζυμώσεις σε ανακινούμενες κωνικές φιάλες (180±5 grm), T=30±1 °C, αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης ~80 g/L και ~120 g/L, pH=6±0,3 υπό αερόβιες και περιοριστικές σε άζωτο συνθήκες. Κάθε πειραματικό σημείο που παρουσιάζεται είναι η μέση τιμή δύο ανεξάρτητων προσδιορισμών από διαφορετικά αρχικά εμβόλια.

	Strains	Time (h)		GloL _{cons} (g/L)	X (g/L)	MI (g/L)	Ery (g/L)	Ara (g/L)	POL (g/L)	Y _{POL/GloL} (% w/w)	Y _{IPS/X} (% w/w)	Y _{L/X} (% w/w)	CA (g/L)
80 g/L Γλυκερόλης	ACA-72	72	ε	21,2	12,5	1,1	2,4	0,4	3,9	18,4	18,7	12,9	2,4
	YC-220	220	ζ	53,4	17,4	9,3	3,7	3	16	30	17	16,9	6,4
	5030-364	364	α,β,γ,δ,στ	76	20,3	16	10,5	4,2	30,9	40,7	16,9	18,7	8,1
	LMBF-196	196	ε,ζ	66,3	14,1	15,2	8,6	0,5	24,3	36,6	21,4	10,5	nd
	20-268	268	α,β,γ,δ	73,1	14,7	16,4	11	0,9	28,3	38,7	20,8	4,8	nd
	NRRL-240	240	ε,ζ	67,3	11,7	11,2	17,3	3,7	32,2	47,8	18	7,4	10,5
	Y-323-312	312	α,β,γ,δ,στ	87,8	17,2	15,1	22,8	5,2	43,1	49,1	14,7	2,7	11,6
	FMCC-144	144	ε,ζ	73,2	16,1	19,7	10,7	5,4	35,8	48,9	26,1	17,9	12,8
	Y-74-216	216	α,β	84,4	17	20,8	15,6	7,1	43,5	51,5	24,2	10,4	14,6
	264	264	γ,δ,στ	85,2	17	20,8	15,9	7,3	44	51,6	21,4	11,1	14,7
120 g/L Γλυκερόλης	ACA-24	24	ζ	47,8	10,5	6,1	7,3	3,4	16,8	35,1	14	19,5	5,6
	YC-124	124	ε	70,7	15,5	10,6	10,3	5,7	26,6	37,6	19,3	15,1	9,1
	5030-172	172	α,β,γ,δ,στ	114,3	19,9	19,1	12,7	8,1	39,9	34,9	15,2	5,7	11,4
	LMBF-96	96	ε	60,8	7	7,5	9,1	0,2	16,8	27,6	25,5	14,7	nd
	20-144	144	ζ	79,9	8,6	9	11,3	0,5	20,8	26	23,1	14,9	nd
	265	265	α,β,γ,δ	121	15,9	18	13,5	1,2	32,7	27	19,7	8,3	nd
	NRRL-72	72	ε,ζ	50,3	9,6	8,3	8,5	2,8	19,6	39	19	18,4	6,6
	Y-323-194	194	α,β,γ,δ,στ	117,1	18,9	20,5	24,4	10,1	55	47	7,3	6,9	16,1
	FMCC-240	240	ε,ζ	93,7	14,2	17	12,7	8	37,7	40,2	30,7	18,1	11,9
	Y-74-360	360	α,β,γ,δ,στ	124,6	17,9	23,9	20,8	12,5	57,2	45,9	19,2	6,5	17,5

α: Μέγιστη συγκέντρωση βιομάζας (g/L), β: Μέγιστη συγκέντρωση μαννιτόλης (g/L), γ: Μέγιστη συγκέντρωση ερυθριτόλης (g/L), δ: Μέγιστη συγκέντρωση αραβιτόλης (g/L), ε: Μέγιστο ποσοστό ενδοκυτταρικών πολυσακχαριτών επί ξηράς ουσίας (Y_{IPS/X}, % w/w), στ: Μέγιστη συγκέντρωση κιτρικού οξέος (g/L), ζ: Μέγιστο ποσοστό λιπιδίων επί ξηράς ουσίας (Y_{L/X}, % w/w).

nd: Δεν έχει προσδιοριστεί (≤0.3 g/L).

Εξαιρετικοί και χρήζουσας αναφοράς ήταν οι συντελεστές απόδοσης των πολυολών ανά μονάδα γλυκερόλης που καταναλώθηκε, σημειώνοντας αξιοθαύμαστα ποσοστά άνω του 60% w/w, σε όξινο περιβάλλον (2±0,3). Συγκεκριμένα, για αρχική συγκέντρωση υποστρώματος ~80 g/L το στέλεχος FMCC Y-74 κατέγραψε ποσοστό 60,7% w/w, ενώ αντίστοιχο συντελεστή της τάξεως του 61,7% w/w πέτυχε και

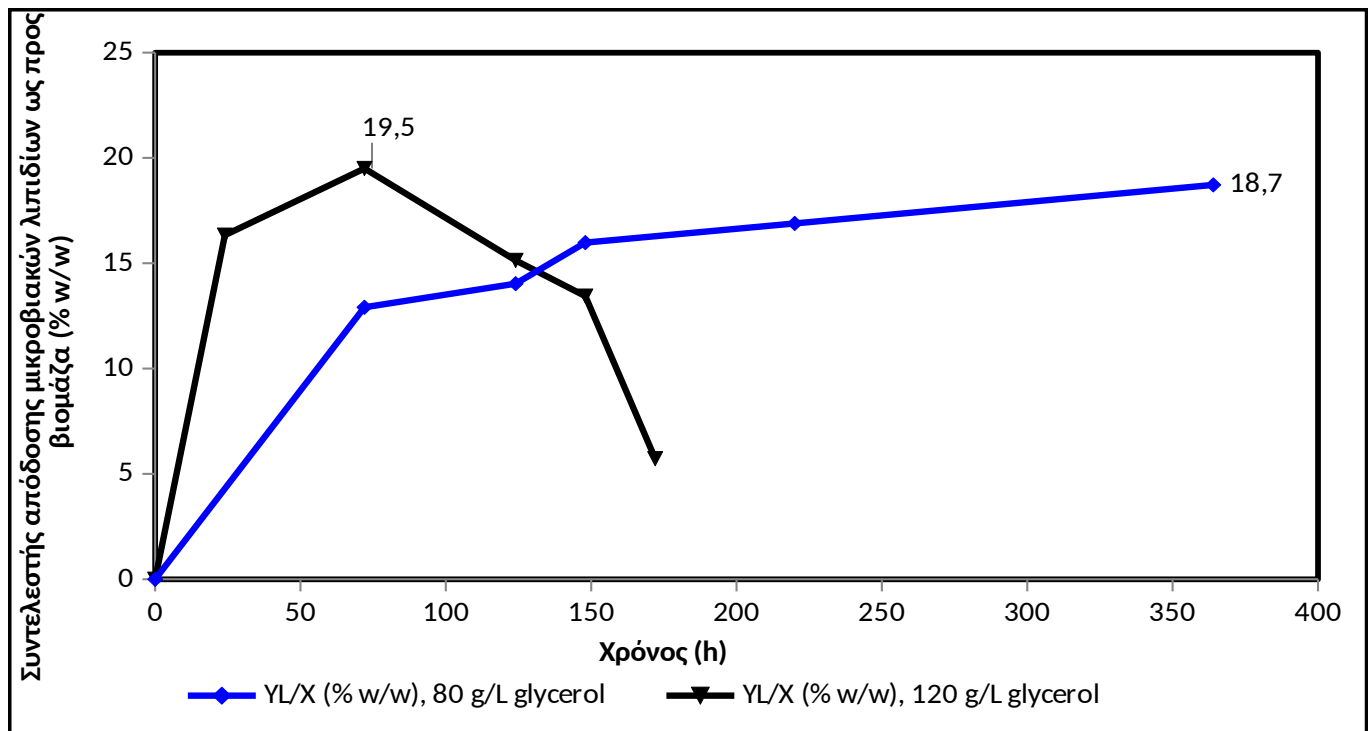
το στέλεχος NRRL Y-323 αναπτυσσόμενο σε ~120 g/L αρχικής γλυκερόλης. Αυτό κρίνεται ως ενδιαφέρον και ξεχωριστό εύρημα, καθώς αποτελεί μια από τις υψηλότερες αποδόσεις πολυολών που συναντάται στη διεθνή βιβλιογραφία (για σύγκριση βλέπετε: Tomaszewska et al., 2012; Rzechonek et al., 2018; Filippousi et al., 2019; Fickers et al., 2020; Rice et al., 2020; Diamantopoulou and Papanikolaou, 2023).

Όλα τα στελέχη ευνοήθηκαν από την αύξηση της αρχικής συγκέντρωσης της γλυκερόλης σε όξινο περιβάλλον ($2\pm 0,3$) παράγοντας πολυόλες. Η κυρίαρχη πολυόλη ήταν η μαννιτόλη, με το στέλεχος FMCC Y-74 να παρουσιάζει τη μέγιστη τιμή των 34,2 g/L, όταν αυτό αναπτύχθηκε σε υπόστρωμα αρχικής συγκέντρωσης γλυκερόλης ~120 g/L. Αντίθετα, παρατηρήθηκε στο στέλεχος NRRL Y-323 η επικράτηση της ερυθριτόλης με την αύξηση της συγκέντρωσης του υποστρώματος, η παραγωγή της οποίας ξεχώρισε για την τιμή της, καθώς συντέθηκαν 32,1 g/L ερυθριτόλης, όταν το στέλεχος αναπτύχθηκε ~120 g/L, όντας σε όξινες περιβαλλοντικές συνθήκες ($2\pm 0,3$). Συνεπώς, το στέλεχος NRRL Y-323 έστρεψε την παραγωγή του προς τη σύνθεση ερυθριτόλης όσο αυξήθηκε η συγκέντρωση του υποστρώματος, ώστε να εξισορροπήσει την ωσμωτική πίεση που δέχθηκε λόγω της υψηλής συγκέντρωσης γλυκερόλης, το οποίο έχει δειχθεί και σε άλλες μελέτες (Rymowicz et al., 2006; 2008; 2009; 2010; Tomaszewska et al., 2014).

Αξίζει αναφοράς η παραγωγή αραβιτόλης που ευνοήθηκε και κατέγραψε σημαντικές ποσότητες άνω των ~10 g/L, από τα στελέχη ACA-YC 5030 (10 g/L), NRRL Y-323 (14 g/L) και FMCC Y-74 (17,3 g/L) σε συνθήκες όξινου περιβάλλοντος ($2\pm 0,3$).

Η αδιάκοπη έκκριση πολυολών, τόσο σε όξινο όσο και σε σχεδόν ουδέτερο pH επισκίασε την παραγωγή ενδοπολυσακχαριτών, καθώς τα στελέχη δε σχημάτισαν αξιόλογες ποσότητες για περαιτέρω σχολιασμό και ανάλυση, παρόλη την αύξηση της βιομάζας που υποδηλώνει πιθανή βιοσύνθεση ενδοκυτταρικών ενώσεων (Makri et al., 2010; Yang et al., 2014; Tomaszewska et al., 2014; Papanikolaou et al., 2017; Rzechonek et al., 2018; Gao et al., 2020).

Επιπρόσθετα, μελετήθηκαν τα μικροβιακά λιπίδια, των οποίων η συσσώρευση αναστάληκε (κινήθηκε σε ποσοστά που δεν υπερέβησαν το ~20% w/w) κυρίως λόγω της παραγωγής πολυολών σε όξινο pH ($2\pm 0,3$) και λόγω της σύνθεσης πολυολών και κιτρικού οξέος στα ελαφρώς ουδέτερα (Rymowicz et al., 2006; Makri et al., 2010; Tomaszewska et al., 2012; Papanikolaou et al., 2017; Diamantopoulou and Papanikolaou, 2023; Diamantopoulou et al., 2023). Στην Εικόνα 3.21 παρουσιάζεται η εξέλιξη του συντελεστή μικροβιακών λιπιδίων συναρτήσει του χρόνου σε ελαφρώς όξινο pH για το στέλεχος ACA-YC 5030 που παρουσίασε το μέγιστο συντελεστή αυτών σε αρχική συγκέντρωση υποστρώματος ~80 g/L και ~120 g/L.



Εικόνα 3.21 Απεικόνιση του συντελεστή απόδοσης μικροβιακών λιπιδίων σε συνάρτηση με τον χρόνο, από *Y. lipolytica* ACA-YC 5030 κατά τη διάρκεια καλλιέργειας σε υποστρώματα με βάση τη γλυκερόλη (GloI₀ ~80 g/L (♦) και ~120 g/L (▾) pH 6±0,3. Συνθήκες καλλιέργειας: Ανακινούμενες κωνικές φιάλες των 250 mL στις 180±5 rpm και θερμοκρασία επώασης T=30±1 °C σε υπόστρωμα ακατέργαστης βιομηχανικής γλυκερόλης. Κάθε πειραματικό σημείο που παρουσιάζεται είναι η μέση τιμή δύο ανεξάρτητων προσδιορισμών από διαφορετικά αρχικά εμβόλια.

Παρά την υψηλή συγκέντρωση γλυκερόλης (~120 g/L), οι μικροοργανισμοί παρουσίασαν αξιόλογη παραγωγή βιομάζας σε όξινα pH (2±0,3), παρέχοντας και πάλι στοιχεία για την καταλληλότητα αυτού του υποστρώματος για στελέχη αυτού του είδους. Η μέγιστη ποσότητα κυτταρικής μάζας με τιμή ίση προς 20,3 g/L σημειώθηκε από το στέλεχος ACA-YC 5030 σε αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης ~80 g/L σε ελαφρώς όξινο pH (6±0,3) και όχι σε συγκέντρωση αρχικού υποστρώματος ~120 g/L, υποδεικνύοντας πιθανή αναστολή που ασκήθηκε λόγω της υψηλής ποσότητας αρχικής γλυκερόλης σε συνδυασμό με το ελαφρώς όξινο περιβάλλον, όπου διεκπεραιώθηκε η ζύμωση. Τα υπόλοιπα στελέχη κινήθηκαν με αντίστοιχες τιμές βιομάζας (17-19,9 g/L) χωρίς να παρουσιάσουν ιδιαίτερες αποκλίσεις στις συγκεντρώσεις, ακολουθώντας την ίδια μεταβολική συμπεριφορά (βλέπε και σύγκρισε τιμές βιομάζας με: Rymowicz et al., 2006; Tomaszewska et al., 2012; Diamantopoulou et al., 2023). Σε κάθε περίπτωση, συγκεντρώσεις μέγιστης ξηράς κυτταρικής μάζας της τάξεως των 17-20 g/L, όπως αυτές οι οποίες αναφέρθηκαν στους Πίνακες 3.5 και 3.6 σε καλλιέργειες οι οποίες ήταν περιοριστικές σε άζωτο, κρίνονται ως αρκετά ικανοποιητικές και, σε συνέργεια με τις υψηλές συγκεντρώσεις πολυολών που αναφέρθηκαν, θα μπορούσαν να αυξήσουν το οικονομικό αποτέλεσμα των βιοδιεργασιών, δεδομένου ότι η βιομάζα του μικροοργανισμού *Y. lipolytica* θεωρείται ως «ασφαλής» («GRAS») και θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως συμπλήρωμα στη διατροφή του ανθρώπου ή/και των αγροτικών ζώων (Diamantopoulou and Papanikolaou, 2023; Koukoumaki et al., 2023).

Συνοψίζοντας, όλα τα στελέχη κρίθηκαν ικανά να αφομοιώσουν το υπόστρωμα και αναπτυχθούν προς παραγωγή τόσο εξωκυτταρικών όσο και ενδοκυτταρικών προϊόντων. Ο καταβολισμός του άνθρακα

κατευθύνθηκε κυρίως προς τη σύνθεση πολυολών, χωρίς να επηρεάζεται σημαντικά από την τιμή του pH. Το όξινο pH ($2\pm 0,3$) ευνόησε την παραγωγή πολυολών στο μέσο της καλλιέργειας (Chatzifragkou et al., 2011; Papanikolaou et al., 2013; Rywińska et al., 2013; Yang et al., 2014; Carly and Fickers, 2018; Diamantopoulou and Papanikolaou, 2023). Ακόμα όμως και σε συνθήκες ελαφρώς όξινου pH ($6\pm 0,3$), η έκκριση πολυολών φάνηκε να κυριαρχεί έναντι του κιτρικού οξέος και των λοιπών μεταβολικών προϊόντων (μικροβιακά λιπίδια και ενδοπολυσακχαρίτες) που τυγχάνουν ευνοϊκής παραγωγής σε pH $6\pm 0,3$. Επιπροσθέτως, παρατηρήθηκε ότι ο ρυθμός αφομοίωσης της γλυκερόλης μειώθηκε αισθητά με την αύξηση της αρχικής συγκέντρωσης υποστρώματος, καθώς χρειάστηκαν περισσότερες από 360 ώρες (αντιστοιχούν σε ~15 ημέρες) εωσότου καταναλωθεί πλήρως το υπόστρωμα γλυκερόλης από τα στελέχη.

3.8 ΚΑΛΙΕΡΓΕΙΕΣ ΣΕ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗΣ ΚΛΙΜΑΚΑΣ ΒΙΟΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΑ

Οι δύο πιο πολλά υποσχόμενοι μικροοργανισμοί που εκτέθηκαν στις προηγούμενες συνθήκες καταπόνησης και ανταπεξήλθαν πλήρως στην αφομοίωση του απόβλητου υποστρώματος, οδηγώντας στην παραγωγή προϊόντων προστιθέμενης αξίας σε σημαντικές ποσότητες ήταν τα στελέχη NRRL Y-323 και FMCC Y-74. Το στέλεχος NRRL Y-323 επιλέχθηκε να καλλιεργηθεί σε βιοαντιδραστήρα κλειστού τύπου σε πλήρως θερμικά επεξεργασμένο υπόστρωμα και σε μη θερμικά επεξεργασμένο υπόστρωμα γλυκερόλης (~40 g/L), σε σταθερή ανάδευση (750±5 rpm), σταθερό αερισμό (1,5 vvm) και θερμοκρασία επώασης 30±1 °C. Τα αποτελέσματα του στελέχους παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.7.

Πίνακας 3.7 Πειραματικά δεδομένα του μικροοργανισμού *Y. lipolytica* NRRL Y-323 τα οποία επιτεύχθηκαν σε υπόστρωμα ακάθαρτης γλυκερόλης με pH 2±0,3 και ανάδευση 750±5 rpm. Συνθήκες καλλιέργειας: Κλειστές ζυμώσεις σε βιοαντιδραστήρα (σταθερός αερισμός 1,5 vvm, θερμοκρασία επώασης T=30±1 °C, αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης ~40 g/L, υπό αερόβιες και περιοριστικές σε άζωτο συνθήκες).

	Time (h)		Glol _{cons} (g/L)	X (g/L)	MI (g/L)	Ery (g/L)	Ara (g/L)	POL (g/L)	Y _{IPS/X} (% w/w)	Y _{L/X} (% w/w)
Θερμικά επεξεργασμένο υπόστρωμα	55	ε,στ	9,9	4,9	1,8	4,7	0,7	7,2	8,1	19,2
	113	α,β,γ,δ	36,9	7,3	7,6	15,2	2,2	25	7,3	14,7
Μη θερμικά επεξεργασμένο υπόστρωμα	99	στ	32,4	11,9	3,2	12,6	1,7	17,5	14,6	9,2
	148	α,β,γ,δ,ε	40,1	12,8	5	13,7	2	20,6	15,2	7,4

α: Μέγιστη συγκέντρωση βιομάζας (g/L), β: Μέγιστη συγκέντρωση μαννιτόλης (g/L), γ: Μέγιστη συγκέντρωση ερυθριτόλης (g/L), δ: Μέγιστη συγκέντρωση αραβιτόλης (g/L), ε: Μέγιστο ποσοστό ενδοκυτταρικών πολυσακχαριτών επί ξηράς ουσίας (Y_{IPS/X}, % w/w), στ: Μέγιστο ποσοστό λιπιδίων επί ξηράς ουσίας (Y_{L/X}, % w/w).

nd: Δεν έχει προσδιοριστεί (≤0.3 g/L).

Όπως προκύπτει από τον Πίνακα 3.7, η παραγωγή πολυολών στις δύο δοκιμές ήταν 25 g/L με συντελεστή απόδοσης 67,7% w/w για το θερμικά επεξεργασμένο υπόστρωμα γλυκερόλης έναντι 20,6 g/L και 51,4% w/w για το μη θερμικά επεξεργασμένο υπόστρωμα. Στα πειράματα του βιοαντιδραστήρα που αφορούν το στέλεχος NRRL Y-323, φάνηκε ότι η ροή του άνθρακα κατευθυνόταν προς τη σύνθεση της ερυθριτόλης, που ήταν η κύρια πολυόλη που παρήχθη, ενώ στην αντίστοιχη καλλιέργεια με χρήση φιαλών η παραγωγή ερυθριτόλης ήταν πολύ χαμηλότερη από αυτής της μαννιτόλης (βλ. Πίνακες 3.1, 3.3 και 3.7). Συμπεραίνεται λοιπόν, ότι ο υψηλότερος αερισμός/ανάδευση που επιβλήθηκε στο πείραμα του βιοαντιδραστήρα ευνόησε τη μετατροπή της γλυκερόλης προς την παραγωγή της ερυθριτόλης. Επιπροσθέτως, όταν η ανάπτυξη του στελέχους NRRL Y-323 πραγματοποιήθηκε σε μη θερμικά επεξεργασμένο υπόστρωμα και σύμφωνα με τα προηγουμένως επιτευχθέντα αποτελέσματα στα πειράματα τύπου φιαλών, η παραγωγή βιομάζας ήταν υψηλότερη (πιθανώς λόγω της παρουσίας επιμολύνσεων).

Η μέγιστη παραγωγή πολυολών που επιτεύχθηκε είναι αρκετά ενθαρρυντική, ειδικά λαμβάνοντας υπόψη ότι είναι στέλεχος άγριου τύπου (και όχι μεταλλαγμένο ή γενετικά τροποποιημένο). Περαιτέρω βελτιστοποίηση της διαδικασίας (ειδικά όσον αφορά την αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης) μπορεί να

αυξήσει αυτή την ποσότητα, ενώ όπως αναφέρθηκε αυτή η τιμή επιτεύχθηκε από ένα νέο στέλεχος ζυμομύκητα άγριου τύπου, που δεν είχε προηγουμένως μελετηθεί συστηματικά σχετικά με το δυναμικό της παραγωγής του.

Από την άλλη μεριά, το στέλεχος FMCC Y-74 επιλέχθηκε να καλλιεργηθεί περαιτέρω σε βιοαντιδραστήρα ημι-συνεχούς τύπου με συνδυασμό μεταβλητών τιμών pH και ανάδευσης (pH $2\pm 0,3$ - 250 ± 5 rpm, pH $2\pm 0,3$ - 750 ± 5 rpm, pH $6\pm 0,3$ - 250 ± 5 rpm και pH $6\pm 0,3$ - 750 ± 5 rpm). Οι σταθερές συνθήκες των ζυμώνσεων ορίστηκαν σε σταθερό αερισμό (1,5 vvm), αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης ~ 40 g/L, πριν να προηγηθούν οι προσθήκες («pulses») με συμπυκνωμένο υπόστρωμα βιομηχανικής γλυκερόλης, περιοριστικές συνθήκες ως προς την πηγή αζώτου και θερμοκρασία επώασης στους 30 ± 1 °C.

Η επιλογή της αρχικής συγκέντρωσης γλυκερόλης (~ 40 g/L) βασίστηκε στα αποτελέσματα τα οποία είχαν προκύψει στο Κεφάλαιο 3.3 με τη συγκριτική αξιολόγηση όλων των στελεχών στις ζυμώσεις βυθού (Πίνακας 3.1), καθώς η γλυκερόλη αφομοιώθηκε πλήρως από το μικροοργανισμό σε σύντομο χρόνο επώασης (περίπου 144 ώρες). Ένας ακόμα σημαντικός παράγοντας επιλογής στάθηκε η συγκέντρωση των πολυολών και του συντελεστή τους που ήταν σημαντικά υψηλοί χωρίς να επηρεάζονται σοβαρά από την αναστολή που ασκήθηκε λόγω παραγόντων καταπόνησης στο μέσο της καλλιέργειας. Οι όξινες συνθήκες, όπως καταγράφηκε σε προηγούμενα εδάφια της μελέτης και έχει δείξει σε πολλά άρθρα της διεθνούς βιβλιογραφίας, προάγουν την παραγωγή πολυολών, ενώ οι ελαφρώς όξινες την συσσώρευση του κιτρικού οξέος (Rywińska et al., 2013; Papanikolaou et al., 2017; Timoumi et al., 2019; Papanikolaou et al., 2020; Diamantopoulou et al., 2023; Diamantopoulou and Papanikolaou, 2023). Για αυτό το σκοπό επιλέχθηκε το pH να συνεχίσει να ερευνάται σε όξινες και ελαφρώς όξινες συνθήκες, ώστε να μελετηθεί σε συνδυασμό με την επιρροή της ανάδευσης και, συνακολούθως του υψηλού ή χαμηλού αερισμού και να αξιολογηθεί η παραγωγικότητα των εξωκυτταρικών προϊόντων.

Το στέλεχος FMCC Y-74 όταν εκτέθηκε στο συνδυασμό pH $2\pm 0,3$ - 250 ± 5 rpm, δεν κατάφερε να ανταγωνιστεί τις συνθήκες καλλιέργειας με αποτέλεσμα να καταστεί ανίκανο να αναπτυχθεί και να αφομοιώσει το υπόστρωμα. Η αδυναμία του, ενδεχομένως οφείλεται στο συνδυασμό με την ανάδευση και τη διαμόρφωση («configuration») του βιοαντιδραστήρα, καθώς έχει αποδειχθεί σε προηγούμενες δοκιμές ότι το πολύ όξινο pH και μια ικανοποιητική ανάδευση των 180 ± 5 rpm που έλαβαν χώρα κατά την καλλιέργεια σε αναδευόμενες φιάλες, δεν παρεμποδίζουν την αύξηση του στελέχους στο συγκεκριμένο υπόστρωμα, αντιθέτως παρουσιάζεται κυρίαρχη μεταβολική δραστηριότητα προς την παραγωγή πολυολών.

Όσον αφορά τη διαδικασία ανατροφοδοσίας του συστήματος πραγματοποιείται κατά διαστήματα, ώστε να διασφαλιστεί η συγκέντρωση γλυκερόλης στα αρχικά της επίπεδα και να συνεχιστεί η αδιάκοπη έκκριση των εξωκυτταρικών προϊόντων. Αυτό επιτεύχθηκε με έγχυση ελεγχόμενης ποσότητας πυκνού διαλύματος γλυκερόλης (στο δοχείο τροφοδοσίας η αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης Glol₀ είχε τεθεί στα ~ 400 g/L), για να μην επέλθει η συγκέντρωση κάτω του κρίσιμου ορίου ~ 10 g/L και σημάνει την

ολοκλήρωση της ζύμωσης. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων που έλαβαν χώρα στο βιοαντιδραστήρα φαίνονται στον Πίνακα 3.8 και έχουν εμπλουτιστεί ενδεικτικά με περισσότερα σημεία από τα μέγιστα για πιο ολοκληρωμένη εικόνα.

Πίνακας 3.8 Πειραματικά δεδομένα του μικροοργανισμού *Y. lipolytica* FMCC Y-74 τα οποία επιτεύχθηκαν σε υπόστρωμα ακάθαρτης γλυκερόλης με συνδυασμό μεταβλητών τιμών pH και ανάδευσης. Συνθήκες καλλιέργειας: Ημι-συνεχείς ανατροφοδοτούμενες ζυμώσεις σε βιοαντιδραστήρα (σταθερός αερισμός 1,5 vvm, θερμοκρασία επώασης $T=30\pm 1$ °C, αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης 40 g/L, υπό αερόβιες και περιοριστικές σε άζωτο συνθήκες).

	Time (h)	Glo _{l,cons} (g/L)	X (g/L)	MI (g/L)	Ery (g/L)	Ara (g/L)	POL (g/L)	Y _{POL/Glo_l} (% w/w)	CA (g/L)	
pH 2±0,3 750±5 rpm	21	17,7	6,1	2,2	1,3	0,5	4	22,6	nd	
	44	28,8	9	3,9	2,5	1	7,4	25,7	nd	
	117	70,1	15,2	10	13,3	1,9	25,1	35,8	nd	
	144	89,3	22,8	10,7	16,5	2	29,1	32,7	nd	
	264	135,4	26,5	22,4	27,1	2	51,5	38,1	nd	
	430	α,β,γ,δ	188	28	30,8	43	5,9	79,7	42,4	nd
pH 6±0,3 250±5 rpm	28	10,3	2,8	1,4	0,5	0,1	2	19,4	nd	
	187	49,1	8,2	14,9	8,1	3,3	26,3	53,7	nd	
	309	85,6	11,4	29,4	14,3	5,8	49,4	57,7	nd	
	481	α	129,2	12,9	47	23,5	8,9	79,3	61,4	nd
	534	β,γ,δ	152,1	12,9	51	26,1	12,2	89,4	58,8	nd
	pH 6±0,3 750±5 rpm	23	11,8	0,3	nd	nd	nd	nd	nd	8,1
27		22,8	1,2	nd	nd	nd	nd	nd	17,5	
175		82,3	9	5,2	1,9	1,5	8,6	10,4	38,4	
248		α	99,8	9,5	19	8,9	4,2	32,1	26,8	45,1
320		β,γ,δ,ε	125,7	9,5	219	10,3	4,4	29,1	23,5	50,1

α: Μέγιστη συγκέντρωση βιομάζας (g/L), β: Μέγιστη συγκέντρωση μαννιτόλης (g/L), γ: Μέγιστη συγκέντρωση ερυθριτόλης (g/L), δ: Μέγιστη συγκέντρωση αραβιτόλης (g/L), ε: Μέγιστη συγκέντρωση κιτρικού οξέος (g/L).

nd: Δεν έχει προσδιοριστεί (≤ 0.3 g/L).

Ο περιορισμός του αζώτου, ο συνδυασμός μεταβλητών τιμών pH-ανάδευσης και η σχετικά αυξημένη ωσμωτική πίεση που επιβλήθηκαν στο μέσο, κατεύθυναν τον κυτταρικό μεταβολισμό του μικροοργανισμού *Y. lipolytica* FMCC Y-74 στις περισσότερες από τις πραγματοποιηθείσες στο βιοαντιδραστήρα ζυμώσεις προς τη σύνθεση και την έκκριση εξωκυτταρικών πολυολών. Όπως και στις προηγούμενες πειραματικές δοκιμές, έτσι και εδώ αποδεικνύεται ξανά ότι παρόλο το pH του μέσου κινήθηκε σε ελαφρώς όξινες έως ουδέτερες τιμές ($\text{pH}=6\pm 0,3$), οι κύριοι εξωκυτταρικοί μεταβολίτες ήταν οι πολυόλες και το κιτρικό οξύ, με τη συγκέντρωση των πολυολών να είναι σε κάθε περίπτωση αξιοσημείωτη (π.χ. $\text{POL}_{\text{max}}=36,6$ g/L έναντι $\text{CA}_{\text{max}}=50,1$ g/L για το συνδυασμό pH 6±0,3-750±5 rpm και $\text{POL}_{\text{max}}=89,4$ g/L έναντι $\text{CA}_{\text{max}}=0$ g/L για το συνδυασμό pH 6±0,3-250±5 rpm).

Η πιο μεγάλη διαφορά μεταξύ της καλλιέργειας στα συστήματα ισχυρώς αναδεδόμενου (και συνεπώς αεριζόμενου) βιοαντιδραστήρα σε σχέση με το βιοαντιδραστήρα χαμηλής ανάδευσης (για pH=6±0,3) παρατηρήθηκε στο φάσμα των τελικών προϊόντων ζύμωσης, καθώς και στην ταχύτητα αφομοίωσης της γλυκερόλης. Στο πείραμα με τη χαμηλή ανάδευση και αερισμό (από τις 20 ώρες και

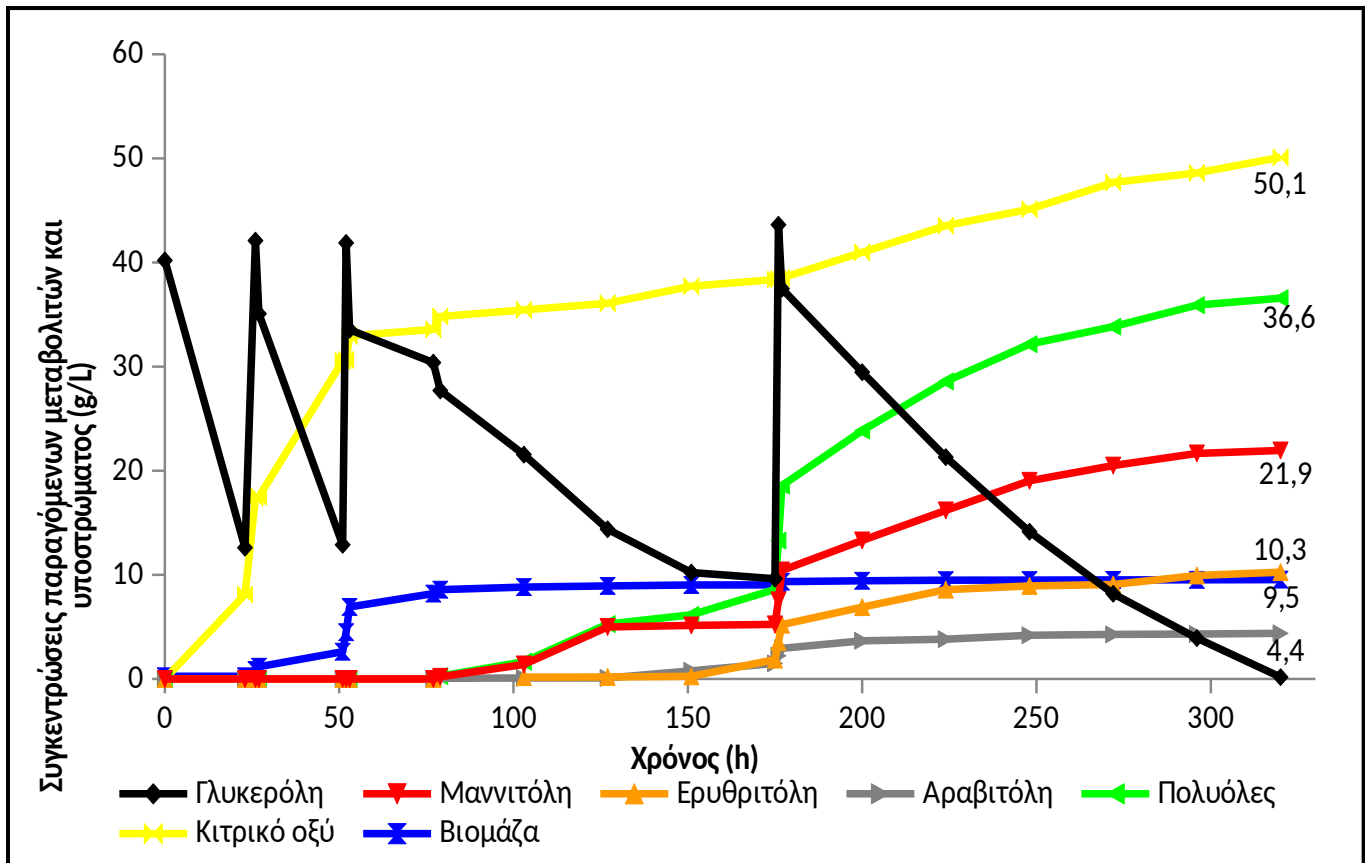
κατόπιν η συγκέντρωση του διαλυμένου οξυγόνου εντός του βιοαντιδραστήρα ήταν <10% v/v) και παρά το γεγονός ότι το pH ήταν σε ελαφρώς όξινες τιμές, οι κύριοι μεταβολίτες που συντέθηκαν ήταν οι πολυόλες (με την πολύ υψηλή τιμή των ~90 g/L να ταυτοποιείται στο τέλος της βιοδιεργασίας, με αντίστοιχο συντελεστή απόδοσης προς την αναλωθείσα γλυκερόλη ~59% w/w). Αντίθετα, ισχυρή και αξιοσημείωτη μεταβολική μετάπτωση («metabolic shift»), διά της οποίας παρήχθη κυρίως κιτρικό οξύ, και σε αρκετά μικρότερο βαθμό πολυόλες, συνέβη στο πείραμα του ισχυρώς αναδεδυμένου και συνεπώς, αεριζόμενου βιοαντιδραστήρα (στην περίπτωση της καλλιέργειας στα 750±5 g/m, το ποσοστό κορεσμού σε οξυγόνο ήταν σε όλα τα στάδια της καλλιέργειας >20% v/v, ενώ για τα περισσότερα από τα στάδια αυτά το ποσοστό ήταν μεγαλύτερο ακόμη και από ~50% v/v, καταδεικνύοντας πλήρως την ύπαρξη απολύτως αερόβιων συνθηκών αύξησης—βλέπετε και: Makri et al., 2010; Filippousi et al., 2022). Συγκεκριμένα, αναφέρθηκε ποσότητα $CA_{max}=50,1$ g/L (με ταυτόχρονο συντελεστή απόδοσης προς την αναλωθείσα γλυκερόλη ~40% w/w), ενώ σημαντικά μικρότερες ποσότητες μαννιτόλης, αραβιτόλης και ερυθριτόλης ταυτοποιήθηκαν και μετρήθηκαν στο μέσο της ζύμωσης (βλέπε Πίνακα 3.8). Το προαναφερθέν συμβάν κρίνεται φυσιολογικό και επιβεβαιώνεται για έναν μικρό αριθμό στελεχών *Y. lipolytica*, όπου σε συνθήκες ελαφρώς όξινου pH και σχετικά χαμηλού κορεσμού σε οξυγόνο (π.χ. <20% v/v) παράγονται κυρίως πολυόλες με πολύ μικρότερα ποσά κιτρικού οξέος να συντίθεται και να εκκρίνονται στο μέσο της καλλιέργειας, ενώ σε συνθήκες υψηλής ανάδευσης και αερισμού προάγεται συνήθως η βιοσύνθεση και έκκριση στο μέσο κιτρικού οξέος, ενίοτε σε πολύ υψηλές συγκεντρώσεις (π.χ. $CA_{max} \sim 100$ g/L) σε βάρος των παραγόμενων πολυολών (Papanikolaou et al., 2017; 2020). Ως αναφέρθηκε, τα ευρήματα στις συνθήκες pH 6±0,3-750±5 g/m και pH 6±0,3-250±5 g/m δε συναντώνται συχνά βιβλιογραφικά, καθώς στο ένα σκέλος υποδεικνύουν τη σχετική έκκριση πολυολών και ταυτόχρονα την (ιδιαίτερως) υψηλή παραγωγή κιτρικού οξέος και στο άλλο σκέλος η έκκριση πολυολών αναστέλλει πλήρως την παραγωγή του κιτρικού οξέος, στην παραγωγή του οποίου, ως αναφέρθηκε, ως επί τω πλείστω θα όφειλε ο μεταβολισμός να οδηγηθεί (Rymowicz et al., 2006; Makri et al., 2010; Tomaszewska et al., 2012; Rywińska et al., 2013; Diamantopoulou and Papanikolaou, 2023). Μια σύνοψη της βιβλιογραφίας σχετικά με την παραγωγή κιτρικού οξέος κατά την αύξηση στελεχών της ζύμης *Y. lipolytica* σε υποστρώματα τύπου «γλυκερόλης», συγκρινόμενη με τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας παρουσιάζεται στον Πίνακα 3.9.

Πίνακας 3.9 Συγκριτικά δεδομένα για τη βιοτεχνολογική παραγωγή κιτρικού οξέος μέσω αξιοποίησης της απόβλητης γλυκερόλης από διάφορα στελέχη που έχουν χρησιμοποιηθεί κατά καιρούς διεθνώς.

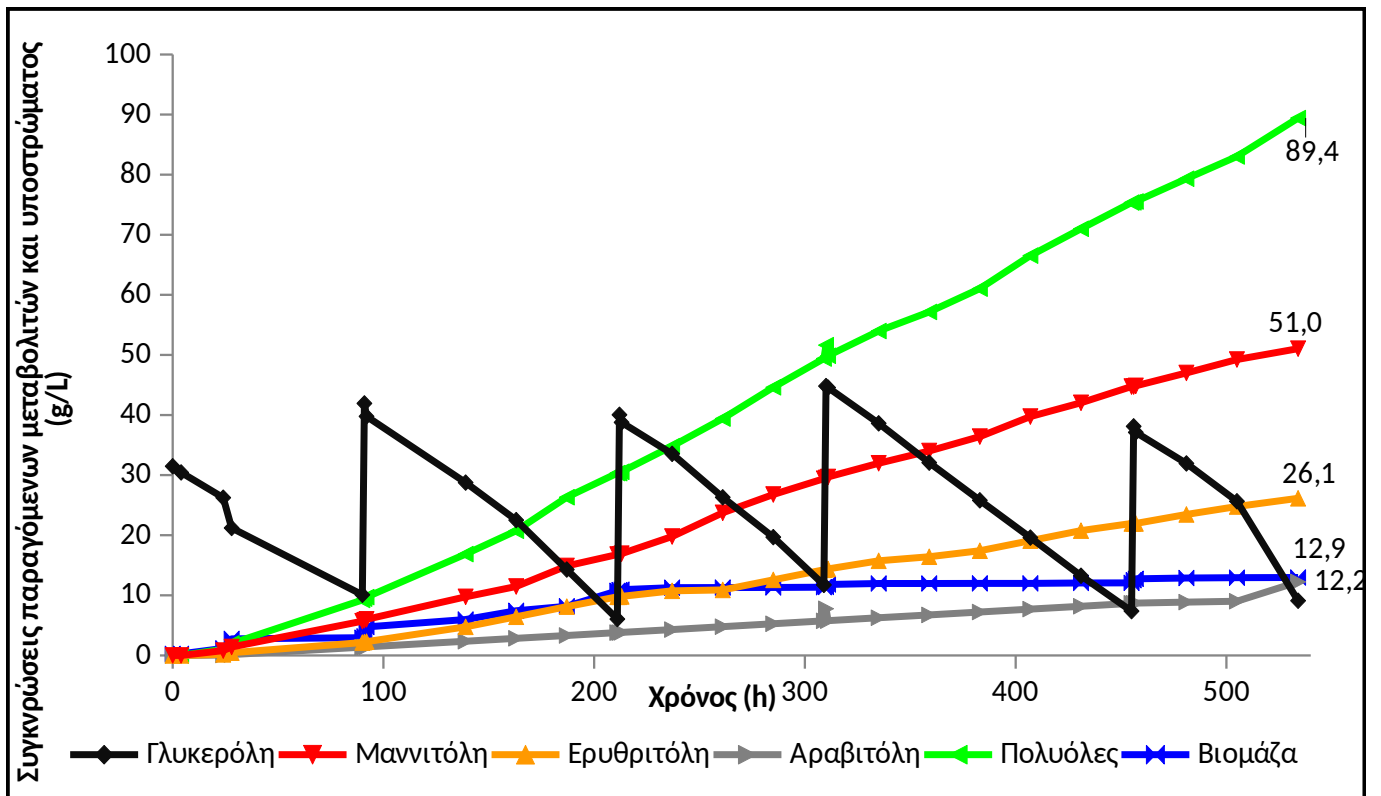
Strain	CA (g/L)	Glycerol type	Yield (g/g)	Culture mode	References
ACA-DC 50109	33,6	Crude	0,44	Shake flasks	[Papanikolaou et al., 2002a]
Wratislavia 1.31	124,5	Crude	0,62	Batch bioreactor	[Rymowicz et al., 2006]
Wratislavia AWG7	88,1	Crude	0,46	Batch bioreactor	[Rymowicz et al., 2006]
Wratislavia K1	75,7	Crude	0,40	Batch bioreactor	[Rymowicz et al., 2006]
NRRL YB-423	21,6	Pure	0,55	Shake flasks	[Levinson et al., 2007]
NCIM 3589	77,4	Crude	nr	Shake flasks	[Imandi et al., 2007]
ACA-DC 50109	62,5	Crude	0,56	Shake flasks	[Papanikolaou et al., 2008]
A-101-1.22	112	Crude	0,60	Batch bioreactor	[Rymowicz et al., 2010]
ACA-YC 5033	50,1	Crude	0,44	Shake flasks	[André et al., 2009]
A-101	66,5	Pure	0,44	Batch bioreactor	[Rywińska et al., 2010a]
A-101	66,8	Crude	0,43	Batch bioreactor	[Rywińska et al., 2010a]
Wratislavia K1	53,3	Pure	0,34	Batch bioreactor	[Rywińska et al., 2010a]
Wratislavia K1	36,8	Crude	0,25	Batch bioreactor	[Rywińska et al., 2010a]
Wratislavia 1.31	126	Crude	0,63	Fed-batch bioreactor	[Rywińska et al., 2010b]
Wratislavia AWG7	157,5	Crude	0,58	Fed-batch bioreactor	[Rywińska et al., 2010b]
Wratislavia 1.31	155,2	Crude	0,55	Fed-batch bioreactor	[Rywińska et al., 2010b]
Wratislavia AWG7	154	Crude	0,78	Repeated batch	[Rywińska and Rymowicz, 2010]
N15	19,1	Pure	0,55	Shake flasks	[Kamzolova et al., 2011])
N15	98	Pure	0,70	Fed-batch bioreactor	[Kamzolova et al., 2011])
Wratislavia AWG7	86,5	Pure	0,59	Continuous bioreactor	[Rywińska et al., 2011]
Wratislavia AWG7	63,3	Pure	0,67	Continuous bioreactor	[Rywińska et al., 2011]
NG40/UV7	115	Pure	0,64	Fed-batch bioreactor	[Morgunov et al., 2013]
NG40/UV7	112	Crude	0,90	Fed-batch bioreactor	[Morgunov et al., 2013]
JMY1203	57,7	Crude	0,92	Shake flasks	[Papanikolaou et al., 2013]
ACA YC 5029	39	Crude	0,42	Batch bioreactor	[Papanikolaou et al., 2017b]
LMBF Y-46	42,4	Pure	0,41	Batch bioreactor	[Papanikolaou et al., 2020]
LMBF Y-46	101,3	Pure	0,46	Fed-batch bioreactor	[Papanikolaou et al., 2020]
FMCC Y-74	50,1	Crude	0,40	Fed-batch bioreactor	Παρούσα εργασία

*nr: not reported

Οι κινητικές της τελείως διαφορετικής εξέλιξης της κατανάλωσης της γλυκερόλης και της παραγωγής μεταβολικών προϊόντων στα πειράματα των βιοαντιδραστήρων με $pH=6\pm 0,3$ και ισχυρή ανάδευση vs χαμηλή ανάδευση, φαίνονται στις Εικόνες 3.22 και 3.23, αναδεικνύοντας τον κεφαλαιώδη ρόλο τον οποίο δύναται να παίζει ο τρόπος της βιοδιεργασίας (ήτοι στη συγκεκριμένη περίπτωση η μικροβιακή αύξηση σε χαμηλό αερισμό vs την καλλιέργεια σε ένα ισχυρώς αναδευόμενο και αεριζόμενο σύστημα βιοαντιδραστήρα) στη φυσιολογική απόκριση του μικροοργανισμού.



Εικόνα 3.22 Κινητικό προφίλ μαννιτόλης (▲), ερυθριτόλης (*), αραβιτόλης (+), πολυολών (-), βιομάζας (x), κιτρικού οξέος (◻) και κατανάλωσης γλυκερόλης (♦) από *Y. lipolytica* FMCC Y-74 κατά τη διάρκεια καλλιέργειας σε υπόστρωμα με βάση τη γλυκερόλη (Gl₀ ~40 g/L) υπό pH 6±0,3 στις 750±5 rpm και θερμοκρασία επώασης T=30±1 °C. Κάθε πειραματικό σημείο που παρουσιάζεται είναι η μέση τιμή δύο ανεξάρτητων προσδιορισμών από διαφορετικά αρχικά εμβόλια.



Εικόνα 3.23 Κινητικό προφίλ μαννιτόλης (◻), ερυθριτόλης (▲), αραβιτόλης (x), πολυολών (*), βιομάζας (•) και κατανάλωσης γλυκερόλης (♦) από *Y. lipolytica* FMCC Y-74 κατά τη διάρκεια καλλιέργειας σε υπόστρωμα με βάση τη γλυκερόλη (Gl₀ ~40 g/L) υπό pH 6±0,3 στις 250±5 rpm και θερμοκρασία επώασης T=30±1 °C. Κάθε πειραματικό σημείο που παρουσιάζεται είναι η μέση τιμή δύο ανεξάρτητων προσδιορισμών από διαφορετικά αρχικά εμβόλια.

Αξίζει να σχολιαστεί ότι η βιομάζα επισκιάστηκε από την υψηλή παραγωγή των πολυολών και του κιτρικού οξέος και στις δύο περιπτώσεις του ελαφρώς όξινου pH ($6\pm 0,3$) που επιβλήθηκε στην καλλιέργεια, συμπεραίνοντας ότι η ανάδευση και, συνεπώς, ο αερισμός, ήταν τα κύρια στοιχεία που καθόρισαν το μεταβολισμό προς παραγωγή των εξωκυτταρικών μεταβολικών προϊόντων. Η συγκέντρωση της βιομάζας που παράχθηκε κινήθηκε σε σταθερά επίπεδα και δεν απείχε σημαντικά από την αντίστοιχη στο πείραμα αναφοράς (~ 10 g/L). Πιο αναλυτικά, η υψηλή ανάδευση πέτυχε συγκεντρώσεις ξηράς κυτταρικής βιομάζας ίσης προς 9,5 g/L, ενώ με τη χαμηλή ανάδευση ευνοήθηκε ελαφρώς η παραγωγή αυτής, έχοντας ως μέγιστη συγκέντρωση 12,9 g/L. Κυρίαρχη πολυόλη στέφθηκε η μαννιτόλη, τόσο σε υψηλή όσο και σε χαμηλή ανάδευση, με μέγιστη συγκέντρωση 51 g/L που αποτέλεσε το $\sim 57\%$ του συνόλου των πολυολών (89,4 g/L). Σημειώνεται ότι η παρούσα εργασία συνιστά μια από τις ελάχιστες μελέτες στη βιβλιογραφία όπου αναφέρεται τόσο υψηλή συγκέντρωση μαννιτόλης από (άγρια ή και γενετικώς τροποποιημένα) στελέχη του μικροοργανισμού *Y. lipolytica* (Rywińska et al., 2013; Diamantopoulou and Papanikolaou, 2023). Ακολούθως, η ερυθριτόλη που παρήχθη κατά το ήμισυ της μαννιτόλης 26,1 g/L και τελικώς η αραβιτόλη που συγκέντρωσε το περίπου το $\frac{1}{4}$ της μαννιτόλης (12,2 g/L). Αξίζει να τονιστεί ότι το ελαφρώς όξινο pH ($6\pm 0,3$) στο μέσο της καλλιέργειας στο βιοαντιδραστήρα ευνόησε την παραγωγή πολυολών και κυρίως της μαννιτόλης που κυριάρχησε, κάτι που δε συνάδει με τις πειραματικές διαδικασίες στις ζυμώσεις βυθού, ακολούθησε η ερυθριτόλη σε αναλογία 2:1 και τέλος η αραβιτόλη σε σημαντικά μικρότερες συγκεντρώσεις. Επιπλέον, σημαντικό ορίστηκε το γεγονός ότι η ανάδευση έπαιξε καθοριστικό ρόλο στη παραγωγική σχέση πολυολών και κιτρικού οξέος. Η χαμηλή ανάδευση ευνόησε αποκλειστικά τις πολυόλες καταγράφοντας τη μέγιστη συγκέντρωση 89,4 g/L με αντίστοιχο συντελεστή απόδοσης να πλησιάζει το 60% w/w και αντιστρόφως ανάλογα ευνοήθηκε το κιτρικό από την υψηλή ανάδευση που επιβλήθηκε στο μέσο της καλλιέργειας. Το κιτρικό οξύ από τη γλυκερόλη χρησιμοποιούμενη ως υλικό εκκίνησης έχει αναφερθεί πολλές φορές στη βιβλιογραφία, όταν το pH του μέσου της καλλιέργειας είναι ελαφρώς όξινο προς ουδέτερο (π.χ. $\text{pH} > 5\pm 0,3$ έως $< 7\pm 0,3$) (Papanikolaou et al., 2002a; 2013; Chatzifragkou et al., 2011; Rywińska et al., 2013; Yang et al., 2014; Carly and Fickers, 2018; Diamantopoulou and Papanikolaou, 2023). Το ποσοστό του συντελεστή απόδοσης κατά την παραγωγή κιτρικού οξέος κρίνεται αξιοπρόσεκτο ($\sim 40\%$ w/w) για τα δεδομένα των στελεχών της ζύμης *Y. lipolytica* που αυξάνονται στη γλυκερόλη ή σε αντιστοίχως καταβολιζόμενα υλικά, όπως η γλυκόζη (André et al., 2009; Tomaszewska et al., 2012; Rzechonek et al., 2018; Filippousi et al., 2019; Fickers et al., 2020; Rice et al., 2020; Diamantopoulou and Papanikolaou, 2023).

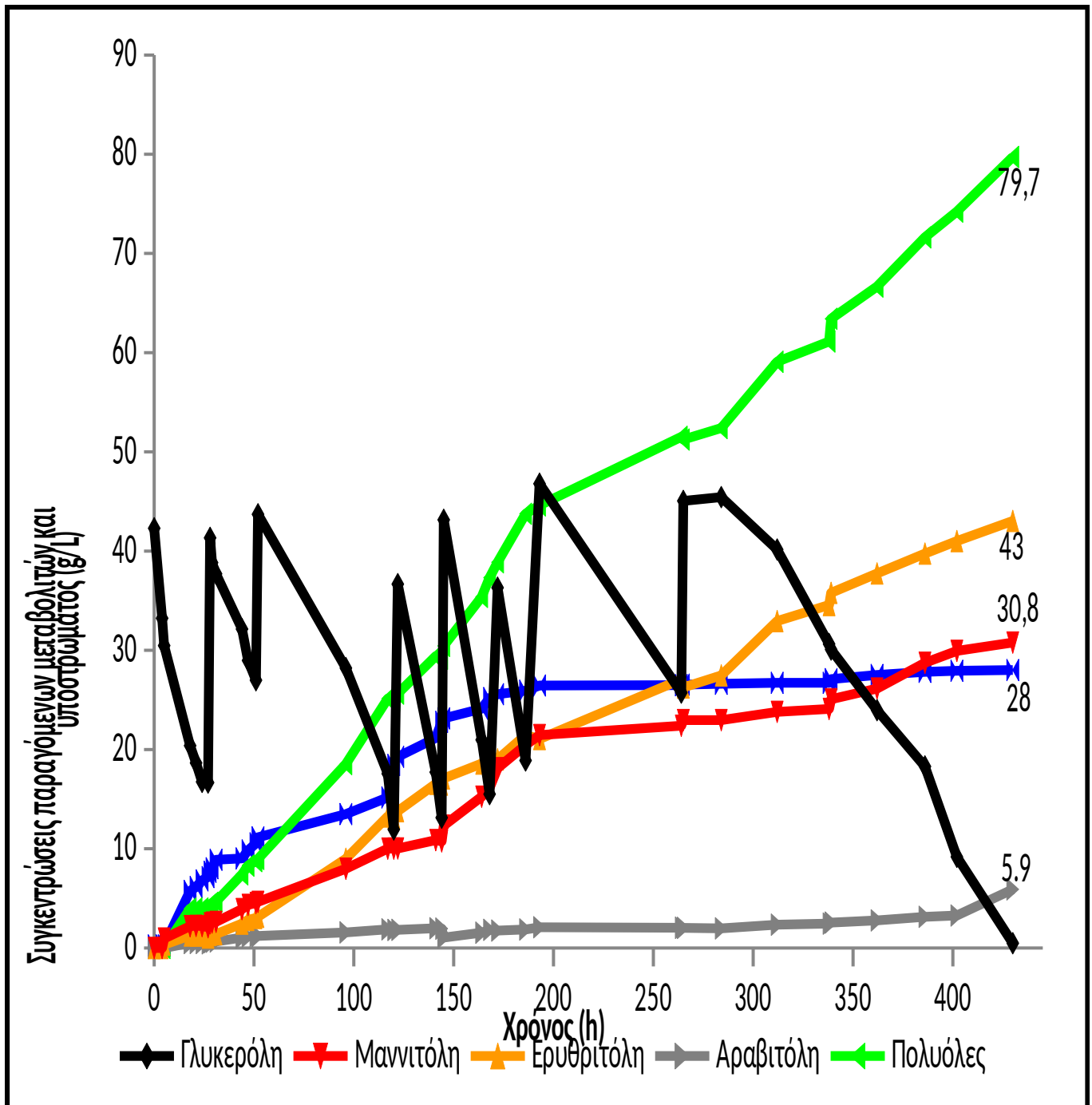
Θέλοντας να επισφραγιστεί η υψηλή επάρκεια της έκκρισης των πολυολών που παρήχθησαν στα πλαίσια αυτής της διατριβής παρατίθεται ο ακόλουθος Πίνακας 3.10 που στοχεύει στη σύγκριση με τα αποτελέσματα της διεθνούς βιβλιογραφίας.

Πίνακας 3.10 Συγκριτικά δεδομένα για τη βιοτεχνολογική παραγωγή πολυολών μέσω αξιοποίησης της απόβλητης γλυκερόλης από διάφορα στελέχη *Y. lipolytica* που έχουν χρησιμοποιηθεί κατά καιρούς διεθνώς.

Strain	Culture mode	MI (g/L)	Ery (g/L)	Ara (g/L)	POL (g/L)	Y _{POL/Glcl} (% w/w)	References
Wratislavia K1	flasks	3,9	133,6	0,1	137,6	45,9	[Mironczuk et al., 2014]
MK1	bioreactor	6,9	165	3	174,9	58,3	[Rakicka et al., 2020]
Wratislavia K1	flasks	nd	110,5	nd	110,5	44,2	[Mironczuk et al., 2014]
Wratislavia K1	flasks	8,1	155,5	0,6	164,2	54,7	[Mironczuk et al., 2014]
Wratislavia K1	bioreactor	6,1	89	0,7	95,8	63,9	[Tomaszewska et al., 2014]
Wratislavia K1	flasks	3,9	135,5	0,1	139,5	58	[Mironczuk et al., 2014]
FCY 218	bioreactor	nd	80,6	nd	80,6	53	[Carly et al., 2018]
Wratislavia K1	bioreactor	3	132	nd	135	45	[Rywińska et al., 2013]
AIB	bioreactor	12,6	56,7	6	75,3	49,1	[Rakicka et al., 2017]
Wratislavia 1.31	bioreactor	23	132	nd	155	51,7	[Rymowicz et al., 2006]
A-101	bioreactor	27	137	nd	164	54,7	[Rymowicz et al., 2006]
8661 UV1	bioreactor	40,5	113	nd	153,5	51,2	[Rymowicz et al., 2006]
AIB UTGUT1/1	flasks	13,8	16,2	5,5	35,5	36,1	[Rakicka et al., 2017]
AIB UTGUT1/2	flasks	16,7	6,7	7,5	30,9	31,4	[Rakicka et al., 2017]
AIB UTGUT1/3	flasks	7,6	14,6	7	29,2	29,6	[Rakicka et al., 2017]
LMBF Y-54	flasks	21,7	24,6	10,3	56,6	54,3	[Vastaroucha et al., 2021]
FMCC Y-74	flasks	23,9	20,8	12,5	57,2	45,9	Παρούσα μελέτη
FMCC Y-74	flasks	23,2	17,7	9,4	50,3	60,7	Παρούσα μελέτη
NRRL Y-323	flasks	17,4	25,5	7,3	50,2	59,9	Παρούσα μελέτη
NRRL Y-323	flasks	25,9	32,1	14	74,8	61,7	Παρούσα μελέτη
FMCC Y-74	flasks	34,2	27,4	18,4	80	59,9	Παρούσα μελέτη
FMCC Y-74	bioreactor	30,8	43	5,9	79,7	42,4	Παρούσα μελέτη
FMCC Y-74	bioreactor	51	26,1	12,2	89,4	61,4	Παρούσα μελέτη
FMCC Y-74	bioreactor	21,9	10,3	4,4	36,6	29,1	Παρούσα μελέτη

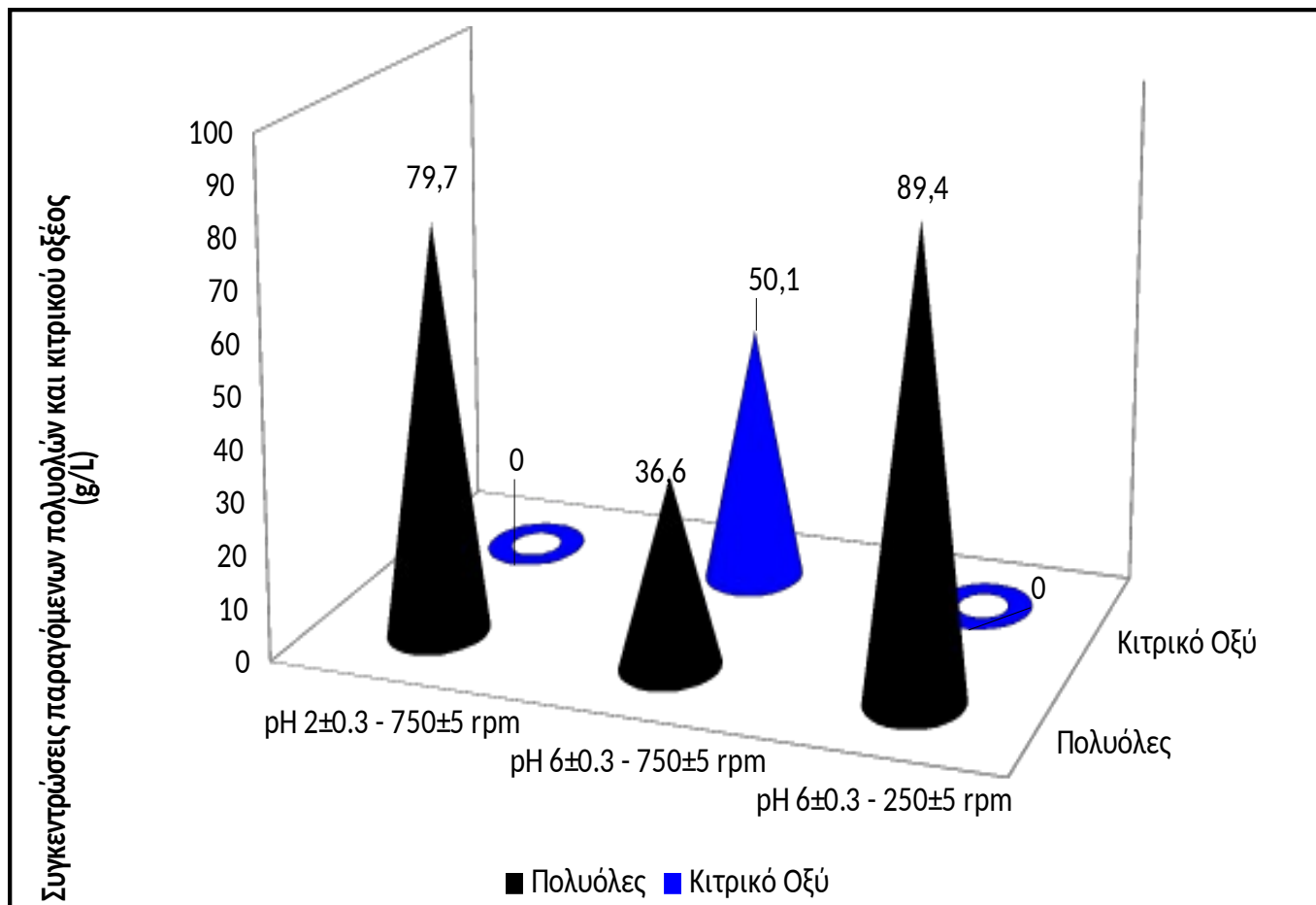
nd: Δεν έχει προσδιοριστεί (≤ 0.3 g/L).

Στον αντίποδα, το πείραμα που συνδύασε το χαμηλό pH με την υψηλή ανάδευση εστίασε ξεκάθαρα στην παραγωγή πολυολών χωρίς να αφήνει περιθώρια στην παραγωγή άλλου εξωκυτταρικού προϊόντος (κιτρικό οξύ), καθώς οι συνθήκες εν δυνάμει κατευθύνουν σχεδόν αποκλειστικά το μεταβολισμό προς την έκκριση τους, με βάση τις αντίστοιχες μελέτες της βιβλιογραφίας, όπου πολύ όξινες τιμές pH ($3 \pm 0,3$ ή και χαμηλότερες) θεωρούνται ως στοιχείο «εκ των ων ουκ άνευ» για την επιτυχή περαιώση της βιοδιεργασίας (Tomaszewska et al., 2012; Rzechonek et al., 2018; Fickers et al., 2020; Rice et al., 2020). Στο πείραμα αυτό, η παραγωγή των πολυολών έφτασε τη μέγιστη τιμή των 79,7 g/L (με συντελεστή απόδοσης πάντως εμφανώς μειωμένο, στο 42,4% w/w, σε σχέση με το πείραμα που εγένετο στο ελαφρώς όξινο pH ($6 \pm 0,3$). Η κυριαρχία της μαννιτόλης επισκιάστηκε από την ερυθριτόλη, συνθήκη που επέρχεται συνήθως όταν τα κύτταρα του στελέχους επιδιώκουν την εξισορρόπηση λόγω οσμωτική πίεσης (Rymowicz et al., 2006; 2008; 2009; 2010; Tomaszewska et al., 2014). Η παραγωγή της ερυθριτόλης έφτασε τα 43 g/L έναντι της μαννιτόλης που έφτασε τα 30,8 g/L και τέλος της αραβιτόλης με 5,9 g/L, όπως φαίνεται στο κινητικό προφίλ του στελέχους στην Εικόνα 3.24 που περιγράφει το πείραμα με το πολύ όξινο pH ($6 \pm 0,3$) και την υψηλή ανάδευση (750 ± 5 rpm).



Εικόνα 3.24 Κινητικό προφίλ μαννιτόλης (□), ερυθριτόλης (▲), αραβιτόλης (×), πολυολών (*), βιομάζας (●) και κατανάλωσης γλυκερόλης (◆) από *Y. lipolytica* FMCC Y-74 κατά τη διάρκεια καλλιέργειας σε υπόστρωμα με βάση τη γλυκερόλη (Gl₀ ~40 g/L) σε pH 2±0,3 στις 750±5 rpm και θερμοκρασία επώασης T=30±1 °C. Κάθε πειραματικό σημείο που παρουσιάζεται είναι η μέση τιμή δύο ανεξάρτητων προσδιορισμών από διαφορετικά αρχικά εμβόλια.

Παρατηρείται λοιπόν, ότι η παραγωγή των πολυολών εκτός από την επίδραση του pH, στην προκειμένη περίπτωση, συνάδει και με την ανάδευση και δη τη χαμηλή, καθώς προάγει τη βιοσύνθεση τους, όπως απεικονίζεται στην Εικόνα 3.25.



Εικόνα 3.25 Ποσοτικά δεδομένα των παραγόμενων πολυολών και του κιτρικού οξέος από το καλλιεργούμενο στέλεχος *Y. lipolytica* FMCC Y-74 σε υπόστρωμα με βάση τη γλυκερόλη (Glol₀ ~40 g/L) υπό μεταβλητές τιμές pH και ανάδευσης. Θερμοκρασία επώασης T=30±1 °C. Κάθε πειραματικό σημείο που παρουσιάζεται είναι η μέση τιμή δύο ανεξάρτητων προσδιορισμών από διαφορετικά αρχικά εμβόλια.

Επιπροσθέτως, η παραγωγή της βιομάζας ενισχύθηκε σημαντικά στο πείραμα με το πολύ όξινο pH ($X_{\max}=28$ g/L, $2\pm 0,3$), εν αντιθέσει με τις άλλες συνθήκες που κυμάνθηκε σε αρκετά χαμηλότερες συγκεντρώσεις, της τάξεως των 9,5-12,9 g/L. Στον Πίνακα 3.11 παρατίθεται σύγκριση με τη βιβλιογραφία σχετικά με την παραγωγή ξηράς βιομάζας από στελέχη ζυμών τα οποία έχουν καλλιεργηθεί στη γλυκερόλη, καθώς και τα καλύτερα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας.

Πίνακας 3.11 Συγκριτικά δεδομένα για τη βιοτεχνολογική παραγωγή βιομάζας μέσω αξιοποίησης της απόβλητης γλυκερόλης από διάφορα στελέχη που έχουν χρησιμοποιηθεί κατά καιρούς διεθνώς.

Strain	Culture mode	X (g/L)	References
<i>Yarrowia lipolytica</i> A18	Fed-batch bioreactor	23	[Celińska and Grajek, 2013]
<i>Yarrowia lipolytica</i> NCYC 3825	Fed-batch bioreactor	42	[Celińska and Grajek, 2013]
<i>Yarrowia deformans</i> CBS 2071	Shake flasks	~42-47	[Rakicka et al., 2016]
<i>Yarrowia phangngensis</i> CBS 10407	Shake flasks	~40-44	[Rakicka et al., 2016]
<i>Yarrowia bubula</i> CBS 12934	Batch bioreactor	27,1	[Rakicka et al., 2016]
<i>Yarrowia porcina</i> CBS 12932	Batch bioreactor	26,8	[Rakicka et al., 2016]
<i>Rhodospiridium toruloides</i> Y4	Fed-batch shake flasks	21,1	[Yang et al., 2014]
<i>Lipomyces starkeyi</i> DSM 70296	Shake flasks	34,4	[Tchakouteu et al., 2015]
<i>Rhodospiridium toruloides</i> NRRL Y-27012	Shake flasks	30,1	[Tchakouteu et al., 2015]
<i>Pichia membranifaciens</i> LFMB 8	Shake flasks	28,4	[Chatzifragkou et al., 2011]
<i>Yarrowia lipolytica</i> 4.29 SoAMY	Fed-batch bioreactor	69,1	[Celińska et al., 2017]
<i>Yarrowia lipolytica</i> ATTC 8661	Batch bioreactor	24,3	[Juszczyk and Rymowicz, 2009]
<i>Yarrowia lipolytica</i> 8661 UV'1	Batch bioreactor	26,8	[Juszczyk and Rymowicz, 2009]
<i>Yarrowia lipolytica</i> Z	Batch bioreactor	17,2	[Juszczyk and Rymowicz, 2009]
<i>Yarrowia lipolytica</i> A-101	Batch bioreactor	20,1	[Juszczyk and Rymowicz, 2009]
<i>Yarrowia lipolytica</i> DiSVA	Shake flasks	25,7	[Taccari et al., 2012]
<i>Yarrowia lipolytica</i> MUCL 28849	Fed-batch bioreactor	40,9	[Fontanille et al., 2012]
<i>Rhodotorula glutinis</i> BCRC 21418	Fed-batch bioreactor	39,2	[Yen et al., 2015]
<i>Rhodospiridium fluviale</i> DMKU-RK 253	Batch bioreactor	14,2	[Polburee et al., 2016]
<i>Rhodotorula glutinis</i> CICC 31596	Fed-batch bioreactor	30,6	[Karamerou et al., 2017]
<i>Yarrowia lipolytica</i> ACA YC 5029	Batch bioreactor	19,4	[Papanikolaou et al., 2017b]
<i>Rhodospiridium toruloides</i> DSM 4444	Shake flasks	39,1	[Papanikolaou et al., 2017b]
FMCC Y-74	Fed-batch bioreactor	28	Παρούσα μελέτη

Συνοψίζοντας, το εντελώς διαφορετικό μεταβολικό προφίλ που παρατηρήθηκε για το στέλεχος FMCC Y-74 μεταξύ των ζυμώσεων βυθού στις αναδεδυόμενες φιάλες σε σχέση με τον εργαστηριακό βιοαντιδραστήρα όπου όλα τα στοιχεία ήταν ίδια εκτός από την ανάδευση η οποία ήταν ή σχετικά χαμηλή ή πολύ υψηλή, καταδεικνύει την κεφαλαιώδη σημασία της ανάδευσης/αερισμού σχετικά με την παραγωγή των μεταβολικών προϊόντων για τη ζύμη *Y. lipolytica*.

4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στη συγκεκριμένη ερευνητική μελέτη, προτάθηκε η χρήση της ακάθαρτης γλυκερόλης ως πηγής άνθρακα για ποικίλες μικροβιακές ζυμώσεις, με σκοπό την παραγωγή μεταβολιτών μέσω διεργασιών που παρουσιάζουν εξαιρετικό επιστημονικό και βιομηχανικό ενδιαφέρον. Η παραγωγή μικροβιακών λιπιδίων εν δυνάμει έχει ως απόρροια το σχηματισμό ενός πλήρους βιοδιυλιστηρίου βιοντίζελ, αφού από το κύριο «απόβλητο» της διεργασίας παραγωγής βιοντίζελ παράγονται λιπίδια που δύνανται να μετατραπούν εκ νέου σε βιοντίζελ, με προφανή μείωση του κόστους της βιομηχανικής παραγωγής βιοντίζελ. Περαιτέρω, όλες οι παραγόμενες πολυόλες (μαννιτόλη, ερυθριτόλη, αραβιτόλη) είναι προϊόντα με πολύ υψηλή αξία, ενώ προστιθέμενης αξίας υλικό είναι το κιτρικό οξύ με ποικίλες χρήσεις, κυρίως ως συντηρητικό στα τρόφιμα. Τέλος, οι παραγόμενοι ενδοπολυσακχαρίτες έχουν εφαρμογές στην κοσμετολογία, ενώ η κυτταρική μάζα πλούσια σε πολυσακχαρίτες και λιπίδια θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως συμπληρωματικό προϊόν ζωοτροφών ή ιχθυοτροφών με υψηλή διατροφική αξία. Επίσης, με γνώμονα το κόστος της διεργασίας (και την ενδεχόμενη μεταφορά κλίμακας σε ημιβιομηχανικούς/βιομηχανικούς βιοαντιδραστήρες) το ενδιαφέρον στη συγκεκριμένη έρευνα εστιάστηκε στην επιλογή στελεχών τα οποία αποδείχθηκαν ωσμοανθεκτικά σε υψηλές αρχικές συγκεντρώσεις του εν λόγω αποβλήτου ή/και σε υψηλές συγκεντρώσεις NaCl, ικανά να αφομοιώσουν υπόστρωμα μη θερμικώς επεξεργασμένο, ώστε μελλοντικά να πραγματοποιηθούν ζυμώσεις, με στόχο την αξιοσημείωτη μείωση τους κόστους της προτεινόμενης διεργασίας.

Ως γενικό συμπέρασμα, αξίζει να τονιστεί ότι τα στελέχη του μικροοργανισμού που χρησιμοποιήθηκαν, βρέθηκαν ικανά να χρησιμοποιήσουν την ακάθαρτη γλυκερόλη ως πηγή άνθρακα και ενέργειας, στις περισσότερες συνθήκες στις οποίες εκτέθηκαν. Εξαίρεση αποτέλεσε η παρουσία χλωριούχου νατρίου σε πολύ όξινα pH ($2\pm 0,3$) που έδρασε ανασταλτικά για τα στελέχη ως προς την αφομοίωση του υποστρώματος, η θερμοκρασία επώασης όταν ρυθμίστηκε στους 40 ± 1 °C και εν μέρει τα απολύτως μη θερμικά επεξεργασμένα υποστρώματα, που κατέστειλαν την ανταγωνιστικότητα των στελεχών απέναντι σε έτερους μικροβιακούς πληθυσμούς, ενώ σημαντικό κρίνεται το γεγονός ότι οι προσμίξεις της απόβλητης γλυκερόλης δεν επηρέασαν την παραγωγικότητα των στελεχών.

Η παραγωγή της βιομάζας δε μπορεί να ειπωθεί ότι κατευθύνθηκε από ένα μόνο παράγοντα που την επηρεάζει, αλλά από ένα συνδυασμό συνθηκών, που περιλαμβάνουν το είδος της ζύμωσης, το στέλεχος, τη θερμοκρασία, το pH, την ανάδευση, τη θερμική επεξεργασία ή όχι του υποστρώματος, κ.λπ. Σημαντικό ρόλο έπαιξε και το εκάστοτε στέλεχος στη μεταβολική της πορεία, καθώς δεν ακολούθησαν όλα τον ίδιο μεταβολισμό κάτω από την έκθεση όμοιων συνθηκών ζύμωσης. Διαπιστώθηκε θετική συσχέτιση της παραγωγής βιομάζας σε παστεριωμένα υποστρώματα. Ευνοϊκές κρίθηκαν οι συνθήκες υψηλού pH ($6\pm 0,3$) και προσθήκης υψηλότερων αρχικών συγκεντρώσεων γλυκερόλης (~80 g/L και ~120 g/L), ενώ η παρουσία μεταβλητών συγκεντρώσεων χλωριούχου νατρίου (~10 g/L, ~30 g/L, ~50 g/L και ~80 g/L) στις ζυμώσεις μείωσαν σχετικά την παραγωγή βιομάζας. Όσον αφορά τη χαμηλή θερμοκρασία που επιβλήθηκε, αυτή συνοδεύτηκε από σημαντική ποσότητα κυτταρικής μάζας για αρκετούς από τους μελετημένους μικροοργανισμούς. Τέλος σε εργαστηριακές δοκιμές που πραγματοποιήθηκαν σε υψηλές

αρχικές συγκεντρώσεις ακάθαρτης γλυκερόλης και σε ημι-συνεχείς τροφοδοτούμενους βιοαντιδραστήρες, καίτοι τα κύρια μεταβολικά προϊόντα τα οποία παρήχθησαν ήταν είτε πολυόλες, είτε κιτρικό οξύ λόγω του περιορισμού σε άζωτο ο οποίος επιβλήθηκε, αρκετά ικανοποιητικές συγκεντρώσεις ξηράς κυτταρικής βιομάζας (π.χ. έως 28 g/L) αναφέρθηκαν. Η βιομάζα αυτή, εμπεριέχει αξιοσημείωτες ποσότητες ενδοπολυσακχαριτών και κυτταρικών λιπιδίων που περιέχουν υψηλής αξίας λιπαρά οξέα (π.χ. ελαιϊκό οξύ, λινελαϊκό οξύ, κ.λπ.), μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως συμπλήρωμα στο σιτηρέσιο αγροτικών ζώων, ιχθύων ή και του ανθρώπου, αυξάνοντας την αειφορία και την οικονομική σημασία των γενομένων βιοδιεργασιών.

Σχετικά με την παραγωγή των ενδοκυτταρικών μεταβολικών προϊόντων (μικροβιακά λιπίδια και ενδοπολυσακχαρίτες) ένας κοινός παρονομαστής της σύνθεσης τους στάθηκε το pH και δη το ελαφρώς όξινο ($6\pm 0,3$). Η συνθήκη αυτή έχει αποδειχθεί κατ' εξακολούθηση σχετικά σημαντική και δεν αποτελέσαν εξαίρεση τα πειραματικά δεδομένα της παρούσας διατριβής. Η λιποσυσσώρευση ευνοήθηκε στα πρώιμα στάδια των ζυμώσεων παρουσία αζώτου και στη συνέχεια μειώνονταν, στρέφοντας το μεταβολισμό προς την παραγωγή των πολυολών. Τα ποσοστά συσσώρευσης των λιπιδίων δεν κατάφεραν να ξεπεράσουν στις περισσότερες περιπτώσεις το ποσοστό $\sim 20\%$ w/w, το οποίο, ως αναφέρθηκε και στα προηγούμενα εδάφια, είναι το κατώτατο όριο χαρακτηρισμού ενός μικροοργανισμού ως ελαιογόνου. Η ενδοκυτταρική περιεκτικότητα των λιπιδίων φάνηκε να εξαρτάται από το στέλεχος, το pH και τη θερμοκρασία επώασης. Σε αρκετές περιπτώσεις στη βιβλιογραφία τα άγριου τύπου στελέχη αυτού του είδους ζυμομύκητα, έχει δείχθει ότι παρουσιάζουν έναν «άτυπο» ελαιογόνο χαρακτήρα. Στην παρούσα μελέτη, τα περιεχόμενα λιπίδια, συνήθως κυμαίνονταν σε ποσοστά από 4% έως 19% w/w, η δε καλλιέργεια τους σε γλυκερόλη επέτρεψε τη σχετικά περιορισμένη *de novo* βιοσύνθεση και συσσώρευση λιπιδίων, ενώ ως εδείχθη σε όλα τα προηγουμένως εδάφια, ο επιβληθείς περιορισμός του μέσου σε άζωτο οδήγησε κυρίως στην παραγωγή πολυολών και (λιγότερο) κιτρικού οξέος και όχι στην υψηλή παραγωγή μικροβιακών λιπιδίων. Θετική ήταν η επίδραση της παρουσίας του χλωριούχου νατρίου που αύξησε την περιεκτικότητα τους κατά τα πρώιμα στάδια της ζύμωσης, χωρίς ωστόσο να καταγραφούν πολύ σημαντικές ποσότητες παραγόμενων ενδοκυτταρικών λιπιδίων.

Ο μεταβολισμός των ενδοπολυσακχαριτών απέτυχε να στραφεί προς την παραγωγή τους κατά τα πειράματα αναφοράς σε σημαντικές ποσότητες. Αντιθέτως, στις παστεριωμένες συνθήκες η υψηλή παραγωγή της βιομάζας δυνητικά ώθησε σε σχετικά ικανοποιητικό βαθμό την παραγωγή τους. Παρόμοια μεταβολική συμπεριφορά παρουσιάστηκε και όταν τα στελέχη καλλιεργήθηκαν παρουσία χλωριούχου νατρίου. Η παραγωγικότητα τους κυμάνθηκε στα υψηλότερα επίπεδα ($20\text{-}29\%$ w/w) που συναντήθηκαν στην τρέχουσα μελέτη, με την ενδοκυτταρική αυτή συσσώρευση ποσοστιαίως να είναι μεγαλύτερη από την αντίστοιχη των λιπιδίων για τις περισσότερες από τις πραγματοποιηθείσες ζυμώσεις. Σημαντική κρίθηκε η μεταβλητή συγκέντρωση του χλωριούχου νατρίου που προστίθετο στις ζυμώσεις, καθώς οι υπερβολικά υψηλές συγκεντρώσεις άλατος που προστέθηκαν μείωσαν τη μικροβιακή ανάπτυξη λόγω παρεμπόδισης, όπως ήταν αναμενόμενο, λαμβάνοντας υπόψη τις συνθήκες ωσμωτικής καταπόνησης.

Ενδιαφέρουσα ήταν και η παραγωγή κιτρικού οξέος σε συνθήκες ελαφρώς όξινου pH ($6\pm 0,3$), αποτέλεσμα που συνάδει με τα βιβλιογραφικά δεδομένα και επιβεβαίωσε την εμφάνιση της παραγωγής του σε συνθήκες pH $6\pm 0,3$. Η παραγωγή του ευνοήθηκε από τα πλήρως θερμικά επεξεργασμένα υποστρώματα, καθώς δεν υπήρχε ο ανασταλτικός παράγοντας της μικροβιακής μόλυνσης, ώστε να καταστείλει τη σύνθεση του. Η χαμηλή θερμοκρασία και η παστερίωση δεν επέτρεψαν την παραγωγή του. Απεναντίας, στα μη θερμικώς επεξεργασμένα υποστρώματα σε συνδυασμό με το ελαφρώς όξινο pH ($6\pm 0,3$) συνετέθησαν κάποιες ποσότητες του οργανικού αυτού οξέος. Η παρουσία χλωριούχου νατρίου αποτέλεσε κρίσιμη παράμετρο, μιας και όταν αυξήθηκε η συγκέντρωση του άλατος ακολουθούσε αυξητική τάση και η παραγωγή κιτρικού οξέος σε pH $6\pm 0,3$. Ομοίως, ευνοήθηκε η παραγωγή του και σε συνθήκες αυξημένης αρχικής συγκέντρωσης υποστρώματος. Τέλος, όταν το στέλεχος FMCC Y-74 χρησιμοποιήθηκε ως βιολογικό υλικό για πειράματα σε εργαστηριακό βιοαντιδραστήρα εξετάζοντας τον καλύτερο συνδυασμό pH-ανάδευσης, διαπιστώθηκε ότι μόνο η υψηλή ανάδευση και ο συνακόλουθος υψηλός αερισμός, στο πείραμα που έλαβε χώρα με το «υψηλό» pH (ήτοι pH= $6\pm 0,3$) τυγχάνουν σημαντικής παραγωγής κιτρικού οξέος. Στους υπόλοιπους συνδυασμούς των κλειστών και ημι-συνεχών τροφοδοτούμενων πειραμάτων, δεν παρατηρήθηκε ουδόλως μεταβολική μετατόπιση προς παραγωγή κιτρικού οξέος.

Η παραγωγή πολυολών χαρακτηρίστηκε η κύρια βιοδιεργασία όλων των πειραματικών δοκιμών που διεξήχθησαν στα πλαίσια αυτής της διατριβής. Παρατηρώντας και συγκρίνοντας την παραγωγή τους σε υπόστρωμα ακατέργαστης (85% w/w) και καθαρής βιομηχανικής γλυκερόλης (100% w/w) διαπιστώθηκε, από τα πρώτα κιόλας στάδια, ότι τα στελέχη είναι άκρως ανταγωνιστικά με την παραγωγή τους, καθώς δεν τα επηρεάζουν δραματικά οι συνθήκες της ζύμωσης, ώστε να ανασταλεί η έκκριση τους. Οι προσμίξεις της απόβλητης γλυκερόλης δε μείωσαν την παραγωγή τους σε σχέση με την καθαρή γλυκερόλη.

Γενικώς έχει δειχθεί ότι παραγωγή των πολυολών συνδέεται άρρηκτα με τις όξινες συνθήκες περιβάλλοντος, χωρίς ωστόσο να εκμηδενίζεται η παραγωγικότητά τους σε ελαφρώς όξινα pH ($6\pm 0,3$) της καλλιέργειας. Η θερμοκρασία επώασης δεν επηρέασε σημαντικά την παραγωγή των πολυολών, διατηρώντας την παραγωγή σε σχετικά σταθερά επίπεδα. Παρατηρήθηκε, πως όταν υπάρχει υψηλή ωσμωτική καταπόνηση, η παραγωγή των πολυολών στρέφεται προς την παραγωγή ερυθριτόλης, ώστε να μειωθεί η εκροή νερού από ενδοκυτταρικό στο εξωκυτταρικό περιβάλλον. Επιπλέον, το πολύ όξινο pH ($6\pm 0,3$) έπαιξε καθοριστικό ρόλο στη σύνθεση και έκκριση πολυολών, καθώς γενικά θεωρείται ότι η ανάπτυξη υπό εξαιρετικά όξινες συνθήκες διοχετεύει τη ροή του άνθρακα προς τη σύνθεση των πολυολών, ενώ η ανάπτυξη σε ελαφρά όξινες τιμές pH (το pH που κυμαίνεται μεταξύ $5\pm 0,3$ και $6\pm 0,3$) ευνοεί την παραγωγή κιτρικού οξέος, εις βάρος της παραγωγής πολυολών. Η ανακατανάλωση των πολυολών εμφανίστηκε σε αρκετά πειραματικά σημεία. Όταν αφομοιωνόταν πλήρως το υπόστρωμα παρατηρήθηκε σε ορισμένες ζυμώσεις κατανάλωση των προϊόντων και συγκεκριμένα των πολυολών, πιθανώς για λόγους συντήρησης του κυττάρου. Στα παστεριωμένα και στα μη θερμικά επεξεργασμένα

υποστρώματα, η δυναμική των πολυολών δε σημείωσε ουσιαστικές διαφορές από τα πειράματα αναφοράς. Επιβεβαιώθηκε και πάλι η συμβολή του pH και συγκεκριμένα του όξινου περιβάλλοντος να προωθεί την έκκριση τους. Διαπιστώθηκε ότι η παραγωγή τους δε σχετίζεται με την παραγωγή τη βιομάζας. Σε αυτές τις συνθήκες κυρίαρχη πολυόλη ήταν η μαννιτόλη, ακολουθούμενη από την ερυθριτόλη και την αραβιτόλη με αμελητέες ποσότητες.

Αίσθηση προκάλεσε το γεγονός ότι η παρουσία χλωριούχου νατρίου δεν ενίσχυσε την παραγωγή πολυολών καταγράφοντας τις χαμηλότερες τιμές που υπήρξαν στα πειραματικά δεδομένα. Με την προσθήκη μεταβλητών συγκεντρώσεων άλατος ενισχύθηκε η παραγωγή κιτρικού οξέος εις βάρος των εκκρινόμενων πολυολών. Οι παραγωγικότητες των δυο αυτών εξωκυτταρικών προϊόντων δε συνάδουν κατά κύριο λόγο. Από την άλλη πλευρά, άξιο αναφοράς ήταν το γεγονός, ότι όταν αυξήθηκε η συγκέντρωση χλωριούχου νατρίου υπήρξε αντιστροφή στην αναλογία μαννιτόλης:ερυθριτόλης. Συγκεκριμένα, επικράτησε η ερυθριτόλη σε προσθήκη ~ 80 g/L NaCl, το δε κομβικό σημείο καμπής ήταν τα ~ 30 g/L έως ~ 50 g/L NaCl, καθώς στα ~ 10 g/L NaCl, επικράτησε ακόμα η μαννιτόλη. Η παραγωγή αραβιτόλης παρεμποδίστηκε από την παρουσία του άλατος. Περαιτέρω, ένας ακόμα παράγοντας που μελετήθηκε ήταν η επίδραση αυξημένων αρχικών συγκεντρώσεων γλυκερόλης, που παρουσίασε ένα εξαιρετικά θετικό αποτέλεσμα στις πραγματοποιηθείσες ζυμώσεις. Η παραγωγή τους ευνοήθηκε τόσο σε πολύ όξινο pH ($2 \pm 0,3$) όσο και σε ελαφρώς όξινο pH ($6 \pm 0,3$), στην τελευταία δε περίπτωση παράλληλα με την παραγωγή του κιτρικού οξέος. Το φαινόμενο αυτό δεν είναι ιδιαίτερος συνηθισμένο, ως αναφέρθηκε και στα προηγούμενα εδάφια, αλλά έχει παρατηρηθεί για ορισμένα στελέχη της ζύμης κάτω από συνθήκες ωσμωτικής πίεσης προερχόμενες από υψηλές συγκεντρώσεις υποστρώματος. Παρουσιάστηκε σημαντική αύξηση στη συγκέντρωση της αραβιτόλης και του συντελεστή απόδοσης πολυολών, ο οποίος κατέγραψε μια από τις υψηλότερες τιμές του ($61,7\%$ w/w) από το στέλεχος NRRL Y-323, στο οποίο κυριάρχησε η ερυθριτόλη όταν αυξήθηκε το υπόστρωμα, σε αντίθεση με τα άλλα στελέχη που για τις ίδιες συνθήκες παρέμεινε η μαννιτόλη ως η κύρια πολυόλη. Συνολικά, για την επίδραση των αυξημένων αρχικών συγκεντρώσεων υποστρώματος παρατηρήθηκε πως οι πολυόλες επικρατήσαν των υπόλοιπων μεταβολικών προϊόντων χωρίς να επηρεάζονται σημαντικά από την τιμή του pH.

Ολοκληρώνοντας το σχολιασμό της μεταβολικής πορείας των πολυολών διαπιστώθηκε ευνοϊκή επίδραση από το συνδυασμό χαμηλής ανάδευσης και υψηλού pH ($6 \pm 0,3$), κάτω από αυτές τις συνθήκες παράχθηκε η μέγιστη τιμή πολυολών. Μεταβάλλοντας τον έναν από τους δύο παράγοντες και κρατώντας σταθερό τον άλλο, το στέλεχος αλλάζει τη μεταβολική συμπεριφορά του. Συγκεκριμένα, σε χαμηλό pH ($2 \pm 0,3$) και υψηλή ανάδευση (750 ± 5 rpm) επιτυγχάνεται πάλι υψηλή έκκριση πολυολών, ενώ το υψηλό pH ($6 \pm 0,3$) με υψηλή ανάδευση (750 ± 5 rpm) στρέφει το μεταβολισμό κυρίως προς την παραγωγή κιτρικού οξέος και λιγότερο προς την παραγωγή πολυολών. Σημαντικό ήταν το γεγονός ότι η παραγωγή ερυθριτόλης που φάνηκε να επηρεάζεται και να ενισχύεται αποκλειστικά από το όξινο pH ($2 \pm 0,3$) με υψηλή ανάδευση (750 ± 5 rpm), καθώς σε αυτές τις συνθήκες ήταν επικρατούσα πολυόλη που παράχθηκε,

ενώ το σχετικά υψηλό pH ($6\pm 0,3$) ευνόησε την παραγωγή της μαννιτόλης. Συνεπώς, για την παραγωγή των πολυολών κρίθηκε σημαντικός παράγοντας η επίδραση του pH και της ανάδευσης.

Εν κατακλείδι, αξιοσημείωτο στάθηκε το γεγονός ότι στα πειράματα παρατηρήθηκε πολύ μεγάλη διαφοροποίηση του κυτταρικού μεταβολισμού, με ιδιαίτερη σημασία στη σχέση του αερισμού της διεργασίας και του pH στο μέσο της καλλιέργειας, ενώ δεν έλλειψε και η ανακατανάλωση των πολυολών ενδεχομένως για κυτταρική συντήρηση, μετά από την πλήρη αποζύμωση του αρχικού υποστρώματος. Το κύριο μεταβολικό προϊόν στο σύνολο των πειραματικών δοκιμών ήταν οι πολυόλες, με αξιοσημείωτες παραγόμενες συγκεντρώσεις, από τις πολύ υψηλές της διεθνούς βιβλιογραφίας που επιτεύχθηκαν από άγρια στελέχη της ζύμης *Y. lipolytica*. Θα πρέπει τέλος να δοθεί έμφαση στο γεγονός ότι το βιοχημικό μονοπάτι σύνθεσης των πολυολών δεν έχει ακόμη διευκρινιστεί πλήρως, με μια τέτοια μελέτη να καθίσταται άκρως ελκυστική και ενδιαφέρουσα. Συνεπώς, η παραγωγή πολυολών μέσω της αξιοποίησης βιομηχανικών παραπροϊόντων αποτελεί σημαντικό αντικείμενο για τη βιοτεχνολογία των τροφίμων και οδηγεί στην αναβάθμιση του περιβάλλοντος και της οικονομίας.

Συμπερασματικώς, στην παρούσα εργασία έλαβε χώρα μια αρκετά μεγάλη σε όγκο κινητική μελέτη πολλών αγρίων στελεχών του είδους *Y. lipolytica* προκειμένου να αποσαφηνιστούν φαινόμενα σχετικά με την παραγωγή των μεταβολικών προϊόντων (πολυόλες, κιτρικό οξύ, λιπίδια, πολυσακχαρίτες) που προέρχονται από το δευτερογενή μεταβολισμό των μικροοργανισμών αυτών όταν η γλυκερόλη χρησιμοποιείται ως υλικό εκκίνησης των διεργασιών ζύμωσης από το ανωτέρω είδος. Σε πολλές από τις περιπτώσεις, έλαβε χώρα υψηλή παραγωγή πολυολών με εξαιρετικό συντελεστή βιομετατροπής σε σχέση με την αναλωθείσα γλυκερόλη. Το κιτρικό οξύ επίσης παράχθηκε σε αρκετά ικανοποιητικές ποσότητες σε υποστρώματα όπου υπήρξε ελαφρώς όξινο pH ($6\pm 0,3$), καθώς και υψηλή ανάδευση και αερισμός. Σχετικά ικανοποιητική παραγωγή ξηράς κυτταρικής βιομάζας που περιείχε σε ποικίλα ποσά λιπίδια και πολυσακχαρίτες αναφέρθηκε σε αρκετές από τις περιπτώσεις των μικροβιακών καλλιεργειών. Η παρούσα μελέτη συνεπώς, κατέδειξε τη δυνατότητα διαφόρων άγριων και μη προηγουμένως εκτενώς μελετημένων στελεχών της ζύμης *Y. lipolytica* να χρησιμοποιηθούν ως κυτταρικά εργαστήρια («cell factories») σε ποικίλες διεργασίες αξιοποίησης της γλυκερόλης, με παραγωγή βιοτεχνολογικών προϊόντων και κυτταρικής βιομάζας, ύψιστης σημασίας για τη βιομηχανία των τροφίμων, τη φαρμακευτική βιομηχανία και τη βιομηχανία των χημικών υλικών.

ΟΝΟΜΑΤΟΛΟΓΙΑ

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ ΚΑΙ ΜΟΝΑΔΕΣ

G_{lgl} –συγκέντρωση γλυκερόλης (g/L)

G_{lgl_{cons}} –συγκέντρωση καταναλωθείσας γλυκερόλης (g/L)

X –βιομάζα (g/L)

IPS –ενδοπολυσακχαρίτες (g/L)

L –μικροβιακά λιπίδια (g/L)

POL –συνολικές πολυόλες (g/L)

MI –μαννιτόλη (g/L)

E_{gy} –ερυθριτόλη (g/L)

A_{ga} –αραβιτόλη (g/L)

CA –κιτρικό οξύ (g/L)

Y_{IPS/X} –συντελεστής απόδοσης παραγόμενων ενδοπολυσακχαριτών προς την παραχθείσα βιομάζα (% w/w επί της ξηρής βιομάζας)

Y_{L/X} –συντελεστής απόδοσης παραγόμενων λιπιδίων προς την παραχθείσα βιομάζα (% w/w επί της ξηρής βιομάζας)

Y_{POL/G_{lgl}} –συντελεστής απόδοσης παραγόμενων πολυολών προς το καταναλωθέν υπόστρωμα

Δείκτες 0 και max, αναφέρονται στην αρχική και στην μέγιστη ποσότητα των συστατικών (προϊόντων ή υποστρωμάτων) που μελετούνται στην εκάστοτε κινητική

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Abdel – Mawgoud, A.M., Markham, K., Palmer, C.M., Liu, N., Stephanopoulos, G., Alper, H. S., (2018). Metabolic engineering in the host *Yarrowia lipolytica*. *Metabolic Engineering*, 50:192-208.
- Adrio, J., (2017). Oleaginous yeasts: promising platforms for the production of oleochemicals and biofuels. *Biotechnology and Bioengineering*, 114(9):1915-1920.
- AFNOR, (1984). Recueil de normes françaises des corps gras, grains oleagineux et produits derives. Association Française pour Normalisation, 95.
- Ahmed, Z., (2001). The properties of *Candida famata* R28 for D-arabitol production from D-glucose. *Journal of Biological Sciences*, 1(11):1005-1008.
- Allende, A., Bolton, D., Chemaly, M., Davies, R., Fernández Escámez, P.S., Girones, R., Herman, L., Koutsoumanis, K., Lindqvist, R., Nørrung, B., Ricci, A., Robertson, L., Ru, G., Sanaa, M., Simmons, M., Skandamis, P., Snary, E., Speybroeck, N., Ter Kuile, B., Threlfall, J., Wahlström, H., (2018). Update of the list of QPS-recommended biological agents intentionally added to food or feed as notified to EFSA 8: suitability of taxonomic units notified to EFSA until March 2018. *EFSA Journal*, 16(7):5315.
- Amaral, P.F.F., Ferreira, T.F., Fontes, G.C., Coelho, A.Z., (2009). Glycerol valorization: new biotechnological routes. *Food and Bioproducts Processing*, 87(3):179-186.
- André, A., Chatziftagkou, 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*, 9:468-478.
- Aro, E.M., (2016). From first generation biofuels to advanced solar biofuels. *Ambio*, 45(1):S24-31.
- Bankar, A.B., Kumar, A.R., Zinjarde, S.S., (2009). Environmental and industrial applications of *Yarrowia lipolytica*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 84:847-865.
- Bati, N., Hammond, E.G., Glatz, B.A., (1984). Biomodification of fats and oil: Trials with *Candida lipolytica*. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 61(11):1743-1746.
- Belitz, H.D., Grosch, W., Schieberle, P., (2009). *Food Chemistry* (4th edition). Berlin, Germany: Springer.

Bellou, S., Makri, A., Triantaphyllidou, I.E., Papanikolaou, S., Aggelis, G., (2014). Morphological and metabolic shifts of *Yarrowia lipolytica* included by alteration of the dissolved oxygen concentration in the growth environment. *Microbiology*, 160(4):807-817.

Beopoulos, A., Cescut, J., Haddouche, R., Uribelarrea, J.L., Molina-Jouvre, C., Nicaud, J.M., (2009). *Yarrowia lipolytica* as a model for bio-oil production. *Progress in Lipid Research*, 48(6):375-87.

Beopoulos, A., Haddouche, R., Kabran, P., Dulermo, T., Chardot, T., Nicaud, J.M., (2012). Identification and characterization of DGA₂, an acyltransferase of the DGAT₁ acyl-CoA:diacylglycerol acyltransferase family in the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica*. New insights into the storage lipid metabolism of oleaginous yeasts. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 93(4):1523-37.

Bernt, W.O., Borzelleca, J.F., Flamm, G., Munro, I.C., (1996). Erythritol: a review of biological and toxicological studies. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 24(2):S191-7.

Bhutada, G., Kavšček, M., Ledesma-Amaro, R., Thomas, S., Rechberger, G., Nicaud, J.M., Natter, K., (2017). Sugar versus fat: elimination of glycogen storage improves lipid accumulation in *Yarrowia lipolytica*. *FEMS Yeast Research*, 17(3):fox020.

Bozell, J., Petersen, G., (2010). Technology development for the production of biobased products from biorefinery carbohydrates – the US Department of Energy’s “Top 10” revisited. *Green Chemistry*, 12(4):539-554.

Carly, F., Fickers, P., (2018). Erythritol production by yeasts: A snapshot of current knowledge. *Yeast*, 35:455–463.

Cavallo, E., Charreau, H., Cerrutti, P., Foresti, M.L., (2017). *Yarrowia lipolytica*: A model yeast for citric acid production. *FEMS Yeast Research*, 17(8):fox084.

Celińska, E., Grajek, W., (2013). A novel multigene expression construct for modification of glycerol metabolism in *Yarrowia lipolytica*. *Microbial Cell Factories*, 12:102.

Celińska, E., Borkowska, M., Białas, W., (2017). Enhanced production of insect raw-starch-digesting alpha-amylase accompanied by high erythritol synthesis in recombinant *Yarrowia lipolytica* fed-batch cultures at high-cell-densities. *Process Biochemistry*, 52:78–85.

- Chambers, P., Pretorius, I., (2010). Fermenting knowledge: the history of winemaking, science and yeast research. *EMBO Reports*, 11(12):914-20.
- Chatzifragkou, A, Makri, A., Belka, A., Bellou, S., Mavrou, M., Mastoridou, M., Mystrioti, P., Onjaro, G., Aggelis, G., Papanikolaou, S., (2011). Biotechnological conversions of biodiesel derived waste glycerol by yeast and fungal species. *Energy*, 36:1097-1108.
- Chatzifragkou, A., Papanikolaou, S., (2012). Effect of impurities in biodiesel-derived waste glycerol on the performance and feasibility of biotechnological processed. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 95(1):13-27.
- Chung, Y., Lee, M., (2013). Genotoxicity assessment of erythritol by using short-term assay. *Toxicol Resources*, 29(4):249-255.
- Daskalaki, A., Perdikouli, D., Aggeli, D., Aggelis, G., (2019). Laboratory evolution strategies for improving lipid accumulation in *Yarrowia lipolytica*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103:8585-8596.
- Dhillon, G. S., Brar, S. K., Verma, M., Tyagi, R. D., (2011). Recent Advances in Citric Acid Bio-production and Recovery. *Food and Bioprocess Technology*, 4:505-529.
- Diamantopoulou, P., Filippousi, R., Antoniou, D., Varfi, E., Xenopoulos, E., Sarris, D., Papanikolaou, S., (2020). Production of added-value microbial metabolites during growth of yeasts strains in media composed of biodiesel-derived crude glycerol and glycerol/xylose blends. *FEMS Microbiology Letters*, 367(10):fnaa063.
- Diamantopoulou, P., Papanikolaou, S., (2023). Biotechnological production of sugar-alcohols: Focus on *Yarrowia lipolytica* and edible/medicinal mushrooms. *Process Biochemistry*, 124:113-131.
- 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.
- Dulermo, R., Dulermo, T., Gamba-Meléndez, H., Thevenieau, F., Nicaud, J.M., (2015). Role of pex11p in lipid homeostasis in *Yarrowia lipolytica*. *Eukaryotic Cell*, 14(5):511-525.

- Egermeier, M., Russmayer, H., Sauer, M., Marx, H., (2017). Metabolic flexibility of *Yarrowia lipolytica* growing on glycerol. *Frontiers in Microbiology*, 8:49.
- Fakas, S., Papanikolaou, S., Galiotou-Panayotou, M., Komaitis, M., Aggelis, G., (2009). *Biochemistry and biotechnology of single cell oil*. Asia Publishers, 38-60.
- Fickers, P., Cheng, H., Lin, C.S.K., (2020). Sugar alcohols and organic acids synthesis in *Yarrowia lipolytica*: Where are we? *Microorganisms*, 8:574.
- 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.
- 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* strains cultivated on biodiesel-derived glycerol. *Carbon Recourses Conversion*, 5(1):92-99.
- Folch, J., Lees, M., Sloane Stanley, G.H., (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *The Journal of Biological Chemistry*, 226(1):497-509.
- Fontanille, P., Kumar, V., Christophe, G., Nouaille, R. (2012). Bioconversion of volatile fatty acids into lipids by the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica*. *Bioresources Technology*, 114:43–449.
- Gao, R., Zhou, X., Bao, W., Cheng, S., Zheng, L., (2020). Enhanced lipid production by *Yarrowia lipolytica* cultured with synthetic and waste-derived high-content volatile fatty acids under alkaline conditions. *Biotechnology for Biofuels*, 13:3.
- Garay, L., Boundy-Mills, K., German, J.B., (2014). Accumulation of high-value lipids in single-cell microorganisms: a mechanistic approach and future perspectives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(13):2709-2727.
- Garlapati, V.K., Shankar, U., Budhiraja, A., (2016). Bioconversion technologies of crude glycerol to value added industrial products. *Biotechnology Reports*, 9:9-14.

- Gonçalves, F.A.G., Colen, G., Takahashi, J.A., (2014). *Yarrowia lipolytica* and its multiple applications in the biotechnological industry. *The Scientific World Journal*, 2014:476207.
- Groenewald, M., Boekhout, T., Neuvéglise, C., Gaillardin, C., van Dijck, P.W.M., Wyss, M., (2014). *Yarrowia lipolytica*: safety assessment of an oleaginous yeast with a great industrial potential. *Critical Reviews in Microbiology*, 40(3):187-206.
- Herrero, A., Lopez, M.C., Fernández-Lago, L., Domínguez, A., (1999). *Candida albicans* and *Yarrowia lipolytica* as alternative models for analyzing budding patterns and germ tube formation in dimorphic fungi. *Microbiology*, 145(10):2727-37.
- Holzschu, D., Presley, H., Miranda, M., Phaff, H., (1979). Identification of *Candida lusitanae* as an opportunistic yeast in humans. *Journal of Clinical Microbiology*, 10(2):202-205.
- Imandi, S.B., Bandaru, V.V., Somalanka, S.R., Garapati, H.R., (2007). Optimization of medium constituents for the production of citric acid from byproduct glycerol using Doehlert experimental design. *Enzyme and Microbial Technology*, 40:1367-1372.
- Jach, M. and Malm, A., (2022). *Yarrowia lipolytica* as an alternative and valuable source of nutritional and bioactive compounds for humans. *Molecules*, 27(7):2300.
- Juszczuk, P. and Rymowicz, W., (2009). Characterization of microbial biomass production from glycerin waste by various yeast strains. *Microbial conversions of raw glycerol*, Aggelis G. (Ed), Nova Science Publishers, New York, 125–135.
- Kamzolova, S.V., Lunina, J.N., Morgunov, I.G., (2011). Biochemistry of citric acid production from rapeseed oil by *Yarrowia lipolytica* yeast. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 88(12):1965-1976.
- Karamerou, E., Theodoropoulos, C., Webb, C., (2017). Evaluating feeding strategies for microbial oil production from glycerol by *Rhodotorula glutinis*. *Engineering Life Sciences*, 17:314–324.
- Kets, E.P., Galinski, E.A., de Wit, M., de Bont, J.A., Heipieper, H.J., (1996). Mannitol, a novel bacterial compatible solute in *Pseudomonas putida* S12. *Journal of Bacteriology*, 178:6665–6670.

- Kiviharju, K., Nyyssölä, A., (2008). Contributions of biotechnology to the production of mannitol. *Recent Paterns on Biotechnology*, 2(2):73-78.
- Koganti, S., Kuo, T.M., Kurtzman, C., Smith, N., Ju, L.K., (2011). Production of arabitol from glycerol: strain screening and study of factors affecting production yield. *Applied Microbial and Cell Physiology*, 90:257-267.
- Koukoumaki, D.I, Tsouko, E., Papanikolaou, S., Ioannou, Z., Diamantopoulou, P., Sarris, D., (2023). Recent advantages in the production of single cell protein from renewable resources and applications. *Carbon Resources Conversion*, In press: www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2588913323000571.
- Kordowska-Wiater, M., (2015). Production of arabitol by yeast: current status and future prospects, *Journal of Applied Microbiology*, 119(2):303-314.
- Lazar, Z., Dulermo, T., Neuvéglise, C., Crutz-Le Coq, A.M., Nicaud, J.M., (2014). Hexokinase-a limiting factor in lipid production from fructose in *Yarrowia lipolytica*. *Metabolic Engineering*, 26:89-99.
- Lazar, Z., Liu, N., Stephanopoulos, G., (2018). Holistic approaches in lipid production by *Yarrowia lipolytica*. *Trends in Biotechnology*, 36(11):1157-1170.
- Lelieveld, H., Boon, B., Bennett, A., Brunius, G., Cantley, M., Chmiel, A., Collins, C.H., Crooy, P., Doblhoff-Dier, O., Economidis, I., Elmqvist, A., Frontali-Botti, C., Havenaar, R., Haymerle, H., Käppeli, O., Leaver, G., Lex, M., Lund, S., Mahler, J.L., Marris, R., Martinez, J.L., Mosgaard, C., Normand-Plessier, C., Romantschuk, M., Wener, R.G., (1996). Safe biotechnology. 7. Classification of microorganisms on the basis of hazard. Working Party "Safety in Biotechnology" of the European Federation Biotechnology. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 45(6):723-9.
- Levinson, W.E., Kurtzman, C.P., Kuo, T.M., (2007). Characterization of *Yarrowia lipolytica* and related species for citric acid production from glycerol. *Enzyme Microbial Technology*, 41:292-295.
- Liang, Y., Sarkany, N., Cui, Y., Blackburn, J.W., (2010). Batch stage of lipid production from crude glycerol derived from yellow grease or animal fats through microalgal fermentation. *Bioresource Technology*, 101:6745-6750.
- Li, Y., Zhao, Z., Bai, F., (2007). High-density cultivation of oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides* Y4 in fed-batch culture. *Enzyme and Microbial Technology*, 41:312-317.

- Liu, H.H., Ji, X.J., Huang, H., (2015). Biotechnological applications of *Yarrowia lipolytica*: Past, present and future. *Biotechnology Advances*, 33(8):1522-46.
- Liu, N., Qiao, K., Stephanopoulos, G., (2016). ¹³C Metabolic flux analysis of acetate conversion to lipids by *Yarrowia lipolytica*. *Metabolic Engineering*, 38:86-97.
- 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.
- Mannaa, M., Han, G., Seo, Y., Park, I., (2021). Evolution of food fermentation processes and use of multi-omics in deciphering the roles of the microbiota. *Foods*, 10(11):2861.
- Miller, G.L., (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 31(3):426-428.
- Mirończuk, A., Biegalska, A., Dobrowolski, A., (2017). Functional overexpression of genes involved in erythritol synthesis in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Biotechnology for Biofuels*, 10:77.
- Morgunov, I.G., Kamzolova, S.V., Lunina, J.N., (2013). The citric acid production from raw glycerol by *Yarrowia lipolytica* yeast and its regulation. *Applied Microbial Biotechnology*, 97:7387-7397.
- Nicaud, J.M., (2012). *Yarrowia lipolytica*. *Yeast Primer*, 29(10):409-418.
- O'Brien-Nabors, L., (2016). *Alternative sweeteners*, New York, USA. CRC Press, 1-9.
- Ortiz, M.E., Bleckwedel, J., Raya, R., Mozzi, F., (2013). Biotechnological and in situ food production of polyols by lactic acid bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(11):4713-26.
- Park, Y.C., Oh, E.J., Jo, J.H., Jin, Y.S., Seo, J.H., (2016). Recent advances in biological production of sugar alcohols. *Current Opinion in Biotechnology*, 37:105-113.
- 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., Chevalot, I., Komaitis, M., Marc, I., Aggelis, G., (2002a). Single cell oil production by *Yarrowia lipolytica* growing on an industrial derivative of animal fat in batch cultures. Applied Microbiology and Biotechnology, 58:308-312.

Papanikolaou, S., Muniglia, L., Chevalot, I., Aggelis, G., Marc, I., (2002b). *Yarrowia lipolytica* as a potential producer of citric acid from raw glycerol. Journal of Applied Microbiology, 92:737–744.

Papanikolaou, S., Aggelis, G. (2002)., Lipid production by *Yarrowia lipolytica* growing on industrial glycerol in a single-stage continuous culture. Bioresource Technology, 82(10):43-49.

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, 32:60-71.

Papanikolaou, S., Aggelis, G., (2009). Biotechnological valorization of biodiesel derived glycerol waste through production of single cell oil and citric acid by *Yarrowia lipolytica*. Lipid Technology, 21(4):83-87.

Papanikolaou, S., Aggelis, G., (2010). *Yarrowia lipolytica*: A model microorganisms used for the production of tailor-made lipids. European Journal of Lipid Science and Technology, 112(6):639-654.

Papanikolaou, S., Aggelis, G., (2011a). Lipids of oleaginous yeasts. Part I: Biochemistry of single cell oil production. European Journal of Lipid Science and Technology, 113(8):1031-1051.

Papanikolaou, S., Aggelis, G., (2011b). Lipids of oleaginous yeasts. Part II: Technology and potential applications. European Journal of Lipid Science and Technology, 113(8):1052-1073.

Papanikolaou, S., Beopoulos, A., Koletti, A., Thevenieau, F., Koutinas, A.A., Nicaud, J. M., Aggelis, G., (2013). Importance of the methyl-citrate cycle on glycerol metabolism in the yeast *Yarrowia lipolytica*. Journal of Biotechnology, 168(4):303-314.

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., (2017a). Conversion of biodiesel-derived glycerol into biotechnological products of industrial significance by yeast and fungal strains. Engineering in Life Sciences, 17:262-281.

Papanikolaou, S., Kampsopoulou, E., Blanchard, F., Rondags, E., Gardeli, C., Koutinas, A.A., Chevalot, I., Aggelis, G., (2017b). 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*, 35:63.

Papanikolaou, S., Diamantopoulou, P., Blanchard, F., Lambrinea, E., Chevalot, I., Stoforos, N., Rondags, E., (2020). Physiological characterization of a novel wild-type *Yarrowia lipolytica* strain grown on glycerol: effects of cultivation condition and mode on polyols and citric acid production. *Applied Sciences*, 10(20):7373.

Polburee, P., Yongmanitcha, W., Honda, K., Ohashi, T., (2016). Lipid production from biodiesel-derived crude glycerol by *Rhodospiridium fluvial* DMKU-RK253 using temperature shift with high cell density. *Biochemical Engineering Journal*, 112:208–218.

Quispe, C., Coronado, C.J.R., Carvallo, J., (2013). Glycerol: production, consumption, prices, characterization and new trends in combustion. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 27:475-493.

Rakicka, M., Kieron, A., Hapeta, P., Neuvéglise, C., Lazar, Z., (2016). Sweet and sour potential of yeast from the *Yarrowia* clade. *Biomass Bioenergy*, 92:48–54.

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(2):417-423.

Rakicka, M., Biegalska, A., Rymowicz, A., Dobrowolski, A., Mirończuk, A.M., (2017). Polyol production from waste materials by genetically modified *Yarrowia lipolytica*. *Bioresource Technology*, 243:393-399.

Ratledge, C., Wynn, J., (2002). The biochemistry and molecular biology of lipid accumulation in oleaginous microorganisms. *Advances in Applied Microbiology*, 51:1-51.

Ratledge, C., (2004). Fatty acid biosynthesis in microorganisms being used for single cell oil production. *Biochimie*, 86(11):807-15.

- Regnat, K., Mach, R.L., Mach-Aiger, A.R., (2018). Erythritol as sweetener-wherefrom and where to?. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(2):587-595.
- Rice, T., Zannini, E., Arendt, E., Coffey, A., (2020). A review of polyols – biotechnological production, food applications, regulation, labeling and health effects. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 60:2034-2051.
- Rymowicz, W., Rywińska, A., Zarowska, B., (2006). Citric acid production from raw glycerol by acetate mutants of *Yarrowia lipolytica*. *Chemical Papers*, 60:391-394.
- Rymowicz, W., Rywinska, A., Gładowski, W., (2008) Simultaneous production of citric acid and erythritol from crude glycerol by *Yarrowia lipolytica* Wratislavia K1. *Chemical Paper*, 62:239–246.
- Rymowicz, W., Rywinska, A., Marcinkiewicz, M., (2009). High yield production of erythritol from raw glycerol in fed-batch cultures of *Yarrowia lipolytica*. *Biotechnology Letters*, 31:377–380.
- Rymowicz, W., Fatykhova, A.R., Kamzolova, S.V., Rywinska, A., Morgunov, I.G., (2010). Citric acid production from glycerol-containing waste of biodiesel industry by *Yarrowia lipolytica* in batch, repeated batch, and cell recycle regimes. *Applied Microbiological Biotechnology*, 7:971–979.
- Ryu, S., Trinh, C., (2018). Understanding functional roles of native pentose-specific transporters for activating dormant pentose metabolism in *Yarrowia lipolytica*. *Applied and Environmental Microbiology*, 84(3):e02146-17.
- Rywińska, A., Wojtatowicz, M., Zarowska, B., Rymowicz, W., (2008). Biosynthesis of citric acid by yeast *Yarrowia lipolytica* A-101-1.31 under repeated batch cultivation. *Electronic Journal of Polish Agricultural Universities*, 11:07.
- Rywińska, A., Rymowicz, W., Zarowska, B., Wojtatowicz, M., (2009). Biosynthesis of citric acid from glycerol by acetate mutants of *Yarrowia lipolytica* in fed-batch fermentation. *Food Technology and Biotechnology*, 47:1-6.
- Rywińska, A., Rymowicz, W., Zarowska, B., Skrzypiński, A., (2010a), Comparison of citric acid production from glycerol and glucose by different strains of *Yarrowia lipolytica*. *World Journal Microbiological Biotechnology*, 26:1217-1224.

- Rywińska, A, Rymowicz, W., Marcinkiewicz, M., (2010b). Valorization of raw glycerol for citric acid production by *Yarrowia lipolytica* yeast. *Electronic Journal Biotechnology*, 13:4.
- Rywińska, A., Rymowicz, W., (2010). High-yield production of citric acid by *Yarrowia lipolytica* on glycerol in repeated-batch bioreactors. *Journal Industrial Microbiology Biotechnology*, 37:431-435.
- Rywińska, A, Juszczak, P., Wojtatowicz, M., Rymowicz, W., (2011). Chemostat study of citric acid production from glycerol by *Yarrowia lipolytica*. *Journal Biotechnology*, 152:54-57.
- Rywińska, A., Juszczak, P., Wojtatowicz, M., Robak, M., Lazar, Z., Tomaszewska, L., Rymowicz, W., (2013). Glycerol as a promising substrate for *Yarrowia lipolytica* biotechnological applications. *Biomass and Bioenergy*, 48:148-166.
- Rzechonec, D., Day, A.M., Quinn, J., Mirończuk, A.M., (2018). Influence of yHog1 MAPK kinase on *Yarrowia lipolytica* stress response and erythritol production. *Scientific Reports*, 8:14735.
- Saha, B., Racine, F.M., (2011). Biotechnological production of mannitol and its applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 89(4):879-91.
- Sarantou, S., Stoforos, 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., 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 Life Sciences*, 17:695–709.
- Spagnuolo, M., Hussain, M.S., Gambill, L., Blenner, M., (2018). Alternative Substrate Metabolism in *Yarrowia lipolytica*. *Frontiers in Microbiology*, 9:1077.
- Song, S., Vielle, C., (2009). Recent advantages in the biological production of mannitol. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 84:55-62.
- Taccari, M., Canonico, L., Comitini, F., Mannazzu, I., (2012). Screening of yeasts for growth on crude glycerol and optimization of biomass production. *Bioresource Technology*, 110:488–495.

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.

Timoumi, A., Guillouet, S.E., Molina-Jouvre, C., Fillaudeau, L., Gorret, N., (2018). Impacts of environmental conditions on product formation and morphology of *Yarrowia lipolytica*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102:3831-3848.

Tomaszewska, L., Rywińska, A., Gladkowski, W., (2012). Production of erythritol and mannitol by *Yarrowia lipolytica* yeast in media containing glycerol. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 39(9):1333-43.

Tomaszewska, L., Rakicka, M., Rymowicz, W., Rywińska, A., (2014). A comparative study on glycerol metabolism to erythritol and citric acid in *Yarrowia lipolytica* yeast cells. *FEMS Yeast Research*, 14(6):966-976.

Turck, D., Castenmiller, J., de Henauw, S., Hirsch-Ernst, K., Kearney, J., Maciuk, A., Mangelsdorf, I., McArdle, H., Naska, A., Pelaez, C., Pentieva, K., Siani, A., Thies, F., Tsabouri, S., Vinceti, M., Cubadda, F., Engel, K., Frenzel, T., Heinonen, M., Marchelli, R., Neuhauser-Berthold, M., Poting, A., Poulsen, M., Sanz, Y., Schlatter, Y., van Loveren, H., Ackerl, R., Knutsen, H., (2019). Safety of *Yarrowia lipolytica* yeast biomass as a novel food pursuant to Regulation (EU) 2015/2283. *EFSA Journal*, 17(2):e05594.

Vasiliadou, I.A, Molina, R., Martinez, F., Melero, J.A., Stathopoulou, P.M., Tsiamis, G., (2018). Toxicity assessment of pharmaceutical compounds on mixed culture from activated sludge using respirometric technique: The role of microbial community structure. *Science of the Total Environment*, 630:809-819.

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):499-516.

Wasylenko, T., Ahn, W., Stephanopoulos, G., (2015). The oxidative pentose phosphate pathway is the primary source of NADPH for lipid overproduction from glucose in *Yarrowia lipolytica*. *Metabolic Engineering*, 30:27-39.

Wierzchowska, K., Zieniuk, B., Nowak, D., Fabiszewska, A., (2021). Phosphorus and nitrogen limitation as a part of the strategy to stimulate microbial lipid biosynthesis. *Applied Sciences*, 11:11819.

Wilson, W., Roach, P., Montero, M., Baroja-Fernández, E., Muñoz, F., Eydallin, G., Viale, A., Pozueta-Romero, J., (2011). FEMS Microbiology Reviews, 34(6):952-985.

Yalcin, S., Bozdemir, T., Ozbas, Y., (2010). Effects of different fermentation conditions on growth and citric acid production kinetics of two *Yarrowia lipolytica* strains. Chemical and Biochemical Engineering Quarterly, 24(3):347-360.

Yang, F., Hanna, M., Sun, R., (2012). Value-added uses for crude glycerol- a byproduct of biodiesel production. Biotechnology for Biofuels, 5(3):1-10.

Yang, L.B., Zhan, X. B., Zheng, Z.Y., Wu, J.R., Gao, M. J., Lin, C.C., (2014). A novel osmotic pressure control fed-batch fermentation strategy for improvement of erythritol production by *Yarrowia lipolytica* from glycerol. Bioresource Technology, 151, 120-127.

Yang, X., Jin, G., Gong, Z., Shen, H., (2014). Recycling biodiesel-derived glycerol by the oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides* Y4 through the two-stage lipid production process. Biochemical Engineering Journal, 91:86–89.

Yen, H.W., Liu, Y.X., Chang, J.S., (2015). The effects of feeding criteria on the growth of oleaginous yeast *Rhodotorula glutinis* in a pilot-scale airlift bioreactor. Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers, 49:67–71.

Zinjarde, S., (2014). Food-related applications of *Yarrowia lipolytica*. Food Chemistry, 152:1-10.

Zinoviev, S., Müller-Langer, F., Das, P., Bertero, N., Fornasiero, P., Kaltschmitt, M., Centi, G., Miertus, S., (2010). “Next-generation biofuels: survey of emerging technologies and sustainability issues. ChemSusChem, 3(10):1106–33.