



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΑΙΓΑΙΟΥ**

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΙΓΑΙΟΥ ΣΧΟΛΗ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

Δευτερογενής ορός γάλακτος και στερεό παραπροϊόν ζυθοποιίας ως
υποστρώματα για την παραγωγή αποθεματικών λιπιδίων της ελαιογόνου ζύμης
Rhodosporidium Toruloides.

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

K.M 3600

Κάντζιας Ιωάννης

Μύρινα, Λήμνος. Ιούνιος 2023

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ του φοιτητή Κάντζια Ιωάννη με τίτλο: «Δευτερογενής ορός γάλακτος και στερεό παραπροϊόν ζυθοποιίας ως υποστρώματα για την παραγωγή αποθεματικών λιπιδίων της ελαιογόνου ζύμης *Rhodosporidium Toruloides*».

Επιβλέπων καθηγητής: Σαρρής Δημήτριος, Επίκουρος Καθηγητής Π.Α.

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή:

1. Σαρρής Δημήτριος (Επιβλέπων Καθηγητής - Επίκουρος Καθηγητής, Πανεπιστήμιο Αιγαίου)
2. Ιωάννου Ζαχαρίας (Επίκουρος Καθηγητής, Πανεπιστήμιο Αιγαίου)
3. Γκατζώνης Κωνσταντίνος (Πρόεδρος τμήματος Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής, Πανεπιστήμιο Αιγαίου)

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα πτυχιακή μελέτη πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας του Τμήματος Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Πανεπιστημίου Αιγαίου.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή μου κ. Σαρρή Δημήτριο για την ευκαιρία που μου έδωσε να δουλέψω στο εργαστήριο του και για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε το διάστημα κατά τη διεξαγωγή και ολοκλήρωση της εργασίας.

Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω την υποψήφια διδάκτορα Κοθρή Μαρία για την καθοδήγησή της και όλη τη πολύτιμη βοήθεια που μου προσέφερε από την εκτέλεση των πειραμάτων έως την ολοκλήρωση της μελέτης.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τους υποψήφιους διδάκτορες Κιουρανάκη Γεώργιο, Κουκουμάκη Δανάη, Πιλαφίδη Σωτήρη καθώς και την μεταδιδακτορικός κ. Τσούκο Έρη για τη βοήθεια και τις συμβουλές τους στον εργαστηριακό χώρο. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τους συμφοιτητές μου Χατζηγεωργιάδη Γεώργιο, Γιάννακα Ιωάννη και Τακίδη Σπυρίδων για όλες τις πολύτιμες συμβουλές τους.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου καθώς και τον συμφοιτητή και φίλο μου Τσέλιο Νικόλαο για την στήριξη τους καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΗΛΗΨΗ.....	6
1. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	6
1.1. Αγροτοβιομηχανικά απόβλητα	6
1.1.1. Δευτερογενής ορός γάλακτος.....	6
1.1.2. Στερέο παραπροϊόν ζυθοποιίας.....	11
1.2. Ελαιογόνοι μικροοργανισμοί.....	15
1.2.1. Ελαιογόνοι μικροοργανισμοί.....	15
1.2.2. Βιοχημεία ελειογόνων μικροοργανισμών.....	19
1.2.3. <i>Rhododsporidium toruloides</i>	24
1.3. Σκοπός εργαστηριακής μελέτης.....	25
2. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	26
2.1. Βιολογικό υλικό	26
2.2. Θρεπτικό υλικό	27
2.3. Προκαλλιέργεια	27
2.4. Συνθήκες καλλιέργειας	27
2.5. Χημικές αναλύσεις και προσδιορισμοί.....	28
2.5.1. Ποσοτικός προσδιορισμός βιομάζας.....	28
2.5.2. Προσδιορισμός αναγόντων σακχάρων.....	28
2.5.3. Εκχύλιση του ενδοκυτταρικού ελαίου από την ξηρή βιομάζα και προσδιορισμός λιπιδίων	29
2.5.4. Προσδιορισμός αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων.....	29
3. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	30
3.1. Καλλιέργεια της ζύμης <i>Rhododsporidium toruloides</i> σε δευτερογενή ορό γάλακτος.....	30
3.1.1. Καλλιέργεια της ζύμης <i>Rhododsporidium toruloides</i> σε δευτερογενή ορό γάλακτος ..	30
3.1.2. Καλλιέργεια της ζύμης <i>Rhododsporidium toruloides</i> σε δευτερογενή ορό γάλακτος αραιωμένο κατά το ήμισυ	31
3.2. Καλλιέργεια της ζύμης <i>Rhododsporidium toruloides</i> σε προσομοίωση δευτερογενή ορού γάλακτος	33
3.2.1. Καλλιέργεια της ζύμης <i>Rhododsporidium toruloides</i> σε προσομοίωση δευτερογενή ορού γάλακτος	33
3.2.2. Καλλιέργεια της ζύμης <i>Rhododsporidium toruloides</i> σε δευτερογενή ορό γάλακτος με περιεκτικότητα σε λακτόζη 25,805 g/L.....	34
3.3. Καλλιέργεια της ζύμης <i>Rhododsporidium toruloides</i> σε στερέο παραπροϊόν ζυθοποιίας	35
3.3.1. Καλλιέργεια της ζύμης <i>Rhododsporidium toruloides</i> σε στερέο παραπροϊόν ζυθοποιίας	35

3.3.2. Καλλιέργεια της ζύμης <i>Rhododsporidium toruloides</i> σε στερεό παραπροϊόν ζυθοποιίας εμπλουτισμένο με πηγή αζώτου.....	36
4. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 ΣΥΖΗΤΗΣΗ	37
4.1. Σχολιασμός αποτελεσμάτων και σύγκριση με άλλες μελέτες.....	37
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	41

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Αγροτοβιομηχανικά απόβλητα όπως το στερεό παραπροϊόν ζυθοποιίας και ο δευτερογενής ορός γάλακτος προκύπτουν συνεχώς ως παραπροϊόντα από μικρές και μεγάλες βιομηχανίες και διατίθενται με μικρό ή μηδενικό κόστος. Σκοπός της συγκεκριμένης μελέτης ήταν η αξιοποίηση των συγκεκριμένων αποβλήτων για βιοτεχνολογικές διεργασίες καθώς μπορούν να αποτελέσουν ικανά υποστρώματα για μικροβιακές ζυμώσεις. Πιο συγκεκριμένα εξετάστηκε η ικανότητα του *Rhodosporidium toruloides* ως προς την ανάπτυξη, την παραγωγή βιομάζας και τη συσσώρευση λιπιδίων όταν αυτό αναπτύσσεται σε υποστρώματα με τα συγκεκριμένα παραπροϊόντα ως πηγή άνθρακα. Το *R. toruloides* έχει δείξει ικανότητα να παράγει ένα ευρύ φάσμα λιπαρών οξέων και μπορεί να συσσωρεύει λιπίδια σε ποσοστό περισσότερο από το 70% του ξηρού κυτταρικού τους βάρους. Τα μονοκυτταρικά έλαια (SCO) προσελκύουν μεγάλη προσοχή τα τελευταία χρόνια λόγω της προοπτικής τους ως λειτουργικά προϊόντα και πρώτες ύλες για την παραγωγή βιοντίζελ.

Όταν ο μικροοργανισμός καλλιεργήθηκε σε θρεπτικό SCW η μέγιστη παραγωγή βιομάζας έφτασε τα 4,40 g/L. Μέγιστη συσσώρευση λιπιδίων παρατηρήθηκε στο θρεπτικό με SCW αραιωμένο κατά το ήμισυ, όπου παρατηρήθηκε συσσώρευση λιπιδίων με ποσοστό 15,09% w/w επί της ξηρής βιομάζας. Όταν το *R. toruloides* καλλιεργήθηκε σε θρεπτικό με ακατέργαστο BSG ως μοναδική πηγή άνθρακα παρατηρήθηκε μέγιστη παραγωγή βιομάζας 8,22 g/L και μέγιστη συσσώρευση λιπιδίων σε ποσοστό 8.93 % w/w επί της ξηρής βιομάζας. Όταν ο μικροοργανισμός καλλιεργήθηκε στο ίδιο υπόστρωμα εμπλουτισμένο με yeast extract 0,68 g/L και peptone 0,34 g/L, τα αποτελέσματα έδειξαν αυξημένη κατανάλωση σακχάρων και συσσώρευση λιπιδίων. Παρατηρήθηκε μέγιστη παραγωγή βιομάζας 8,51g/L και μέγιστη συσσώρευση λιπιδίων σε ποσοστό 34,35 % w/w επί της ξηρής βιομάζας.

Παρατηρήθηκε, επίσης, η ανάπτυξη άσχημης οσμής στις καλλιέργειες σε υποστρώματα που αποτελούνταν από υποπροϊόν, σε SCW και σε BSG.

Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης μελέτης έδειξαν πως το συγκεκριμένο στέλεχος του *R. toruloides* δεν κατάφερε να αναπτυχθεί και να συσσωρεύσει ικανοποιητικό ποσοστό λιπιδίων σε κανένα από τα υποστρώματα που περιείχαν λακτόζη ως πηγή άνθρακα. Στις περιπτώσεις που ο μικροοργανισμός καλλιεργήθηκε σε υποστρώματα με BSG ως πηγή άνθρακα εμπλουτισμένο με yeast extract και peptone τα αποτελέσματα, αν και ήταν καλύτερα σε σύγκριση με το SCW, δεν είχαν την προσδοκώμενη επιτυχία. Και τέλος, από την ύπαρξη της άσχημης οσμής υποθέτουμε ότι το συγκεκριμένο στέλεχος πιθανότατα μπορεί να καταβολίζει αμινοξέα στα υποστρώματα με υποπροϊόν, με τελικό παράγωγο την 3-μεθυλ-ινδόλη, ένωση με δυσάρεστη οσμή.

1. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1.Αγροτοβιομηχανικά απόβλητα

1.1.1. Δευτερογενής ορός γάλακτος

Ο δευτερογενής ορός γάλακτος (second cheese whey) (SCO) είναι υποπροϊόν της διαδικασίας παραγωγής τυριού. Η παραγωγή του λαμβάνει χώρα κατά τη διαδικασία τυροκομίας, η οποία περιλαμβάνει τον διαχωρισμό του τυροπήγματος και του ορού γάλακτος.

Το πρώτο βήμα στην τυροκομία είναι η προσθήκη ενός πηκτικού παράγοντα όπως πυτιάς ή ενός οξέος στο γάλα. Αυτό αναγκάζει τις πρωτεΐνες του γάλακτος (καζεΐνη) να πήξουν και να σχηματίσουν το τυρόπηγμα. Στη συνέχεια, το τυρόπηγμα κόβεται σε μικρά κομμάτια και ανακατεύεται για να απελευθερωθεί περισσότερος ορός γάλακτος. Η απόδοση του τυριού είναι περίπου 10%, με το υπόλοιπο 90% να είναι υγρό υποπροϊόν «ορός γάλακτος» (cheese whey). Το τυρόπηγμα και ο ορός γάλακτος στη συνέχεια διαχωρίζονται χρησιμοποιώντας μηχανική μέθοδο ή μέθοδο που βασίζεται στη βαρύτητα. Ο ορός γάλακτος στραγγίζεται και συλλέγεται, αφήνοντας πίσω το τυρόπηγμα. Ο ορός γάλακτος που συλλέγεται ονομάζεται πρωτογενής ορός γάλακτος και περιέχει την πλειοψηφία της πρωτεΐνης και του λίπους από το γάλα. Σύμφωνα με την απόφαση 97/80/EK: «ορός γάλακτος είναι ένα υποπροϊόν που λαμβάνεται κατά την παραγωγή του τυριού ή της καζεΐνης». Στην υγρή φάση, ο ορός γάλακτος περιέχει φυσικά συστατικά (κατά μέσο όρο 4,8% λακτόζη, 0,8% πρωτεΐνη και 0,2% λιπαρά w/w), τα οποία παραμένουν όταν η καζεΐνη και το μεγαλύτερο μέρος του λίπους έχουν αφαιρεθεί από το γάλα (Valta *et al.*, 2017). Ο ορός γάλακτος είναι ένα υγρό απόβλητο με πρασινοκίτρινο χρώμα λόγω της παρουσίας ριβοφλαβίνης (βιταμίνη B2) και μπορεί να θεωρηθεί ως γάλα χωρίς καζεΐνη και λίπος (Prazeres *et al.*, 2012). Χωρίζεται σε όξινο ορός γάλακτος και σε γλυκός ορός γάλακτος. Ο όξινο ορός γάλακτος έχει τιμή pH περίπου 4,5–5,8 και λαμβάνεται μετά από ζύμωση λακτοβάκιλλων ή προσθήκη γαλακτικού οξέος ή ανόργανων οξέων. Η περιεκτικότητα του σε λακτόζη είναι γενικά χαμηλότερη σε σχέση με το γλυκό ορό γάλακτος, αλλά η περιεκτικότητά του σε ανόργανα άλατα συνήθως υπερβαίνει αυτή του γλυκού ορού. Ο γλυκός ορός γάλακτος έχει τιμή pH= 6–7 και λαμβάνεται με προσθήκη πρωτεολυτικών ενζύμων (πυτιά). Περιέχει 6–10 g L⁻¹ πρωτεΐνη, 5–6 g L⁻¹ λίπος, 46–52 g L⁻¹ λακτόζη και 2,5–4 g L⁻¹ μέταλλα (Carvalho *et al.*, 2013. Pires *et al.*, 2021. Yadav *et al.*, 2015). Η σύσταση του εξαρτάται σημαντικά από τον τύπο του γάλακτος (αγελαδινό, πρόβιο, κατσικίσιο) που χρησιμοποιείται για την παραγωγή του τυριού, τη φυλή των ζώων, την εποχή του έτους, το είδος της τροφής, το στάδιο της γαλακτοπαραγωγής και την ποιότητα της επεξεργασίας (Mollea *et al.*, 2013, Prazeres *et al.*, 2012). Σε γενικές γραμμές στο CW περιέχονται ολικά αιωρούμενα στερεά στο εύρος τιμών 1,3–22,0 g L⁻¹, έχει υψηλή αλατότητα ως συνέπεια της προσθήκη NaCl κατά την παραγωγή τυριού. Άλλα δευτερεύοντα συστατικά όπως κιτρικό και γαλακτικό οξύ, μη πρωτεϊνικές ενώσεις αζώτου (ουρία και ουρικό οξύ), και βιταμίνες (ομάδα B). Τα κύρια μεταλλικά συστατικά είναι NaCl, KCl και άλατα ασβεστίου. Η λακτόζη είναι η κύρια υπεύθυνη για το υψηλό οργανικό φορτίο του αποβλήτου. Η βιοχημική απαίτηση οξυγόνου (BOD) είναι 27–60 g L⁻¹ και η χημική απαίτηση οξυγόνου (COD) είναι 50–102 g L⁻¹ (Asunis *et al.*, 2020. Kumar Awasthi *et al.*, 2022). Η αναλογία BOD/COD είναι συνήθως πάνω από 0,5 γεγονός που το

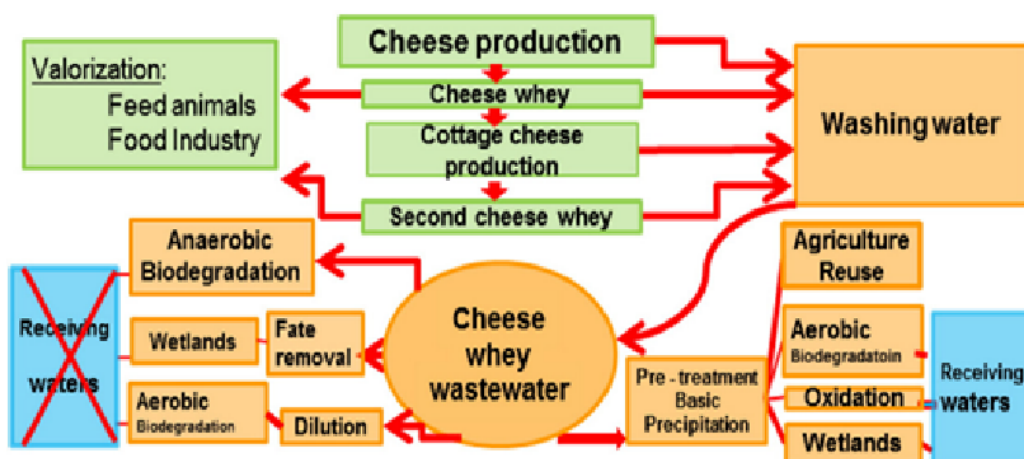
καθιστά υπόστρωμα εύκολα βιοαποδομήσιμο με αναερόβια ή αερόβια χώνεψη ωστόσο η υψηλή περιεκτικότητα σε νάτριο του CW μπορεί προκαλέσει προβλήματα κατά τη λειτουργία των βιολογικών χωνευτών (Carvalho *et al.*, 2013. Prazeres *et al.*, 2012. Yadav *et al.*, 2015). Τα κύρια συστατικά μεταξύ των πρωτεϊνών του CW είναι η β-λακτοσφαιρίνη (β-LG), η α-λακταλβουμίνη (αLA), η αλβουμίνη ορού βοοειδών (BSA) και η ανοσοσφαιρίνη (IG) όπου συντίθενται από επιθηλιακά κύτταρα στον μαστικό αδένα εκτός από τις BSA και IG (Prazeres *et al.*, 2012). Στο CW συναντάμε επίσης δευτερεύουσες πρωτεΐνες, που ονομάζονται πρωτεΐνες χαμηλής αφθονίας, όπως η λακτοφερρίνη (LF), η λακ-τοπεροξειδάση (LP), η πεπτόνη πρωτεόζης (PP), η οστεοποντίνη (OPN) και η λισοζύμη (LZ) (Mollea *et al.*, 2013. Yadav *et al.*, 2015)

Ο ορός γάλακτος (CW) αρχικά θεωρήθηκε ως λύμα που προκύπτει από την επεξεργασία τυριού και απορρίπτονταν κυρίως μαζί με τα λύματα που παράγονται από το πλύσιμο του εξοπλισμού και των δαπέδων των τυροκομικών μονάδων (cheese whey wastewater). Ωστόσο λόγω του υψηλού οργανικού φορτίου του το CW προκαλεί σοβαρά περιβαλλοντικά προβλήματα και η απόρριψη του στο περιβάλλον κρίθηκε ακατάλληλη καθώς επηρεάζει τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του εδάφους με αποτέλεσμα να μειώνονται οι αποδόσεις των καλλιεργειών ενώ όταν απορρίπτεται σε πηγές νερού, μειώνει το διαλυμένο οξυγόνο, και αποτελεί σημαντικό κίνδυνο για την υδρόβια ζωή και την ανθρώπινη υγεία (Prazeres *et al.*, 2012. Yadav *et al.*, 2015). Οι μικρές και μεσαίες εταιρείες γαλακτοκομικών προϊόντων δεν διαθέτουν τον εξοπλισμό και τη δομή για την επεξεργασία του πρωτογενούς και του δευτερογενούς ορού γάλακτος. Σε αυτές τις περιπτώσεις, γενικά, χρησιμοποιούνται για ζωοτροφές ή απορρίπτονται χωρίς κατάλληλη μεταποίηση (Pires *et al.*, 2021). Η γαλακτοκομική βιομηχανία είναι μια από τις κύριες πηγές βιομηχανικών αποβλήτων στην Ευρώπη. Αυτή η βιομηχανία βασίζεται στη μεταποίηση και παρασκευή νωπού γάλακτος σε προϊόντα όπως γιαούρτι, παγωτό, βούτυρο, τυρί και διάφορα είδη γλυκών από διάφορες διεργασίες, όπως η παστερίωση, η πήξη, η διήθηση, η φυγοκέντρωση, η ψύξη κλπ. (Asunís *et al.*, 2020. Carvalho *et al.*, 2013). Περίπου το 50% της παγκόσμιας παραγωγής τυριού-ορού γάλακτος υφίσταται επεξεργασία και μετατρέπεται σε διάφορα τρόφιμα και προϊόντα ζωοτροφών (Mollea *et al.*, 2013).

Πρόσφατες προσπάθειες για αξιοποίηση του ορού γάλακτος έχουν δείξει ότι μπορεί να έχει πολλές εφαρμογές όπως πρόσθετο σε ζωοτροφές, παραγωγή πρωτεϊνών, παραγωγή βιοηλεκτρισμού μέσω της τεχνολογίας MFCs (Microbial fuel cells), παραγωγή βιοντίζελ, αιθανόλης, οργανικό λίπασμα και αυτούσιος ως λειτουργικό συστατικό στα τρόφιμα, φαρμακευτικές εφαρμογές και ως θρεπτικό συστατικό σε διαιτητικές και υγιεινές τροφές

(Kumar Awasthi *et al.*, 2022). Μπορεί να λειτουργήσει ως υπόστρωμα για παραγωγή προϊόντων προστιθέμενης αξίας μέσω ζύμωσης από μικροοργανισμούς όπως: οργανικά οξέα (π.χ. γαλακτικό, ηλεκτρικό και προπιονικό), έλαια (Single Cell Oil-SCO), βιοπολυμερή (ένζυμα, πολυυδροξυαλκανοϊκά, εξωπολυσακχαρίτες), βακτηριοσίνη και μονοκυτταρική πρωτεΐνη (SCP) από βακτήρια, ζύμες, μύκητες και μικροφύκη (Mollea *et al.*, 2013. Yadav *et al.*, 2015). Επίσης ο ορός γάλακτος μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή λευκού τυριού όπου και προκύπτει ως παραπροϊόν ο δευτερογενής ορός γάλακτος (SCW) (Valta *et al.*, 2017).

Η διαδικασία παραγωγής σε μια βιομηχανία τυριού φαίνονται στην **εικόνα 1**.



Εικόνα 1

Επισκόπηση της παραγωγής των αποβλήτων της τυροκομίας. Κύριες μορφές αξιοποίησης. Περιήληψη των υφιστάμενων συστημάτων επεξεργασίας και μελλοντικές λύσεις. *Valorization*: διατίμηση, *feed animals*: σίτιση ζώων, *food industry*: βιομηχανία τροφίμων, *cheese production*: παραγωγή τυριού, *cheese whey*: ορός τυρογάλακτος, *cottage cheese production*: παραγωγή τυριού κότατζ, *second cheese whey*: δευτερογενής ορός τυρογάλακτος, *washing water*: νερό πλυσίματος, *cheese whey wastewater*: λύματα ορού τυρογάλακτος, *anaerobic biodegradation*: αναερόβια βιοαποικοδόμηση, *fate removal*: αφαίρεση λιπαρών, *dilution*: διαλυτοποίηση, *wetlands*: υγρότοπος, *aerobic biodegradation*: αερόβια βιοαποικοδόμηση, *pre-treatment basic precipitation*: βασική κατακρήμνιση προεπεξεργασίας, *agriculture reuse*: γεωργική επαναχρησιμοποίηση, *oxidation*: οξείδωση, *receiving waters*: παραλαβή υδάτων.

Ο δευτερογενής ορός γάλακτος (SCW) προκύπτει ως παραπροϊόν κατά την παραγωγή λευκού τυριού όπως τύπου “cottage” από πρωτογενή ορό γάλακτος (CW). Η απόδοση τυριού ορού γάλακτος ποικίλλει αρκετά ανάλογα με την προέλευση του ορού γάλακτος και τη διαδικασία που ακολουθείται. Το υγρό που απομένει μετά τον διαχωρισμό του τυριού από ορό γάλακτος αντιπροσωπεύει περισσότερο από το 90% του αρχικού ορού γάλακτος και ονομάζεται δευτερογενής ορός γάλακτος (SCW) (Carvalho *et al.*, 2013. Pires *et al.*, 2021). Η παραγωγή τυριού από CW επιτυγχάνεται με θερμική επεξεργασία του ορού γάλακτος σε θερμοκρασίες περίπου 85–90 °C για 20–30 λεπτά με στόχο τη μετουσίωση των πρωτεϊνών ορού γάλακτος. Η παραγωγή τυριού από CW γίνεται κυρίως στην Ισπανία, την Πορτογαλία, την Ελλάδα, την Τουρκία, την Ρουμανία και την Ιταλία όπου το SCW που προκύπτει χρησιμοποιείται συνήθως για ζωοτροφές ή αντιμετωπίζεται ως απόβλητο (Pires *et al.*, 2021). Ωστόσο το συγκεκριμένο υποπροϊόν αποτελεί πηγή σημαντικών ενώσεων όπως πρωτεΐνες

(κυρίως σε μετουσιωμένη κατάσταση), διαλυτά πεπτίδια, ολιγοσακχαρίτες, λακτόζη, μη πρωτεϊνικό άζωτο, υδροδιαλυτές βιταμίνες, μια ποικιλία από μέταλλα και ελεύθερα αμινοξέα, γεγονός που το καθιστά καλό υπόστρωμα για βιοτεχνολογικές διεργασίες με σκοπό την παραγωγή ενώσεων υψηλής εμπορικής αξίας (Pires *et al.*, 2021).

Ομοίως με το CW, είναι εξαιρετικά ρυπογόνο απόβλητο με αρνητικές επιπτώσεις στο υδάτινο περιβάλλον. Το SCW περιέχει περίπου το 50-60% της περιεκτικότητας σε ξηρά ουσία του αρχικού CW όπου η λακτόζη και τα μέταλλα αντιπροσωπεύουν το μεγαλύτερο μέρος της, αλλά υπάρχουν επίσης υπολείμματα λιπών και μη θερμικά κατακρημνισμένα συστατικά αζώτου. Το SCW έχει όξινα χαρακτηριστικά με τιμές pH εντός του εύρους 3-6 και περιέχει κυρίως ποσότητες πρωτεΐνης, αζώτου, αζώτου αμμωνίου, φωσφόρου, λίπη, ολικά αιωρούμενα στερεά, αλάτων (η υψηλή αλατότητα προέρχεται από τη δεύτερη προσθήκη αλάτων όπως το χλωριούχο ασβέστιο για την παραγωγή τυριού cottage) και λακτόζης. Οι τιμές του COD κυμαίνονται 60-80 g L⁻¹ και του BOD ≈30 g L⁻¹ (Carvalho *et al.*, 2013. Pires *et al.*, 2021). Βέβαια οι περιεκτικότητες σε ουσίες ομοίως με την απόδοση διαφέρουν ανάλογα με την προέλευση του ορού γάλακτος και τη διαδικασία που ακολουθείται για την παραγωγή τυριού. Το SCW που λαμβάνεται από πρόβιο ορό γάλακτος γενικά χαρακτηρίζεται από υψηλότερη περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη και περιέχει περίπου 0,49% πρωτεΐνες, 0,53% λίπος και 2,08% μέταλλα (Η περιεκτικότητα σε ανόργανα άλατα του προβάτου SCW είναι αρκετά υψηλή λόγω της προσθήκης αλατιού στο γάλα κατά την τυροκομία) (Pires *et al.*, 2021).

Το SCW αποτελεί πηγή σημαντικών ενώσεων όπως πρωτεΐνες (κυρίως σε μετουσιωμένη κατάσταση), διαλυτά πεπτίδια, ολιγοσακχαρίτες, λακτόζη, μη πρωτεϊνικό άζωτο, υδροδιαλυτές βιταμίνες, μια ποικιλία από μέταλλα και ελεύθερα αμινοξέα, γεγονός που το καθιστά καλό υπόστρωμα για βιοτεχνολογικές διεργασίες με σκοπό την παραγωγή ενώσεων υψηλής εμπορικής αξίας όπως SCO (Pires *et al.*, 2021). SCO παράγεται κυρίως από μύκητες, ζύμες, βακτήρια και μικροφύκη. Οι μικροοργανισμοί που θα μπορούσαν να αναπτυχθούν σε ένα υποπροϊόν όπως το δεύτερο SCW που περιέχει ως επί το πλείστον λακτόζη ως πηγή άνθρακα, προϋποθέτει την ικανότητά τους να υδρολύουν το δισακχαρίτη σε γλυκόζη και γαλακτόζη και στη συνέχεια τον καταβολισμό των απελευθερωμένων μονοσακχαριτών. Ελαιογόνοι μύκητες που είναι σε θέση να παράγουν SCO με υπόστρωμα SCW είναι κάποια στελέχη που ανήκουν στο είδος *Cryptococcus curvatus*, στο γένος *Yarrowia*, στο *Debaryomyces*, στο *Wickerhamomyces* και στο *Cystobasidium*. Τα κυτταρικά λιπίδια που παράγονται περιέχουν λιπαρά οξέα και αποτελούν τέλειους υποψήφιους για τη σύνθεση βιοντίζελ δεύτερης γενιάς, ελαιοχημικών και λιπαντικών (Vasilakis *et al.*, 2022). Άλλοι μικροοργανισμοί που παράγουν ικανοποιητική ποσότητα βιομάζας και λιπιδίων στο

συγκεκριμένο υπόστρωμα ανήκουν σε ζύμες του είδους *Rhodotorula glutinis* και του γένους *Cryptococcus*, όπως το *C. curvatus* και το *C. Laurentii*, αλλά και στο βακτήριο *Tepidibacillus fermentans*. Ωστόσο σε γενικές γραμμές τα υποστρώματα SCW, συχνά δεν επαρκούν για να υποστηρίξουν την ανάπτυξη μυκήτων, καθώς η μεγάλη πλειονότητα του άνθρακα σε αυτό το υποπροϊόν είναι λακτόζη, η αφομοίωση της οποίας δεν είναι ευρέως διαδεδομένη μεταξύ των μυκήτων. Λύση σε αυτό το πρόβλημα θα μπορούσε να είναι η προεπεξεργασία του SCW είτε με όξινη υδρόλυση και επακόλουθη διόρθωση του pH ή ενζυματική υδρόλυση με β-γαλακτοσιδάση. (Carota *et al.*, 2017).

1.1.2. Στερεό παραπροϊόν ζυθοποιίας

Η μύρα είναι το πέμπτο σε κατανάλωση ποτό στον κόσμο μετά από το τσάι, τα ανθρακικά, το γάλα και τον καφέ (Aliyu & Bala, 2011). Το στερεό παραπροϊόν ζυθοποιίας «Brewer's spent grains» (BSG) είναι το κύριο υποπροϊόν της βιομηχανίας ζυθοποιίας και αντιπροσωπεύει περίπου το 85% των συνολικών παραγόμενων παραπροϊόντων. Σαν κύρια πρώτη ύλη είναι το κριθάρι (Aliyu & Bala, 2011, Tang *et al.*, 2009). Το κριθάρι είναι το πιο σημαντικό δημητριακό στον κόσμο μετά το σιτάρι, το καλαμπόκι και το ρύζι. Χρησιμοποιείται κυρίως ως ζωοτροφή ή ως πρώτη ύλη για την παραγωγή μύρας. Ο σπόρος κριθαριού είναι πλούσιο σε άμυλο και πρωτεΐνες. Αποτελείται από τρία κύρια μέρη: το φύτρο (έμβρυο), το ενδοσπέρμιο (που περιλαμβάνει την αλευρόνη και το αμυλούχο ενδοσπέρμιο) και τα καλύμματα κόκκων. Το τελευταίο μπορεί να χωριστεί σε τρία κλάσματα: το περίβλημα του σπόρου, τα εσωτερικά στρώματα που περιβάλλουν την αλευρόνη και τα στρώματα του περικαρπίου που καλύπτουν το περίβλημα του σπόρου τα οποία με τη σειρά τους καλύπτονται από το φλοιό. Το περικάρπιο είναι κέρινο και αδιάβροχο, το περίβλημα των σπόρων λειτουργεί ως ημιδιαπερατή μεμβράνη. Η διεπαφή περικαρπίου-σπόρου ορίζει αποτελεσματικά το εξωτερικό και το εσωτερικό του πυρήνα. Ο φλοιός παρέχει εξωτερική προστασία στους κόκκους, και είναι πολυστρωματικός, νεκρός ιστός που αποτελείται κυρίως από λιγνοκυτταρινικά κυτταρικά τοιχώματα, αλλά περιέχει επίσης μικρές ποσότητες από πρωτεΐνες, ρητίνες και τανίνες (Lynch *et al.*, 2016). Μετά από μια περίοδο ανάπαυσης των κόκκων, το κριθάρι βύνεται σε μια ελεγχόμενη διαδικασία βλάστησης, που χρησιμεύει στην αύξηση της ενζυμικής περιεκτικότητας του κόκκου. Η βυνοποίηση πραγματοποιείται σε τρία στάδια: (1) εμβάπτιση, (2) βλάστηση και (3) ξήρανση ή ψήσιμο. Στο πρώτο στάδιο τοποθετούνται οι καθαρισμένοι κόκκοι κριθαριού σε δεξαμενές νερού μεταξύ 5 και 18 °C για

περίπου 2 ημέρες. Το στάδιο της βλάστησης προάγει τη σύνθεση και ενεργοποίηση ενζύμων όπως αμυλάσες, πρωτεάσες, β-γλυκανάσες και άλλα, στην αλευρόνη και το ενδοσπερμιακό άμυλο. Η δράση αυτών των ενζύμων τροποποιεί την δομή του αμυλώδους ενδοσπερμίου. Τέλος κατά την ξήρανση το βυνοποιημένο κριθάρι ξηραίνεται (ψήνεται) στους 40–60 °C σε υγρασία 4–5%. Στο ζυθοποιείο το βυνοποιημένο κριθάρι αλέθεται και αναμιγνύεται με νερό. Παράλληλα η θερμοκρασία αυξάνεται σταδιακά από 37 έως 78 °C. Κατά αυτό τον τρόπο προωθείται η ενζυματική υδρόλυση των συστατικών της βύνης όπως άμυλο, πρωτεΐνες, β-γλυκάνες και αραβινοξυλάνες, και η διαλυτοποίηση των προϊόντων διάσπασής τους. Στη διάρκεια αυτής της διαδικασίας, το άμυλο μετατρέπεται σε ζυμώσιμα σάκχαρα, κυρίως μαλτόζη και μαλτοτριόζη και μη ζυμώσιμα σάκχαρα όπως δεξτρίνες. Οι πρωτεΐνες αποικοδομούνται μερικώς σε πολυπεπίδια και αμινοξέα. Αυτή η ενζυματική μετατροπή έχει τελικό αποτέλεσμα ένα γλυκό υγρό γνωστό ως ζυθογλεύκος. Ο ζυθογλεύκος φιλτράρεται και στη συνέχεια χρησιμοποιείται ως μέσο ζύμωσης για την παραγωγή μύρας (ζύμωση για παραγωγή αιθανόλης). Το στερεό υπόλειμμα που προκύπτει από την φίλτρανση είναι το BSG (Mussatto, 2014).

Ανάλογα τον τύπο μύρας που παρασκευάζεται, το BSG μπορεί να αποτελείται από υπολείμματα βυνοποιημένου κριθαριού ή από βυνοποιημένο κριθάρι και πρόσθετα όπως σιτάρι, ρύζι ή καλαμπόκι που προστίθεται κατά την πολτοποίηση. Το BSG αποτελείται από το κέλυφος και το περικάρπιο που βρίσκονται σε στρώσεις στο φλοιό και καλύπτουν τον κόκκο του κριθαριού. Τα κύρια συστατικά του BSG βρίσκονται στα τοιχώματα του κελύφους, του φλοιού, του περικαρπίου και του σπόρου, που είναι πλούσια σε κυτταρίνη, μη κυτταρινικούς πολυσακχαρίτες, λιγνίνη και μπορεί να περιέχει πρωτεΐνη και λιπίδια. Ο φλοιός περιέχει επίσης σημαντικές ποσότητες πυριτίου και μεγάλο μέρος του πολυφαινολικά συστατικά (το 25% των μετάλλων που υπάρχουν στο κριθάρι υπάρχουν ως πυριτικά) (Lynch *et al.*, 2016, Mussatto *et al.*, 2006). Η χημική σύνθεση του BSG ποικίλλει ανάλογα με την ποικιλία του κριθαριού, το χρόνο συγκομιδής, τις συνθήκες βυνοποίησης και πολτοποίησης και την ποιότητα και τον τύπο των πρόσθετων που προστίθενται στη διαδικασία παρασκευής. Το BSG από ζυθοποιίες lager έχει υψηλότερη περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες αλλά μικρότερη περιεκτικότητα σε άμυλο σε σχέση με το BSG από ζυθοποιίες ale (Robertson *et al.*, 2010). Το BSG είναι ένα λιγνοκυτταρινικό (lignocellulosic) υλικό που περιέχει περίπου 17% κυτταρίνη, 28% μη κυτταρινικούς πολυσακχαρίτες, κυρίως αραβινοξυλάνες (arabinoxylans) και 28% λιγνίνη. Η ημικυτταρίνη, που αποτελείται κυρίως από αραβινοξυλάνη, είναι το κύριο συστατικό του BSG και μπορεί να βρίσκεται σε ποσοστό έως και 40% του ξηρού του βάρους. Σε μεγάλες ποσότητες υπάρχουν μονοσακχαρίτες όπως η ξυλόζη, η μαλτόζη και η μαλτοτριόζη, η γλυκόζη

και η αραβινόζη, ενώ ενδέχεται να υπάρχουν και ίχνη ραμινόζης και γαλακτόζης (Aliyu & Bala, 2011). Τα σάκχαρα αντιστοιχούν σε περίπου το ήμισυ της σύνθεσης BSG σε ξηρό βάρος (Mussatto, 2014). Ένα άλλο σημαντικό συστατικό του BSG είναι η λιγνίνη, που αντιπροσωπεύει περίπου 10-28% του συνολικού ξηρού βάρους. Όσο αφορά την περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη του BSG ποικίλλει αρκετά αλλά συνήθως υπάρχει σε επίπεδα ~20% του ξηρού του βάρους. Σε αφθονία υπάρχουν ορδεΐνες, γλουτίνες, σφαιρίνες και αλβουμίνες. Τα απαραίτητα αμινοξέα αντιπροσωπεύουν το ~30% της συνολικής περιεκτικότητας σε πρωτεΐνη, με τη λυσίνη να είναι σε μεγαλύτερη ποσότητα (Mussatto, 2014). Το BSG περιέχει βιταμίνες και μια ποικιλία μετάλλων μεταξύ των οποίων είναι σε μεγαλύτερες ποσότητες το πυρίτιο, ο φώσφορος, το ασβέστιο και το μαγνήσιο, ενώ σε μικρότερες ποσότητες περιέχει κοβάλτιο, χαλκό, σίδηρο, μαγγάνιο, φώσφορο, κάλιο, σελήνιο, νάτριο και θείο, όλα σε χαμηλές συγκεντρώσεις (Aliyu & Bala, 2011. Lynch *et al.*, 2016).

Το BSG διατίθεται σε μεγάλες ποσότητες καθ' όλη τη διάρκεια του έτους, αλλά η κύρια εφαρμογή του έχει περιοριστεί στη διατροφή των ζώων. Ωστόσο, λόγω της υψηλής περιεκτικότητάς του σε φυτικές ίνες (30–50% w/w) και πρωτεΐνη (19–30% w/w) μπορεί να χρησιμεύσει ως ελκυστικό συμπλήρωμα στην ανθρώπινη διατροφή (Lynch *et al.*, 2016. Mussatto, 2014). Μία άλλη πιθανή εφαρμογή μπορεί να είναι η ανάκτηση πρωτεϊνών από BSG μέσω υπερδιήθησης (Tang *et al.*, 2009). Το 31% του αρχικού βάρους βύνης, αντιπροσωπεύει περίπου 20 kg ανά 100 λίτρα παραγόμενης μύρας. Το BSG διατίθεται με χαμηλό ή χωρίς κόστος και παράγεται σε μεγάλες ποσότητες από μεγάλες και μικρές ζυθοποιίες (Lynch *et al.*, 2016. Mussatto *et al.*, 2006). Η υψηλή περιεκτικότητα σε υγρασία του BSG το καθιστά ιδιαίτερα ευαίσθητο σε μικροβιακή ανάπτυξη και επακόλουθη αλλοίωση. Η μικροχλωρίδα του φρέσκου BSG αποτελείται κυρίως από σπόρια αερόβιων θερμοφίλων βακτηρίων ανάλογα με τη πηγή του BSG (Robertson *et al.*, 2010). Το BSG μπορεί να διατηρηθεί περισσότερο και να αυξηθεί ο χρόνος ζωής του μέσω ξήρανσης (αφαίρεση της υγρασίας). Η ξήρανση ως μέθοδος συντήρησης έχει το πλεονέκτημα ότι μειώνει τον όγκο του προϊόντος με αποτέλεσμα να μειώνονται τα έξοδα μεταφοράς και αποθήκευσης (Aliyu & Bala, 2011). Ωστόσο η έρευνα των Buffington (2014) δείχνει πως η μεταφορά και διανομή του BSG δεν είναι οικονομικά βιώσιμη για τις βιομηχανίες λόγω του υψηλού συντελεστή υγρασίας και τη μείωση των σακχάρων.

Έχουν γίνει προσπάθειες να χρησιμοποιηθεί το BSG σε βιοτεχνολογικές διεργασίες. Η αυξημένη περιεκτικότητα σε υγρασία, η παρουσία πρωτεϊνών και σακχάρων, αλλά και ορισμένες φυσικές ιδιότητες αυτού του υλικού όπως το μέγεθος σωματιδίων, το βάρος όγκου, η πυκνότητα, η πορώδης επιφάνεια και η ικανότητα συγκράτησης νερού ευνοούν την ανάπτυξη μυκήτων, μικροφυκών και βακτηρίων. Το BSG συνεπώς αποτελεί καλό υπόστρωμα για

παραγωγή χρήσιμων ενώσεων εμπορικής αξίας όπως φερουλικό και π-κουμαρικό οξύ, ξυλόζη, αραβινόζη, κυτταρινάσες, ημικυτταρινάσες, αμυλάσες, πρωτεάσες, ξυλιτόλη, αραβιτόλη, βιοαιθανόλη (βιοαέριο), βιομάζα μικροοργανισμών, ένζυμα και άλλα (Casas-Godoy *et al.*, 2023. Aliyu & Bala, 2011. Ezeonu *et al.*, 1996. Mussatto, 2014. Xiros & Christakopoulos, 2012).

Τα κυριότερα είδη μυκήτων που έχουν αναφερθεί ότι αναπτύσσονται σε προϊόντα λιγνοκυτταρινικής βιομάζας (LCB) και παράγουν λιπίδια είναι το, *Yarrowia lipolytica*, το *Lipomyces starkeyi*, το *Rhodotorula glutinis* και το *Rhododsporidium toruloides* (Kumar *et al.*, 2019). Ωστόσο γενικά πολλά στελέχη μυκήτων και ζύμης έχουν μελετηθεί ως προς την ικανότητα τους να παράγουν σημαντικές ενώσεις με BSG ως πηγή άνθρακα. Τα είδη ζύμης *Candida guilliermondii* και *Debaryomyces hansenii* έχουν μελετηθεί ως προς την ικανότητα τους να παράγουν ξυλιτόλη σε υπόστρωμα BSG (Carvalho *et al.*, 2005. Mussato *et al.*, 2005. Mussatto & Roberto, 2005. Mussatto & Roberto, 2008). Το είδος μύκητα *Aspergillus oryzae* έχει την ικανότητα να παράγει α-αμυλάση μέσω ζύμωσης στερεάς κατάστασης (solid state fermentation- SSF) σε υπόστρωμα BSG (Bogar *et al.*, 2002. Francis *et al.*, 2002. Xu *et al.*, 2008). Ο μύκητας *Trichoderma reesei* μπορεί να παράγει κυτταρινάσες καταναλώνοντας BSG χωρίς προεπεξεργασία (Sire & Oh, 1990). Πολλοί μύκητες έχουν την ικανότητα να παράγουν αιθανόλη μέσω ζύμωσης του BSG όπως ο ασκομύκητας *Fusarium oxysporum* και ο μύκητας *Neurospora crassa* σε συνθήκες SSF (Xiros *et al.*, 2008a. 2008b). Όσο αφορά τα βακτήρια έχει αποδειχθεί πως μπορούν να παράγουν χρήσιμες ενώσεις χρησιμοποιώντας BSG ως πηγή άνθρακα. Μέσω αναερόβιας ζύμωσης βακτηρίων μπορεί να παραχθεί βιοαέριο από BSG ως πηγή άνθρακα (Ezeonu *et al.*, 1996). Το είδος βακτηρίου *Streptomyces avermitilis* μπορεί να παράγει φερουλικό οξύ (FA) και φερουλοϋλεστεράσες (feruloyl esterase) (FAE) (Bartolomé *et al.*, 2003). Είδη βακτηρίων του γένους *Bacillus* όπως το *Bacillus cereus*, το *B. Subtilis* και κερατυνολιτικά βακτήρια όπως το *Bacillus* sp μπορούν και παράγουν υδρολυτικά ένζυμα (όπως πρωτεάσες και αμυλάσες) (Francis *et al.*, 2002. Łaba *et al.*, 2017).

Τα μικροφύκη παρουσιάζουν επίσης την ικανότητα να καταναλώνουν άνθρακα από BSG και να παράγουν χρήσιμες για τον άνθρωπο ενώσεις. Το *Euglena gracilis* είναι ένα πολλά υποσχόμενο μέσο για παραγωγή παραμύλου (paramylon) (Kim *et al.*, 2020). Επίσης το είδος *Chlorella protothecoides*, φαίνεται να μπορεί να αναπτυχθεί αποτελεσματικά σε μικτό υπόστρωμα BSG και ακατέργαστης γλυκερόλης παράγοντας βιομάζα και SCO (Cho & Park, 2018).

1.2.Ελαιογόνοι μικροοργανισμοί

1.2.1. Ελαιογόνοι μικροοργανισμοί

Μικροοργανισμοί όπως βακτήρια, μύκητες, ζύμες και μικροφύκη έχουν την ικανότητα να παράγουν και να συσσωρεύουν SCO. Το SCO παράγεται ενδοκυτταρικά και εμφανίζεται στο κύτταρο με τη μορφή σταγονιδίων λαδιού. Συνήθως το παραγόμενο λίπος υπάρχει με τη μορφή τριακυλογλυκερολών και είναι η ίδια μορφή λίπους που συναντάμε στους φυτικούς οργανισμούς. Η βασική διαφορά που καθιστά έναν μικροοργανισμό ως ελαιογόνο είναι η ικανότητα του να συσσωρεύει μικροβιακό λίπος σε ποσοστό μεγαλύτερο από 20%-25% w/w επί της ξηρής του βιομάζας και μπορεί να φτάσει έως και το 80% w/w (Ratledge, 1991, 1994). Αν και δεν υπάρχει διακριτό βιοχημικό κριτήριο ελαιογένειας στους μικροοργανισμούς, υπάρχει συσχέτιση της παρουσίας του ενζύμου ATP: κιτρική λυάση (Kumar *et al.*, 2019).

Τα βακτήρια, γενικά, δεν παράγουν τριακυλογλυκερόλες αλλά, αντίθετα παράγουν πολυ-β-υδροξυ-βουτυρικά και -αλκαναοϊκά ως πολυμερή αποθήκευσης, ενώ έχουν επίσης βρεθεί γλυκεροθεϊκά και αιθερικά λιπίδια σε βακτήρια συμπεριλαμβανομένων και των αρχαίων (Leman, 1997). Η ποσότητα του παραγόμενου λιπιδίου είναι μικρή, τυπικά λιγότερο από το 10%. Εξαιρέση αποτελούν το *Arthrobacter sp.* όπου μπορεί να συσσωρευτεί μέχρι 80% και τα είδη *Mycobacterium*, *Corynebacterium* και *Rhodococcus (Nocardia)* όπου μπορούν να συσσωρεύσουν λιπίδια έως 30-40% w/w, ωστόσο αυτά είτε αναπτύσσονται αργά, είτε παράγουν λιπίδια που είναι δύσκολο να εξαχθούν, είτε συνδέονται με τοξικούς και αλλεργικούς παράγοντες (Ratledge, 1994).

Επομένως, περισσότερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η συσσώρευση λιπιδίων που εντοπίζεται κυρίως σε ζύμες, μύκητες και έναν αριθμό μικροφυκών. (Ratledge, 1994). Οι ζύμες και μύκητες παράγουν τριγλυκερίδια ή ουδέτερα λίπη, φωσφολιπίδια, στεροειδή, σφιγγολιπιδίων και γλυκολιπίδια. Πιο συγκεκριμένα, τα λιπαρά οξέα των ζυμών είναι παρόμοια με αυτά των φυτικών ελαίων, δηλαδή το ελαϊκό, το παλμιτικό, το λινολεϊκό και το στεατικό οξύ, ενώ άλλα είδη μυκήτων μπορούν και συσσωρεύουν λιπαρά οξέα κοντής αλυσίδας (έως 14 άνθρακες), PUFAs και υδροξύ-λιπαρά οξέα (hydroxy fatty acids) (Leman, 1997). Τα είδη μυκήτων, *Mortierella isabellina*, *Aspergillus terreus* και *Mortierella alpina* έχει βρεθεί ότι παράγουν λιπίδια όπως το δοκοσαεξανοϊκό οξύ (DHA), το εικοσαπεντανοϊκό οξύ (EPA), το αραχιδονικό οξύ (ARA) και το γάμα λινολενικό οξύ (GLA). Στο μύκητα *Mortierella isabellina* η παραγωγή GLA και PUFAs φαίνεται να ευνοείται στα νεαρά και ταχέως αναπτυσσόμενα μυκήλια, ενώ μειώνεται σημαντικά στα ηλικιωμένα μυκήλια (Fakas *et al.*, 2009). Στο είδος μύκητα *Cunninghamella echinulata* η βιοσύνθεση του γάμα λινολενικού

οξέος (GLA) φαίνεται να συνδέεται με την παραγωγή νέας βιομάζας (Fakas *et al.*, 2007). Οι ελαιογόνες ζύμες αν και παρουσιάζουν μεγάλο βιοτεχνολογικό ενδιαφέρον αρχικά δεν ήταν σε θέση να παράγουν PUFA. Αυτή την ικανότητα μπορούν να αποκτήσουν κατόπιν γενετικής τροποποίησης (Bellou *et al.*, 2016). Ο *Yarrowia lipolytica* είναι ένας από τους πιο καλά μελετημένους ζυμομύκητες με βιοτεχνολογικό ενδιαφέρον για τις ιδιότητες που έχει να συσσωρεύει λιπίδια σε συνθήκες έλλειψης αζώτου (και μαγνησίου) και αποτελεί οργανισμό μοντέλο με καλά μελετημένο γονιδίωμα (Athenstaedt *et al.*, 2006. André *et al.*, 2009. Bellou *et al.*, 2016). Οι πιο κοινές ελαιώδεις ζύμες που έχουν μελετηθεί είναι τα είδη, *Lipomyces starkeyi*, *Lipomyces lipofer*, *Rhodospiridium tortuloides*, *Yarrowia lipolytica*, *Cryptococcus albidus*, *Cryptococcus albidus*, *Trichosporon pullulans* και *Rhodotorula glutinis*. Η περιεκτικότητα σε λιπίδια των στελεχών καθορίζεται από τις συνθήκες ζύμωσης (Kumar *et al.*, 2019).

Η περιεκτικότητα σε λιπίδια στα μικροφύκη είναι τυπικά 20% έως 40% w/w, αλλά μπορεί να φτάσει έως και 85% w/w. Αν και η καλλιέργεια μικροφυκών δεν είναι πάντα οικονομικά βιώσιμη, θεωρούνται πιθανή πηγή πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (PUFAs) και μπορούν πλέον να καλλιεργηθούν ετερότροφα. Το κύριο μειονέκτημα στη χρήση μικροφυκών για την παραγωγή PUFAs σε μεγάλη κλίμακα είναι η χαμηλή περιεκτικότητα σε λιπίδια στα κύτταρα και η χαμηλή πυκνότητα βιομάζας στον αντιδραστήρα, που συνήθως δεν υπερβαίνει τα 400–600 mg/L σε συνθήκες βιομηχανικής καλλιέργειας, γεγονός που αυξάνει σημαντικά το κόστος συγκομιδής. Επίσης σε σύγκριση με τα μικροφύκη, τα βακτήρια, οι μύκητες και οι ζύμες αναπτύσσονται πιο γρήγορα και έχουν μικρότερο κίνδυνο μόλυνσης (Kumar *et al.*, 2019). Από την άλλη πλευρά τα πλεονεκτήματα από βιομηχανική άποψη περιλαμβάνουν, την απλότητα της καλλιέργειας, την αυξημένη φωτοσυνθετική απόδοση, το ρυθμό ανάπτυξης και την υψηλότερη παραγωγικότητα βιομάζας και ελαίου σε σύγκριση με τα χερσαία φυτά (Bellou *et al.*, 2014). Τα μικροφύκη μπορούν και παράγουν διάφορες βιοδραστικές ενώσεις όπως βήτα-καροτένιο, ασταξανθίνη χρωστικές ουσίες, αντιοξειδωτικά, αντιβιοτικά και τοξίνες. Τα είδη μικροφυκών, *Chlorella sp.* και *Nannochloropsis salina* είναι σε θέση να συσσωρεύουν λιπίδια πλούσια σε PUFA όπως EPA (εικοσαπεντανοϊκό οξύ) και ALA (α-λινολενικό οξύ) αντίστοιχα. Αυτά τα λιπαρά οξέα εντοπίζονται κυρίως σε γλυκολιπίδια και κλάσμα σφιγγολιπιδίων (Certik & Shimizu, 1999). Τα είδη μικροφυκών που ανήκουν στα γένη *Porphyridium*, *Dunaliella*, *Isochrysis*, *Nannochloropsis*, *Tetraselmis*, *Phaeodactylum*, *Chlorella* και *Schizochytrium*, γενικά συσσωρεύουν λιπίδια σε περιεκτικότητα που κυμαίνεται μεταξύ 20 και 50% (Bellou *et al.*, 2012. Bellou *et al.*, 2014).

Τα PUFAs είναι απαραίτητα για τη διατήρηση της ομαλής λειτουργίας του ανθρώπινου οργανισμού καθώς ελέγχουν την έκφραση ορισμένων γονιδίων και επηρεάζουν ορισμένες διεργασίες όπως τη βιοσύνθεση λιπαρών οξέων και τη μεταφορά της χοληστερόλης στο σώμα. Οι κυτταρικές μεμβράνες, όπως αυτές των νευρώνων και των αισθητηριακών κυττάρων, είναι πλούσια σε PUFA που περιέχουν φωσφολιπίδια. Αυτά επηρεάζουν τη ρευστότητα της μεμβράνης και αποτελούν σημαντικό παράγοντα που επηρεάζει τη δραστηριότητα των πρωτεϊνών της μεμβράνης και τις αλληλεπιδράσεις τους με άλλα μόρια (Bellou *et al.*, 2016). Οι ελλείψεις σε PUFAs οδηγούν σε ανωμαλίες στο δέρμα, στο νευρικό σύστημα, στο ανοσοποιητικό, φλεγμονές στο καρδιαγγειακό σύστημα, στο ενδοκρινικό σύστημα, στα νεφρά, στο αναπνευστικό και στο αναπαραγωγικό συστήματα. Επειδή τα θηλαστικά στερούνται την ικανότητα σύνθεσης PUFAs, αυτά πρέπει να παρέχονται από τη διατροφή (Certik & Shimizu, 1999). Οι συμβατικές πηγές PUFA είναι κυρίως τα ιχθυέλαια. Εμπλουτισμός τροφίμων με PUFA μπορεί να επιτευχθεί με πολλούς τρόπους όπως, η άμεση προσθήκη PUFA σε αυτά, η παραγωγή PUFA από βρώσιμους μικροοργανισμούς στα τρόφιμα ή μέσω της χρήσης ζωοτροφών πλούσιων σε PUFA που οδηγεί στην παραγωγή ζωικών προϊόντων πλούσια σε PUFA. Οι κύριοι μικροοργανισμοί που παράγουν PUFA είναι οι μύκητες και τα μικροάλγη παράγοντας έλαια υψηλής καθαρότητας (Bellou *et al.*, 2016).

Η βιοσύνθεση των λιπαρών οξέων σε όλους σχεδόν τους οργανισμούς κορυφώνεται στον σχηματισμό είτε C16 είτε C18 κορεσμένων λιπαρών οξέων. Αυτά τα λιπαρά οξέα τροποποιούνται μέσω μιας ακολουθίας από αποκορεσμάσες (desaturases) και ελονγκάσες (elongases) έτσι ώστε να παραχθούν ακόρεστα λιπαρά οξέα και πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFAs). Τα ενδοκυτταρικά λιπίδια που συνθέτουν οι ζύμες σε γενικές γραμμές αποτελούνται επίσης από C16 και C18 λιπαρά οξέα (Bellou *et al.*, 2016). Συνήθως το παλμιτικό οξύ (C16:0) αποτελεί το 15–25% w/w, των συνολικών λιπιδίων με το γένος *Lipomyces spp* να μπορεί να φτάσει έως και 30% (Ratledge, 1994), το παλμιτολεϊκό (C16:1) παρουσιάζεται σε ποσοστά κατώτερα από 5% w/w με τη ζύμη *Saccharomyces cerevisiae* να μπορεί να φτάσει έως 43–54% και είδη της *Hanseniaspora* επίπεδα έως και 67% (Ratledge, 1994). το στεατικό οξύ (C18:0) παρουσιάζονται σε ποσοστά κατώτερα από 10% w/w. Το ελαϊκό οξύ (C18:1) είναι το κύριο λιπαρό οξύ που συσσωρεύεται ενδοκυτταρικά στις ζύμες και μερικές φορές υψηλότερα από 70% w/w (σε ορισμένα είδη, π.χ. *Schizosaccharomyces spp*, μπορεί να ξεπεράσει και το 80%), το λινολεϊκό (12C18:2) θεωρείται ότι είναι το περιοριστικό βήμα για τη σύνθεση μικροβιακού λίπους υψηλής αξίας (Certik & Shimizu, 1999). Το λινολεϊκό οξύ μπορεί να είναι το δεύτερο πιο άφθονο λιπαρό οξύ σε πολλούς ζυμομύκητες. Ωστόσο, καθώς τα C18:2 και C18:3 συνδέονται συχνότερα με μεμβράνες φωσφολιπιδίων η υψηλή περιεκτικότητα C18:2 ενδέχεται

να υποδηλώνει πολύ χαμηλή συνολική περιεκτικότητα σε λιπίδια (Ratledge, 1994). Μόνο στους μύκητες και στα μικροφύκη τα PUFA εμφανίζονται σε επίπεδα άνω του 20% των συνολικών λιπαρών οξέων (Ratledge, 2004). Τα προφίλ λιπαρών οξέων πολλών ελαιογόνων ζυμομυκήτων όταν πραγματοποιείται *de novo* συσσώρευση λιπιδίων απεικονίζονται στην **εικόνα 2** (S. Papanikolaou & G. Aggelis, 2011a).

Εικόνα 2. Σύνθεση λιπαρών οξέων από λιπίδια που παράγονται από διάφορα στελέχη ζύμης ενώ αναπτύσσονται σε υπόστρωμα σακχάρων σε συνθήκες καλλιέργειας που ευνοούν τη συσσώρευση μικροβιακών λιπιδίων (Papanikolaou, Aggelis, 2011-a).

Strain	Lipid (% w/w)	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3
<i>Candida</i> sp. 107	37.1	37	1	14	36	7	T.
<i>Candida</i> sp. 107	n.r.	28	n.r.	8	41	17	17
<i>Candida</i> sp.	40.3	23	13	3	54	5	2
<i>Rhodotorula gracilis</i>	41.0	21	T.	13	51	11	3
<i>Candida curvata</i>	29.1	36	T.	14	40	7	T.
<i>Candida curvata</i>	28.0	37	T.	10	44	6	T.
<i>Apiotrichum curvarum</i>	31.0	34	T.	10	43	7	2
<i>Cryptococcus curvatus</i>	38.0	24	T.	10	46	9	6
<i>Cryptococcus curvatus</i>	25.0	18	T.	16	50	16	T.
<i>Cryptococcus curvatus</i>	50.0	31	-	22	42	1	n.r.
<i>Cryptococcus albidus</i>	46.3	14	T.	9	53	18	2
<i>Cryptococcus albidus</i>	n.r.	20	n.r.	11	59	6	6
<i>Yarrowia lipolytica</i>	43.2	15	2	11	47	21	3
<i>Yarrowia lipolytica</i>	30.7	12	11	9	57	11	T.
<i>Yarrowia lipolytica</i>	22.3	13	17	6	55	7	n.r.
<i>Rhodospiridium toruloides</i>	67.5	20	1	15	47	13	3
<i>Rhodospiridium toruloides</i>	65.2	34	T.	13	48	1	T.
<i>Rhodospiridium toruloides</i>	62.1	26	2	5	62	3	T.
<i>Rhodospiridium toruloides</i>	55.6	43	T.	16	35	2	T.
<i>Lipomyces starkeyi</i>	68.0	56	2	14	26	T.	T.
<i>Lipomyces starkeyi</i>	61.5	37	4	6	49	1	T.
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	48.6	22	2	9	55	11	T.
<i>Trichosporon capitatum</i>	37.6	12	1	2	74	9	n.r.
<i>Rhodotorula</i> sp.	22.0	22	1	7	56	12	n.r.
<i>Candida oleophila</i>	15.3	13	3	7	66	11	n.r.

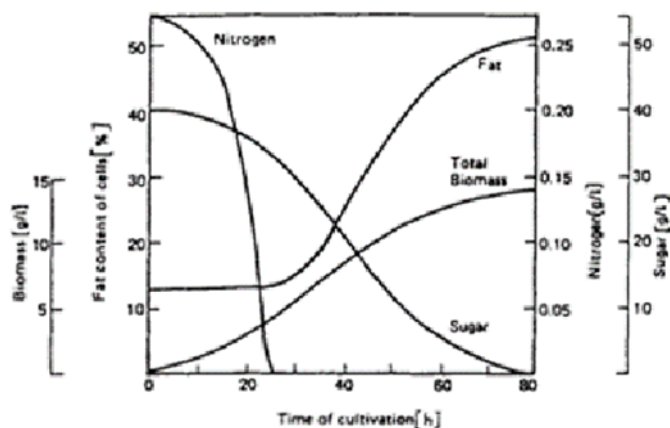
T. <0.5% w/w; n.r.: not reported. δεν αναφέρεται

Μια μεγάλη ποικιλία υποστρωμάτων έχει χρησιμοποιηθεί ως πηγές άνθρακα για τους ελαιογόνους μικροοργανισμούς που πραγματοποιούν συσσώρευση λιπιδίων, σε ακίνητη φιάλη, batch-bioreactor, fed-batch bioreactor, και συνεχείς μοντέλα καλλιέργειας. Τα υποστρώματα που μπορούν να χρησιμοποιηθούν περιλαμβάνουν μελάσα, τυρί, ορό γάλακτος, απόβλητα ντομάτας εμπλουτισμένα με υδρόλυμα γλυκόζης, λάσπη λυμάτων εμπλουτισμένη με γλυκόζη, πολυσακχαρίτες, (ακατέργαστη) γλυκερόλη, υδρολύμα υπολειμμάτων τομάτας εμπλουτισμένο με γλυκερίνη, χυμός από φραγκόσυκο, N-ακετυλο-γλυκοζαμίνη, υδρολύματα αμύλου, ινουλίνη, υδρολύματα αγκινάρας Ιερουσαλήμ, υδρολύματα κόκκων ρυζιού, εκχυλίσματα γλυκού σόργου, οργανικά οξέα και αιθανόλη, πιο συχνά συναντάμε τη γλυκόζη (Papanikolaou & Aggelis, 2011a. Papanikolaou & Aggelis, 2011b). Τα οργανικά απόβλητα ως υπόστρωμα ζύμωσης από ελαιογόνους μικροοργανισμούς για παραγωγή βιοντίζελ πλήρους κλίμακας έχει τραβήξει το ενδιαφέρον πολλών ερευνών (Carpus *et al.*, 2016. Cho & Park, 2018). Η φύση των λιπιδίων ποικίλλει ανάλογα τον μικροοργανισμό, όπως ζύμες, μύκητες,

βακτήρια και μικροφύκη και μπορούν να χρησιμεύσουν ως πρώτη ύλη για παραγωγή βιοντίζελ αλλά και διαφορετικών βιοκαυσίμων (Chew *et al.*, 2018). Το βιοντίζελ παράγεται από ανανεώσιμη βιομάζα με μετεστεροποίηση τριακυλογλυκερολών, αποδίδοντας μονοαλκυλεστέρες λιπαρών οξέων μακράς αλυσίδας με αλκοόλες μικρής αλυσίδας, για παράδειγμα, μεθυλεστέρες λιπαρών οξέων (FAMES) και αιθυλεστέρες λιπαρών οξέων (FAEEs) (Arous *et al.*, 2019. Meng *et al.*, 2009). Η θεωρητική απόδοση υδατανθράκων προς λιπίδια κυμαίνεται στο 32-33%, συνήθως όμως η πραγματική αποδόση των υδατανθράκων προς λιπίδια κυμαίνεται στο 15-20%. Ουσιαστικά στην πράξη χρειάζεται πενταπλάσια ποσότητα σακχάρου για να δώσει μια μονάδα ελαίου, αυτό αποτελεί σημαντικό παράγοντα για την οικονομική βιωσιμότητα της διαδικασίας (Leman, 1997. Ratledge, 1994).

1.2.2. Βιοχημεία ελαιογόνων μικροοργανισμών

Γενικά ανάμεσα στους ελαιογόνους μικροοργανισμούς μπορούμε να συναντήσουμε πολλές κατηγορίες λιπιδίων όπως πεπτιδολιπίδια, υδρογονάνθρακες, στερόλες, πολυδροξυαλκανοϊκά και εστέρες κεριού. Το μεγαλύτερο ποσοστό των παραγόμενων λιπιδίων συνήθως είναι τριακυλογλυκερόλη όπου αντιπροσωπεύει έως και το 95%, ενώ γλυκολιπίδια και διακυλογλυκερόλες συνήθως αντιπροσωπεύουν έως και το 10% των συνολικών λιπιδίων (Leman, 1997. Ratledge, 1991. 1994). Για να προκύψει συσσώρευση μικροβιακού λίπους σε έναν μικροοργανισμό πρέπει να αναπτυχθεί σε περιβάλλον με περίσσεια υποστρώματος άνθρακα και περιορισμένη ποσότητα κάποιου θρεπτικού συστατικού συνήθως άζωτο. Η ιδανική πορεία συσσώρευσης λιπιδίων με το άζωτο ως περιοριστικό παράγοντα παρουσιάζεται από τον Ratledge, (1991) στην εικόνα 3. Ωστόσο η ελαιογόνος ζύμη *R. toruloides* μπορεί να παρουσιάσει αποτελεσματική παραγωγή βιομάζας και συσσώρευση λιπιδίων με το φώσφορο ή το θειικό να είναι ο περιοριστικός παράγοντα κυτταρικής ανάπτυξης και όχι το άζωτο (Papanikolaou & Aggelis, 2011a).



Εικόνα 3. Ιδανική πορεία συσσώρευσης λιπιδίων σε ελαιώδη μικροοργανισμό. Η μαγιά ή οι μύκητες αναπτύσσονται σε μέσο με υψηλή αναλογία C:N έτσι ώστε το N (συνήθως ως NH₄⁺) να εξαντλείται μετά από 24 ώρες. Η περίσσεια άνθρακα μετατρέπεται σε λιπίδια χωρίς ταυτόχρονη αύξηση του αριθμού των κυττάρων. Ως εκ τούτου, τα μικροβιακά κύτταρα γίνονται «παχύσαρκα» (Ratledge, C, 1991). biomass: βιομάζα, fat content of cells: περιεκτικότητα των κυττάρων σε λίπος, time of cultivation: χρόνος καλλιέργειας, nitrogen: άζωτο, sugar: σάκχαρα, fat: λιπίδια.

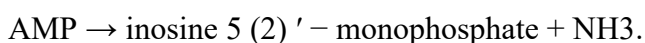
Ο μηχανισμός βιοσύνθεσης λιπαρών οξέων είναι κοινός για όλους τους οργανισμούς, αυτό που δίνει σε έναν μικροοργανισμό ελαιογόνο χαρακτήρα φαίνεται να είναι η ικανότητα συνεχούς παροχής ακετυλο-CoA, (Acetyl-CoA) απευθείας στο κυτταρόπλασμα του κυττάρου ως απαραίτητος πρόδρομος του ενζύμου συνθάση λιπαρού οξέος (FAS) και την ικανότητα παραγωγής επαρκούς προμήθειας NADPH ως το βασικό αναγωγικό που χρησιμοποιείται στη βιοσύνθεση λιπαρών οξέων. Ο κύριος προμηθευτής NADPH για τη βιοσύνθεση λιπαρών οξέων θεωρείται το μηλικό ένζυμο.



Η δραστηριότητα του μηλικού ενζύμου έχει βρεθεί στους περισσότερους ελαιογόνους μικροοργανισμούς. Ο σχηματισμός ακετυλο-CoA σε ελαιώδεις μικροοργανισμούς έχει αποδοθεί στην παρουσία του ενζύμου ATP:κιτρική λυάση (Papanikolaou & Aggelis, 2011a. Ratledge, 1991. 1994. 2004).

Η βιοχημεία της βιοσύνθεσης λιπιδίων μπορεί να χωριστεί σε δύο διακριτά μέρη, τον ενδιάμεσο κυτταρικό μεταβολισμό και τη βιοσύνθεση των τριακυλογλυκερόλες (TAGs). Στο

πρώτο σκέλος αρχικά το πυροσταφυλικό οξύ το οποίο προκύπτει από γλυκόλυση περνά μέσω της μιτοχονδριακής μεμβράνης στη μιτοχονδριακή μήτρα. Το πυροσταφυλικό-αφυδρογονάση (Pyruvate-dehydrogenase) καταλύει το σχηματισμό του ακετυλο-CoA από το πυροσταφυλικό οξύ. Το ακετυλο-CoA στη συνέχεια εισέρχεται εντός του κύκλου του Krebs, αλλιώς μεταφέρεται ξανά στο κυτταρόπλασμα προκειμένου να ενισχυθεί η βιοσύνθεση των κυτταρικών λιπαρών οξέων. Λόγω του ότι η μιτοχονδριακή μεμβράνη δεν μπορεί να γίνει διαπερατή από το ακετυλο-CoA ο μετασχηματισμός αυτής της ένωσης σε ακετυλο-καρνιτίνη (acetyl-carnitine) είναι απαραίτητο βήμα για τη μεταφορά της στο κυτταρόσολιο. Ο ρόλος της καρνιτίνη-ακυλο-τρανσφεράσης (carnitine-acyl-transferase) είναι η μεταφορά του ακετυλο-CoA, που προκύπτει από β-οξείδωση στη μιτοχονδριακή μήτρα. Το ακετυλο-CoA αποτελεί τον πρόδρομο της ενδοκυτταρικής βιοσύνθεσης λιπαρών οξέων (Bellou *et al.*, 2016. Paranikolaou & Aggelis, 2011a). Η συσσώρευση λιπιδίων στους ελαιογόνους μικροοργανισμούς ουσιαστικά ξεκινά με την αλλαγή της ενδοκυτταρικής συγκέντρωση διαφόρων μεταβολιτών, που επιτυγχάνεται μέσω της εξάντλησης ορισμένων θρεπτικών ουσιών στο μέσο καλλιέργειας. Συγκεκριμένα η εξάντληση του αζώτου προκαλεί αυξημένη δραστηριότητα της απαμινάσης AMP, η οποία είναι έως και πενταπλάσια από ό,τι στα κύτταρα πριν από τον περιορισμό του αζώτου. Η αυξημένη δραστηριότητα της απαμινάσης AMP μειώνει το κυτταρικό περιεχόμενο της (AMP) μονοφωσφορικής αδενοσίνης συμπεριλαμβανομένης της περιεκτικότητάς της στο μιτοχόνδριο, αυτό έχει σαν αποτέλεσμα να σταματά η λειτουργία της ισοκιτρικής αφυδρογονάσης. Χάρη στην AMP-δεαμινάση, ο μικροοργανισμός διασπά το AMP σε (IMP) μονοφωσφορική ινοσίνη και ιόντα NH_4^+ .

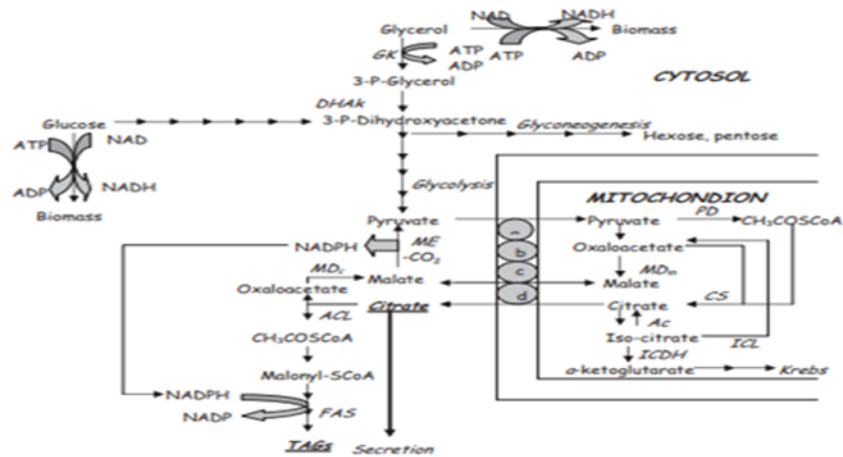


Τα ιόντα NH_4^+ αποτελούν μια συμπληρωματική πηγή αζώτου, απαραίτητη για τη σύνθεση του κυττάρου υλικού μετά τον περιορισμό του εξωκυτταρικού αζώτου (Ratledge, 1994). Η υπερβολική μείωση της ενδοκυτταρικής συγκέντρωσης AMP αλλάζει τη λειτουργία του κύκλου Krebs. Το NAD^+ - (και σε διάφορες περιπτώσεις NADP^+ -) ισοκιτρική αφυδρογονάση (isocitrate dehydrogenase-ICDH), υπεύθυνο για τον μετασχηματισμό του ισοκιτρικού σε α-κετογλουταρικό οξύ (α-ketoglutaric acid), χάνει τη δραστηριότητά του. Αυτό έχει σαν συνέπεια το ισοκιτρικό οξύ να συσσωρεύεται μέσα στο μιτοχόνδριο όπου και βρίσκεται σε ισορροπία με κιτρικό οξύ. Όταν η συγκέντρωση του κιτρικού οξέος εντός του μιτοχονδρίου φτάσει σε μια κρίσιμη τιμή, το κιτρικό εισέρχεται στο κυτταρόπλασμα στη θέση μηλικού οξέος. Τέλος, το κιτρικό οξύ διασπάται από την ATP-κιτρική λυάση (ATP-CL), σε Acetyl-CoA και οξαλοξικό (Carsanba *et al.*, 2018. Dourou *et al.*, 2017).

Κιτρικό + CoA + ATP → Acetyl-CoA + οξαλοξικό + ADP + Pi..

Το κιτρικό οξύ συντίθεται ως μέρος του κύκλου του τρικαρβοξυλικού οξέος (TCA) μέσα στο μιτοχόνδριο του κυττάρου και αποτελεί χαρακτηριστικό των ελαιογόνων μικροοργανισμών το οποίο επιτρέπει συσσώρευση κιτρικού οξέος, είναι το γεγονός ότι η δράση της ισοσιτρικής αφυδρογονάσης (isocitrate dehydrogenase) ως συστατικού του κύκλου TCA εξαρτάται από την παρουσία της AMP (Bellou *et al.*, 2014. Dourou *et al.*, 2017. Papanikolaou & Aggelis, 2011a. Ratledge, 2004).

Το ATP-CL είναι ένα ενζυματικό σύμπλεγμα και η παρουσία του σε έναν μικροοργανισμό θεωρείται ίσως ο πιο σημαντικός παράγοντας για ελαιογόνο δράση. Το καθαρό προϊόν της δράσης του ATP-CL είναι το ακετυλο-CoA, το οποίο θα μετατραπεί περαιτέρω σε ενδοκυτταρικά λιπαρά οξέα. Εάν δεν υπάρχει ενζυματικό σύμπλεγμα ATP-CL, η εξάντληση του αζώτου οδηγεί στη συσσώρευση κιτρικού οξέος στο εσωτερικό του κυτοπλάσματος. Σε αυτήν την περίπτωση, το κιτρικό οξύ είτε θα απεκκριθεί στο μέσο καλλιέργειας ή θα προκαλέσει την αναστολή της 6-φωσφορο-φρουκτοκινάσης (6-phospho-fructokinase), με αποτέλεσμα ενδοκυτταρική συσσώρευση πολυσακχαριτών με βάση την 6-φωσφορο-γλυκόζη (6-phospho-glucose) (Carsanba *et al.*, 2018. Ratledge, 1994. 2004). Τα μονοπάτια του ενδιάμεσου κυτταρικού μεταβολισμού περιγράφονται στην εικόνα 4 (Papanikolaou & Aggelis, 2011a).

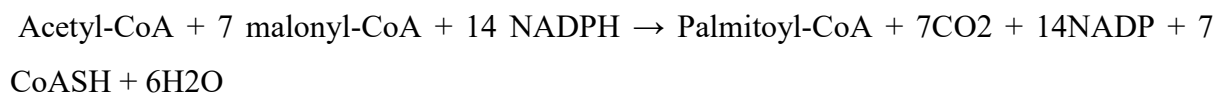


Εικόνα 4: Ενδιάμεσος μεταβολισμός στους ελαιώδεις μικροοργανισμούς. (α-γ) Συστήματα μεταφοράς πυροσταφυλικού από το κυτταρόπλασμα στο μιτοχόνδριο και αντίστροφα για το μηλικό. (δ) Σύστημα μεταφοράς κιτρικού και μηλικού μεταξύ κυτταροπλάσματος και μιτοχονδρίου. Cytosol:κυτοσόλιο, hexose:εξόζη, pentose:πεντόζη, mitochondrion:μιτοχόνδριο. Ένζυμα: Ac: acotinase, ACC: acetyl-CoA carboxylase, ACL: ATP-citrate lyase, FAS: fatty acid synthetase, ICDH: iso-citrate dehydrogenase, MDC: malate dehydrogenase (cytoplasmic), MDm: malate dehydrogenase (mitochondrial), PM: pyruvate dehydrogenase, PFK: phospho-fructo-kinase, PK: pyruvate kinase. Ac: ακοτινάση, ACC: ακετυλο-CoA καρβοξυλάση, ACL: ATP-κιτρική λυάση, FAS: συνθετάση λιπαρού οξέος, ICDH: ισο-κιτρική αφυδρογονάση, MDC: μηλική αφυδρογονάση (κυτταροπλασματική), MDm: μηλική αφυδρογονάση (μιτοχονδριακή), PM: πυροσταφυλική αφυδρογονάση, PFK: φωσφο-φρουκτο-κινάση, PK: πυροσταφυλική κινάση (Papanikolaou, Aggelis, 2011).

Η πρώτη αντίδραση βιοσύνθεσης λιπαρών οξέων μετά την παραγωγή ακετυλοCoA, καταλύεται από το ένζυμο ακετυλοCoA καρβοξυλάση (acetylCoA carboxylase, ACC) εξαρτόμενη από τη βιοτίνη, στην αντίδραση:



Η βιοσύνθεση των λιπαρών οξέων συνεχίζεται με τη συμμετοχή της συνθετάσης λιπαρών οξέων (fatty acid synthetase) (FAS) και της malonyl-CoA με την αντίδραση:



(Papanikolaou & Aggelis, 2011a).

Η κύρια οδός σχηματισμού λιπαρών οξέων σε όλους σχεδόν τους μικροοργανισμούς θεωρήθηκε ότι είναι η «συμβατική» διαδρομή FAS (Ratledge, 2004).

1.2.3. *Rhododsporidium toruloides*

Ο *R. toruloides* απομονώθηκε για πρώτη φορά το 1922 από τον αέρα στο Dalian της Κίνας και η αρχική του ονομασία ήταν *Torula rubescen*. Ταξινομείται στην οικογένεια *Sporidiobolaceae*, τάξη *Sporidiobolales*, ομοταξία *Microbotryomycetes* και φύλο *Basidiomycota*. Επρόκειτο για έναν κόκκινο ετεροθαλικό, διμορφικό ζυμομύκητα ο οποίος μπορεί να υπάρχει είτε με τη μορφή ζύμης είτε με τη μορφή μυκηλίου. Στη φύση, ο *R. toruloides* μπορεί να βρεθεί μεταξύ άλλων σε πολύ ζύλου από πεύκο, στο χώμα, σε θαλασσινό νερό, σε όξινα λύματα και σε φύλλα φυτών. Αναπτύσσεται καλά σε διάφορες τιμές θερμοκρασίας και pH και μπορεί να χρησιμοποιήσει διάφορες ενώσεις του άνθρακα ως πηγές ενέργειας όπως εξόζες, πεντόζες, σακχαρόζη, μαλτόζη, κελλοβιόζη, τρεαλόζη, ραφινόζη, μελεξιτόζη, αιθανόλη, γλυκερίνη, γλυκόζη, φρουκτόζη, ξυλόζη, μαννιτόλη, σορβιτόλη, οξικό οξύ, γαλακτικό οξύ, ηλεκτρικό οξύ, κιτρικό οξύ, λιπαρά οξέα μακράς αλυσίδας και D-γαλακτουρονικό οξύ. Σαν πηγές αζώτου μπορεί να χρησιμοποιεί αμμώνιο, νιτρικά άλατα, καδαβερίνη, αμινοξέα και μικρά πεπτίδια (Wen *et al.*, 2020). Ο *R. toruloides* είναι μη παθογόνος, ελαιογόνος βασιδιομύκητας με πολλές βιοτεχνολογικές δυνατότητες καθώς διαθέτει σύντομους χρόνους αναπαραγωγής, διατροφική ευελιξία και ευκολία στην κλιμάκωση για βιομηχανική εφαρμογή (Castañeda *et al.*, 2018). Έχει δείξει ικανότητα να παράγει ένα ευρύ φάσμα λιπαρών οξέων, όπως το βιοδιασπώμενο πολυεστέρα πολυβουτανολακτόνη (PHB), το οποίο μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως βιοδιασπώμενο πλαστικό. Μπορεί να συσσωρεύει λιπίδια σε ποσοστό περισσότερο από το 70% του ξηρού κυτταρικού τους βάρους και είναι ικανός για παραγωγή καροτενοειδών και ενζύμων βιοτεχνολογικού ενδιαφέροντος, όπως η κεφαλοσπορίνη (cephalosporin), η εστεράση (esterase) και η εποξειδική υδρολάση (epoxide hydrolase). Για να επιτευχθεί συσσώρευση λιπιδίων συνήθως καλλιεργείται σε συνθήκες περιορισμού του αζώτου όπως και οι περισσότερες ελαιογόνες ζύμες ωστόσο ο περιορισμός και άλλων θρεπτικών συστατικών όπως, ανόργανα, φωσφορικά, θειικά και του σιδήρου φέρνει παρόμοια αποτελέσματα (Zhu *et al.*, 2012). Ο μικροοργανισμός αυτός είναι ανθεκτικός σε πολλούς τύπους απορριμμάτων και βιομηχανικών αποβλήτων, επομένως έχει προταθεί ως υποψήφιος για βιολογική επεξεργασία αποβλήτων. Η παραγωγικότητα των λιπιδίων του *R. toruloides* ποικίλλει ανάλογα με το στέλεχος, την ποιότητα του μέσου καλλιέργειας και τις συνθήκες καλλιέργειας (Castañeda *et al.*, 2018).

Ο *R. toruloides* ακολουθεί τα βιοχημικά μονοπάτια των ελαιογόνων μικροοργανισμών για την παραγωγή SCO. Ο περιορισμός του αζώτου είναι ο κύριος ρυθμιστής για την έναρξη της υπερπαραγωγής λιπιδίων. Οι χημικές οδοί για την παραγωγή λιπιδίων στο *R. toruloides*

περιλαμβάνουν ένα πολύπλοκο δίκτυο μεταβολικών αντιδράσεων. Ένα από τα βασικά μονοπάτια για την παραγωγή λιπιδίων στο *R. toruloides* είναι η οδός σύνθεσης λιπαρών οξέων. Αυτή η οδός περιλαμβάνει τη μετατροπή του ακετυλο-CoA (acetyl-CoA) σε μηλονυλο-CoA (malonyl-CoA), το οποίο στη συνέχεια χρησιμοποιείται ως δομικό στοιχείο για τη σύνθεση λιπαρών οξέων. Τα λιπαρά οξέα στη συνέχεια επιμηκύνονται περαιτέρω για να παράξουν διάφορους τύπους λιπιδίων, συμπεριλαμβανομένων των τριακυλογλυκερολών (TAGs), των φωσφολιπιδίων και των στερολών. Καθώς η πηγή άνθρακα μεταβολίζεται, μέρος του άνθρακα εκτρέπεται προς την de novo οδό σύνθεσης λιπαρών οξέων. Κατά την πρόσληψη άνθρακα, η πηγή άνθρακα μετατρέπεται σε ακετυλο-CoA μέσω γλυκόλυσης, οδός φωσφορικής πεντόζης ή β-οξειδωσης λιπαρών οξέων, ανάλογα με τον τύπο της πηγής άνθρακα. Το Acetyl-CoA είναι ένας κεντρικός πρόδρομος για τη σύνθεση λιπαρών οξέων (Bommareddy *et al.*, 2015. Zhu *et al.*, 2012). Η σύνθεση λιπαρών οξέων λαμβάνει χώρα στο κυτταρόπλασμα του *R. toruloides*. Το πρώτο βήμα στη σύνθεση λιπαρών οξέων είναι η μετατροπή του ακετυλο-CoA μέσω καρβοξυλίωσης σε μηλονυλο-CoA (malonyl-CoA) από την ακετυλο-CoA καρβοξυλάση (ACC). Το Malonyl-CoA χρησιμεύει ως δομικό στοιχείο για τη σύνθεση λιπαρών οξέων. Στη συνέχεια, το malonyl-CoA συμμετέχει σε έναν επαναλαμβανόμενο κύκλο αντιδράσεων επιμήκυνσης δύο ανθράκων που καταλύονται από τη συνθάση λιπαρών οξέων (FAS). (Zhu *et al.*, 2012). Το σύμπλοκο συνθάσης λιπαρών οξέων (FAS) στο *R. toruloides* είναι ένα μεγάλο, πολυλειτουργικό ένζυμο που καταλύει μια σειρά αντιδράσεων για να επιμηκύνει την αλυσίδα των λιπαρών οξέων κατά δύο μονάδες άνθρακα. Το τελικό στάδιο της σύνθεσης λιπαρών οξέων στο *R. toruloides* είναι η απελευθέρωση της αλυσίδας λιπαρών οξέων από το σύμπλεγμα FAS. (Bommareddy *et al.*, 2015. Zhu *et al.*, 2012) Το τελικό προϊόν της αντίδρασης FAS στο *R. toruloides* είναι το παλμιτικό οξύ (C16:0), ένα κορεσμένο λιπαρό οξύ με 16 άτομα άνθρακα. Το παλμιτικό οξύ μπορεί περαιτέρω να επιμηκυνθεί και να κορεσθεί για να σχηματίσει διάφορα ακόρεστα λιπαρά οξέα από αποκορεσμάσες (desaturases) και ελονγκάσες (elongases) λιπαρών οξέων (Ratledge, 1994).

1.3.Σκοπός εργαστηριακής μελέτης

Το στερεό παραπροϊόν ζυθοποιίας και ο δευτερογενής ορός γάλακτος προκύπτουν συνεχώς ως παραπροϊόντα από μικρές και μεγάλες βιομηχανίες. Σκοπός της συγκεκριμένης μελέτης ήταν η αξιοποίηση των συγκεκριμένων αποβλήτων για βιοτεχνολογικές διεργασίες καθώς μπορούν να αποτελέσουν ικανά υποστρώματα για μικροβιακές ζυμώσεις. Λόγω του

χαμηλού κόστους και τον προβλημάτων που δημιουργούνται κατά την απόρριψη τους η αξιοποίηση τους παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον.

Στη παρούσα μελέτη εξετάστηκε η ικανότητα του *R. toruloides* ως προς την ανάπτυξη, την παραγωγή βιομάζας και τη συσσώρευση λιπιδίων όταν αυτό αναπτύσσεται σε υποστρώματα με τα συγκεκριμένα παραπροϊόντα ως πηγή άνθρακα.

2. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1.Βιολογικό υλικό

Για τη συγκεκριμένη μελέτη χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος ζύμης *R. toruloides* της συλλογής του εργαστηρίου Μικροβιολογίας του Πανεπιστημίου Πατρών, του τμήματος Βιολογίας. Ο μικροοργανισμός διατηρούταν σε κεκλιμένους δοκιμαστικούς σωλήνες καλλιέργειας σε θρεπτικό υλικό PDA (Potato Dextrose Agar) σε θερμοκρασία 5 ± 1 °C και ανανεώνονταν ανά τακτά χρονικά διαστήματα για τις ανάγκες της παρούσας εργασίας.

2.2.Θρεπτικό υλικό

Για τις καλλιέργειες παρασκευάστηκαν θρεπτικά υλικά που περιείχαν ιχνοστοιχεία KH_2PO_4 7 g/L, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ 2,55 g/L, $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ 0,15 g/L, $\text{FeCl} \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ 0,01 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 0,732 g/L, $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ 0,0001 g/L, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,06 g/L. Ως πηγή αζώτου χρησιμοποιήθηκαν εκχύλισμα ζύμης (Yeast extract-YE) και πεπτόνη (peptone). Ως πηγές άνθρακα χρησιμοποιήθηκαν δευτερογενής ορός γάλακτος (SCW), προσομοίωση SCW περιεκτικότητας σε λακτόζη 51g/L και στερεό απόβλητο ζυθοποιίας (BSG, Brewery Spent Grain) από ζυθοποιία οικιακής κλίμακας (ομάδα ζυθοποιίας του Τμήματος Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Πανεπιστημίου Αιγαίου).

2.3.Προκαλλιέργεια

Για την παρασκευή της προκαλλιέργειας χρησιμοποιήθηκαν κωνικές φιάλες Erlenmeyer των 100 mL, πληρωμένες κατά το 1/5 του όγκου τους (20mL) με θρεπτικό μέσο Potato Dextrose Broth (PDB). Το θρεπτικό αποστειρώθηκε σε αυτόκλειστο (Rayra AES-75) στους 121 °C, για 20 min σε πίεση 1,1 atm. Ο εμβολιασμός πραγματοποιήθηκε σε ασηπτικές συνθήκες εντός μηχανήματος Laminar Flow με μικροβιακό κρίκο από τρυβλίο πέτρι (το τρυβλίο είχε εμβολιαστεί από κεκλιμένο σωλήνα (slant) (με προσφάτως ανανεωμένο μικροοργανισμό) με τη μέθοδο streaking. Η προκαλλιέργεια επώαστηκε σε ανακινούμενη τράπεζα σε σταθερές συνθήκες ανάδευσης 180 rpm. θερμοκρασίας 28°C, για 48 ώρες.

2.4.Συνθήκες καλλιέργειας

Οι καλλιέργειες της ζύμης *R. toruloides* πραγματοποιήθηκαν σε κωνικές φιάλες Erlenmeyer των 250 ml οι οποίες περιείχαν 50 ml θρεπτικού υλικού και αποστειρώνονταν σε αυτόκλειστο (Rayra AES-75) σε θερμοκρασία 121°C, πίεση 1,1 atm για 20 min. Μετά την αποστείρωση, οι κωνικές φιάλες εμβολιάζονταν με 4 ml προκαλλιέργειας (ηλικίας 48h). Το pH της καλλιέργειας προσδιοριζόταν με κατάλληλο ηλεκτρόδιο μέτρησης και ρυθμιζόταν στην τιμή ~6.5 με κατάλληλη ποσότητα διαλύματος NaOH 4 M. Οι κωνικές φιάλες των καλλιερειών μεταφέρθηκαν σε ανακινούμενη τράπεζα σε σταθερές συνθήκες ανάδευσης στα 180 rpm σε θερμοκρασία 28°C. Κάθε 24 ώρες λαμβανόταν από την ανακινούμενη τράπεζα, είτε μια κωνική φιάλη καλλιέργειας, είτε δείγμα καλλιέργειας από κωνική φιάλη σε φάλκον (falcon) των 10ml ώστε να εξεταστεί δείγμα σε μικροσκόπιο για τυχόν επιμόλυνση και

παρατήρηση των κυττάρων, να μετρηθεί το Ph, να γίνει προσδιορισμός αναγόντων σακχάρων και στις περιπτώσεις που λαμβανόταν ολόκληρη η καλλιέργεια, να ληφθεί η βιομάζα.

2.5.Χημικές αναλύσεις και προσδιορισμοί

2.5.1. Ποσοτικός προσδιορισμός βιομάζας

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό της βιομάζας μετά τη συλλογή της κωνικής φιάλης αρχικά η καλλιέργεια ογκομετρήθηκε σε ογκομετρικό κύλινδρο των 100ml. Στη συνέχεια μεταφέρθηκε σε φάλκον των 50ml και φυγοκεντρήθηκε στα 9.000 rpm, στους 4°C, για 10 λεπτά. Μετά την πρώτη φυγοκέντρωση το υπερκείμενο υγρό μεταφέρθηκε σε φάλκον των 10ml και φυλάχθηκε σε ψυγείο στους -20 °C (για προσδιορισμό αναγόντων σακχάρων). Η φυγοκέντρωση επαναλήφθηκε άλλες τρεις φορές ξεπλένοντας με απιονισμένο νερό την κωνική φιάλη και μεταφέροντας στο ίδιο φάλκον ώστε να συλλεχθεί το σύνολο της βιομάζας. Έπειτα έγινε επαναδιαλυτοποίηση της βιομάζας σε \approx 10ml απιονισμένο νερό μέσω συσκευής Vortex. Στη συνέχεια η διαλυτοποιημένη βιομάζα μεταφέρθηκε σε McCartney το οποίο προηγουμένως είχε τοποθετηθεί για 10 λεπτά σε ξηραντήρα στους 80 °C και είχε ζυγιστεί σε ζυγό ακριβείας (το φάλκον ξεπλύθηκε τρεις φορές με απιονισμένο νερό και προστέθηκε και αυτό στο McCartney) και τοποθετήθηκε ξανά σε ξηραντήρα σε θερμοκρασία 80 °C για 24h. Τέλος το McCartney με την αποξηραμένη βιομάζα ζυγίστηκε σε ζυγό ακριβείας και η ξηρή βιομάζα τοποθετήθηκε σε erpendorf tubes.

2.5.2. Προσδιορισμός αναγόντων σακχάρων

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό των αναγόντων σακχάρων χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος του 3,5 δινιτροσαλικυλικού οξέος (DNS) (Miller, 1959). Η μέθοδος στηρίζεται στην αναγωγή του 3,5- δινιτροσαλικυλικού οξέος προς 3-αμινο-5 νιτροσαλικυλικό οξύ, παρουσία NaOH και την ταυτόχρονη οξείδωση της γλυκόζης προς γλυκονικό οξύ. Κατά την παραπάνω αντίδραση παράγεται έγχρωμο προϊόν λόγω της οξείδωσης της γλυκόζης προς γλυκονικό οξύ.

Σε δοκιμαστικούς σωλήνες τοποθετήθηκε κατάλληλα αραιωμένο δείγμα (το υπερκείμενο από την πρώτη φυγοκέντρωση) σε ποσότητα 0,5ml, ενώ σε άλλους δυο δοκιμαστικούς σωλήνες τοποθετήθηκαν 0,5ml απιονισμένο νερό ως τυφλό δείγμα και προστέθηκαν 0,5ml αντιδραστήριου DNS. Τα δείγματα ανακινήθηκαν σε συσκευή Vortex και τοποθετήθηκαν σε υδατόλουτρο στους 100 °C για 5 λεπτά καλύπτοντας του δοκιμαστικούς

σωλήνες με αλουμινόχαρτο. Στη συνέχεια τα δείγματα ψύχθηκαν σε λεκάνη με παγωμένο νερό για 2-3 λεπτά σε σκοτεινό μέρος και έπειτα προστέθηκαν 5ml απιονισμένο νερό. Τέλος τα δείγματα αναδεύθηκαν σε συσκευή Vortex και φωτομετρήθηκαν. Το φωτόμετρο είχε προετοιμαστεί στα 540 nm και είχε μηδενιστεί με το τυφλό δείγμα.

2.5.3. Εκχύλιση του ενδοκυτταρικού ελαίου από την ξηρή βιομάζα και προσδιορισμός λιπιδίων

Σε ένα McCartney μεταφέρθηκε η ξηρή βιομάζα που φυλασσόταν σε eppendorf tube και ζυγίστηκε σε ζυγό ακριβείας. Στο McCartney προστέθηκε 2:1 χλωροφόρμιο-μεθανόλη (FOLCH) ($\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$, 2:1 (v/v)) μέχρι πλήρωσης και έμεινε σε σκοτεινό μέρος για τρεις μέρες. Έπειτα έγινε διήθηση σε σφαιρική φιάλη που πρώτα είχε τοποθετηθεί σε ξηραντήρα και είχε ζυγιστεί σε ζυγό ακριβείας. Για τη διήθηση έγινε χρήση ηθμού Whatman No 1 που τοποθετήθηκε σε γυάλινο χωνί. Μόλις ολοκληρώθηκε η διήθηση η σφαιρική φιάλη τοποθετήθηκε σε περιστροφικό θερμαινόμενο εξατμιστήρα (Rotavapor R-210, Buchi, Flawil, Switzerland) σε θερμοκρασία 39 °C υπό κενό ώστε να εξατμιστεί ο δαυλίτης. Στη συνέχεια μεταφέρθηκε σε αφυδατικό θάλαμο μέχρι να φτάσει σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και πραγματοποιήθηκε ζύγιση της σφαιρικής φιάλης σε ζυγό ακριβείας. Η διαφορά του βάρους αντιστοιχεί στο βάρος των λιπιδίων το οποίο εκφράζεται σε g/100g ξηρής βιομάζας (L/X, %).

2.5.4. Προσδιορισμός αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων

Για τον προσδιορισμό του αζώτου των ελευθέρων αμινομάδων (FREE AMINO NITROGEN, FAN) σε δοκιμαστικούς σωλήνες (δυο για κάθε και συγκέντρωση και δύο για κάθε δείγμα) προστέθηκαν 1ml από κατάλληλα αραιωμένα διαλύματα, ενώ σε άλλους δυο δοκιμαστικούς σωλήνες προστέθηκαν 1ml απιονισμένο νερό ως τυφλό δείγμα. Στη συνέχεια 0.5ml αντιδραστηρίου χρώσης προστέθηκαν σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα και αναδεύθηκαν ελαφρώς. Τα δείγματα καλύφθηκαν με αλουμινόχαρτο ώστε να αποφευχθεί η εξάτμιση και θερμάνθηκαν στους 100°C για 16 λεπτά σε υδατόλουτρο. Μετά το βρασμό τα δείγματα ψύχθηκαν σε λεκάνη με νερό και πάγο για 20 λεπτά σε σκοτεινό μέρος. Έπειτα στα δείγματα προστέθηκαν 2.5ml αντιδραστηρίου αραιώσης και αναδεύθηκαν σε συσκευή Vortex για 20 δευτερόλεπτα. Προετοιμάστηκε το φωτόμετρο στα 570 nm και μηδενίστηκε με το τυφλό δείγμα. Τέλος μετρήθηκαν οι απορροφήσεις των δειγμάτων γνωστής συγκέντρωσης FAN. Με

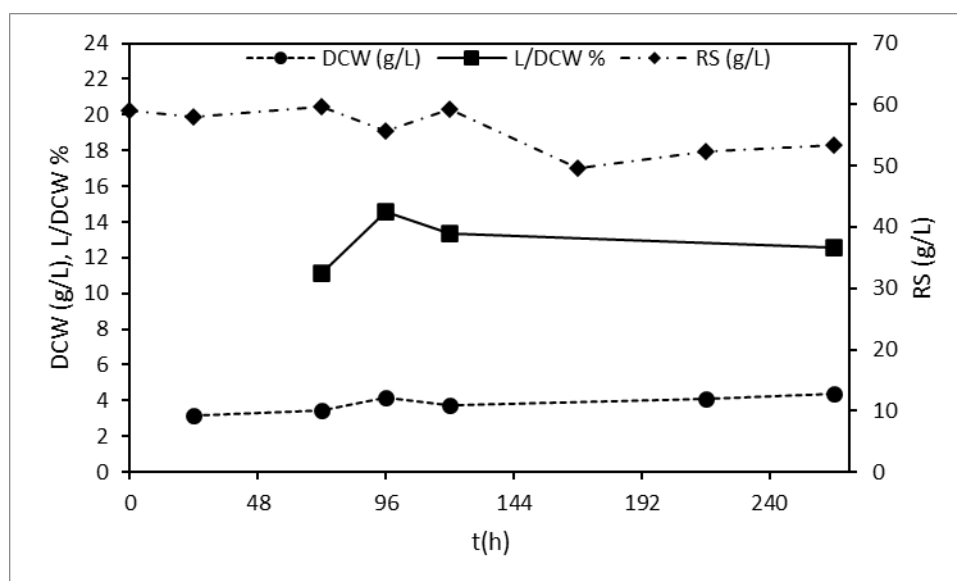
το μέσο όρο των απορροφήσεων γνωστής συγκέντρωσης FAN κατασκευάστηκε πρότυπη καμπύλη μέσω της εξίσωσης πρότυπης FAN. Σε περίπτωση που η λαμβανόμενη απορρόφηση του αγνώστου δείγματος ήταν μεγαλύτερη από την απορρόφηση της πρότυπης καμπύλης πραγματοποιήθηκε μεγαλύτερη αραίωση ώστε να ληφθεί μέτρηση εντός των ορίων απορρόφησης των προτύπων διαλυμάτων.

3. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1. Καλλιέργεια της ζύμης *Rhododsporidium toruloides* σε δευτερογενή ορό γάλακτος

3.1.1. Καλλιέργεια της ζύμης *Rhododsporidium toruloides* σε δευτερογενή ορό γάλακτος

Αρχικά η ζύμη *R. toruloides* καλλιεργήθηκε στο υπόστρωμα που περιείχε δευτερογενή ορό γάλακτος συγκέντρωσης σε λακτόζη 51,61 g/L, yeast extract 0,68 g/L και peptone 0,34 g/L, με τελική συγκέντρωση σε Free Amino Nitrogen 115,03 mg/L. Εξετάστηκε η ικανότητα του μικροοργανισμού να αναπτύσσεται και να παράγει λιπίδια στο συγκεκριμένο θρεπτικό. Στο



διάγραμμα 1 παρουσιάζεται η κινητική αύξηση του *R. toruloides* στο συγκεκριμένο υπόστρωμα.

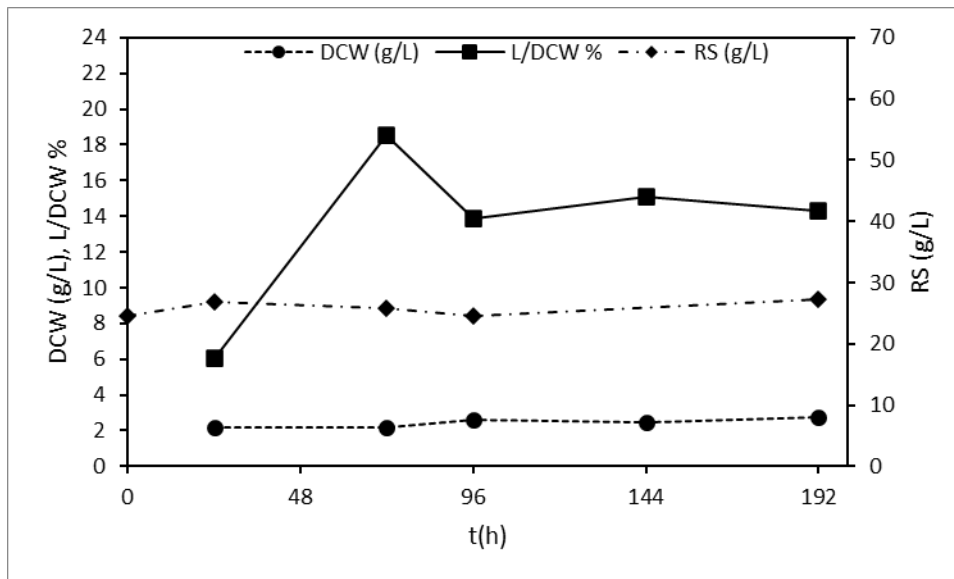
Διάγραμμα 1: Κινητική αύξηση του *Rhododsporidium toruloides* καλλιεργούμενου σε δευτερογενή ορό γάλακτος. DCW: ξηρή βιομάζα (g/L), L/DCW %: ποσοστό λιπιδίων επί της ξηρής βιομάζας (% w/w), R.S.: ανάγοντα σάκχαρα (g/L).

Η αρχική συγκέντρωση σακχάρων στις 0 ώρες ήταν 59 g/L, μέγιστη κατανάλωση σημειώθηκε στις 216 ώρες όπου η συγκέντρωση μειώθηκε σε 52,23 g/L. Μέγιστη συσσώρευση λιπιδίων σημειώθηκε στις 96 ώρες με ποσοστό 14,54% w/w επί της ξηρής βιομάζας. Η μέγιστη παραγωγή βιομάζας σημειώθηκε στις 264 ώρες με συγκέντρωση ξηρής βιομάζας 4,40 g/L.

Σε όλες τις καλλιέργειες που περιείχαν το συγκεκριμένο υπόστρωμα διαπιστώθηκε δυσάρεστη οσμή.

3.1.2. Καλλιέργεια της ζύμης *Rhododsporidium toruloides* σε δευτερογενή ορό γάλακτος αραιωμένο κατά το ήμισυ.

Η ζύμη *R. toruloides* καλλιεργήθηκε στο υπόστρωμα που περιείχε δευτερογενή ορό γάλακτος αραιωμένο κατά το ήμισυ με απιονισμένο νερό, συγκέντρωση σε λακτόζη 25,805 g/L, yeast extract 0,484 g/L και peptone 0,242 g/L. Εξετάστηκε η ικανότητα του μικροοργανισμού να αναπτύσσεται και να παράγει λιπίδια στο συγκεκριμένο θρεπτικό. Στο διάγραμμα 2 παρουσιάζεται η κινητική αύξηση του *R. toruloides* στο συγκεκριμένο υπόστρωμα.



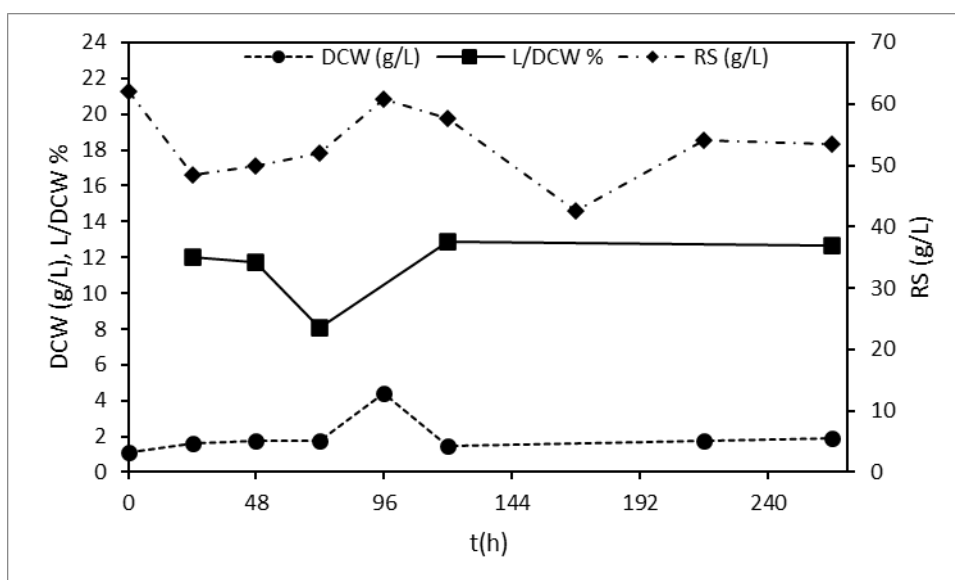
Διάγραμμα 2: Κινητική αύξηση του *Rhododsporidium toruloides* καλλιεργούμενου σε δευτερογενή ορό γάλακτος, αραιωμένου κατά το ήμισυ. DCW: ξηρή βιομάζα (g/L), L/DCW %: ποσοστό λιπιδίων επί της ξηρής βιομάζας (% w/w), R.S.: ανάγοντα σάκχαρα (g/L).

Μέγιστη παραγωγή βιομάζας σημειώθηκε στις 192 ώρες με συγκέντρωση ξηρής βιομάζας 2,71 g/L. Στις 144 ώρες παρατηρήθηκε η μέγιστη συσσώρευση λιπιδίων με ποσοστό 15,09% w/w επί της ξηρής βιομάζας. Σε όλες τις καλλιέργειες που περιείχαν το συγκεκριμένο υπόστρωμα διαπιστώθηκε δυσάρεστη οσμή.

3.2. Καλλιέργεια της ζύμης *Rhododsporidium toruloides* σε προσομοίωση δευτερογενή ορού γάλακτος

3.2.1. Καλλιέργεια της ζύμης *Rhododsporidium toruloides* σε προσομοίωση δευτερογενή ορού γάλακτος

Η ζύμη *R. toruloides* καλλιεργήθηκε στο υπόστρωμα προσομοίωσης δευτερογενούς ορού γάλακτος, με πηγή άνθρακα λακτόζη, πηγή αζώτου yeast extract 2,125 g/L και peptone 1 g/L, με τελική συγκέντρωση σε Free Amino Nitrogen 110 mg/L. Εξετάστηκε η ικανότητα του μικροοργανισμού να αναπτύσσεται και να παράγει λιπίδια στο συγκεκριμένο θρεπτικό. Στο διάγραμμα 3 παρουσιάζεται η κινητική αύξηση του *R. toruloides* στο συγκεκριμένο υπόστρωμα.

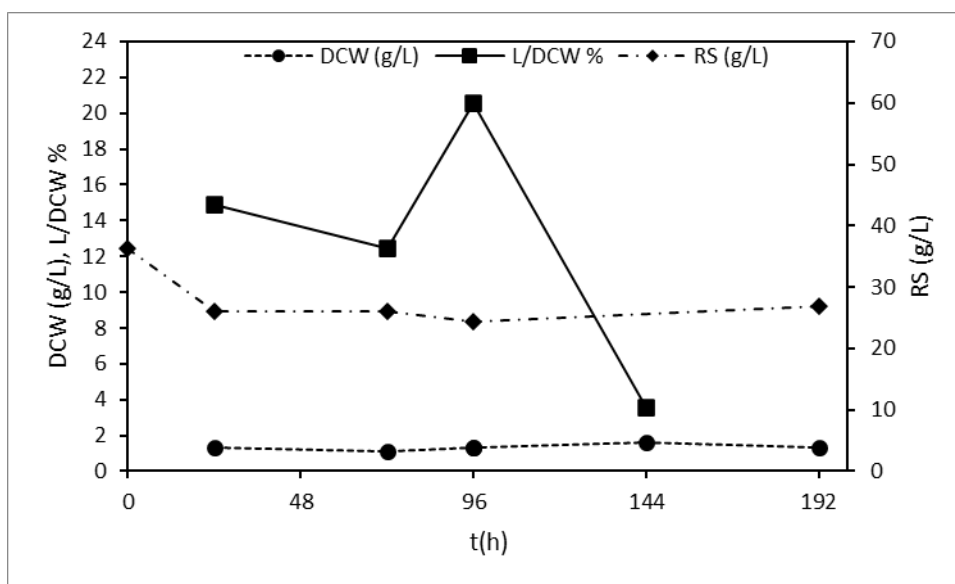


Διάγραμμα 3: Κινητική αύξηση του *Rhododsporidium toruloides* καλλιεργούμενου σε προσομοίωση δευτερογενούς ορού γάλακτος. DCW: ξηρή βιομάζα (g/L), L/DCW %: ποσοστό λιπιδίων επί της ξηρής βιομάζας (% w/w), R.S.: ανάγοντα σάκχαρα (g/L).

Μέγιστη κατανάλωση σακχάρων πραγματοποιήθηκε στις 24 ώρες όπου η συγκέντρωση μειώθηκε από 62 g/L σε 48,45 g/L. Μέγιστη παραγωγή βιομάζας σημειώθηκε στις 264 ώρες με συγκέντρωση 1,89 g/L. Στις 120 ώρες παρατηρήθηκε η μέγιστη συσσώρευση λιπιδίων με ποσοστό 12,88 % w/w επί της ξηρής βιομάζας.

3.2.2. Καλλιέργεια της ζύμης *Rhododsporidium toruloides* σε προσομοίωση δευτερογενή ορού γάλακτος με συγκέντρωση σε λακτόζη 25,805 g/L

Η ζύμη *R. toruloides* καλλιεργήθηκε στο υπόστρωμα που περιείχε προσομοίωση δευτερογενή ορού γάλακτος συγκέντρωσης σε λακτόζη 25,805 g/L, yeast extract 1 g/L και peptone 0,5 g/L. Εξετάστηκε η ικανότητα του μικροοργανισμού να αναπτύσσεται και να παράγει λιπίδια στο συγκεκριμένο θρεπτικό. Στο διάγραμμα 4 παρουσιάζεται η κινητική αύξηση του *R. toruloides* στο συγκεκριμένο υπόστρωμα.



Διάγραμμα 4: Κινητική αύξηση του *Rhododsporidium toruloides* καλλιεργούμενου σε προσομοίωση δευτερογενούς ορού γάλακτος, αραιωμένου κατά το ήμισυ. DCW: ξηρή βιομάζα (g/L), L/DCW %: ποσοστό λιπιδίων επί της ξηρής βιομάζας (% w/w), R.S.: ανάγοντα σάκχαρα (g/L).

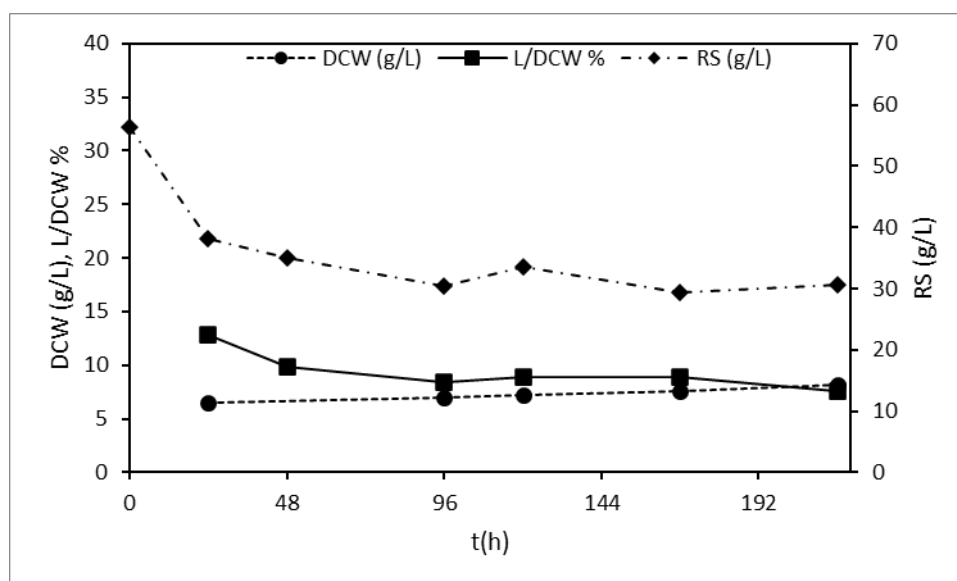
Μέγιστη κατανάλωση σακχάρων πραγματοποιήθηκε στις 72 ώρες όπου η συγκέντρωση μειώθηκε από 36,36 g/L σε 25,99 g/L. Μέγιστη παραγωγή βιομάζας σημειώθηκε στις 192 ώρες με συγκέντρωση 1,64 g/L.

Σε όλες τις καλλιέργειες που περιείχαν το συγκεκριμένο υπόστρωμα διαπιστώθηκε δυσάρεστη οσμή.

3.3. Καλλιέργεια της ζύμης *Rhododsporidium toruloides* σε στερεό παραπροϊόν ζυθοποιίας

3.3.1. Καλλιέργεια της ζύμης *Rhododsporidium toruloides* σε στερεό παραπροϊόν ζυθοποιίας

Η ζύμη *R. toruloides* καλλιεργήθηκε στο υπόστρωμα BSG. Εξετάστηκε η ικανότητα του μικροοργανισμού να αναπτύσσεται και να παράγει λιπίδια στο συγκεκριμένο θρεπτικό. Στο διάγραμμα 5 παρουσιάζεται η κινητική αύξηση του *R. toruloides* στο συγκεκριμένο υπόστρωμα.



Διάγραμμα 5: Κινητική αύξηση του *Rhododsporidium toruloides* καλλιεργούμενου σε BSG.

DCW: ξηρή βιομάζα (g/L), L/DCW %: ποσοστό λιπιδίων επί της ξηρής βιομάζας (% w/w),

R.S.: ανάγοντα σάκχαρα (g/L).

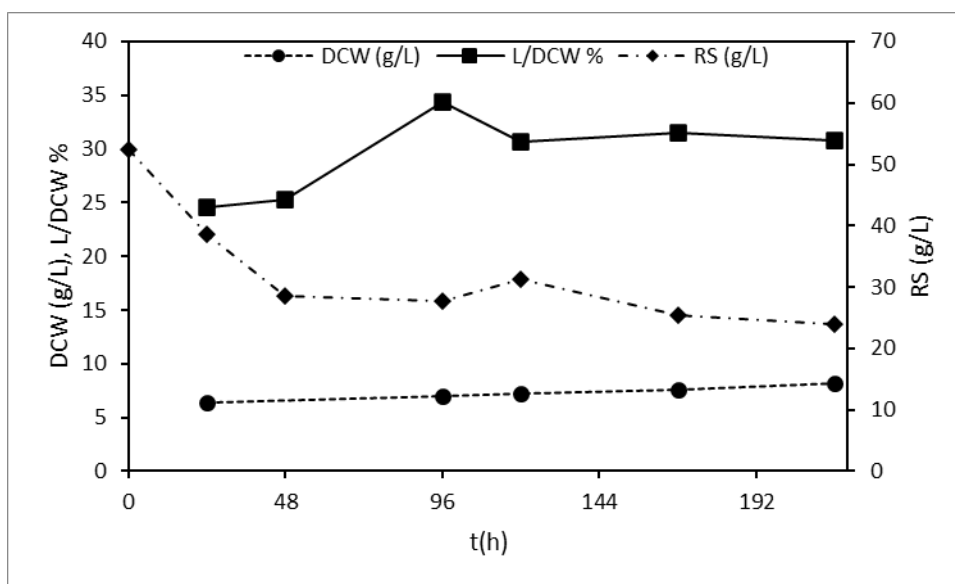
Σημειώθηκε σταδιακή κατανάλωση σακχάρων μέχρι τις 96 ώρες με μέγιστη κατανάλωση στις 168 ώρες όπου η συγκέντρωση των σακχάρων μειώθηκε από 56,36 g/L σε 29,38 g/L.

Μέγιστη παραγωγή βιομάζας παρατηρήθηκε στις 216 ώρες με συγκέντρωση 8,22 g/L.

Μέγιστη συσσώρευση λιπιδίων παρατηρήθηκε στις 120 ώρες με ποσοστό 8.93 % w/w επί της ξηρής βιομάζας.

3.3.2. Καλλιέργεια της ζύμης *Rhododsporidium toruloides* σε στερεό παραπροϊόν ζυθοποιίας εμπλουτισμένο με πηγή αζώτου.

Η ζύμη *R. toruloides* καλλιεργήθηκε στο υπόστρωμα στερεό παραπροϊόν ζυθοποιίας, εμπλουτισμένο με yeast extract 0,68 g/L και peptone 0,34 g/L. Εξετάστηκε η ικανότητα του μικροοργανισμού να αναπτύσσεται και να παράγει λιπίδια στο συγκεκριμένο θρεπτικό. Στο διάγραμμα 6 παρουσιάζεται η κινητική αύξηση του *R. toruloides* στο συγκεκριμένο υπόστρωμα.



Διάγραμμα 6: Κινητική αύξηση του *Rhododsporidium toruloides* καλλιεργούμενου σε BSG, εμπλουτισμένου με πηγή αζώτου. DCW: ξηρή βιομάζα (g/L), L/DCW %: ποσοστό λιπιδίων επί της ξηρής βιομάζας (% w/w), R.S.: ανάγοντα σάκχαρα (g/L).

Στις 24 ώρες η συγκέντρωση των σακχάρων μειώθηκε από 52,42 g/L σε 38,59 g/L και στις 216 ώρες η συγκέντρωση είχε μειωθεί σε 23,85 g/L. Μέγιστη παραγωγή βιομάζας παρατηρήθηκε στις 120 ώρες με συγκέντρωση 8,51g/L. Μέγιστη παραγωγή λιπιδίων παρατηρήθηκε στις 96 ώρες με ποσοστό 34,35 % w/w επί της ξηρής βιομάζας.

Σε όλες τις καλλιέργειες που περιείχαν το συγκεκριμένο υπόστρωμα διαπιστώθηκε δυσάρεστη οσμή.

4. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

4.1.Σχολιασμός αποτελεσμάτων και σύγκριση με άλλες μελέτες

Στη συγκεκριμένη εργασία έγινε προσπάθεια αξιοποίησης των αγροτοβιομηχανικών αποβλήτων δευτερογενή ορό γάλακτος και στερεό παραπροϊόν ζυθοποιίας μέσω ζύμωσης από την ελαιογόνο ζύμη *R. toruloides* προς παραγωγή ενδοκυτταρικών λιπιδίων και βιομάζας.

Τα μονοκυτταρικά έλαια (SCO) προσελκύουν μεγάλη προσοχή τα τελευταία χρόνια λόγω της προοπτικής τους ως λειτουργικά προϊόντα και πρώτες ύλες για την παραγωγή βιοντίζελ. Ωστόσο, το υψηλό κόστος ζύμωσης εμποδίζει την περαιτέρω εφαρμογή τους. Ως εκ τούτου, η χρήση διαφόρων χαμηλού κόστους, υποστρωμάτων για την παραγωγή SCO παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον. Τα λιγνοκυτταρινικά υποστρώματα (όπως το BSG) είναι η πιο διαθέσιμη και ανανεώσιμη πηγή στη φύση και μπορεί να είναι ιδανική πρώτη ύλη για παραγωγή SCO (Huang *et al.*, 2013) (Agrawal *et al.*, 2023).

Τα αναλωμένα σιτηρά ζυθοποιίας (BSG) είναι το υποπροϊόν που προκύπτει από τις βιομηχανίες ζυθοποιίας και αντιστοιχεί περίπου στο 85% του συνόλου των παραπροϊόντων. Τα τελευταία χρόνια έχει παρουσιαστεί αυξημένο επιστημονικό ενδιαφέρον για αυτό το απόβλητο ως προς την χρήση του σε βιοτεχνολογικές διεργασίες (Xiros & Christakopoulos, 2012). Ο δευτερογενής ορός γάλακτος (SCW), ένα από τα σημαντικότερα υποπροϊόντα της γαλακτοβιομηχανίας, παράγεται σε πολύ υψηλή και σταθερά αυξανόμενες ποσότητες. Λόγω του υψηλού οργανικού του φορτίου, η απόρριψή του απευθείας στο περιβάλλον είναι απαγορευτική. Η αξιοποίηση του SCW ως μέσου ανάπτυξης για την παραγωγή λιπιδίων ίσως είναι μια πολλά υποσχόμενη μέθοδος διαχείρισης αυτού του αποβλήτου (Carota *et al.*, 2017).

Στη συγκεκριμένη μελέτη χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος ελαιογόνης ζύμης *R. toruloides* σε υποστρώματα που περιείχαν ως πηγή άνθρακα BSG και SCW και εξετάστηκε η ικανότητα του μικροοργανισμού να αναπτύσσεται στα συγκεκριμένα υποστρώματα και να παράγει βιομάζα και SCO. Το *R. toruloides* έχει δείξει ικανότητα να παράγει ένα ευρύ φάσμα λιπαρών οξέων και μπορεί να συσσωρεύει λιπίδια σε ποσοστό περισσότερο από το 70% του ξηρού κυτταρικού τους βάρους και μπορεί να χρησιμοποιήσει διάφορες ενώσεις του άνθρακα ως πηγές ενέργειας (Wen *et al.*, 2020. Zhu *et al.*, 2012).

Η βιβλιογραφία που να περιγράφει χρήση του συγκεκριμένου μικροοργανισμού σε αυτά τα υποστρώματα είναι περιορισμένη και συγκεκριμένα για την ζύμωση υποστρωμάτων με λακτόζη ως πηγή άνθρακα τα αποτελέσματα δεν είναι ενθαρρυντικά.

Στην μελέτη των Fillet *et al.*, (2015) το *R. toruloides* φάνηκε να μην μπορεί να μεταβολίσει αποτελεσματικά τη γαλακτόζη. Στη μεταπτυχιακή μελέτη της Έλλη-Άννα Γ.

Σινάπη 2019 με θέμα «Επίδραση διαφόρων πηγών άνθρακα στην σύσταση λιπιδίων και δευτερογενών μεταβολικών προϊόντων» όταν το στέλεχος *R. toruloides* NNRL 27012 καλλιεργήθηκε σε υπόστρωμα γαλακτόζης με αρχική συγκέντρωση 61 g/L, παρουσίασε μέγιστη συσσώρευση λιπιδίων 1,44 g/L, και μέγιστη παραγωγή βιομάζας 16,22 g/L.

Στη μελέτη των Jagtap *et al.*, (2019) τα αποτελέσματα έδειξαν πως όταν κύτταρα του *R. toruloides* αναπτύχθηκαν σε υπόστρωμα 40 g/L γαλακτόζης φτωχό σε άζωτο το μέγιστο ξηρό βάρος κυττάρων ήταν 3,1 g/L και η περιεκτικότητα σε λιπίδια ήταν 45% w/w επί της ξηρής βιομάζας ενώ όταν το υπόστρωμα ήταν πλούσιο σε άζωτο, το μέγιστο ξηρό βάρος κυττάρων ήταν 10,5 g/L και η περιεκτικότητα σε λιπίδια 5% w/w επί της ξηρής βιομάζας.

Τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης μελέτης έδειξαν πως το *R. toruloides* δεν κατάφερε να αναπτυχθεί και να συσσωρεύσει ικανοποιητικό ποσοστό λιπιδίων σε κανένα από τα υποστρώματα που περιείχαν λακτόζη ως πηγή άνθρακα. Μέγιστη παραγωγή βιομάζας σημειώθηκε όταν ο μικροοργανισμός καλλιεργήθηκε σε θρεπτικό SCW με συγκέντρωση σε λακτόζη 51,61 g/L όπου η βιομάζα έφτασε τα 4,40 g/L στις 264 ώρες και τα λιπίδια ποσοστό 14,54% w/w επί της ξηρής βιομάζας στις 96 ώρες. Μέγιστη συσσώρευση λιπιδίων παρατηρήθηκε στο θρεπτικό με SCW συγκέντρωσης σε λακτόζη 25,805 g/L. Η μέγιστη παραγωγή βιομάζας σημειώθηκε στις 192 ώρες με συγκέντρωση ξηρής βιομάζας 2,71 g/L και στις 144 ώρες παρατηρήθηκε η μέγιστη συσσώρευση λιπιδίων με ποσοστό 15,09% w/w επί της ξηρής βιομάζας.

Στο τεχνητό θρεπτικό μέσω προσομοίωσης του SCW με συγκέντρωση σε λακτόζη 51,61 g/L η παραγωγή βιομάζας ήταν αρκετά μικρότερη σε σύγκριση με αυτή του SCW με μέγιστη συγκέντρωση ξηρής βιομάζας 1,89 g/L, στις 264 ώρες. Ενώ η παραγωγή των λιπιδίων δεν είχε σημαντική διαφορά συσσωρεύοντας μέγιστο ποσοστό 12,88% w/w επί της ξηρής βιομάζας στις 120 ώρες. Αυτή η διαφορά στην αύξηση της βιομάζας μπορεί να οφείλεται στην παρουσία χημικών ενώσεων που συναντώνται στο SCW και είχαν θετική επίδραση στην καλλιέργεια όπως πρωτεΐνες (κυρίως σε μετουσιωμένη κατάσταση), διαλυτά πεπτίδια, ολιγοσακχαρίτες, μη πρωτεϊνικό άζωτο, υδροδιαλυτές βιταμίνες καθώς και μια ποικιλία από μέταλλα και ελεύθερα αμινοξέα (Pires *et al.*, 2021). Στο τεχνητό θρεπτικό μέσω προσομοίωσης του SCW με συγκέντρωση σε λακτόζη 25,805 g/L η μέγιστη παραγωγή βιομάζας σημειώθηκε στις 192 ώρες με συγκέντρωση 1,64 g/L.

Τα αποτελέσματα της προσομοίωσης φαίνεται να συμφωνούν με αυτά της μεταπτυχιακής μελέτης της Έλλη-Άννα Γ. Σινάπη 2019. Στα αποτελέσματα των Jagtap *et al.*, (2019) αν και η παραγωγή βιομάζας ήταν αρκετά κοντά με τη βιομάζα της καλλιέργειας με SCW η παραγωγή λιπιδίων ήταν σημαντικά υψηλότερη στο θρεπτικό με μειωμένο άζωτο

(αναμενόμενο βάσει την βιβλιογραφία των ελαιογόνων), κάτι τέτοιο δεν συνέβη στην παρούσα μελέτη. Πιθανός η πηγή άνθρακα δεν μεταβολίστηκε με την ίδια αποτελεσματικότητα ή η συγκέντρωση του αζώτου έπρεπε να υπάρχει σε χαμηλότερα επίπεδα.

Σχετικά με το BSG, στην έρευνα των Cooray *et al.*, (2017) το BSG βρέθηκε ότι μπορεί να υποστηρίξει την ανάπτυξη του *R. toruloides*. Όταν ο μικροοργανισμός καλλιεργήθηκε σε ζυμωμένο BSG στο οποίο προστέθηκε 2% w/w γλυκόζη, τα αποτελέσματα έδειξαν μέγιστη παραγωγή λιπαρών οξέων 7,03 g/L, 35.31 % w/w επί της ξηρής βιομάζας και μέγιστη παραγωγή βιομάζας 19,90 g/L. Ενώ όταν ο μικροοργανισμός καλλιεργήθηκε σε μη ζυμωμένο BSG η μέγιστη παραγωγή λιπαρών οξέων ήταν 1.69 g/L, 22.18% w/w επί της ξηρής βιομάζας και μέγιστη παραγωγή βιομάζας 7,6 g/L.

Στην έρευνα των Patel *et al.*, (2018) η ζύμη *R. toruloides* καλλιεργήθηκε σε προεπεξεργασμένο υδρόλυμα από BSG το οποίο είχε υποστεί ενζυματική σακχαροποίηση ώστε να προκύψει τελικό προϊόν με συγκέντρωση γλυκόζης 46,45 g/L και ξυλόζης 25,15 g/L με αναλογία C/N 500. Τα αποτελέσματα έδειξαν μέγιστη παραγωγή βιομάζας 18,44 g/L και μέγιστη παραγωγή λιπιδίων 10,41 g/L, 56,45 % w/w επί της ξηρής βιομάζας περιεκτικότητα σε λιπίδια.

Στην έρευνα των Patel *et al.*, (2015) το στέλεχος ζύμης *Rhodosporidium kratochvilovae* HIMPA1 καλλιεργήθηκε σε θρεπτικό υλικό με πηγή άνθρακα υδατικό εκχύλισμα πολτού φρούτου *Cassia fistula* L (CAE). Το συγκεκριμένο παραπροϊόν αποτελεί λιγνοκυτταρινική βιομάζα παρόμοιας σύστασης υδατανθράκων με το BSG. Τα αποτελέσματα έδειξαν συσσώρευση λιπιδίων 53,18% w/w επί της ξηρής βιομάζας και μέγιστη παραγωγή βιομάζας 9,13 g/L.

Στη συγκεκριμένη μελέτη όταν το *R. toruloides* καλλιεργήθηκε σε θρεπτικό με ακατέργαστο BSG ως μοναδική πηγή άνθρακα παρατηρήθηκε σταδιακή κατανάλωση των σακχάρων μέχρι της 96 ώρες όπου και σημειώθηκε μείωση από 56.36 g/L της αρχικής συγκέντρωσης σακχάρων (κυρίως γλυκόζη) σε 30,31 g/L στη συνέχεια η κατανάλωση δεν συνεχίστηκε έως και τις 216 ώρες. Η μέγιστη παραγωγή βιομάζας σημειώθηκε στις 216 ώρες και ήταν 8,22 g/L και η μέγιστη συσσώρευση λιπιδίων παρατηρήθηκε στις 120 ώρες σε ποσοστό 8.93 % w/w επί της ξηρής βιομάζας. Όταν ο μικροοργανισμός καλλιεργήθηκε στο ίδιο υπόστρωμα εμπλουτισμένο με yeast extract 0,68 g/L και peptone 0,34 g/L, τα αποτελέσματα έδειξαν αυξημένη κατανάλωση σακχάρων και συσσώρευση λιπιδίων. Η μεγαλύτερη κατανάλωση σακχάρων πραγματοποιήθηκε τις πρώτες 24 ώρες όπου η συγκέντρωση μειώθηκε από 52,42 g/L σε 38,59 g/L, ωστόσο ο μικροοργανισμός συνέχισε να καταναλώνει μέχρι και τις 216 ώρες όπου η συγκέντρωση είχε μειωθεί σε 23,85 g/L. Μέγιστη

παραγωγή βιομάζα παρατηρήθηκε στις 120 ώρες με συγκέντρωση 8,51g/L και δεν σημειώθηκε περαιτέρω αύξηση. Μέγιστη παραγωγή λιπιδίων παρατηρήθηκε στις 96 ώρες με ποσοστό 34,35 % w/w επί της ξηρής βιομάζας και στη συνέχεια η συσσώρευση φαίνεται να μην συνεχίζεται. Η προσθήκη yeast extract και peptone στο θρεπτικό φαίνεται να ευνόησαν την παραγωγή και συσσώρευση λιπιδίων. Τα αποτελέσματα από την καλλιέργεια σε BSG εμπλουτισμένο με yeast extract και peptone φαίνεται να συμφωνούν με τα αποτελέσματα των Cooray *et al.*, (2017) ως προς την παραγωγή βιομάζας στην περίπτωση που ο μικροοργανισμός καλλιεργήθηκε σε μη ζυμωμένο BSG αλλά και στην περίπτωση που ο μικροοργανισμός καλλιεργήθηκε σε ζυμωμένο BSG ως προς την συσσώρευση λιπιδίων. Σε σύγκριση με την υπόλοιπη βιβλιογραφία τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης αποκλίνουν τόσο στην παραγωγή βιομάζας όσο και στην συσσώρευση λιπιδίων. Αυτό μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι δεν προηγήθηκε προ επεξεργασία του BSG ώστε να απελευθερωθούν περισσότερα ανάγοντα σάκχαρα (Mitri *et al.*, 2022. Ravindran *et al.*, 2018)

Σε όλες τις καλλιέργειες που περιείχαν SCW και BSG ως υπόστρωμα διαπιστώθηκε δυσάρεστη οσμή χωρίς να έχει υπάρξει επιμόλυνση από βακτήρια ή άλλο μικροοργανισμό. Πιθανολογούμε πως αυτό οφείλεται στην παραγωγή σκατόλης 3-μέθυλοινδόλης (Skatole, 3-methylindole) από το *R. toruloides*. Στην έρευνα των Nutaratat *et al.*, (2016) το στέλεχος ζύμης *Rhodospiridium paludigenum* βρέθηκε ότι παρήγαγε 3-μεθυλινδόλη όταν αυτό καλλιεργήθηκε σε υπόστρωμα που περιείχε συγκεντρώσεις 2% σακχαρόζη, 0,1% yeast extract και 0,1 % 1-τρυπτοφάνη. Το BSG και το SCW είναι πλούσια σε αμινοξέα και η τρυπτοφάνη είναι ένα αμινοξύ που μπορούμε να συναντήσουμε στα συγκεκριμένα υποστρώματα (Yadav *et al.*, 2015. Robertson *et al.*, 2010) και ίσως ευθύνεται για την παραγωγή της 3-μέθυλοινδόλης. Η 3-μεθυλινδόλη είναι μια οργανική ένωση που ανήκει στην οικογένεια των ινδολών. Παράγεται κυρίως από βακτήρια και είναι προϊόν της μικροβιακής αποδόμησης του ινδολο-3-οξικού οξέος (Indole-3-acetic acid) (IAA). Η τρυπτοφάνη αποτελεί πρόδρομος για τη βιοσύνθεση του IAA (Nutaratat *et al.*, 2016).

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Βιβλιογραφία

- Agrawal, D., Gopaliya, D., Willoughby, N., Khare, S. K., & Kumar, V. (2023). Recycling potential of brewer's spent grains for circular biorefineries. In *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry* (Vol. 40). Elsevier B.V.
<https://doi.org/10.1016/j.cogsc.2022.100748>
- Aliyu, S., & Bala, M. (2011). Brewer's spent grain: A review of its potentials and applications. *African Journal of Biotechnology*, 10(3), 324–331.
<https://doi.org/10.5897/AJBx10.006>
- André, A., Chatzifragkou, A., Diamantopoulou, P., Sarris, D., Philippoussis, A., Galiotou-Panayotou, M., Komaitis, M., & Papanikolaou, S. (2009). Biotechnological conversions of bio-dieselderived crude glycerol by *Yarrowia lipolytica* strains. *Engineering in Life Sciences*, 9(6), 468–478. <https://doi.org/10.1002/elsc.200900063>
- Arous, F., Jaouani, A., & Mechichi, T. (2019). Oleaginous microorganisms for simultaneous biodiesel production and wastewater treatment: A review. In *Microbial Wastewater Treatment* (pp. 153–174). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816809-7.00008-7>
- Asunis, F., de Gioannis, G., Dessì, P., Isipato, M., Lens, P. N. L., Muntoni, A., Polettini, A., Pomi, R., Rossi, A., & Spiga, D. (2020). The dairy biorefinery: Integrating treatment processes for cheese whey valorisation. In *Journal of Environmental Management* (Vol. 276). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2020.111240>
- Athenstaedt, K., Jolivet, P., Boulard, C., Zivy, M., Negroni, L., Nicaud, J. M., & Chardot, T. (2006). Lipid particle composition of the yeast *Yarrowia lipolytica* depends on the carbon source. *Proteomics*, 6(5), 1450–1459. <https://doi.org/10.1002/pmic.200500339>

- Bartolomé, B., Gómez-Cordovés, C., Sancho, A. I., Díez, N., Ferreira, P., Soliveri, J., & Copa-Patiño, J. L. (2003). Growth and release of hydroxycinnamic acids from Brewer's spent grain by *Streptomyces avermitilis* CECT 3339. In *Enzyme and Microbial Technology* (Vol. 32). [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(02\)00277-6](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(02)00277-6)
- Bellou, S., & Aggelis, G. (2012). Biochemical activities in *Chlorella* sp. and *Nannochloropsis salina* during lipid and sugar synthesis in a lab-scale open pond simulating reactor. *Journal of Biotechnology*, 164(2), 318–329.
<https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2013.01.010>
- Bellou, S., Baeshen, M. N., Elazzazy, A. M., Aggeli, D., Sayegh, F., & Aggelis, G. (2014). Microalgal lipids biochemistry and biotechnological perspectives. In *Biotechnology Advances* (Vol. 32, Issue 8, pp. 1476–1493). Elsevier Inc.
<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2014.10.003>
- Bellou, S., Triantaphyllidou, I. E., Aggeli, D., Elazzazy, A. M., Baeshen, M. N., & Aggelis, G. (2016). Microbial oils as food additives: Recent approaches for improving microbial oil production and its polyunsaturated fatty acid content. In *Current Opinion in Biotechnology* (Vol. 37, pp. 24–35). Elsevier Ltd.
<https://doi.org/10.1016/j.copbio.2015.09.005>
- Bogar, B., Szakacs, G., Tengerdy, R. P., Linden, J. C., & Pandey, A. A. (2002). Production of α -Amylase with *A. oryzae* on SBG 453 Production of α -Amylase with *Aspergillus oryzae* on Spent Brewing Grain by Solid Substrate Fermentation. In *Applied Biochemistry and Biotechnology* (Vol. 102). <https://doi.org/10.1385/ABAB:102-103:1-6:453>
- Bommareddy, R. R., Sabra, W., Maheshwari, G., & Zeng, A. P. (2015). Metabolic network analysis and experimental study of lipid production in *Rhododsporidium toruloides* grown on single and mixed substrates. *Microbial Cell Factories*, 14(1).
<https://doi.org/10.1186/s12934-015-0217-5>

- Buffington, J. (2014). The Economic Potential of Brewer's Spent Grain (BSG) as a Biomass Feedstock. *Advances in Chemical Engineering and Science*, 04(03), 308–318.
<https://doi.org/10.4236/aces.2014.43034>
- Capus, A., Monnerat, M., Ribeiro, L. C., de Souza, W., Martins, J. L., & Sant'Anna, C. (2016). Application of high-content image analysis for quantitatively estimating lipid accumulation in oleaginous yeasts with potential for use in biodiesel production. *Bioresource Technology*, 203, 309–317.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.12.067>
- Carota, E., Crognale, S., D'Annibale, A., Gallo, A. M., Stazi, S. R., & Petruccioli, M. (2017). A sustainable use of Ricotta Cheese Whey for microbial biodiesel production. *Science of the Total Environment*, 584–585, 554–560.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.01.068>
- Carsanba, E., Papanikolaou, S., & Erten, H. (2018). Production of oils and fats by oleaginous microorganisms with an emphasis given to the potential of the nonconventional yeast *Yarrowia lipolytica*. In *Critical Reviews in Biotechnology* (Vol. 38, Issue 8, pp. 1230–1243). Taylor and Francis Ltd. <https://doi.org/10.1080/07388551.2018.1472065>
- Carvalho, F., Duarte, L. C., Lopes, S., Parajó, J. C., Pereira, H., & Gírio, F. M. (2005). Evaluation of the detoxification of brewery's spent grain hydrolysate for xylitol production by *Debaryomyces hansenii* CCMI 941. *Process Biochemistry*, 40(3–4), 1215–1223. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2004.04.015>
- Carvalho, F., Prazeres, A. R., & Rivas, J. (2013). Cheese whey wastewater: Characterization and treatment. In *Science of the Total Environment* (Vols. 445–446, pp. 385–396).
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.12.038>
- Casas-Godoy, L., González-Escobar, J. L., Mathis, A. G., & Barrera-Martínez, I. (2023). Revalorization of untreated Brewer's spent grain: novel and versatile feedstock to

- produce cellulases, lipases, and yeast biomass in a biorefinery approach. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 13(3), 1659–1670. <https://doi.org/10.1007/s13399-020-01157-3>
- Castañeda, M. T., Nuñez, S., Garelli, F., Voget, C., & de Battista, H. (2018). Comprehensive analysis of a metabolic model for lipid production in *Rhododsporidium toruloides*. *Journal of Biotechnology*, 280, 11–18. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2018.05.010>
- Certik, M. and Shimizu, S. (1999) ‘Biosynthesis and regulation of microbial polyunsaturated fatty acid production’, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 87(1), pp. 1–14. [https://doi:10.1016/s1389-1723\(99\)80001-2](https://doi:10.1016/s1389-1723(99)80001-2).
- Chew, K. W., Chia, S. R., Show, P. L., Ling, T. C., & Chang, J. S. (2018). Biofuels from microbial lipids. In *Green Energy and Technology* (Vol. 0, Issue 9789811076763, pp. 359–388). Springer Verlag. https://doi.org/10.1007/978-981-10-7677-0_9
- Cho, H. U., & Park, J. M. (2018). Biodiesel production by various oleaginous microorganisms from organic wastes. In *Bioresource Technology* (Vol. 256, pp. 502–508). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.02.010>
- Cooray, S. T., Lee, J. J. L., & Chen, W. N. (2017). Evaluation of brewers’ spent grain as a novel media for yeast growth. *AMB Express*, 7(1). <https://doi.org/10.1186/s13568-017-0414-1>
- Dourou, M., Mizerakis, P., Papanikolaou, S., & Aggelis, G. (2017). Storage lipid and polysaccharide metabolism in *Yarrowia lipolytica* and *Umbelopsis isabellina*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101(19), 7213–7226. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8455-6>

- Ezeonu, F. C., & Okaka, A. N. C. (1996). Process Kinetics and Digestion Efficiency of Anaerobic Batch Fermentation of Brewer's Spent Grains (BSG). In *Process Biochemistry* (Vol. 3, Issue 1). [https://doi.org/10.1016/0032-9592\(94\)00064-6](https://doi.org/10.1016/0032-9592(94)00064-6)
- Fakas, S., Galiotou-Panayotou, M., Papanikolaou, S., Komaitis, M., & Aggelis, G. (2007). Compositional shifts in lipid fractions during lipid turnover in *Cunninghamella echinulata*. *Enzyme and Microbial Technology*, 40(5), 1321–1327. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2006.10.005>
- Fakas, S., Makri, A., Mavromati, M., Tselepi, M., & Aggelis, G. (2009). Fatty acid composition in lipid fractions lengthwise the mycelium of *Mortierella isabellina* and lipid production by solid state fermentation. *Bioresource Technology*, 100(23), 6118–6120. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.06.015>
- Fillet, S., Gibert, J., Suárez, B., Lara, A., Ronchel, C., & Adrio, J. L. (2015). Fatty alcohols production by oleaginous yeast. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 42(11), 1463–1472. <https://doi.org/10.1007/s10295-015-1674-x>
- Francis, F., Sabu, A., Nampoothiri, K. M., Szakacs, G., & Pandey, A. (2002). Synthesis of α -amylase by *Aspergillus oryzae* in solid-state fermentation. [https://doi.org/10.1002/1521-4028\(200210\)42:5<320::AID-JOBM320>3.0.CO;2-6](https://doi.org/10.1002/1521-4028(200210)42:5<320::AID-JOBM320>3.0.CO;2-6)
- Huang, C., Chen, X. fang, Xiong, L., Chen, X. de, Ma, L. long, & Chen, Y. (2013). Single cell oil production from low-cost substrates: The possibility and potential of its industrialization. In *Biotechnology Advances* (Vol. 31, Issue 2, pp. 129–139). <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2012.08.010>
- Jagtap, S. S., Bedekar, A. A., Liu, J. J., Jin, Y. S., & Rao, C. v. (2019). Production of galactitol from galactose by the oleaginous yeast *Rhododsporidium toruloides*

IFO0880. *Biotechnology for Biofuels*, 12(1). <https://doi.org/10.1186/s13068-019-1586-5>

Kim, S., Lee, D., Lim, D., Lim, S., Park, S., Kang, C., Yu, J., & Lee, T. (2020). Paramylon production from heterotrophic cultivation of *Euglena gracilis* in two different industrial byproducts: Corn steep liquor and brewer's spent grain. *Algal Research*, 47. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.101826>

Kumar Awasthi, M., Paul, A., Kumar, V., Sar, T., Kumar, D., Sarsaiya, S., Liu, H., Zhang, Z., Binod, P., Sindhu, R., Kumar, V., & Taherzadeh, M. J. (2022). Recent trends and developments on integrated biochemical conversion process for valorization of dairy waste to value added bioproducts: A review. In *Bioresource Technology* (Vol. 344). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126193>

Kumar, L. R., Kaur, R., Yellapu, S. K., Zhang, X., & Tyagi, R. D. (2019). Biodiesel production from oleaginous microorganisms with wastes as raw materials. In *Biomass, Biofuels, Biochemicals: Biofuels: Alternative Feedstocks and Conversion Processes for the Production of Liquid and Gaseous Biofuels* (pp. 661–690). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816856-1.00027-0>

Leman, J. (1997). *Oleaginous Microorganisms: An Assessment of the Potential*. Znstitute of Food Biotechnology University of Agriculture and Technology 10-724 Olsztyn, Poland. [https://doi.org/10.1016/S0065-2164\(08\)70226-0](https://doi.org/10.1016/S0065-2164(08)70226-0)

Lynch, K. M., Steffen, E. J., & Arendt, E. K. (2016). Brewers' spent grain: a review with an emphasis on food and health. In *Journal of the Institute of Brewing* (Vol. 122, Issue 4, pp. 553–568). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1002/jib.363>

Meng, X., Yang, J., Xu, X., Zhang, L., Nie, Q., & Xian, M. (2009). Biodiesel production from oleaginous microorganisms. In *Renewable Energy* (Vol. 34, Issue 1, pp. 1–5). Elsevier BV. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2008.04.014>

- Mitri, S., Salameh, S. J., Khelifa, A., Leonard, E., Maroun, R. G., Louka, N., & Koubaa, M. (2022). Valorization of Brewers' Spent Grains: Pretreatments and Fermentation, a Review. In *Fermentation* (Vol. 8, Issue 2). MDPI.
<https://doi.org/10.3390/fermentation8020050>
- Mollea, C., Marmo, L., & Bosco, F. (2013). Valorisation of Cheese Whey, a By-Product from the Dairy Industry. In *Food Industry. InTech*. <https://doi.org/10.5772/53159>
- Mussatto, S. I. (2014). Brewer's spent grain: A valuable feedstock for industrial applications. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94(7), 1264–1275.
<https://doi.org/10.1002/jsfa.6486>
- Mussatto, S. I., & Roberto, I. C. (2005). Acid hydrolysis and fermentation of brewer's spent grain to produce xylitol. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85(14), 2453–2460. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2276>
- Mussatto, S. I., & Roberto, I. C. (2008). Establishment of the optimum initial xylose concentration and nutritional supplementation of brewer's spent grain hydrolysate for xylitol production by *Candida guilliermondii*. *Process Biochemistry*, 43(5), 540–546.
<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2008.01.013>
- Mussatto, S. I., Dragone, G., & Roberto, I. C. (2005). Kinetic behavior of *Candida guilliermondii* yeast during xylitol production from brewer's spent grain hemicellulosic hydrolysate. *Biotechnology Progress*, 21(4), 1352–1356.
<https://doi.org/10.1021/bp0501118>
- Mussatto, S. I., Dragone, G., & Roberto, I. C. (2006). Brewers' spent grain: Generation, characteristics and potential applications. In *Journal of Cereal Science* (Vol. 43, Issue 1, pp. 1–14). <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2005.06.001>

- Nutaratat, P., Srisuk, N., Arunrattiyakorn, P., & Limtong, S. (2016). Indole-3-acetic acid biosynthetic pathways in the basidiomycetous yeast *Rhodospordium paludigenum*. *Archives of Microbiology*, *198*(5), 429–437. <https://doi.org/10.1007/s00203-016-1202-z>
- Papanikolaou, S., & Aggelis, G. (2011a). Lipids of oleaginous yeasts. Part I: Biochemistry of single cell oil production. *In European Journal of Lipid Science and Technology* (Vol. 113, Issue 8, pp. 1031–1051). <https://doi.org/10.1002/ejlt.201100014>
- Papanikolaou, S., & Aggelis, G. (2011b). Lipids of oleaginous yeasts. Part II: Technology and potential applications. *In European Journal of Lipid Science and Technology* (Vol. 113, Issue 8, pp. 1052–1073). <https://doi.org/10.1002/ejlt.201100015>
- Patel, A., Sindhu, D. K., Arora, N., Singh, R. P., Pruthi, V., & Pruthi, P. A. (2015). Biodiesel production from non-edible lignocellulosic biomass of *Cassia fistula* L. fruit pulp using oleaginous yeast *Rhodospordium kratochvilovae* HIMPA1. *Bioresource Technology*, *197*, 91–98. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.08.039>
- Patel, A., Mikes, F., Bühler, S., & Matsakas, L. (2018). Valorization of brewers' spent grain for the production of lipids by oleaginous yeast. *Molecules*, *23*(12). <https://doi.org/10.3390/molecules23123052>
- Pires, A. F., Marnotes, N. G., Rubio, O. D., Garcia, A. C., & Pereira, C. D. (2021). Dairy by-products: A review on the valorization of whey and second cheese whey. *In Foods* (Vol. 10, Issue 5). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/foods10051067>
- Prazeres, A. R., Carvalho, F., & Rivas, J. (2012). Cheese whey management: A review. *In Journal of Environmental Management* (Vol. 110, pp. 48–68). <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2012.05.018>

- Ratledge, C. (1991). Microorganisms for Lipids. *In Acta Biotechnol* (Vol. 11).
<https://doi:10.1002/abio.370110506>
- Ratledge, C. (1994). Yeasts, moulds, algae and bacteria as sources of lipids. *Technological Advances in Improved and Alternative Sources of Lipids*, 235–291.
https://doi:10.1007/978-1-4615-2109-9_9
- Ratledge, C. (2004). Fatty acid biosynthesis in microorganisms being used for Single Cell Oil production. *In Biochimie* (Vol. 86, Issue 11, pp. 807–815). Elsevier B.V.
<https://doi.org/10.1016/j.biochi.2004.09.017>
- Ravindran, R., Jaiswal, S., Abu-Ghannam, N., & Jaiswal, A. K. (2018). A comparative analysis of pretreatment strategies on the properties and hydrolysis of brewers' spent grain. *Bioresource Technology*, 248, 272–279.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.06.039>
- Robertson, J. A., I'Anson, K. J. A., Treimo, J., Faulds, C. B., Brocklehurst, T. F., Eijsink, V. G. H., & Waldron, K. W. (2010). Profiling brewers' spent grain for composition and microbial ecology at the site of production. *LWT*, 43(6), 890–896.
<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2010.01.019>
- Sire, T. S., & Oh, J. C. S. (1990). Spent brewery grains as substrate for the production of cellulases by *Trichoderma reesei* QM9414. <https://doi.org/10.1007/BF01573865>
- Tang, D. S., Yin, G. M., He, Y. Z., Hu, S. Q., Li, B., Li, L., Liang, H. L., & Borthakur, D. (2009). Recovery of protein from brewer's spent grain by ultrafiltration. *Biochemical Engineering Journal*, 48(1), 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2009.05.019>
- Valta, K., Damala, P., Angeli, E., Antonopoulou, G., Malamis, D., & Haralambous, K. J. (2017). Current Treatment Technologies of Cheese Whey and Wastewater by Greek

Cheese Manufacturing Units and Potential Valorisation Opportunities. *Waste and Biomass Valorization*, 8(5), 1649–1663. <https://doi.org/10.1007/s12649-017-9862-8>

- Vasilakis, G., Karayannis, D., Massouras, T., Politis, I., & Papanikolaou, S. (2022). Biotechnological Conversions of Mizithra Second Cheese Whey by Wild-Type Non-Conventional Yeast Strains: Production of Yeast Cell Biomass, Single-Cell Oil and Polysaccharides. *Applied Sciences (Switzerland)*, 12(22). <https://doi.org/10.3390/app122211471>
- Wen, Z., Zhang, S., Odoh, C. K., Jin, M., & Zhao, Z. K. (2020). *Rhododsporidium toruloides* - A potential red yeast chassis for lipids and beyond. In *FEMS Yeast Research* (Vol. 20, Issue 5). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/femsyr/foaa038>
- Xiros, C., & Christakopoulos, P. (2012). Biotechnological potential of brewers spent grain and its recent applications. In *Waste and Biomass Valorization* (Vol. 3, Issue 2, pp. 213–232). <https://doi.org/10.1007/s12649-012-9108-8>
- Xiros, C., Topakas, E., Katapodis, P., & Christakopoulos, P. (2008a). Evaluation of fusarium oxysporum as an enzyme factory for the hydrolysis of Brewer's spent grain with improved biodegradability for ethanol production. *Industrial Crops and Products*, 28(2), 213–224. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2008.02.004>
- Xiros, C., Topakas, E., Katapodis, P., & Christakopoulos, P. (2008b). Hydrolysis and fermentation of brewer's spent grain by *Neurospora crassa*. *Bioresource Technology*, 99(13), 5427–5435. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.11.010>
- Xu, H., Sun, L., Zhao, D., Zhang, B., Shi, Y., & Wu, Y. (2008). Production of α -amylase by *Aspergillus oryzae* As 3951 in solid state fermentation using spent brewing grains as substrate. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 88(3), 529–535. <https://doi.org/10.1002/jsfa.3118>

- Yadav, J. S. S., Yan, S., Pilli, S., Kumar, L., Tyagi, R. D., & Surampalli, R. Y. (2015). Cheese whey: A potential resource to transform into bioprotein, functional/nutritional proteins and bioactive peptides. *In Biotechnology Advances* (Vol. 33, Issue 6, pp. 756–774). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.07.002>
- Zhu, Z., Zhang, S., Liu, H., Shen, H., Lin, X., Yang, F., Zhou, Y. J., Jin, G., Ye, M., Zou, H., & Zhao, Z. K. (2012). A multi-omic map of the lipid-producing yeast *Rhododsporidium toruloides*. *Nature Communications*, 3. <https://doi.org/10.1038/ncomms2112>
- Łaba, W., Piegza, M., & Kawa-Rygielska, J. (2017). Evaluation of brewer's spent grain as a substrate for production of hydrolytic enzymes by keratinolytic bacteria. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 92(6), 1389–1396. <https://doi.org/10.1002/jctb.5134>
- Σινάπη Ε.Γ. (2019) Επίδραση διαφόρων πηγών άνθρακα στην σύσταση λιπιδίων και δευτερογενών μεταβολικών προϊόντων της ζύμης *Rhododsporidium toruloides*. [Μεταπτυχιακή Μελέτη, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών].
URI: <http://hdl.handle.net/10329/7048>