

ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΩΝ ΠΗΓΩΝ ΑΝΘΡΑΚΑ ΣΤΗΝ
ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΚΑΡΟΤΕΝΟΕΙΔΩΝ ΚΑΙ ΛΙΠΙΔΙΩΝ ΑΠΟ
ΤΗ ΖΥΜΗ *Rhodosporidium paludigenum* 2664

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Της

ΜΠΑΤΣΟΛΑΚΗ ΦΩΤΕΙΝΗΣ

ΑΜ: ΤΡ2019139

Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων

Σχολή Περιβάλλοντος

ΙΟΝΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ



Αργοστόλι Κεφαλληνίας

Οκτώβριος 2023

ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΩΝ ΠΗΓΩΝ ΑΝΘΡΑΚΑ ΣΤΗΝ
ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΚΑΡΟΤΕΝΟΕΙΔΩΝ ΚΑΙ ΛΙΠΙΔΙΩΝ ΑΠΟ
ΤΗ ΖΥΜΗ *Rhodospiridium paludigenum* 2664

Η πτυχιακή εργασία εγκρίθηκε από:

Νικόλαο Κοψαχείλη

Αικατερίνη Παπαδάκη

Χαρίλαο Παπαποστόλου

Ευχαριστίες

Με την ολοκλήρωση αυτής της πτυχιακής εργασίας, έρχεται η ευκαιρία να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου προς όλους όσους με στήριξαν και με καθοδήγησαν σε αυτό το σημαντικό ταξίδι. Η παρούσα εργασία δεν θα μπορούσε να ολοκληρωθεί χωρίς την υποστήριξη και την ενθάρρυνση που έλαβα από την πλευρά πολλών αξιότιμων προσώπων. Ειδικότερα, θέλω να εκφράσω τις ειλικρινείς μου ευχαριστίες προς τον αναπληρωτή καθηγητή κ. Κοψαχείλη Νικόλαο για την ανάθεση αυτού του συναρπαστικού θέματος και την εμπιστοσύνη του προς το πρόσωπό μου. Η ευκαιρία που μου προσέφερε να ασχοληθώ με αυτό το ενδιαφέρον θέμα αποτελεί προνόμιο. Ιδιαίτερα ευχαριστώ την επίκουρη καθηγήτρια κ. Αλεξανδρή Μαίρη και την υποψήφια διδάκτορα Σερέτη Φανή για την πολύτιμη καθοδήγησή τους και την αμέριστη υποστήριξή τους κατά τη διάρκεια της έρευνας. Η εμπειρία και οι γνώσεις τους αποτέλεσαν τη βάση για την επίτευξη των αποτελεσμάτων που παρουσιάζονται σε αυτήν την εργασία. Ακόμα, ευχαριστώ την αγαπητή μου συμφοιτήτρια, Δήμητρα Δέσποινα Τάγιου, για την πολύτιμη βοήθειά της κατά τη διάρκεια αυτής της επιστημονικής περιπέτειας. Η στήριξή της και η συνεργασία μας ήταν κρίσιμες για την ολοκλήρωση αυτής της εργασίας. Τέλος, θέλω να ευχαριστήσω θερμά την αγαπημένη μου οικογένεια για τη συνεχή τους ψυχολογική υποστήριξη και την αφοσίωσή τους στην πρόοδό μου. Οι ευχαριστίες μου δεν μπορούν να εκφράσουν πλήρως την εκτίμησή μου προς όλους εσάς, και είμαι ευγνώμον για την ευκαιρία που μου δόθηκε να μοιραστώ αυτή την εμπειρία μαζί σας.

Πίνακας περιεχομένων

Περιεχόμενα

Περίληψη	6
Abstract	8
1. Εισαγωγή	10
1.1 Ζύμες	10
1.2 Χρωστικές	11
1.3 Καροτενοειδή	12
1.3.1 Δομή καροτενοειδών	14
1.3.2 Μικροβιακή παραγωγή καροτενοειδών	15
1.4 Μικροβιακό λίπος	17
1.4.1 Δομή και ιδιότητες λιπιδίων	18
1.4.2 Μεταβολικό μονοπάτι λιπιδίων	19
2. Υλικά και μέθοδοι	22
2.1 Πρώτες ύλες	22
2.2 Μικροοργανισμοί και συνθήκες ανάπτυξης	22
2.3 Προκαλλιέργεια	22

2.4 Υγρές καλλιέργειες σε συνθετικά υποστρώματα	22
2.5 Υγρή καλλιέργεια με φλούδες πορτοκαλιού ως υπόστρωμα	23
2.6 Αναλυτικές μέθοδοι	24
2.6.1 Προσδιορισμός ξηρής βιομάζας, σακχάρων, αζώτου ελεύθερων αμινομάδων (FAN) και αμμωνιακού αζώτου	24
2.6.2 Εκχύλιση καροτενοειδών	27
2.6.3 Φασματοφωτομετρική ποσοτικοποίηση των ολικών καροτενοειδών	28
2.6.4 Ταυτοποίηση καροτενοειδών	28
2.6.5 Εκχύλιση λιπιδίων	29
2.7 Στατιστική ανάλυση	30
3. Αποτελέσματα	31
3.1 Ανάπτυξη σε συνθετικά υποστρώματα	31
3.1.1 Γλυκόζη	31
3.1.2 Σουκρόζη	34
3.1.3 Φρουκτόζη	37
3.1.4 Γλυκόζη-Γαλακτόζη 1:1	40
3.1.5 Συγκριτική παρουσίαση των αποτελεσμάτων	43

3.2 Ανάπτυξη σε υπόστρωμα από νωπές φλούδες πορτοκαλιού	45
3.2.1 Συγκριτική παρουσίαση των αποτελεσμάτων	48
4.Συμπεράσματα	50
5. Βιβλιογραφικές αναφορές	53

Περίληψη

Η παρούσα πτυχιακή εργασία επικεντρώνεται στην παραγωγή καροτενοειδών και λιπιδίων από το στέλεχος *Rhodospiridium paludigenum* 2664. Κατά τη διάρκεια της έρευνας, μελετήθηκαν τέσσερα συνθετικά υποστρώματα που περιλάμβαναν γλυκόζη, σουκρόζη, φρουκτόζη και μίγμα γλυκόζης-γαλακτόζης σε αναλογία 1:1, καθώς επίσης και σε υπόστρωμα από φλούδες πορτοκαλιού, ως εναλλακτικό μέσο ζύμωσης. Το στέλεχος βιοσύνθεσε καροτενοειδή σε όλα τα υπό μελέτη υποστρώματα. Από τα συνθετικά υποστρώματα, η φρουκτόζη οδήγησε στην υψηλότερη παραγωγή καροτενοειδών (1,55 mg/L) εκ των οποίων 94,52% ήταν β-καροτένιο, 1,8% γ-καροτένιο και 3,69% τορουλένιο. Παράλληλα, στο ίδιο υπόστρωμα σημειώθηκε και η υψηλότερη συγκέντρωση λιπιδίων (3,48 g/L, 64,1% περιεκτικότητα). Ο μικροοργανισμός αναπτύχθηκε και στο υπόστρωμα από φλούδες πορτοκαλιού, χωρίς την προσθήκη επιπλέον θρεπτικών συστατικών ή ιχνοστοιχείων. Συγκεκριμένα, παρήχθησαν 0,92 mg/L καροτενοειδών όπου το 58,99% ήταν β-καροτένιο, το 10,97% γ-καροτένιο, το 25,5% τορουλένιο και το 4,53% τορουλαροδίνη. Επιπλέον, το στέλεχος συσσωρεύσε 3,77 g/L λιπιδίων (περιεκτικότητα 28%), που είναι η υψηλότερη τιμή που επιτεύχθηκε στην παρούσα μελέτη. Τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι η ζύμη *R. paludigenum* 2664 δύναται να βιοσυνθέσει λιπίδια και καροτενοειδή καταναλώνοντας διαφορετικές πηγές άνθρακα. Τα ευρήματα αυτά συμβάλλουν στην κατανόηση των παραγωγικών

δυνατοτήτων του στελέχους και μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως βάση για περαιτέρω ερευνητικές και αναπτυξιακές προσπάθειες στον τομέα αυτό. Επιπρόσθετα, η μελέτη αυτή καταδεικνύει τη δυνατότητα παραγωγής λιπιδίων και καροτενοειδών από το συγκεκριμένο στέλεχος χρησιμοποιώντας φλούδες πορτοκαλιού, ως εναλλακτικό και ευτελές υπόστρωμα , έχοντας σημαντικές εφαρμογές στην βιομηχανία των τροφίμων και στη φαρμακευτική βιομηχανία.

Abstract

This study focuses on the production of carotenoids and lipids from the strain *Rhodospiridium paludigenum* 2664. During the research, four synthetic substrates were studied, including glucose, sucrose, fructose, and a glucose-galactose mixture in 1:1 ratio, as well as an orange peel-based substrate, as an alternative nutrient source. The strain was able to synthesize carotenoids in all substrates. Among the synthetic substrates, fructose led to the highest carotenoid production (1.55 mg/L), while HPLC analysis revealed that the extract consisted of 94.52% β -carotene, 1.8% γ -carotene and 3.69% torulene. Moreover, the highest lipid accumulation was also achieved using the same substrate (3.48 g/L, 64.1% content). The microorganism grew sufficiently also on orange peels, without the addition of extra nutrients or minerals. More specifically, 0.92 mg/L of carotenoids were produced, where 58.99% was β -carotene, 10.97% γ -carotene, 25.5% torulene and 4.53% torularhodin. In addition, the strain accumulated 3.77 mg/L lipids (28% content), which is the highest value achieved in this study. The results indicate that *R. paludigenum* 2664 is able to biosynthesize both lipids and carotenoids when growing on various carbon sources. These findings contribute to understanding the productive capabilities of the strain and can serve as a basis for further research and development efforts in this field. Moreover, this work highlights the potential for lipids and carotenoids production from this particular strain using orange peels as a renewable and

inexpensive substrate, with significant applications in the food and pharmaceutical industries.

1. Εισαγωγή

1.1 Ζύμες

Οι ζύμες είναι μονοκύτταροι ευκαρυωτικοί μικροοργανισμοί, οι οποίοι μπορούν να αναπαραχθούν με εκβλάστηση ή σε μικρότερο ποσοστό με σχάση και δεν σχηματίζουν σπόρια πάνω ή μέσα σε καρποφόρα σώματα. Είναι λιγότερο διαδεδομένες στην φύση από τα βακτήρια, αλλά μπορούν να απομονωθούν από το έδαφος, το νερό, τα φυτά, τα ζώα και τα έντομα. Διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στον κύκλο του άνθρακα στην φύση ως σαπρόφυτα, αποικοδομώντας τα φυτικά υπολείμματα σε διοξείδιο του άνθρακα ([Walker, 2009](#)). Οι περισσότερες ζύμες είναι αερόβιες, λόγω του ότι το οξυγόνο είναι απαραίτητο ως παράγοντας ανάπτυξης για την βιοσύνθεση λιπαρών οξέων (π.χ. ελαϊκό οξύ) και στερολών (π.χ. εργοστερόλη) στις μεμβράνες των κυττάρων ([Walker, 2009](#)). Για την ανάπτυξή τους οι ζύμες απαιτούν μακροθρεπτικά συστατικά όπως πηγή άνθρακα και αζώτου, οξυγόνο, θείο, φώσφορο, κάλιο και μαγνήσιο, ενώ σε μικρότερες ποσότητες χρειάζονται μικροθρεπτικά στοιχεία (ιχνοστοιχεία) όπως Ca, Cu, Fe, Mn και Zn. Ως προς τις συνθήκες ανάπτυξης, τα περισσότερα είδη ζυμών ευδοκιμούν σε θερμά, όξινα και αερόβια περιβάλλοντα. Η ιδανική θερμοκρασία για την άριστη ανάπτυξη τους ανάλογα με το στέλεχος μπορεί να κυμαίνεται μεταξύ 20°C και 50°C ενώ αναπτύσσονται πολύ καλά σε pH από 4,5 έως 6,5 ([Walker, 2009](#)).

Όπως στους περισσότερους μικροοργανισμούς, έτσι και στις ζύμες, όταν εμβολιαστούν σε ένα υγρό θρεπτικό υπόστρωμα και επωαστούν στις βέλτιστες φυσικές συνθήκες ανάπτυξης, προκύπτει μια τυπική καμπύλη ανάπτυξης όπου ο βιώσιμος κυτταρικός πληθυσμός κυττάρων απεικονίζεται συναρτήσει του χρόνου. Αυτή η καμπύλη απαρτίζεται από την φάση

καθυστέρησης στην οποία δεν υπάρχει ανάπτυξη, αλλά τα κύτταρα προσαρμόζονται στο νέο τους περιβάλλον, την εκθετική φάση (λογαριθμικός διπλασιασμός των κυττάρων), την στάσιμη φάση όπου ο ρυθμός ανάπτυξης είναι μηδενικός και τελικά την φάση θανάτου στην περίπτωση της μη-συνεχούς ζύμωσης ([Walker, 2009](#)).

Σε πολλές έρευνες έχει επιτευχθεί η παραγωγή σημαντικών ποσοτήτων χρωστικών ουσιών όπως τα καροτένια και οι ξανθοφύλλες από ζύμες. Οι [Aksu & Eren \(2005\)](#) παρήγαγαν 89.0 mg καροτενοειδών ανά λίτρο ζύμωσης σε υπόστρωμα σουκρόζης από μελάσα και 35 mg/L σε υπόστρωμα λακτόζης τυρογάλακτος με την ζύμη *Rhodotorula mucilaginosa*, στους 30°C και σε pH 6. Επίσης, οι [Liu, et al \(2020\)](#) ανέπτυξαν το στέλεχος *Rhodospiridium toruloides*, σε υδρόλυμα από άχυρα σίτου, το οποίο παρήγαγε 24.58 mg/L καροτενοειδών παρομοίως με βέλτιστη θερμοκρασία 30°C και pH 6. Τέλος, οι [Sereti, et al \(2023\)](#) μελέτησαν την παραγωγή καροτενοειδών από τα στελέχη *Rhodospiridium kratochvilovae* Y-42 και Y-43 σε συνθετικά υποστρώματα. Το στέλεχος Y-42 είχε μέγιστο 2.59 mg/L καροτενοειδών σε υπόστρωμα γλυκόζης και λόγο C/N 80, ενώ το στέλεχος Y-43 παρήγαγε 2 mg/L καροτενοειδών σε υπόστρωμα γλυκόζης αλλά και υπόστρωμα γλυκόζης-γαλακτόζης.

1.2 Χρωστικές

Οι φυσικές χρωστικές ουσίες προέρχονται από μεταλλεύματα, έντομα, φυτά και μικρόβια. Θεωρούνται ασφαλείς λόγω του ότι είναι βιοδιασπώμενες, δεν είναι τοξικές και δεν είναι καρκινογόνες. Χρησιμοποιούνται ευρέως στην παραγωγή τροφίμων, την κλωστοϋφαντουργία, την παραγωγή χαρτιού και τις γεωργικές πρακτικές. Πριν την ανακάλυψη και προώθηση των συνθετικών χρωστικών οι φυσικές ήταν η μόνη πηγή χρώματος και

διακινούνται ευρέως, συμβάλλοντας έτσι σημαντικά στην παγκόσμια οικονομία ([Venil et al., 2013](#)). Τα τελευταία χρόνια η χρήση φυσικών χρωστικών παρουσιάζει παγκόσμιο ενδιαφέρον και η ζήτηση αυτών των ουσιών αυξάνεται μέρα με τη μέρα. Αυτό οφείλεται στην ασφάλεια αλλά και τα οφέλη που παρουσιάζουν σε αντίθεση με τις συνθετικές χρωστικές ουσίες. Η βιομηχανική παραγωγή φυσικών χρωστικών για τρόφιμα μέσω μικροβιακής ζύμωσης έχει πολλά πλεονεκτήματα όπως την ευκολότερη εκχύλιση, το χαμηλότερο κόστος παραγωγής, την αφθονία των πρώτων υλών και την έλλειψη εποχικών διακυμάνσεων που μπορούν να επηρεάσουν την παραγωγή ([Malik, et al 2012](#)). Επιπλέον, με την αντικατάσταση των συνθετικών χρωστικών ουσιών μπορούμε να αποφύγουμε την απελευθέρωση επιβλαβών τοξικών ουσιών στο περιβάλλον και την διατήρηση της βιοποικιλότητας ([Malik, et al 2012](#)).

Οι χρωστικές ταξινομούνται σε οργανικές και ανόργανες ή φυσικές και συνθετικές. Ορισμένα παραδείγματα χρωστικών που βρίσκονται στη φύση είναι οι ριβοφλαβίνες (κίτρινες υδατοδιαλυτές βιταμίνες που παράγονται από πολλούς μικροοργανισμούς), τα καροτένια και οι ξανθοφύλλες (χρωστικές κίτρινες, κόκκινες και πορτοκαλί, οι οποίες συναντώνται παντού στην φύση), η προδιγιοσίνη (κόκκινη χρωστική που παράγεται από διάφορους μικροοργανισμούς), η φυκοκυανίνη (μπλε χρωστική που παράγεται από κυανοβακτήρια τα οποία περιέχουν χλωροφύλλη α) και η βιολασεΐνη (χρωστική που παράγεται από το βακτήριο *Chromobacterium violaceum*) ([Malik, et al 2012](#)).

1.3 Καροτενοειδή

Τα καροτενοειδή χαρακτηρίζονται ως λιπόφιλες, τερπενοειδείς, χρωστικές ουσίες και το χρώμα τους κυμαίνεται από κίτρινο έως πορτοκαλί ή κόκκινο. Χωρίζονται σε δύο μεγάλες

ομάδες με βάση τη παρουσία ή μη λειτουργικών ομάδων οξυγόνου: μη πολικά καροτένια (β-καροτένιο, λυκοπένιο) και πολικές ξανθοφύλλες (ζεαξανθίνη, λουτεΐνη) ([Popova & Andreeva, 2013](#)). Μόνο τα φυτά και ορισμένοι μικροοργανισμοί είναι σε θέση να συνθέσουν καροτενοειδή, τα ζώα βασίζονται στην διατροφή τους για την πρόσληψη χρωστικών ουσιών. Μέχρι σήμερα έχουν αναφερθεί 1183 φυσικά καροτενοειδή σε 702 είδη από διαφορετικούς τομείς, από τα οποία 606 παράγονται σε ευκαρυωτικούς οργανισμούς ([Vargas-Sinisterra, Ramírez-Castrillón, 2021](#)). Για τους φωτοσυνθετικούς οργανισμούς τα καροτενοειδή επιτελούν δομικές λειτουργίες, φωτοπροστασία, εξουδετέρωση ελεύθερων ριζών καθώς και μεταφορά ηλεκτρονίων. Το πρόσφατο ενδιαφέρον για τα καροτενοειδή από την βιομηχανία, οφείλεται σε επιδημιολογικές μελέτες που αποδεικνύουν πως η κατανάλωση τροφίμων πλούσιων σε καροτενοειδή μπορεί να μειώσει την εμφάνιση διαφόρων ασθενειών, όπως ο καρκίνος, οι καρδιαγγειακές παθήσεις, ο εκφυλισμός της ωχράς κηλίδας που σχετίζεται με την ηλικία, ο καταρράκτης και άλλες εκφυλιστικές ασθένειες ([Chandi, Gill, 2011](#)). Ωστόσο η εμπορική παραγωγή φυσικών καροτενοειδών αντιμετωπίζει ορισμένες προκλήσεις, καθώς η τιμή παραγωγής τους είναι σχεδόν πέντε φορές μεγαλύτερη από την τιμή παραγωγής συνθετικών χρωστικών. Επιπλέον, οι μικροβιακές χρωστικές είναι πιο ασθενείς και αντιδρούν διαφορετικά με τα τρόφιμα προκαλώντας ανεπιθύμητες αλλαγές στην γεύση και την οσμή. Τέλος, τα καροτενοειδή είναι ασταθή όταν εκτίθενται στο ηλιακό φως και το οξυγόνο ([Tanuka, et al, 2019](#)).

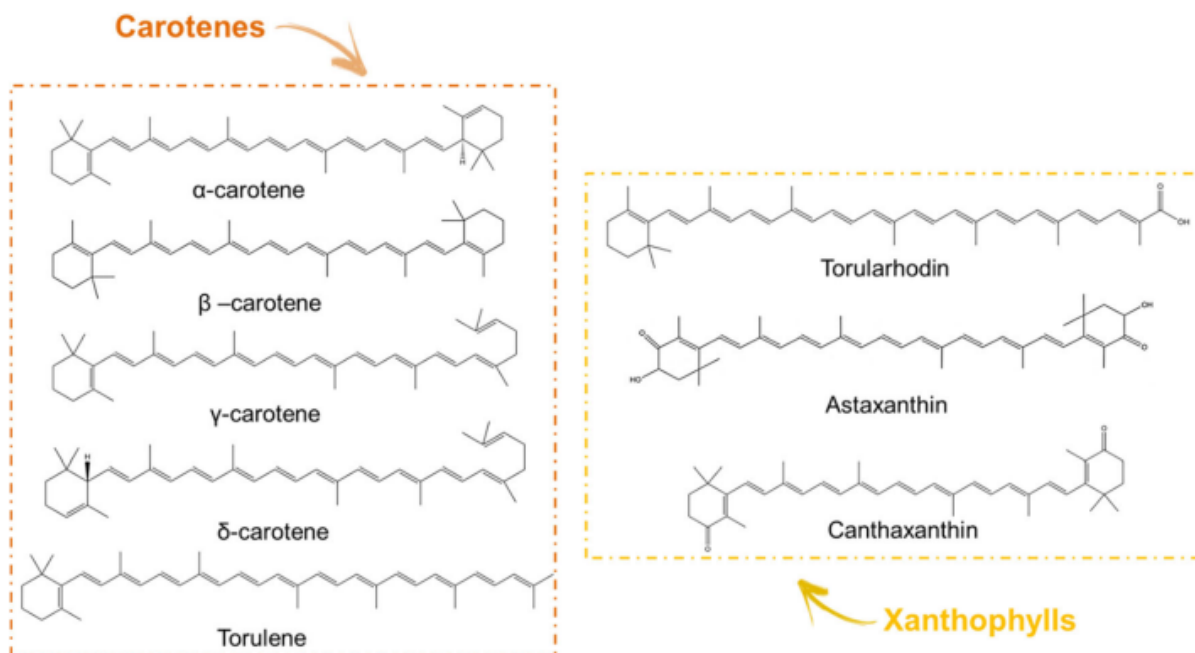


Fig. 1 Δομές κύριων καροτενοειδών ([Cassamo, et al, 2019](#))

1.3.1 Δομή καροτενοειδών

Τα καροτενοειδή αποτελούνται από μια μεγάλη πολυενική αλυσίδα με 35-40 άτομα άνθρακα η οποία λειτουργεί ως την ραχοκοκαλιά του μορίου. Αυτή η πολυενική αλυσίδα ευθύνεται κατά κύριο λόγο για τον αντιοξειδωτικό τους ρόλο και την ικανότητά τους να δεσμεύουν τις ελεύθερες ρίζες. Διαθέτουν οκτώ μονάδες ισοπρενίου, διαμορφωμένες έτσι ώστε η διάταξη τους να αντιστρέφεται στο κέντρο του μορίου και οι δύο κεντρικές μεθυλικές ομάδες να βρίσκονται σε 1,6- σχέση θέσης, ενώ οι υπόλοιπες μη τερματικές μεθυλικές ομάδες να βρίσκονται σε 1,5- σχέση θέσης ([Chandi, Gill, 2011](#)). Στο ένα ή και στα δύο άκρα της ανθρακικής αλυσίδας κάποιων καροτενοειδών μπορεί να είναι συνδεδεμένος ένας βενζολικός δακτύλιος. Τα καροτενοειδή ως πολυένια είναι άκαμπτα. Λόγω του άκαμπτου σκελετού τους

λοιπόν, έχουν την ικανότητα να ενισχύουν τις κυτταρικές μεμβράνες των βακτηρίων. Οι ξανθοφύλλες, οι οποίες έχουν πολικές τελικές ομάδες, μπορούν να αγκυρώνονται στην διεπιφάνεια μεταξύ νερού και λιπιδίων, προσφέροντας έτσι σταθερότητα στις μεμβράνες ([Skibsted, 2012](#)). Η πλειονότητα των καροτενοειδών που απαντώνται στην φύση βρίσκονται σε all-trans μορφή και είναι πιο σταθερά από αυτά που βρίσκονται σε cis-trans ή all-cis μορφή ([Popova, Andreeva, 2013](#)).

1.3.2 Μικροβιακή παραγωγή καροτενοειδών

Η μικροβιακή σύνθεση των καροτενοειδών υπολογίζεται να προήλθε από αρχαίους φωτοσυνθετικούς μικροοργανισμούς. Μέσω της εξέλιξης αυτών των μικροοργανισμών, εξελίχθηκαν και οι βιοσυνθετικοί οδοί, έχοντας ως αποτέλεσμα την δομική διαφοροποίηση των καροτενοειδών. Η μικροβιακή παραγωγή καροτενοειδών εξαρτάται από την βιοχημική σύσταση του περιβάλλοντος που βρίσκεται ο μικροοργανισμός, αλλά και τους στρεσογόνους παράγοντες (θερμοκρασία, pH, φως) στο περιβάλλον αυτό ([Vachali, et al., 2012](#)).

Η βιοσύνθεση των καροτενοειδών ξεκινάει με την πρόδρομη ένωση πυροφωσφορικό ισοπεντενύλιο (IPP). Η οδός που οδηγεί στο IPP είναι η οδός του μεβαλονικού οξέος (MVA), η οποία ξεκινάει από την πρόδρομη ένωση ακετυλο-CoA. Αρχικά το ακετυλο-CoA μετατρέπεται σε 3-υδροξυ-3-μεθυλο-γλουταρυλο-CoA (HMG-CoA) που καταλύεται από την HGM-CoA συνθάση. Το HGM-CoA γίνεται μια C6 ένωση MVA η οποία στη συνέχεια μετατρέπεται σε C5 IPP μέσω διαδοχικών αντιδράσεων που περιλαμβάνουν φωσφορυλίωση (MVA κινάση) ακολουθούμενη από αποκαρβοξυλίωση. Η συμπύκνωση από την πρενυλ-τρανσφεράση ενός μορίου διφωσφορικού διμεθυλαλλύλου (DMADP) και τριών μορίων IPP παράγει μια C20

διτερπενική ένωση GGDP. Δύο μόρια GGDP συμπυκνώνονται για τον σχηματισμό του πρώτου άχρωμου καροτενοειδούς, το φυτοένιο. Ο αποκορεσμός του φυτοενίου έχει ως αποτέλεσμα τον σχηματισμό άκυκλων C40 καροτενοειδών όπως το νευροσπορένιο ή το λυκοπένιο. Όλες οι μορφές trans-λυκοπένιου λειτουργούν ως πρόδρομες ενώσεις για σημαντικά άκυκλα και κυκλικά καροτενοειδή και ξανθοφύλλες. Ο σχηματισμός καροτενίων όπως το β-καροτένιο, είναι από τα πιο βασικά και συνηθισμένα βήματα στην μικροβιακή καροτενογένεση. Το αποκορεσμένο λυκοπένιο κυκλοποιείται και στα δύο άκρα και σχηματίζει β- ή α-καροτένιο. Ο σχηματισμός των ξανθοφυλλών περιλαμβάνει διαδοχικές οξειδώσεις μορίων μετά-καροτενίου που δίνουν -υδροξυ, -εποξυ και -οξο ομάδες. Αν στις θέσεις C3 και C3' των δακτυλίων ιονόνης εισαχθούν υδροξυλικές ομάδες (-OH), δημιουργούνται η ζεαξανθίνη και η λουτεΐνη, οι οποίες είναι C3 και C3'-διυδροξυ παράγωγα του β,β-καροτενίου και του β,ε-καροτενίου αντίστοιχα. Η β-κρυπτοξανθίνη είναι ένα μονοϋδροξυ-καροτενοειδές που δρα ως ενδιάμεσο προϊόν στην βιοσύνθεση των διυδροξυ-καροτενοειδών, όπως για παράδειγμα η ζεαξανθίνη. Τα καροτενοειδή που διαθέτουν λειτουργικές κετονομάδες (C=O), όπως η κανθαξανθίνη και η ασταξανθίνη, σχηματίζονται εάν εισαχθούν κετονομάδες (C=O) στις θέσεις C4 και C4', με ή χωρίς υδροξυλίωση στις θέσεις C3 και C3'. Για τον σχηματισμό βιολαξανθίνης, νεοξανθίνης και φουκοξανθίνης επέρχεται εποξειδωση στις θέσεις 5,6 και 5',6' ([Vachali, et al., 2012](#)).

Από τα ένζυμα που συμμετέχουν στην οδό MVA, τα περισσότερα είναι διαλυτές πρωτεΐνες, ενώ αυτά που συμμετέχουν στα μεταγενέστερα στάδια της καροτενογένεσης είναι κυρίως πρωτεΐνες μεμβράνης. Τα λιπόφιλα προϊόντα που προκύπτουν από τα μονοπάτια της καροτενογένεσης χωρίζονται σε κυτταροπλασματικές μεμβράνες ή μεμβράνες οργανιδίων. Αν και τα βακτήρια και οι ζύμες περιέχουν πολλές ισοπρενοειδείς ενώσεις όπως δολιχόλες, κινόνες

και εργοστερόλες, το πυροφωσφορικό φαρνεσύλιο (FPP) έχει ταυτοποιηθεί ως το πρώτο υπόστρωμα που κωδικοποιείται από το σύμπλεγμα γονιδίων crt και είναι μια κοινή ένωση για πολλές βιοσυνθετικές οδούς καροτενοειδών (Vachali, et al., 2012).



Fig. 2 Βιοχημική οδός καροτενοειδών (Vachali, et al., 2012).

1.4 Μικροβιακό λίπος

Στην φύση υπάρχουν ευκαρυωτικοί μικροοργανισμοί, όπως οι ζυμομύκητες και οι μύκητες, οι οποίοι έχουν την ικανότητα να συνθέτουν και να αποθηκεύουν λιπίδια στα κύτταρά τους. Η σύνθεση και η συσσώρευση λιπιδίων σε ελαιογόνους μικροοργανισμούς συμβαίνει συνήθως κατά την ανάπτυξή τους σε υπόστρωμα από το οποίο κάποιο απαραίτητο θρεπτικό συστατικό έχει εξαντληθεί (συνήθως το άζωτο). Μετά την εξάντληση του θρεπτικού συστατικού τα κύτταρα του μικροοργανισμού παραμένουν βιώσιμα και αρχίζουν να μετατρέπουν τον άνθρακα του θρεπτικού υποστρώματος σε λιπαρά οξέα, τριακυλογλυκερόλες (TAGs) ή/και φωσφολιπίδια. Σε κάποιους μικροοργανισμούς όπως οι ελαιογόνες ζύμες και τα μικροφύκη οι συσσωρευμένες τριακυλογλυκερόλες στα κύτταρα μπορούν να φτάσουν το 70% της βιομάζας τους ([Ghazani, Marangoni, 2022](#)).

Για την μέγιστη παραγωγικότητα και ανάπτυξη των ελαιογόνων μικροοργανισμών, απαιτούνται βέλτιστες περιβαλλοντικές συνθήκες ανάπτυξης. Είναι σημαντικός ο προσεκτικός έλεγχος των παραμέτρων ανάπτυξης όπως το pH, η θερμοκρασία, το οξυγόνο και οι πηγές άνθρακα/αζώτου, αφού μπορούν να αλλάξουν την απόδοση και την σύνθεση των λιπιδίων. Η επίδραση του αερισμού στην συσσώρευση λιπιδίων για παράδειγμα, διαφέρει ανάλογα με το είδος της ζύμης. Σε κάποια στελέχη ο περιορισμός του οξυγόνου μπορεί να ενισχύσει την παραγωγή κορεσμένων λιπαρών οξέων, ενώ σε άλλα είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της ενσωμάτωσης ακόρεστων λιπαρών οξέων στις τριακυλογλυκερόλες. Όσον αφορά την θερμοκρασία, η βέλτιστη για την ανάπτυξη των ζυμών διαφέρει ανάλογα με το είδος και μπορεί να επηρεάσει την σύσταση των λιπαρών οξέων ([Ghazani, Marangoni, 2022](#)).

1.4.1 Δομή και ιδιότητες λιπιδίων

Το μικροβιακό λίπος αποτελείται κατά 80-90% από τριακυλογλυκερόλες (TAGs) και ένα μικρό κλάσμα στερολών (SE), που ονομάζονται ουδέτερα λιπίδια. Αυτά τα αποθηκευτικά λιπίδια συσσωρεύονται σε συγκεκριμένο μέρος στο κύτταρο το οποίο ονομάζεται λιπιδικό σώμα και αποτελείται από έναν λιπιδικό πυρήνα που περικλείεται σε μια φωσφολιπιδική στιβάδα. Οι TAGs είναι πολύ αποτελεσματικά μόρια για την αποθήκευση ενέργειας, καθώς οι κυρίαρχες υδρόφοβες ιδιότητες τους επιτρέπουν την στενή τους αποθήκευση στο λιπιδικό σώμα χωρίς να επηρεάζονται από το πολικό υδατικό περιβάλλον του κυττάρου. Τα ουδέτερα λιπίδια μπορούν να ικανοποιήσουν τις ανάγκες του κυττάρου σε στερόλες και λιπαρά οξέα. Η υδρόλυση των TAGs από τις λιπάσες των ζυμομυκήτων παρέχει διακυλογλυκερόλη (DAG) και ελεύθερα λιπαρά οξέα (FFA) για την βιοσύνθεση μεμβρανικών λιπιδίων και την ολοκλήρωση των ενεργειακών αναγκών του κυττάρου. Η σύνθεση των λιπαρών οξέων παραμένει παρόμοια μεταξύ των ειδών. Τα κύρια λιπαρά οξέα που παράγονται από τις ελαιογόνες ζύμες είναι το μυριστικό (C14:0), παλμιτικό (C16:0), παλμιτολεϊκό (C16:1, n-7), στεατικό (C18:0), ελαϊκό (C18:1, n-9), λινελαϊκό (C18:2, n-6) και λινολενικό οξύ (C18:3) ([Ghazani, Marangoni, 2022](#)).

1.4.2 Μεταβολικό μονοπάτι λιπιδίων

Η συσσώρευση λιπιδίων στις ελαιογόνες ζύμες πραγματοποιείται συνήθως μέσω δύο διαφορετικές οδούς. Η πρώτη οδός είναι η *de novo* σύνθεση λιπιδίων από τα δομικά στοιχεία ακετυλο-CoA και μηλονυλο-CoA. Στο πρώτο στάδιο, το ένζυμο αδενοσίνη μονοφωσφορική απαμινάση ενεργοποιείται και προκαλεί μείωση της μονοφωσφορικής αδενοσίνης (AMP) στα κύτταρα. Τα μειωμένα επίπεδα AMP οδηγούν σε μείωση ή πλήρη αναστολή της ισοκιτρικής

αφυδρογονάσης (IDH) με αποτέλεσμα την μικρότερη παραγωγή α-κετογλουταρικού και διακοπή του κύκλου του τρικαρβοξυλικού οξέος. Με την συσσώρευση του ισοκιτρικού στο εσωτερικό των μιτοχονδρίων ενεργοποιείται το ένζυμο ακονιτάση και το μετατρέπει σε κιτρικό οξύ. Το κιτρικό μεταφέρεται στο κυτταρόπλασμα με την βοήθεια της τρανσλοκάσης, όπου διασπάται από την κιτρική λυάση, ένα ένζυμο που απαντάται αποκλειστικά στα ελαιογόνα στελέχη για τον σχηματισμό οξαλοξικού και ακετυλο-CoA. Το οξαλοξικό ανάγεται στο κυτταροπλασματικό δίκτυο από την μηλική αφυδρογονάση σε μηλικό και στη συνέχεια μετατρέπεται από το μηλικό ένζυμο σε πυροσταφυλικό. Η αντίδραση αυτή παράγει NADPH που χρησιμοποιείται αργότερα στην μετατροπή του ακετυλο-CoA σε λιπαρά οξέα. Στην συνέχεια, το ακετυλο-CoA καρβοξυλιώνεται στο κυτταροπλασματικό δίκτυο ή στο μιτοχόνδριο από την ακετυλο-CoA καρβοξυλάση προς σχηματισμό μηλονυλο-CoA. Τα ακετυλο-CoA και μηλονυλο-CoA θεωρούνται τα δομικά στοιχεία των λιπιδίων, τα οποία με την βοήθεια της συνθάσης των λιπαρών οξέων (FAS) προστίθενται σε μια αναπτυσσόμενη ανθρακική αλυσίδα λιπαρών οξέων. Συνήθως τα λιπαρά οξέα που παράγονται από την FAS έχουν μήκος μεταξύ 14-16 ανθράκων. Ανάλογα με την ενζυμική σύνθεση του κάθε οργανισμού, αντιδράσεις αποκορεσμού ή περαιτέρω επιμήκυνσης μπορούν να αυξήσουν τον αριθμό των διπλών δεσμών ή το μήκος της ανθρακικής αλυσίδας. Τέλος, τα λιπαρά οξέα εστεροποιούνται σε γλυκερόλη από ένζυμα ακυλοτρανσφεράσης για την παραγωγή τριακυλογλυκερολών ως λιπίδια αποθήκευσης ([Ghazani, Marangoni, 2022](#)) ([Papanikolaou, Aggelis, 2011](#)).

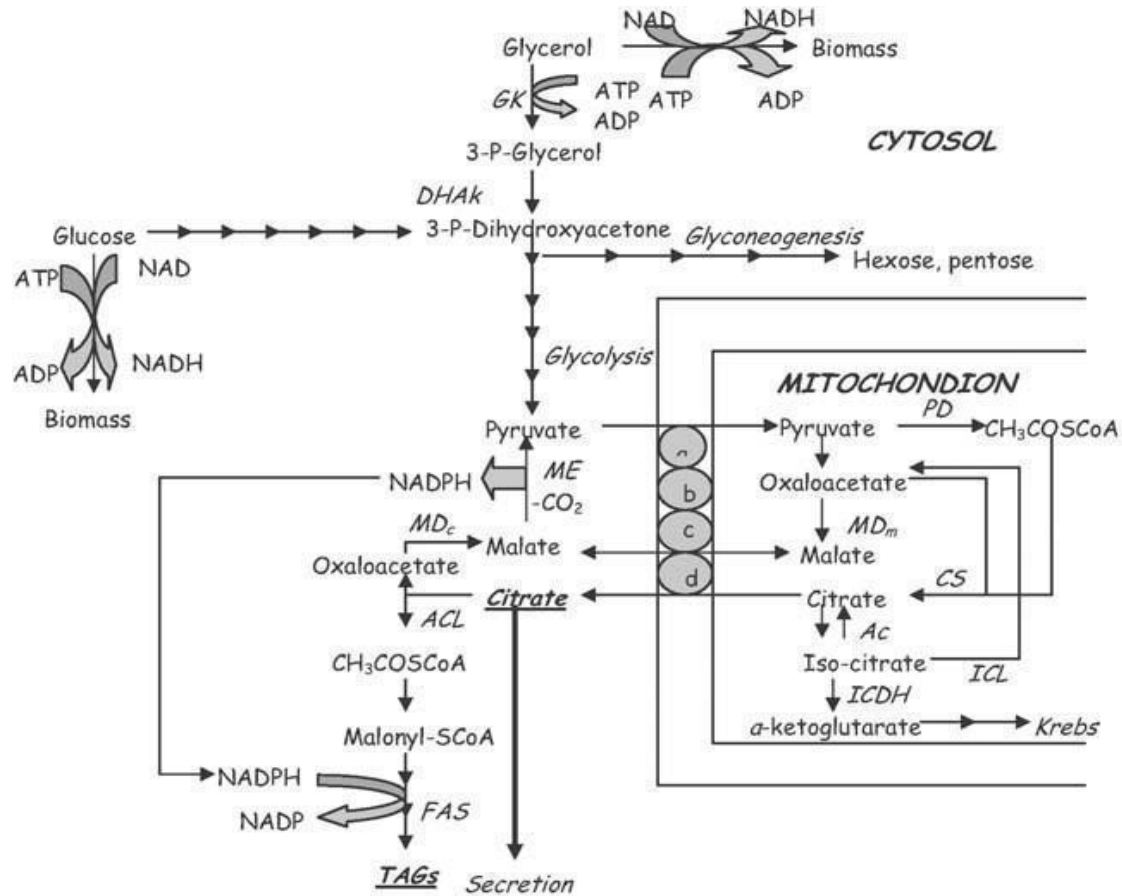


Fig. 3 Μεταβολικό μονοπάτι λιπιδίων (Papanikolaou, Aggelis, 2011).

Η δεύτερη οδός είναι το μονοπάτι της *ex novo* συσσώρευσης λιπιδίων και περιλαμβάνει την πρόσληψη λιπαρών οξέων και TAGs από το θρεπτικό υπόστρωμα της καλλιέργειας και την άμεση συσσώρευση τους σε λιπιδικά σώματα εντός του κυττάρου. Αυτή η οδός απαιτεί υδρόλυση των TAGs και επανεστεροποίηση των ελεύθερων λιπαρών οξέων (Ghazani, Marangoni, 2022).

2. Υλικά και μέθοδοι

2.1 Πρώτες ύλες

Οι φλούδες πορτοκαλιού που χρησιμοποιήθηκαν ως υπόστρωμα στο πείραμα προήλθαν από τοπικές επιχειρήσεις εστίασης. Τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν για την διεξαγωγή των πειραμάτων ήταν υψηλής καθαρότητας και προμηθεύτηκαν από την εταιρία Sigma-Aldrich.

2.2 Μικροοργανισμοί και συνθήκες ανάπτυξης

Η ζύμη που μελετήθηκε, *Rhodosporidium paludigenum* 2664, προμηθεύτηκε από την τράπεζα μικροοργανισμών National Collection of Yeast Cultures (NCYC UK). Το στέλεχος διατηρήθηκε σε θερμοκρασία -80°C , σε κρυοπροστατευτικά φιαλίδια με θρεπτικό μέσο κατάψυξης (20% γλυκερόλη, εκχύλισμα ζύμης και πεπτόνης 10% w/v). Η επανακαλλιέργειά της έγινε πρώτα σε τρυβλίο με θρεπτικό υπόστρωμα 10 g/L γλυκόζη, 10 g/L εκχύλισμα ζύμης, 10 g/L πεπτόνη (YPD medium) και 15 g/L άγαρ, σε θερμοκρασία 28°C για δύο ημέρες.

2.3 Προκαλλιέργεια

Σε κωνική φιάλη των 250 mL προστίθενται 10 g/L yeast extract (0,5 g/ 50mL), 10 g/L γλυκόζη (0,5 g/ 50ml), 10 g/L πεπτόνη (0.5 g/ 50mL) και 50 mL απιονισμένο νερό. Ακολουθεί αποστείρωση του θρεπτικού μέσου στους 121°C για 15 λεπτά. Μια μοναδική αποικία από το τρυβλίο τοποθετείται υπό ασηπτικές συνθήκες στην κωνική φιάλη και αφήνεται να επωαστεί για 24 ώρες στους 28°C υπό ανάδευση (180 rpm).

2.4 Υγρές καλλιέργειες σε συνθετικά υποστρώματα

Υγρές καλλιέργειες των 20 mL με συνθετικά υποστρώματα χρησιμοποιήθηκαν για την μελέτη της επίδρασης των διαφορετικών σακχάρων (γλυκόζη, σουκρόζη, φρουκτόζη και 1:1 γλυκόζη/γαλακτόζη) στην παραγωγή καροτενοειδών και λιπιδίων, σε αναλογία άνθρακα/αζώτου (C/N) ίσο με 20. Τα υποστρώματα περιείχαν 50 g/L πηγή άνθρακα, 0,5 g/L εκχύλισμα ζύμης και διαφορετικές συγκεντρώσεις θειικού αμμωνίου ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) για την επίτευξη της αναλογίας άνθρακα/αζώτου 20. Η επιλογή του λόγου άνθρακα/αζώτου έγινε βάση παλαιότερων πειραμάτων που πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο Χημείας Τροφίμων και Βιομηχανικών Ζυμώσεων του Ιονίου Πανεπιστημίου. Επιπλέον, χρησιμοποιήθηκε μείγμα ιχνοστοιχείων σύστασης (g/L): KH_2PO_4 (7,0), Na_2HPO_4 (2,5), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (1,5), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,15), $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0,15), $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (0,06), $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,02). Το εμβόλιο για τις καλλιέργειες ήταν 10% v/v (2 mL) και η ζύμωση έγινε στους 28°C υπό ανάδευση στα 180 rpm.

2.5 Υγρή καλλιέργεια με φλούδες πορτοκαλιού ως υπόστρωμα

Για την χρήση των νωπών φλούδων πορτοκαλιού ως υπόστρωμα υπήρξε κατάλληλη προεπεξεργασία. Αρχικά οι φλούδες τοποθετήθηκαν σε dH_2O υπό βρασμό (100°C) σε αναλογία νερό:πορτοκάλι 3:1, για 1 ώρα. Μετά το πέρας της μίας ώρας, το υπόστρωμα διηθήθηκε με την βοήθεια γάζας και διηθητικού χαρτιού και στην συνέχεια υπό κενό. Τα σάκχαρα του υποστρώματος υπολογίστηκαν μέσω υγρής χρωματογραφίας υψηλής πίεσης (HPLC), ώστε να εκτιμηθεί η συμπύκνωση στους 100°C που έπρεπε να γίνει για να έχουμε υπόστρωμα με συγκέντρωση σακχάρων περίπου 40 g/L. Μετά την συμπύκνωση, προσδιορίστηκαν τα σάκχαρα του υποστρώματος μέσω HPLC ξανά, για επιβεβαίωση της συγκέντρωσής τους. Η αρχική συγκέντρωση σακχάρων ήταν: 10,6 g/L σουκρόζη, 6,78 g/L γλυκόζη και 5,63 g/L φρουκτόζη

ενώ η τελική συγκέντρωση μετά την συμπύκνωση και την προσθήκη της προκαλλιέργειας ήταν: 5.84 g/L σουκρόζη, 16.23 g/L γλυκόζη και 16.84 g/L φρουκτόζη. Δεν έγινε προσθήκη πηγής αζώτου, άνθρακα ή ιχνοστοιχείων. Το άζωτο ελεύθερων αμινομάδων (FAN) προσδιορίστηκε πριν και μετά την συμπύκνωση. Στο υπόστρωμα δεν βρέθηκε ανόργανο άζωτο μετά από την αντίστοιχη ανάλυση. Οι συνθήκες ανάπτυξης ήταν ίδιες με αυτές που αναφέρονται στην ενότητα 2.3.

2.6 Αναλυτικές μέθοδοι

2.6.1 Προσδιορισμός ξηρής βιομάζας, σακχάρων, αζώτου ελεύθερων αμινομάδων (FAN) και αμμωνιακού αζώτου

Ο προσδιορισμός της ξηρής βιομάζας έγινε με την ανάκτηση των κυττάρων της ζύμης μέσω φυγοκέντρωσης 8 λεπτών (4.500 rpm) στους 4°C. Τα κύτταρα ξεπλύθηκαν 2 φορές με απιονισμένο νερό και έπειτα ξηράνθηκαν στους 50°C έως ότου το βάρος τους σταθεροποιήθηκε. Το ξηρό βάρος μετρήθηκε σε ζυγό ακριβείας. Η ξηρή βιομάζα εκφράζεται ως g/L ζύμωσης.

Η κατανάλωση των σακχάρων προσδιορίστηκε με την χρήση υγρής χρωματογραφίας υψηλής πίεσης (HPLC). Χρησιμοποιήθηκε η στήλη ROA-organic acid H+ (300 mm μήκος × 7.8 mm εσωτερική διάμετρος, Phenomenex) συνδεδεμένη με ανιχνευτή δείκτη διάθλασης (differential refractometer). Η κινητή φάση ήταν διάλυμα 10 mM H₂SO₄, με ροή 0.6 mL/λεπτό και η θερμοκρασία ήταν 65 °C. Τα δείγματα είχαν αραιωθεί κατάλληλα και φιλτραριστεί με φίλτρο Whatman 0,2 μm. Η κατανάλωση των σακχάρων εκφράζεται ως g/L μέσου ζύμωσης.

Για τον προσδιορισμό του αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων, λήφθηκαν δείγματα ανά συγκεκριμένα τακτά χρονικά διαστήματα. Ο προσδιορισμός έγινε μέσω φωτομετρικής μεθόδου

βασισμένη στην νινιδρίνη ([Lie, 1973](#)). Σε 1 mL κατάλληλα αραιωμένου δείγματος προστέθηκε 0.5 mL αντιδραστηρίου χρώσης. Τα δείγματα τοποθετήθηκαν στους 100°C για ακριβώς 16 λεπτά και μετά τοποθετήθηκαν σε παγωμένο νερό για 20 λεπτά. Στην συνέχεια προστέθηκε 2.5 mL αντιδραστηρίου αραιώσης και το δείγμα αναδεύτηκε για 20 δευτερόλεπτα σε vortex. Η φωτομέτρηση έγινε στα 570 nm σε φασματοφωτόμετρο τύπου Helios Omega UV/Vis, Thermo scientific. Το τυφλό δείγμα περιείχε 1 mL απιονισμένο νερό αντί δείγματος.

Πίνακας 1 Σύσταση αντιδραστηρίων FAN

Αντιδραστήριο χρώσης	49,71 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 5 g Νινυδρίνη 3 g φρουκτόζη ~40 g KH_2PO_4 έως pH 6,6 – 6,8, σε 1 L dH₂O Αποθήκευση στους 4°C, σε σκουρόχρωμο μπουκάλι
Αντιδραστήριο αραιώσης	2 g KIO_3 384 mL καθαρής αιθανόλης. 616 mL dH₂O

Ο προσδιορισμός του ανόργανου αζώτου έγινε σύμφωνα με το πρωτόκολλο της [Scheiner \(1976\)](#). Σε δοκιμαστικό σωλήνα προστέθηκαν 2 mL απιονισμένο νερό και 50 μmL κατάλληλα αραιωμένου δείγματος και αναδεύτηκαν έντονα. Στην συνέχεια έγινε προσθήκη 1 mL φαινολικού διαλύματος και μετά από ανάδευση συμπληρώθηκε 1.5 mL αλκαλικού διαλύματος. Το διάλυμα αφέθηκε για 1 ώρα σε θερμοκρασία περιβάλλοντος πριν φωτομετρηθεί στα 635 nm σε φασματοφωτόμετρο Helios Omega UV/Vis, Thermo scientific.

Πίνακας 2 Σύσταση αντιδραστηρίων για τον προσδιορισμό του ανόργανου αζώτου

Ρυθμιστικό διάλυμα	1,3 g Na_3PO_4 3 g $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ 0,3 g EDTA 100 mL dH_2O
Φαινολικό διάλυμα	6 g Φαινόλης 20 mg νιτροπρωσσικού νατρίου σε 80 mL ρυθμιστικού διαλύματος Αποθήκευση στους 4°C, σε σκουρόχρωμο μπουκάλι

Αλκαλικό διάλυμα	2 mL NaClO σε 80 mL NaOH 1N 120 mL dH₂O Αποθήκευση στους 4°C, σε σκουρόχρωμο μπουκάλι
------------------	---

2.6.2 Εκχύλιση καροτενοειδών

Η εκχύλιση των καροτενοειδών που παρήχθησαν έγινε σύμφωνα με τα πρωτόκολλα των [Buzzini et al. \(2007\)](#) και [Lopes et al. \(2017\)](#), τα οποία τροποποιήθηκαν ελαφρώς. Αναλυτικότερα, 2 mL θρεπτικού μέσου πλούσιου σε κύτταρα της ζύμης φυγοκεντρήθηκαν (8 λεπτά, 4°C, 4.500 rpm), για ανάκτηση της βιομάζας. Η βιομάζα ξεπλύθηκε 2 φορές με απιονισμένο νερό ώστε να απομακρυνθούν υπολείμματα της καλλιέργειας. Στη συνέχεια, ακολούθησε διάρρηξη των κυτταρικών μεμβρανών με την προσθήκη 3 mL διμεθυλοσουλφοξειδίου (DMSO). Το μείγμα αναδεύτηκε έντονα σε vortex και επώαστηκε σε υδατόλουτρο στους 40°C για μία ώρα. Το υπερκείμενο του διαλύματος συλλέχθηκε μέσω φυγοκέντρωσης (8 λεπτά, 4°C, 4.500 rpm) και στο ίζημα προστέθηκαν 3 mL ακετόνης. Το διάλυμα ιζήματος-ακετόνης αναδεύτηκε έντονα και φυγοκεντρήθηκε (8 λεπτά, 4°C, 4.500 rpm). Η διαδικασία επαναλήφθηκε έως ότου το ίζημα να αποχρωματιστεί και το υπερκείμενο συλλέχθηκε ξανά και αναμείχθηκε με το προηγούμενο. Τα καροτενοειδή εκχυλίστηκαν από τις φάσεις που συλλέχθηκαν με 5 mL πετρελαϊκού αιθέρα. Προστέθηκαν επιπλέον 5 mL διαλύματος NaCl 20% (w/v), ώστε να διευκολυνθεί η διαδικασία διαχωρισμού. Τέλος, η οργανική φάση

συλλέχθηκε και μετρήθηκε με φασματοφωτόμετρο. Κατά την διαδικασία των σταδίων της εκχύλισης υπήρχαν συνθήκες ελάχιστου φωτισμού ώστε να αποφευχθεί η οξείδωση των καροτενοειδών.

2.6.3 Φασματοφωτομετρική ποσοτικοποίηση των ολικών καροτενοειδών

Ο προσδιορισμός των ολικών καροτενοειδών έγινε μέσω φασματοφωτομέτρου (HeliosOmegaUV/Vis, Thermoscientific, USA) στα 450 nm. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως ανάλογα του β-καροτενίου ανά γραμμάριο ξηρής βιομάζας με την χρήση της εξίσωσης:

$$TC (\mu g/g) = \frac{A \times V \times 10^6}{A_{1cm}^{1\%} \times 100 \times m_{sample}}$$

Όπου TC είναι τα ολικά καροτενοειδή, A είναι η απορρόφηση στα 450 nm, V είναι η ποσότητα (mL) του πετρελαϊκού αιθέρα, $A_{1cm}^{1\%}$ είναι η ειδική απορροφητικότητα (2592 για τον πετρελαϊκό αιθέρα) και m_{sample} είναι η ξηρή βιομάζα (g). Η παραγωγή καροτενοειδών εκφράστηκε ως συγκέντρωση καροτενοειδών ανά λίτρο ζύμωσης (mg/L) και ως απόδοση ανά γραμμάριο ξηρής βιομάζας (mg/g) μετά τους κατάλληλους υπολογισμούς.

2.6.4 Ταυτοποίηση καροτενοειδών

Τα παραγόμενα καροτενοειδή προσδιορίστηκαν με την χρήση υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC) σε συνδυασμό με ανιχνευτή συστοιχίας διοδών (Agilent 1200 Series Gradient HPLC System, Germany), σύμφωνα με την μέθοδο του [Bushway \(1986\)](#) μετά από ορισμένες τροποποιήσεις. Τα καροτενοειδή διαχωρίστηκαν σε στήλη αντίστροφης φάσης (Eclipse XDB-C18, 5 μ m, 4,6 $\times$ 150 mm, Agilent, Germany) και η κινητή φάση αποτελούνταν

από διάλυμα ακετονιτριλίου, μεθανόλης και τετραϋδροφουρανίου (σταθεροποιημένο με 0.025% BHT) (40:56:4, v/v/v). Η ροή ήταν 1 mL ανά λεπτό και το φάσμα αναγνώρισης από 400 nm έως 600 nm. Η θερμοκρασία της στήλης ορίστηκε στους 30 °C και ο όγκος του δείγματος ήταν 10 µL. Η αναγνώριση των καροτενοειδών έγινε με βάση τον χρόνο έκλουσης και το αντίστοιχο φάσμα σε σχέση με πρότυπες ενώσεις: β-καροτένιο στα 450 nm, γ-καροτένιο στα 460 nm, τορουλένιο στα 480 nm και τορουλαροδίνη στα 500 nm ([Britton et al. 2004](#)).

2.6.5 Εκχύλιση λιπιδίων

Η εκχύλιση του ολικού λίπους έγινε με την τροποποίηση ενός πρωτοκόλλου βασισμένου στις μεθοδολογίες των [Folch et al. \(1987\)](#) και [Patel et al. \(2015\)](#). Πιο συγκεκριμένα, η ξηρή βιομάζα αναμείχθηκε με 20 mL χλωροφόρμιο:μεθανόλη (2:1, v/v) και τοποθετήθηκε σε σκοτεινό μέρος για 72 ώρες. Στη συνέχεια, το δείγμα πέρασε από διηθητικό χαρτί και φυγοκεντρήθηκε (8 λεπτά, 4°C, 4.500 rpm). Το υπερκείμενο διηθήθηκε υπό κενό και ακολούθησε φιλτράρισμα με σύριγγα και φίλτρο Whatman με πορώδες ίσο με 0,45 µm. Έπειτα, προστέθηκαν στο υπερκείμενο 0.034% $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ και το δείγμα φυγοκεντρήθηκε ξανά (8 λεπτά, 4°C, 4.500 rpm). Η οργανική φάση, συλλέχθηκε και ξεπλύθηκε τρεις φορές με 1 mL 2N KCl:methanol (4:1 v/v) ώστε να επιτευχθεί η μέγιστη καθαρότητα του δείγματος. Τέλος, το δείγμα τοποθετήθηκε σε προ-ζυγισμένη σφαιρική φιάλη ώστε να παραληφθούν τα λιπίδια μέσω εξάτμισης υπό κενό. Τα ολικά λιπίδια προσδιορίστηκαν βαρομετρικά και εκφράστηκαν ως g/L ζύμωσης και η απόδοση ως γραμμάρια παραγόμενου λίπους προς γραμμάρια υποστρώματος που καταναλώθηκαν. Η περιεκτικότητα της βιομάζας σε λιπίδια (% w/w) εκφράστηκε ως γραμμάρια λιπιδίων που παρήχθησαν ανά γραμμάρια ξηρής βιομάζας.

2.7 Στατιστική ανάλυση

Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε στο πρόγραμμα Excel 2007 της Microsoft και οι τιμές παρουσιάζονται ως οι μέσοι όροι των μετρήσεων $\pm$ τυπική απόκλιση.

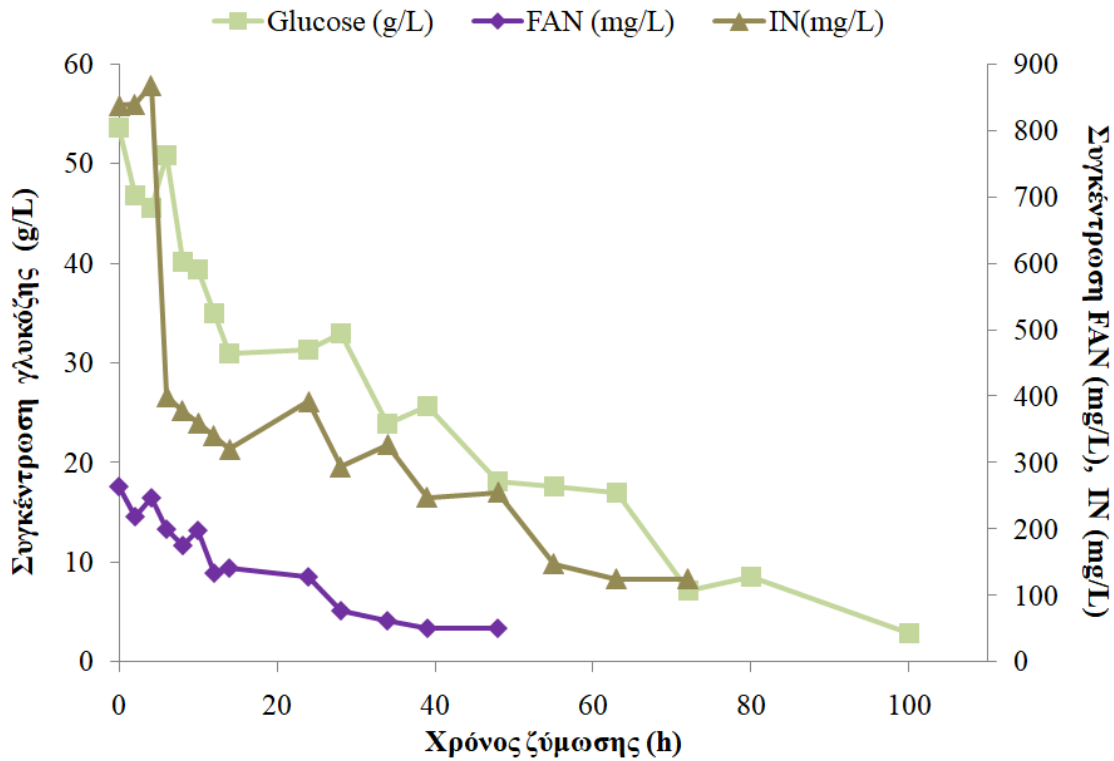
3. Αποτελέσματα

Σε πρώτη φάση μελετήθηκε η ικανότητα ανάπτυξης της ζύμης *Rhodosporidium paludigenum* 2664 σε συνθετικά υποστρώματα γλυκόζης, σουκρόζης, φρουκτόζης και 1:1 γλυκόζης-γαλακτόζης, καθώς και η ικανότητα παραγωγής καροτενοειδών και λιπιδίων στα υποστρώματα αυτά. Στη συνέχεια, μελετήθηκαν οι ίδιες παράμετροι σε υπόστρωμα από απόβλητα φρούτων, όπως είναι οι φλούδες πορτοκαλιού.

3.1 Ανάπτυξη σε συνθετικά υποστρώματα

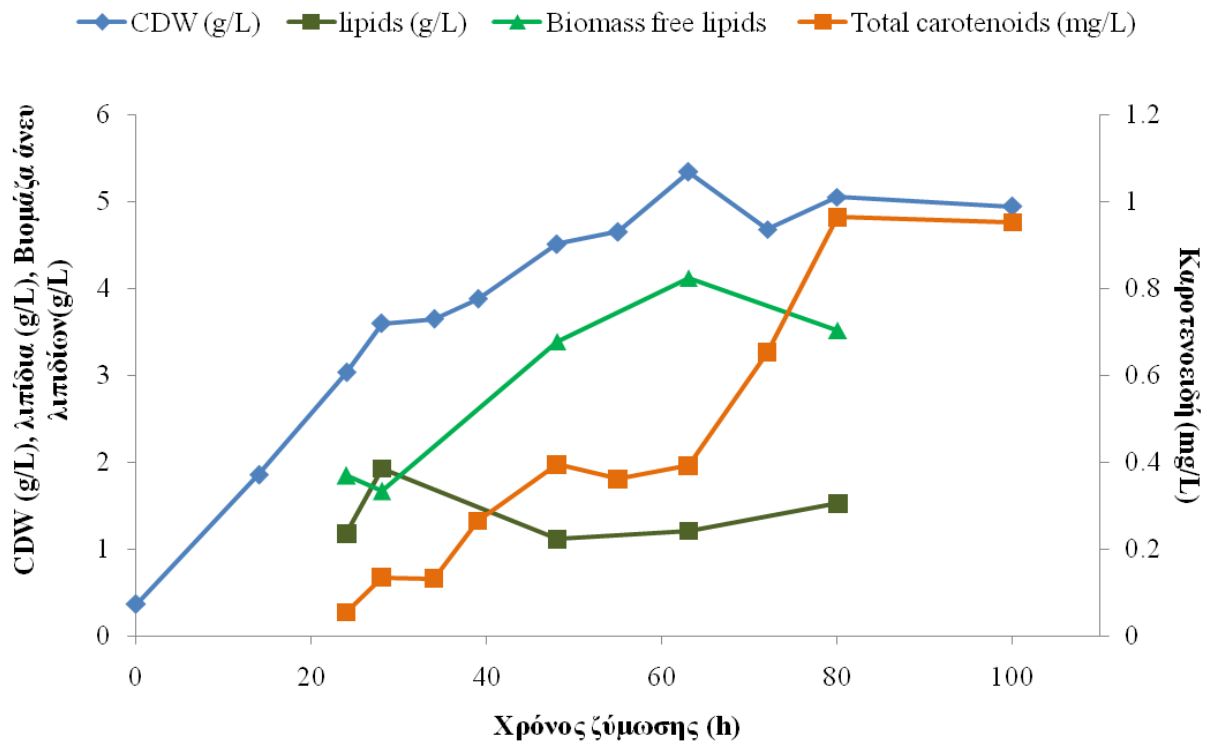
3.1.1 Γλυκόζη

Στο διάγραμμα 3.1. παρουσιάζεται η κινητική κατανάλωσης της γλυκόζης, του αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων (FAN) και του ανόργανου αζώτου (IN). Από την συνολική ποσότητα της γλυκόζης, φαίνεται το μεγαλύτερο μέρος να έχει καταναλωθεί στις 72 ώρες, ενώ τελικά παρέμειναν περίπου 2 g/L γλυκόζης, τα οποία δεν καταναλώθηκαν. Το ανόργανο άζωτο καταναλώνονταν με ραγδαίους ρυθμούς τις πρώτες 14 ώρες. Στις 63 ώρες η κατανάλωσή του φαίνεται να σταματά αφήνοντας περίπου 125 mg/L αναξιοποιημένο ανόργανο άζωτο. Η κατανάλωση του FAN έλαβε χώρα μέσα στις πρώτες 39 ώρες της ζύμωσης, ενώ δεν καταναλώθηκαν περίπου 50 mg/L από την αρχική ποσότητα.



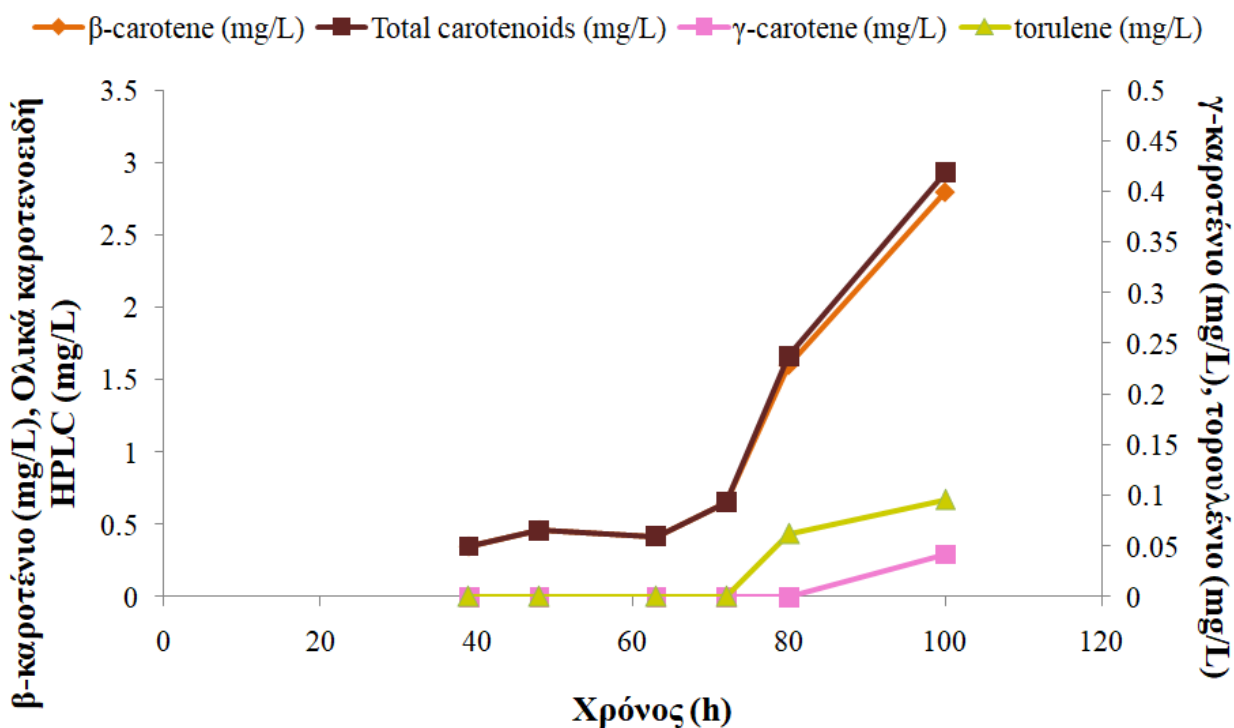
Διάγραμμα 3.1. Κατανάλωση γλυκόζης, οργανικού και ανόργανου αζώτου

Στο διάγραμμα 3.2 παρουσιάζεται η παραγωγή των καροτενοειδών, της ολικής ξηρής βιομάζας, των λιπιδίων και της βιομάζας χωρίς λιπίδια. Η παραγωγή καροτενοειδών ξεκίνησε μετά τις 24 ώρες της ζύμωσης και η μέγιστη συγκέντρωσή τους επιτεύχθηκε στο τέλος της ζύμωσης (0,95 mg/L) όπου η βιομάζα είχε φτάσει τα 4,94 g/L στις 63 ώρες. Η βιομάζα ελεύθερη λιπιδίων έχει ανοδική πορεία μετά τις 24 ώρες. Η παραγωγή λιπιδίων ξεκίνησε όπως και τα καροτενοειδή μετά τις πρώτες 24 ώρες της ζύμωσης, με μέγιστο τα 1,93 g/L στις 28 ώρες. Η ολική ξηρή βιομάζα έφτασε το μέγιστό της (5,34 g/L) και μετά τις 80 ώρες φαίνεται να σταθεροποιείται.



Διάγραμμα 3.2 Κινητική παραγωγής λιπιδίων, βιομάζας χωρίς λιπίδια, καροτενοειδών και ολικής ξηρής βιομάζας.

Στο διάγραμμα 3.3 διαχωρίζονται τα είδη καροτενοειδών που παρήχθησαν κατά τη ζύμωση, με την χρήση υγρής χρωματογραφίας υψηλής πίεσης (HPLC). Το β-καροτένιο ήταν αυτό που παράχθηκε σε μεγαλύτερη ποσότητα με μέγιστο τα 2,79 mg/L. Σε μικρότερες ποσότητες παρήχθησαν γ-καροτένιο (0,042 mg/L) και τορουλένιο (0,096 mg/L)

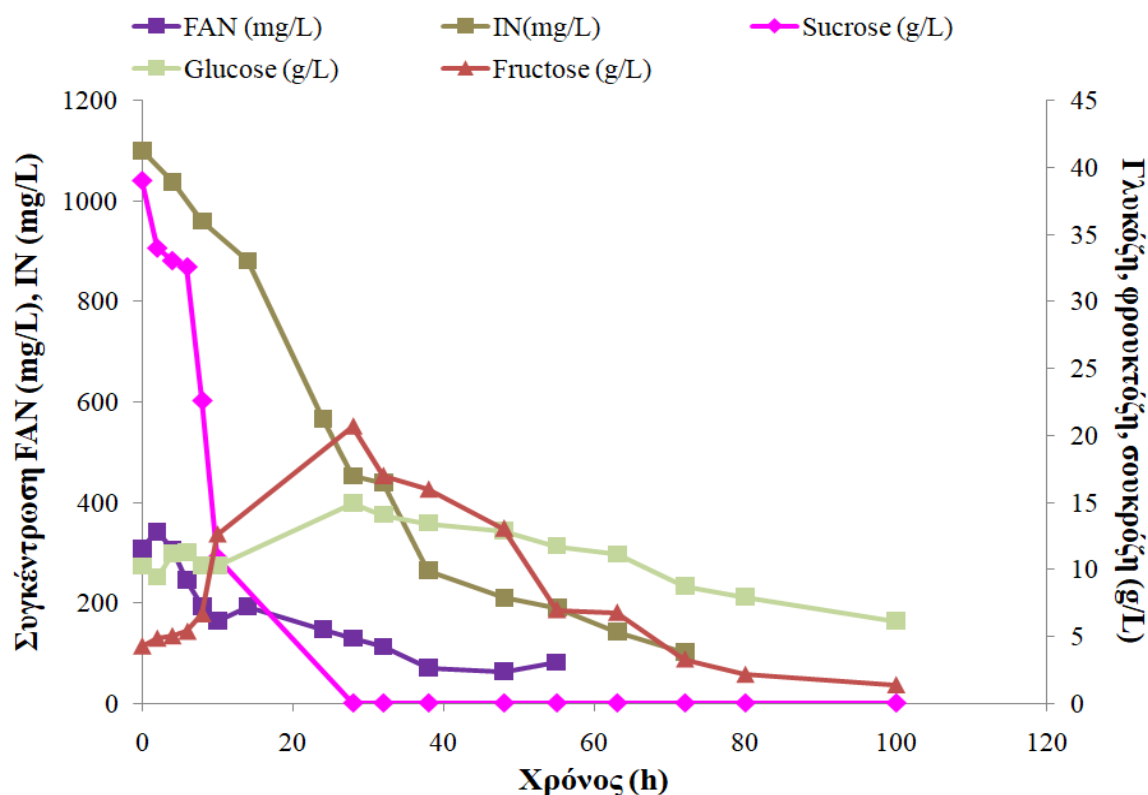


Διάγραμμα 3.3 Παραγόμενα ολικά καροτενοειδή HPLC, κινητική παραγωγής β-καροτενίου, γ-καροτενίου και τορουλενίου

3.1.2 Σουκρόζη

Στο διάγραμμα 3.4 διακρίνεται ο ρυθμός με τον οποίο καταναλώθηκαν η σουκρόζη, το οργανικό και το ανόργανο άζωτο κατά τη διάρκεια της ζύμωσης. Η ζύμη *R. paludigenum* 2664 έχει την ικανότητα να διασπά τον δισακχαρίτη σουκρόζη στα δομικά της συστατικά, δηλαδή τους μονοσακχαρίτες γλυκόζη και φρουκτόζη, καταναλώνοντας τα δύο σάκχαρα ταυτόχρονα. Η σουκρόζη είχε διασπαστεί πλήρως το πρώτο 24ωρο. Από το διάγραμμα φαίνεται η γλυκόζη να καταναλώνεται πιο γρήγορα από την φρουκτόζη, ωστόσο κανένα από τα δύο σάκχαρα δεν καταναλώθηκε πλήρως κατά τις 100 ώρες που διήρκεσε η ζύμωση. Επίσης, το ανόργανο και το οργανικό άζωτο δεν καταναλώθηκαν πλήρως. Η κατανάλωση του οργανικού αζώτου φαίνεται να

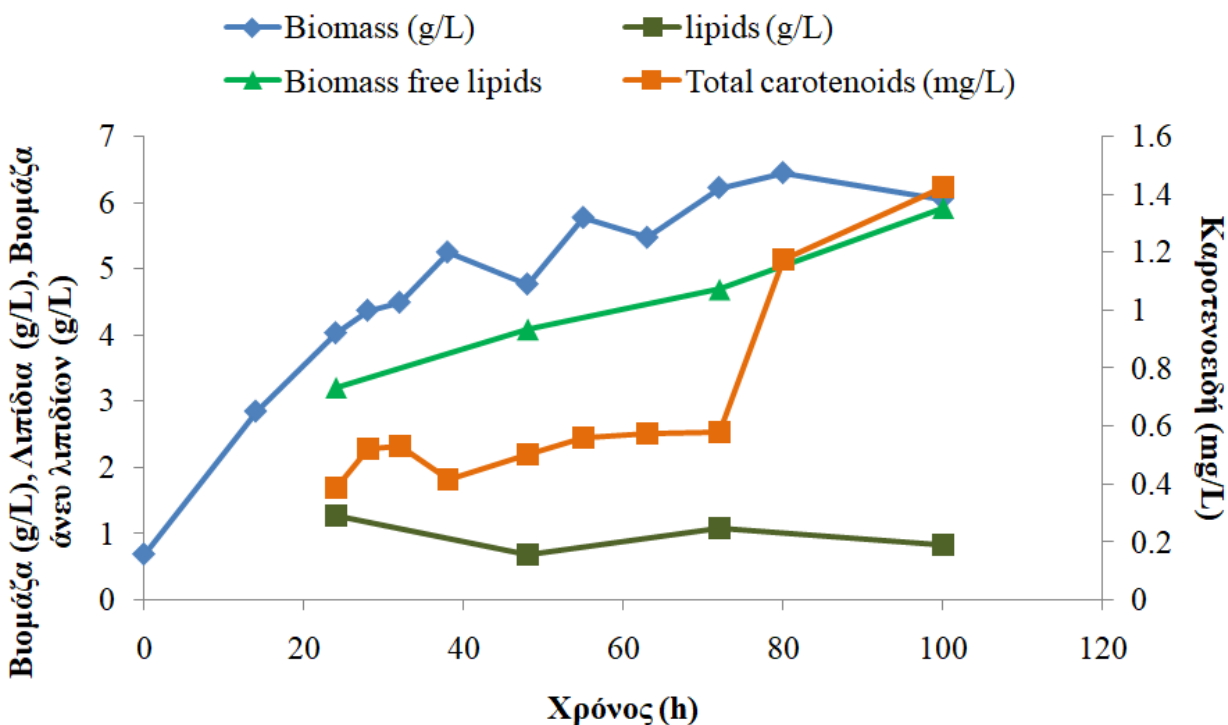
σταθεροποιείται από τις 38 ώρες έως τις 55 ώρες με περίσσεια 81,7 mg/L, ενώ η κατανάλωση του ανόργανου αζώτου σταμάτησε στις 72 ώρες με περίσσεια 101,3 mg/L.



Διάγραμμα 3.4 Κινητική κατανάλωσης σουκρόζης, γλυκόζης, φρουκτόζης, οργανικού και ανόργανου αζώτου.

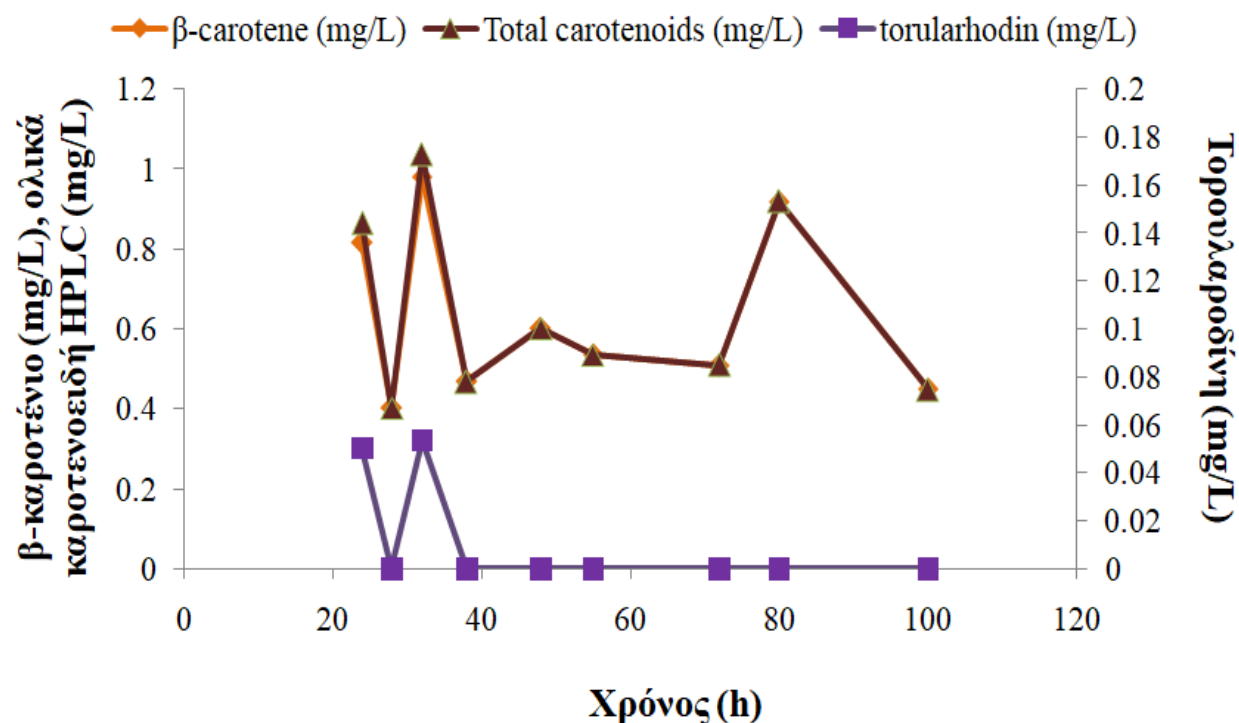
Στο διάγραμμα 3.5 παρουσιάζεται η κινητική παραγωγής ολικής ξηρής βιομάζας, βιομάζας χωρίς λιπίδια, λιπιδίων και ολικών καροτενοειδών. Η ολική ξηρή βιομάζα αυξάνονταν ομαλά τις πρώτες 48 ώρες, ενώ η αύξησή της παρουσιάζει διακυμάνσεις από τις 48 ώρες έως τις 80 ώρες όπου φτάνει και το μέγιστό της στα 6,45 g/L. Η βιομάζα άνευ λιπιδίων από την άλλη φαίνεται να έχει μια ομαλά ανοδική πορεία από τις 24 ώρες έως τις 100 ώρες και να φτάνει τα 5,92 g/L στο τέλος της ζύμωσης. Η παραγωγή καροτενοειδών ξεκινάει μετά το πρώτο 24ωρο και

φτάνει το μέγιστο (1,42 mg/L) στο τέλος της ζύμωσης. Τα λιπίδια φαίνεται να έχουν την μεγαλύτερη τους συγκέντρωση (1,28 g/L) στις 24 ώρες και μια μικρή άνοδο (1,08 g/L) στις 72 ώρες.



Διάγραμμα 3.5 Κινητική παραγωγής ολικών καροτενοειδών, λιπιδίων, ολικής ξηρής βιομάζας και βιομάζας χωρίς λιπίδια.

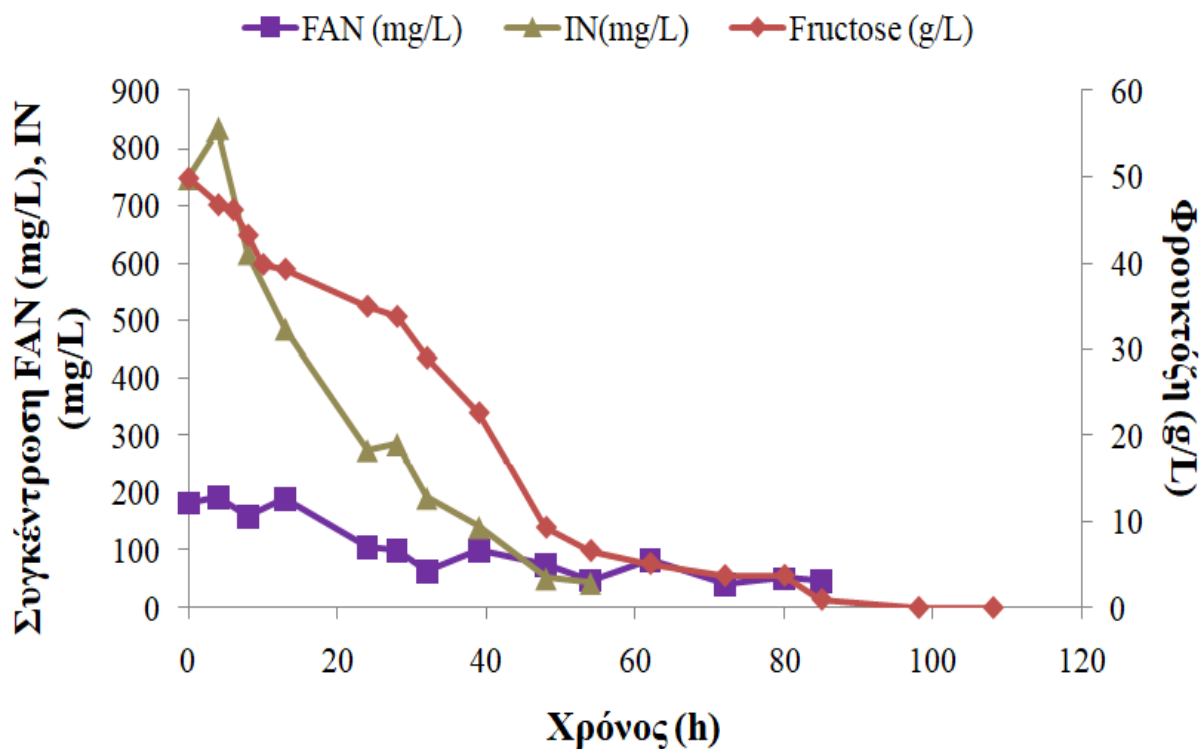
Στο διάγραμμα 3.6 διακρίνονται οι τύποι καροτενοειδών που παρήχθησαν. Στην ζύμωση που χρησιμοποιήθηκε η σουκρόζη ως υπόστρωμα τα μόνα καροτενοειδή που παράχθηκαν είναι το β-καροτένιο και η τορουλαροδίνη. Όπως στην γλυκόζη, έτσι και στην σουκρόζη, το β-καροτένιο είναι το κύριο καροτενοειδές. Η συγκέντρωσή του β-καροτενίου έφθασε τη μέγιστη τιμή (0,98 mg/L) στις 32 ώρες όπως και της τορουλαροδίνης (0.05 mg/L). Η παραγωγή της τορουλαροδίνης σταματάει μετά τις 32 ώρες.



Διάγραμμα 3.6 Παραγόμενα ολικά καροτενοειδή HPLC, κινητική παραγωγής β-καροτενίου και τορουλαροδίνης

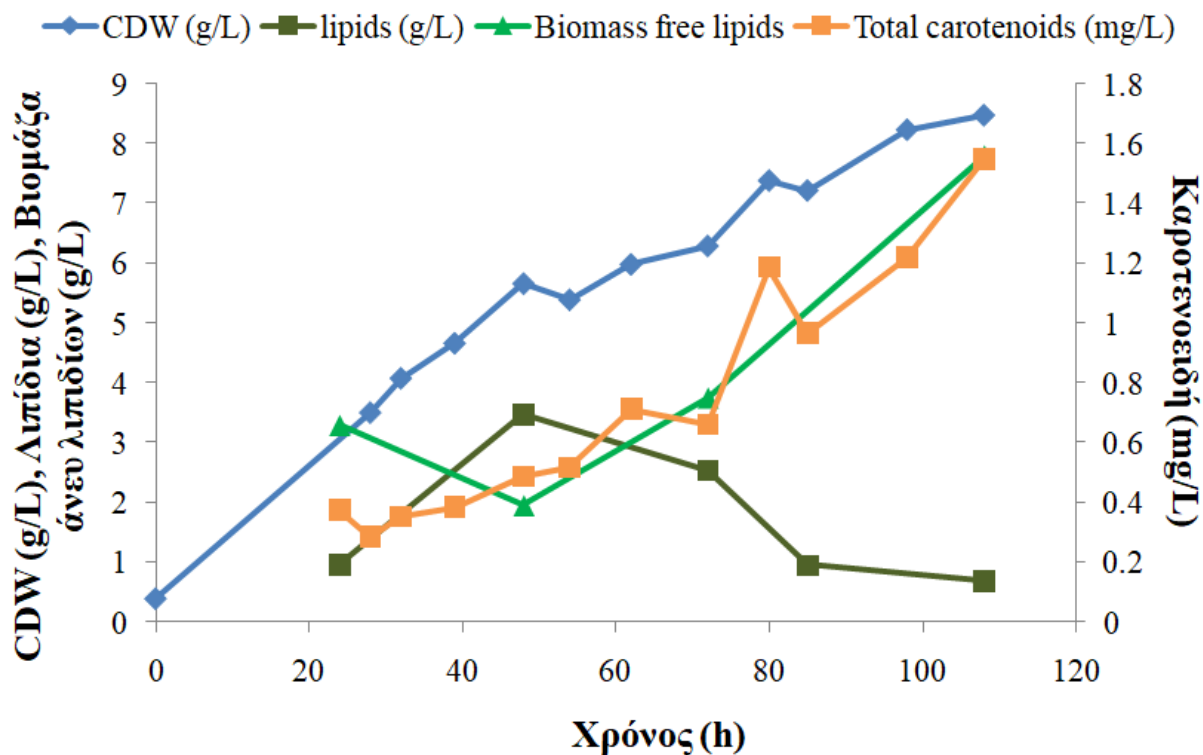
3.1.3 Φρουκτόζη

Στο διάγραμμα 3.7 παρουσιάζεται η κινητική κατανάλωσης της φρουκτόζης, του ανόργανου και του οργανικού αζώτου. Ο μονοσακχαρίτης καταναλώθηκε στις 98 ώρες ενώ η ζύμωση κράτησε 108 ώρες. Η κατανάλωση του ανόργανου αζώτου σταθεροποιήθηκε στις 54 ώρες αλλά δεν καταναλώθηκε πλήρως (περίσσεια 43,77 mg/L). Το οργανικό άζωτο φαίνεται ότι σταμάτησε να καταναλώνεται στις 54 ώρες, παρά τις διακυμάνσεις που υπήρξαν στα αποτελέσματα από τις 54 ώρες έως τις 85 ώρες. Το οργανικό άζωτο που δεν καταναλώθηκε ήταν 46,41 mg/L.



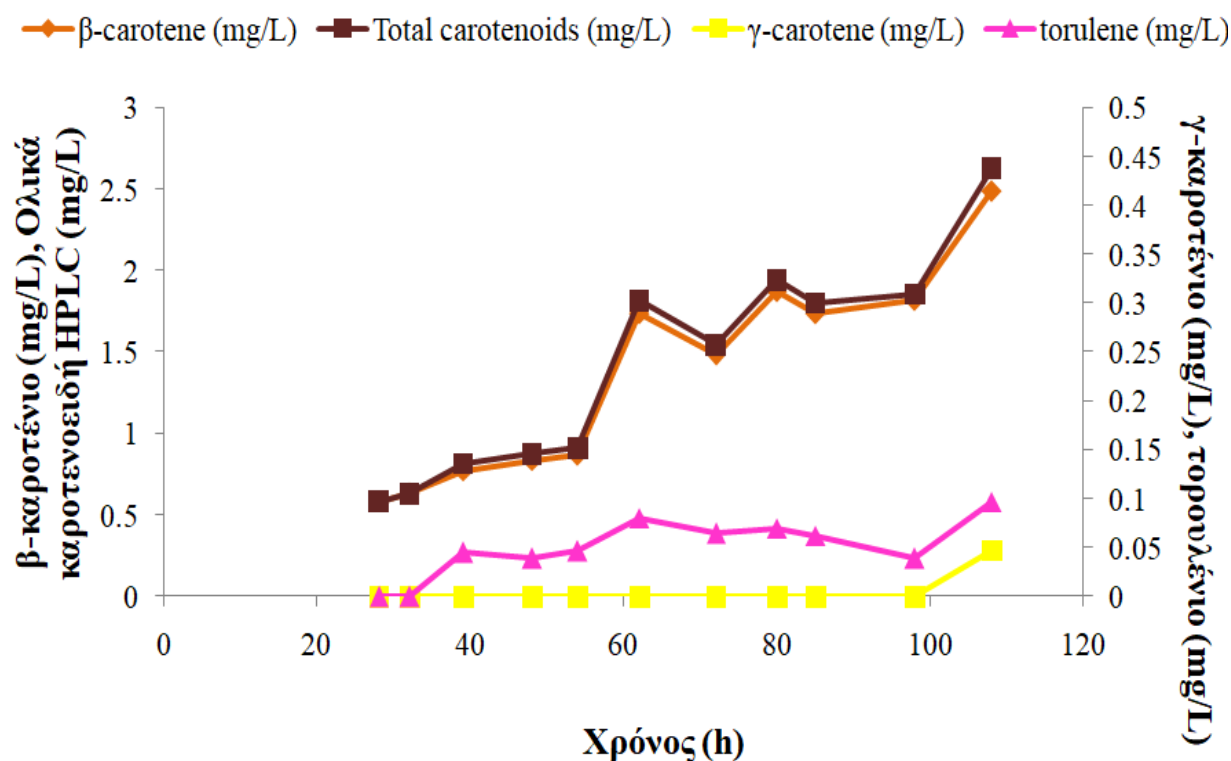
Διάγραμμα 3.7 Κινητική κατανάλωσης φρουκτόζης, οργανικού και ανόργανου αζώτου.

Στο διάγραμμα 3.8 φαίνεται η αύξηση της ολικής ξηρής βιομάζας, της βιομάζας χωρίς λιπίδια, των καροτενοειδών και των λιπιδίων. Η καροτενογένεση ξεκίνησε στις 24 ώρες και το μέγιστο των καροτενοειδών ήταν στις 108 ώρες (1,55 mg/L). Τα λιπίδια έφτασαν το μέγιστό τους στις 48 ώρες (3,48 g/L), ενώ στις 108 ώρες όπου τα καροτενοειδή ήταν στο μέγιστο, τα λιπίδια είχαν την μικρότερη τους τιμή (0,68 g/L). Η ολική ξηρή βιομάζα έφτασε τα 8,47 g/L στις 108 ώρες, ενώ η βιομάζα άνευ λιπιδίων, της οποίας η αύξηση ήταν σχεδόν παράλληλη στην αύξηση της ολικής, έφτασε τα 7,79 g/L την ίδια στιγμή.



Διάγραμμα 3.8 Αύξηση ολικής ξηρής βιομάζας, βιομάζας άνευ λιπιδίων, καροτενοειδών και λιπιδίων.

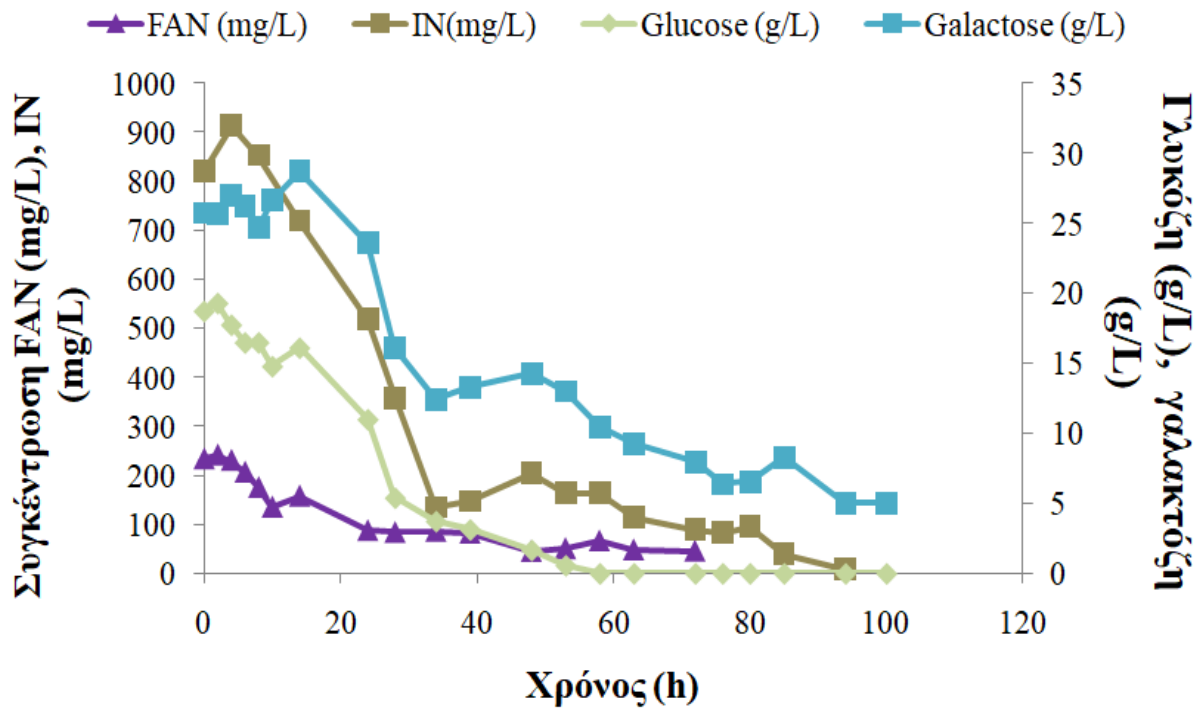
Στο διάγραμμα 3.9 παρατηρούνται τα είδη των καροτενοειδών που παρήχθησαν με την βοήθεια υγρής χρωματογραφίας υψηλής πίεσης (HPLC). Αν και όπως στα υπόλοιπα συνθετικά υποστρώματα, έτσι και στην φρουκτόζη το κυρίαρχο καροτενοειδές ήταν το β-καροτένιο, παρήχθησαν επίσης τορουλένιο (μέχρι και 0,097 mg/L) και γ-καροτένιο (0,047 mg/L).



Διάγραμμα 3.9 Παραγόμενα ολικά καροτενοειδή HPLC, κινητική παραγωγής β -καροτενίου, γ -καροτενίου και τορουλενίου.

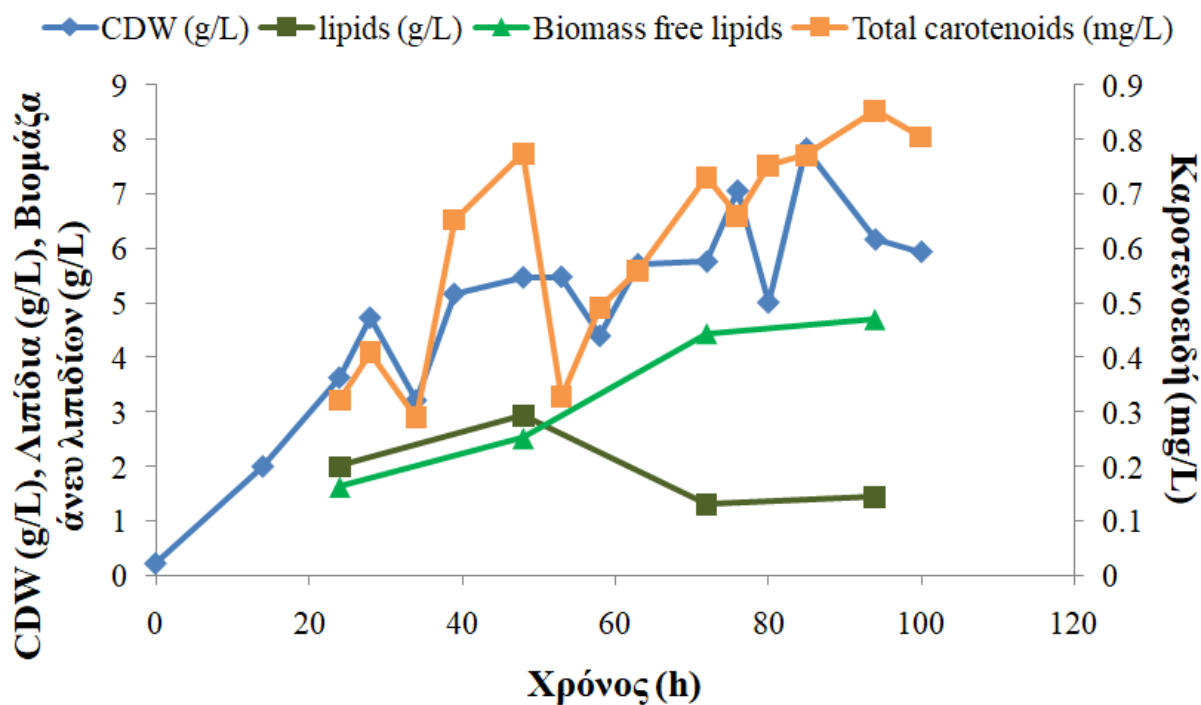
3.1.4 Γλυκόζη-Γαλακτόζη 1:1

Η κινητική κατανάλωσης των δύο μονοσακχαριτών, του οργανικού και του ανόργανου αζώτου παρουσιάζεται στο παρακάτω διάγραμμα (διάγραμμα 3.10). Η γλυκόζη καταναλώθηκε πλήρως στις 58 ώρες, ενώ η γαλακτόζη είχε περίσσεια περίπου 5 g/L στο τέλος της ζύμωσης. Η κατανάλωση του ανόργανου αζώτου τις πρώτες 48 ώρες ήταν ραγδαία και μετά από 94 ώρες παρέμειναν ακατανάλωτα περίπου 7 mg/L. Αντίθετα, το FAN χρησιμοποιήθηκε από την ζύμη έως τις 63 ώρες, όπου φαίνεται να σταθεροποιείται η κατανάλωσή του και να απομένουν 45 mg/L στο υπόστρωμα.



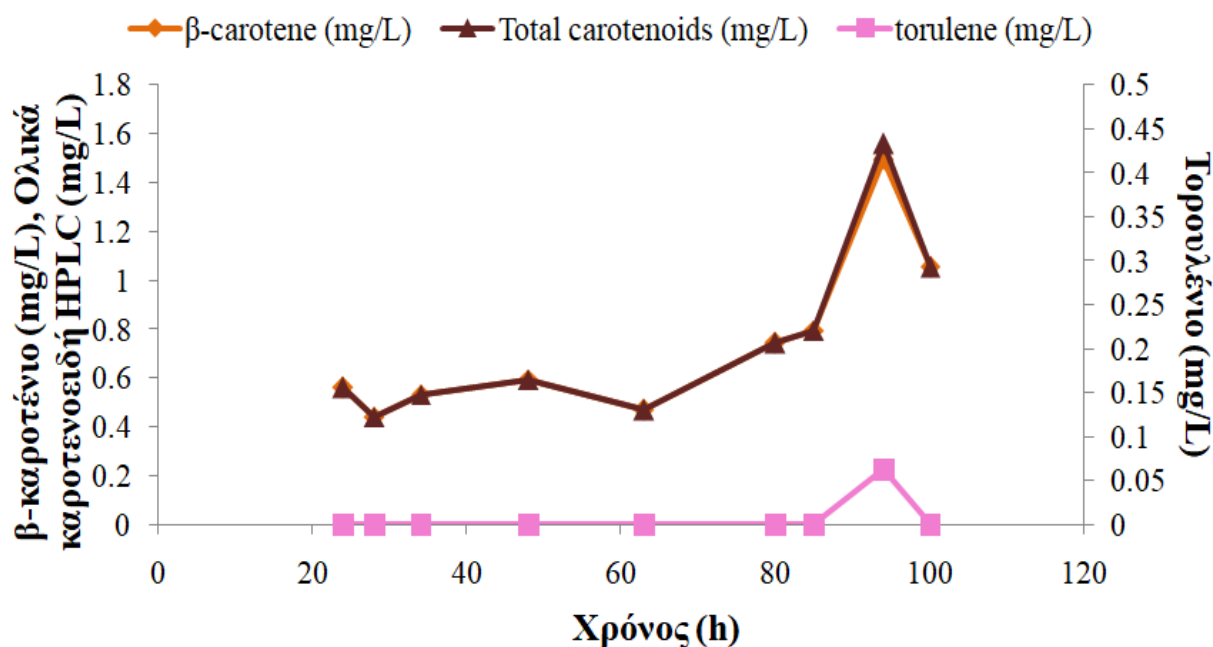
Διάγραμμα 3.10 Κατανάλωση γλυκόζης, γαλακτόζης, οργανικού και ανόργανου αζώτου.

Στο διάγραμμα 3.11 διακρίνεται ο ρυθμός ανάπτυξης της ολικής ξηρής βιομάζας, της βιομάζας χωρίς λιπίδια, των ολικών καροτενοειδών και των λιπιδίων. Η ολική ξηρή βιομάζα παρ'ότι παρουσίασε διακυμάνσεις, έφτασε τα 7,8 g/L στις 85 ώρες. Η βιομάζα άνευ λιπιδίων είχε μέγιστο στις 94 ώρες (4,7 g/L). Η παραγωγή λιπιδίων και καροτενοειδών ξεκίνησε στις 24 ώρες, το μέγιστο των λιπιδίων ήταν στις 48 ώρες (2,9 g/L), ενώ είχαν την μικρότερη τιμή (1,4 g/L) στις 94 ώρες όπου τα καροτενοειδή είχαν την μέγιστη (0,85 mg/L).



Διάγραμμα 3.11 Παραγωγή ολικής ξηρής βιομάζας, βιομάζας άνευ λιπιδίων, καροτενοειδών και λιπιδίων.

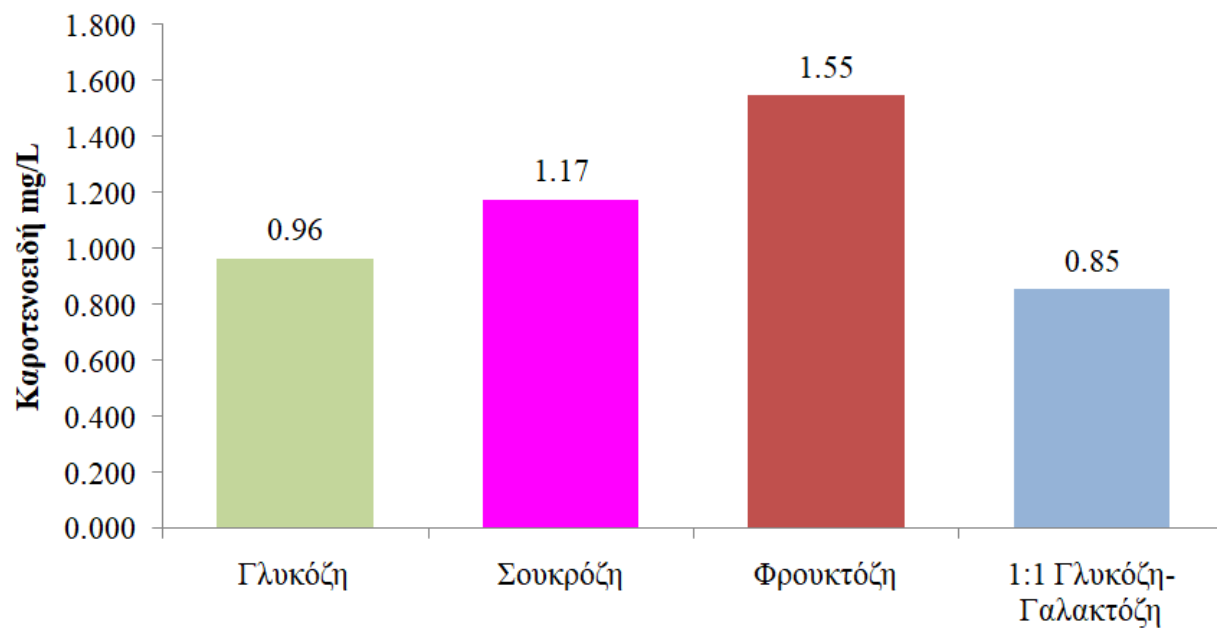
Στο παρακάτω διάγραμμα (διάγραμμα 3.12) φαίνεται πως στην ζύμωση που χρησιμοποιήθηκε ως συνθετικό υπόστρωμα γλυκόζη-γαλακτόζη με αναλογία 1:1 παράχθηκε σχεδόν αποκλειστικά β-καροτένιο. Στις 94 ώρες, εκτός απο β-καροτένιο, το οποίο εκείνη την στιγμή είχε την μέγιστη συγκέντρωσή του (1,5 mg/L), παράχθηκε και τορουλαροδίνη (0,062 mg/L).



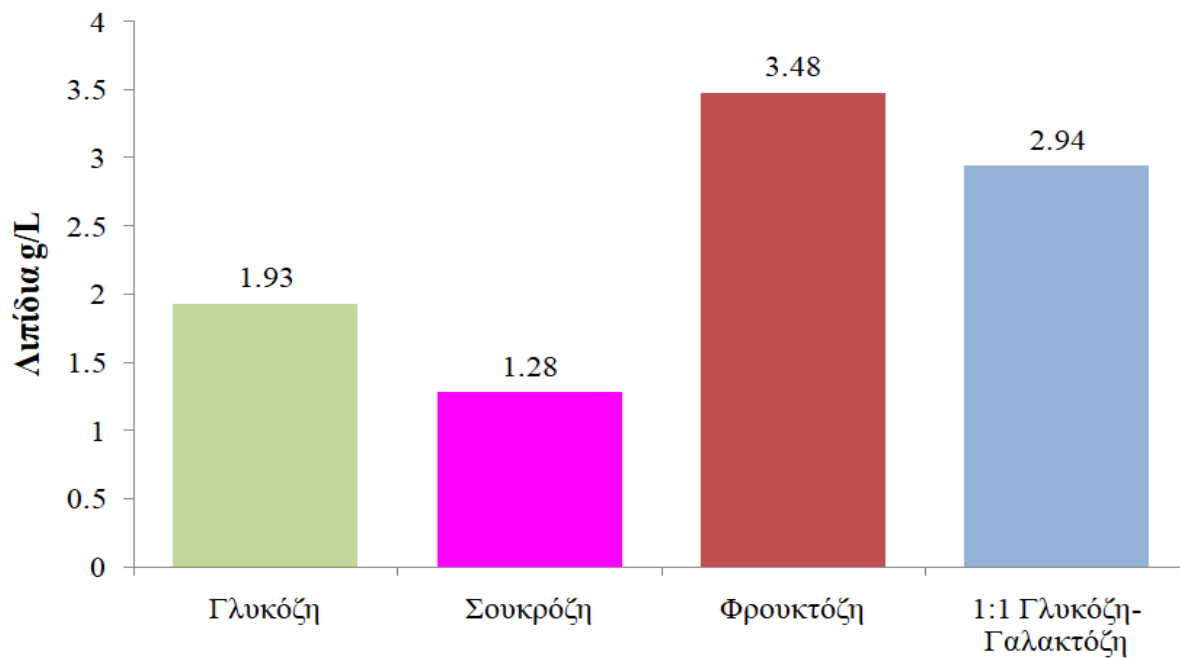
Διάγραμμα 3.12 Παραγόμενα ολικά καροτενοειδή HPLC, κινητική παραγωγή β-καροτενίου και τορουλαροδίνης.

3.1.5 Συγκριτική παρουσίαση των αποτελεσμάτων

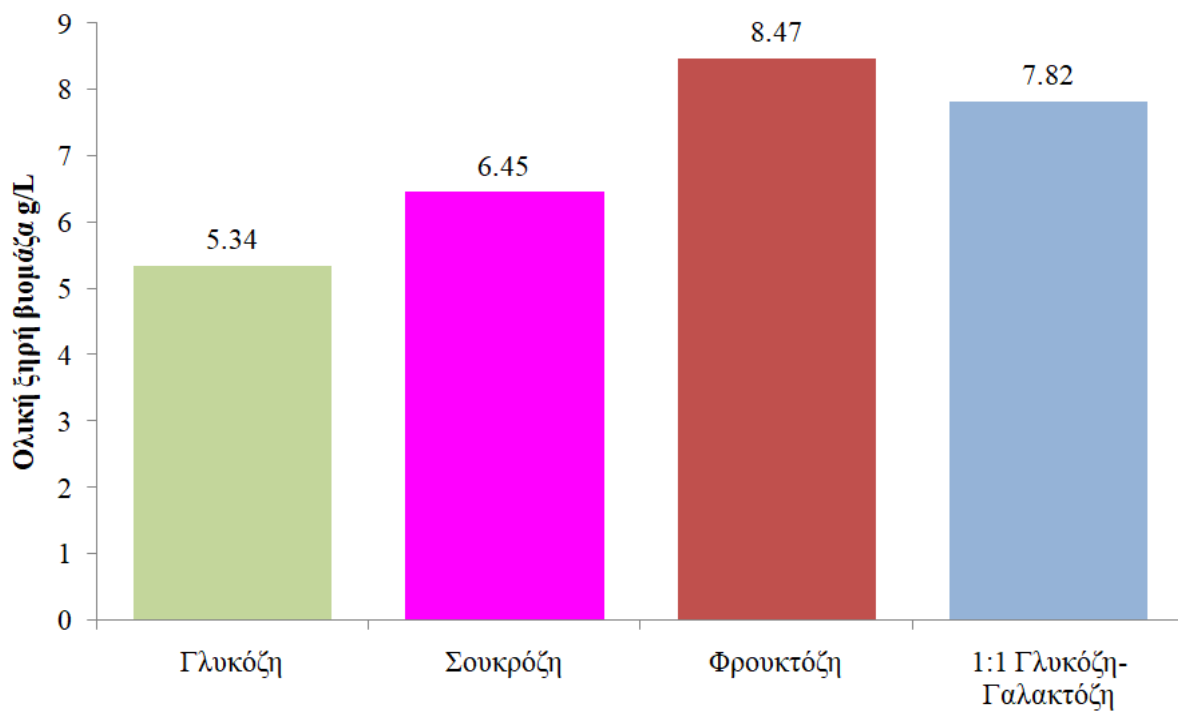
Όπως φαίνεται από τα συγκεντρωτικά διαγράμματα 3.13 και 3.14, η μέγιστη συγκέντρωση καροτενοειδών παρήχθησε στο συνθετικό υπόστρωμα φρουκτόζης (1,55 mg/L), ωστόσο και στο υπόστρωμα σουκρόζης η παραγωγή των καροτενοειδών ήταν υψηλή. Η μέγιστη τιμή λιπιδίων επιτεύχθηκε επίσης στο υπόστρωμα φρουκτόζης (3,48 g/L), ενώ και το υπόστρωμα με γλυκόζη-γαλακτόζη σε αναλογία 1:1 είχε υψηλή παραγωγικότητα. Το σάκχαρο που φαίνεται να προτιμήθηκε από την ζύμη ήταν η φρουκτόζη, η οποία καταναλώθηκε πλήρως στις 98 ώρες. Αντιθέτως, στο υπόστρωμα σουκρόζης αν και ο δισακχαρίτης διασπάστηκε πλήρως μέσα στις πρώτες 10 ώρες της ζύμωσης, έμειναν 6,11 g/L γλυκόζης και 1,4 g/L φρουκτόζης, τα οποία δεν καταναλώθηκαν. Η μεγαλύτερη συγκέντρωση της ολικής ξηρής βιομάζας επιτεύχθηκε στο υπόστρωμα της φρουκτόζης (8,47 g/L) και παρουσιάζεται στο διάγραμμα 3.15.



Διάγραμμα 3.13 Σύγκριση παραγωγής καροτενοειδών μεταξύ των συνθετικών υποστρωμάτων.



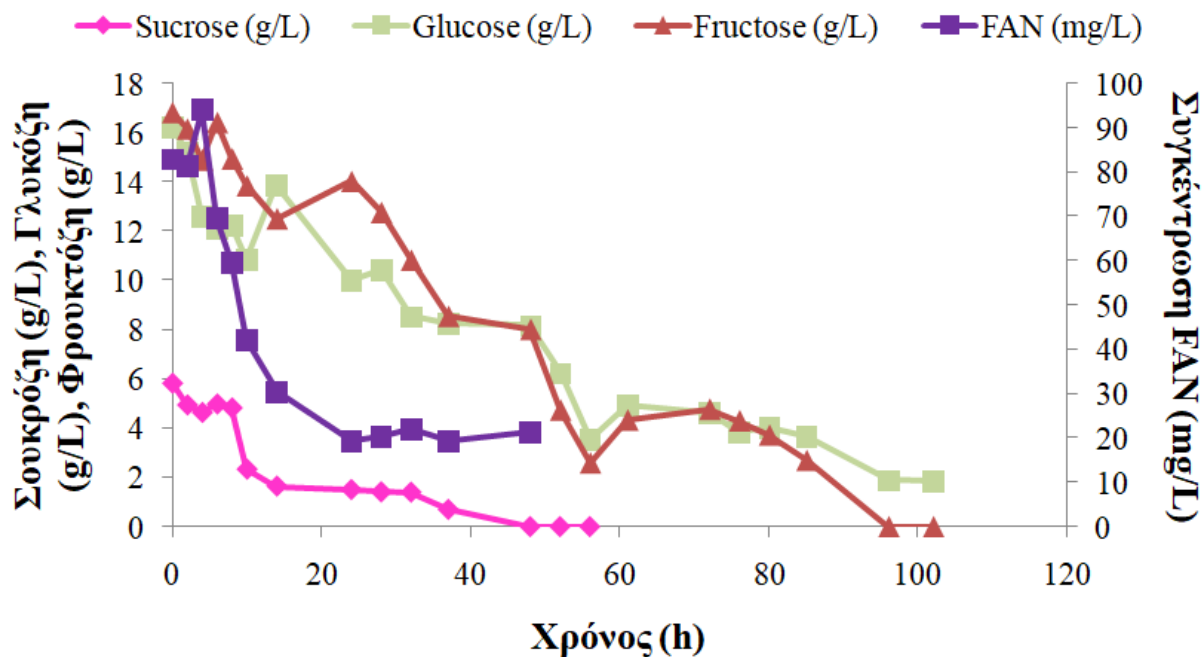
Διάγραμμα 3.14 Σύγκριση παραγωγής λιπιδίων μεταξύ των συνθετικών υποστρωμάτων.



Διάγραμμα 3.15 Σύγκριση ολικής ξηρής βιομάζας

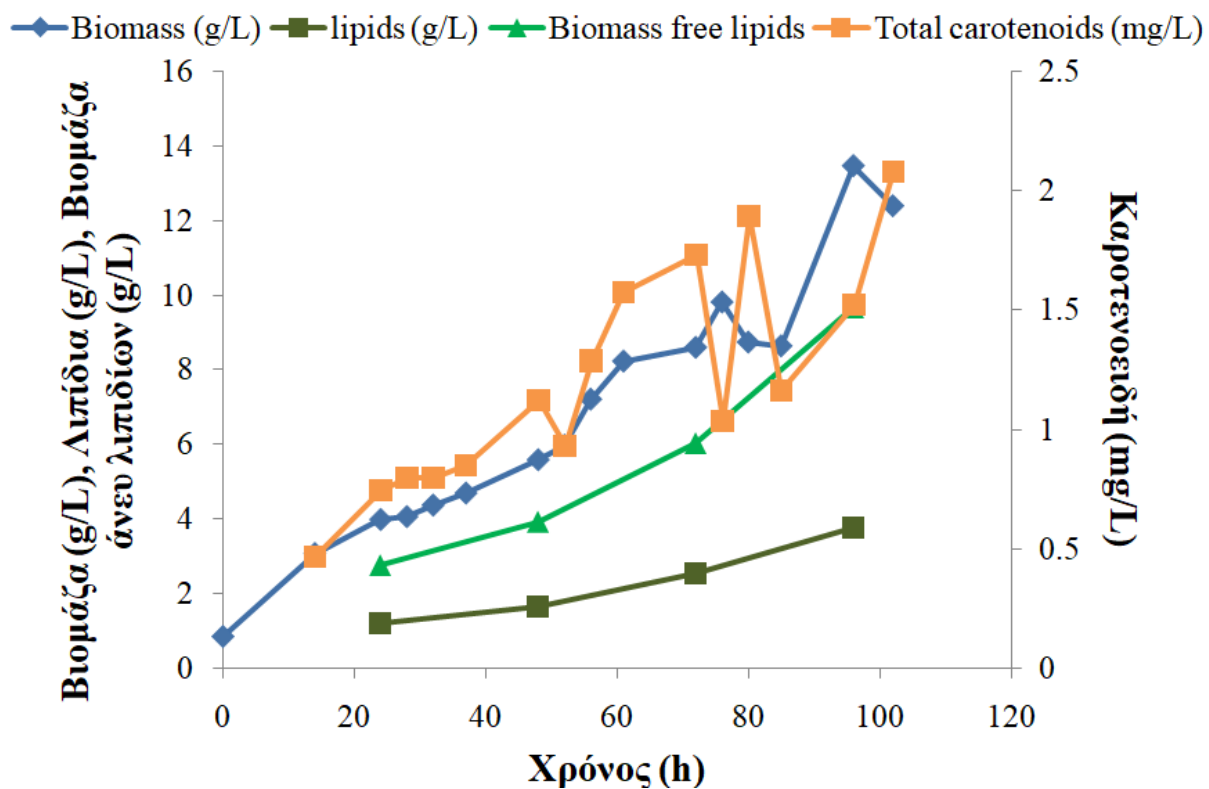
3.2 Ανάπτυξη σε υπόστρωμα από νωπές φλούδες πορτοκαλιού

Στο τέλος της πειραματικής διαδικασίας μελετήθηκε η ανάπτυξη της ζύμης *R. paludigenum* 2664 σε υπόστρωμα από νωπές φλούδες πορτοκαλιού χωρίς της προσθήκη ιχνοστοιχείων ή ανόργανου αζώτου. Το υπόστρωμα από φλούδες πορτοκαλιού ήταν πλούσιο σε σάκχαρα όπως η σακχαρόζη, η φρουκτόζη και η γλυκόζη. Στο διάγραμμα 3.16 παρουσιάζεται η κινητική της κατανάλωσης των σακχάρων του υποστρώματος και του FAN. Η σακχαρόζη καταναλώθηκε στις πρώτες 48 ώρες της ζύμωσης, η φρουκτόζη στις 96 ώρες, ενώ η γλυκόζη δεν καταναλώθηκε πλήρως. Το FAN ξεκίνησε από τα 82,77 mg/L και κατέληξε στις 48 ώρες να σταθεροποιείται στα 21,25 mg/L.



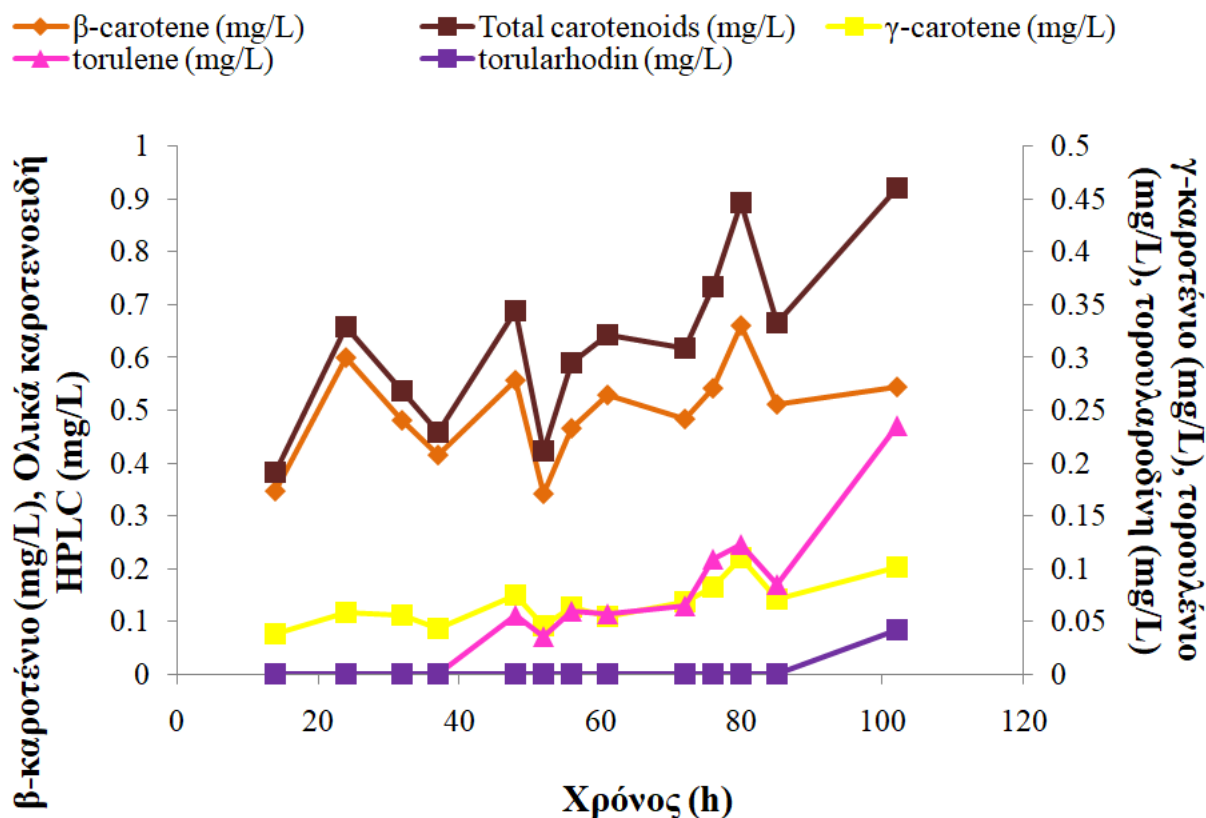
Διάγραμμα 3.16 Κινητική κατανάλωσης σουκρόζης, φρουκτόζης, γλυκόζης και οργανικού αζώτου

Στο διάγραμμα 3.17 παρουσιάζεται η κινητική παραγωγής καροτενοειδών, λιπιδίων, ολικής ξηρής βιομάζας και βιομάζας άνευ λιπιδίων. Η παραγωγή των καροτενοειδών έφτασε τη μέγιστη συγκέντρωση (2,08 mg/L) στο τέλος της ζύμωσης και συγκεκριμένα στις 102 ώρες. Η μέγιστη τιμή των λιπιδίων στην συγκεκριμένη ζύμωση (3,77 g/L), επιτεύχθηκε στις 96 ώρες. Η ολική ξηρή βιομάζα έφτασε τα 13,45 g/L, ενώ την ίδια χρονική στιγμή και η βιομάζα άνευ λιπιδίων είχε μέγιστο 9,68 g/L.



Διάγραμμα 3.17 Κινητική παραγωγής καροτενοειδών, λιπιδίων, ολικής ξηρής βιομάζας και βιομάζας άνευ λιπιδίων.

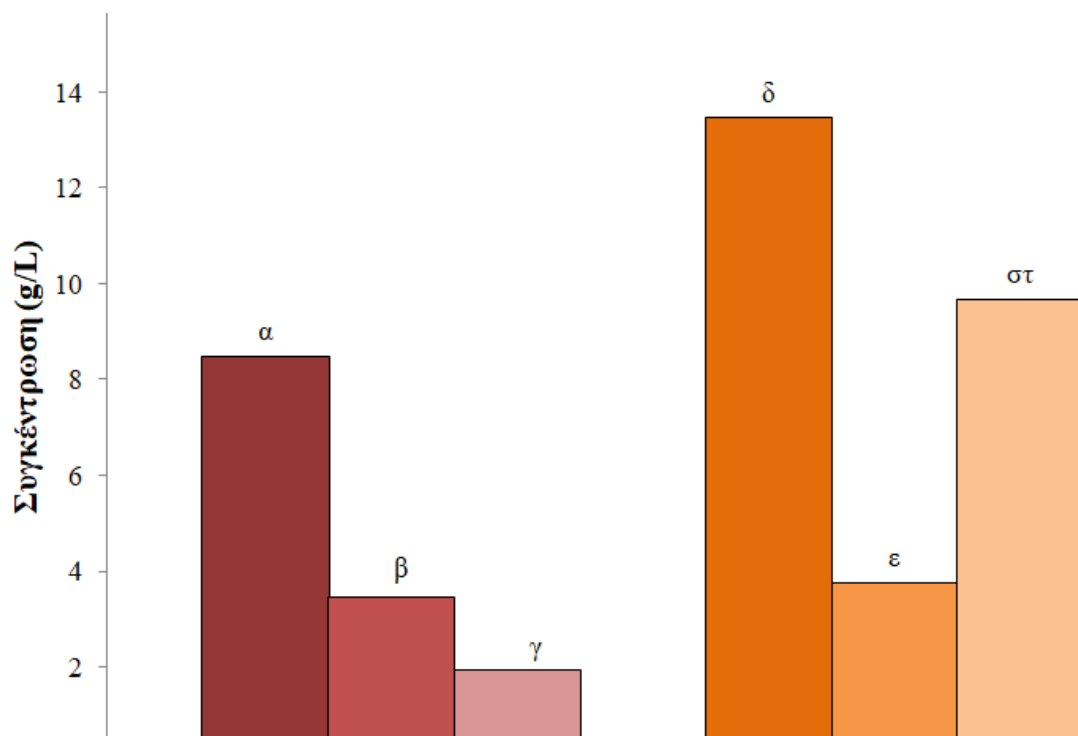
Τα καροτενοειδή που παρήχθησαν κατά τη ζύμωση παρουσιάζονται στο διάγραμμα 3.18. Το β-καροτένιο παράχθηκε στην μεγαλύτερη ποσότητα (0,66 mg/L), ωστόσο στο υπόστρωμα από νωπές φλούδες πορτοκαλιού παράχθηκαν επίσης γ-καροτένιο (με μέγιστη τιμή τα 0,11 mg/L) σε όλη την διάρκεια της παραγωγής καροτενοειδών, τορουλένιο (0,12 mg/L) αλλά και τορουλαροδίνη (0,04 mg/L).



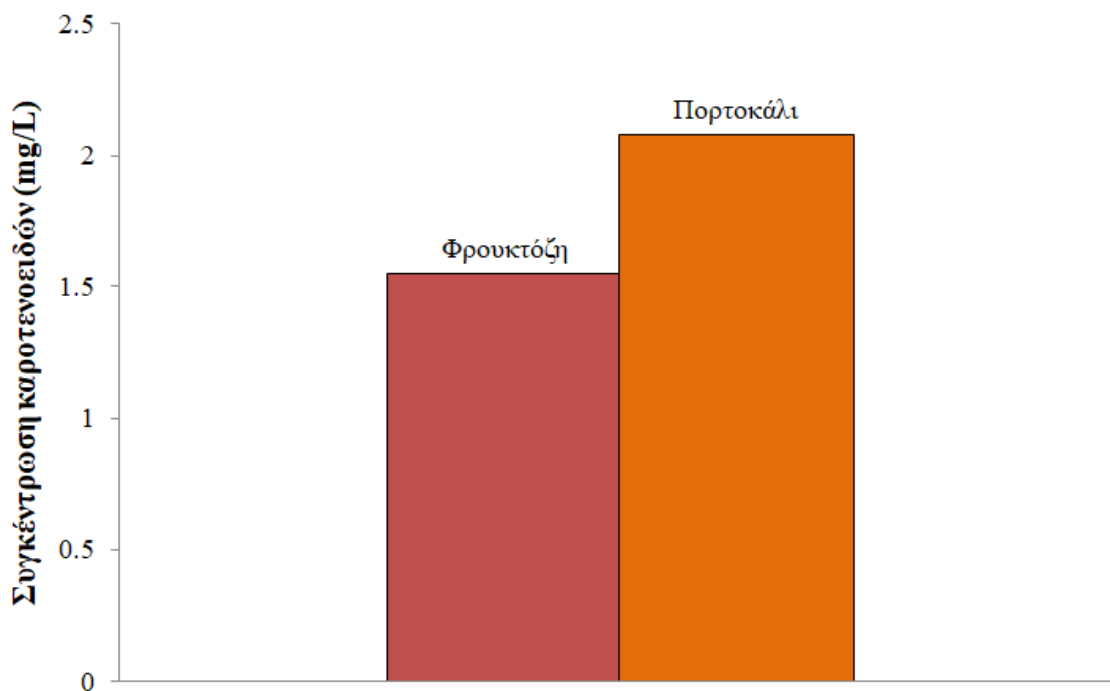
Διάγραμμα 3.18 Παραγόμενα ολικά καροτενοειδή HPLC, κινητική παραγωγής β-καροτενίου, γ-καροτενίου, τορουλενίου και τορουλαροδίνης.

3.2.1 Συγκριτική παρουσίαση των αποτελεσμάτων

Στα διαγράμματα 3.19 και 3.20 απεικονίζεται η σύγκριση μεταξύ της μέγιστης παραγωγής καροτενοειδών, λιπιδίων, ολικής ξηρής βιομάζας και βιομάζας χωρίς λιπίδια σε συνθετικό υπόστρωμα (στην προκειμένη περίπτωση στο υπόστρωμα φρουκτόζης) και της παραγωγής τους σε υπόστρωμα από νωπές φλούδες πορτοκαλιού, οι οποίες θεωρούνται απόβλητο. Είναι εμφανές το γεγονός ότι στο υπόστρωμα από φλούδες πορτοκαλιού η κινητική παραγωγής καροτενοειδών, λιπιδίων και βιομάζας ήταν μεγαλύτερη. Πιο συγκεκριμένα η διαφορά των δύο υποστρωμάτων στην παραγωγή καροτενοειδών ήταν 0,53 mg/L, στην παραγωγή λιπιδίων 0,29 g/L και στην παραγωγή ολικής ξηρής βιομάζας 4,98 g/L.



Διάγραμμα 3.19 Συγκριτική παρουσίαση παραγωγής λιπιδίων, ολικής ξηρής βιομάζας και άνευ λιπιδίων βιομάζας.
 α: βιομάζα σε υπόστρωμα φρουκτόζης, β: λιπίδια και γ: βιομάζα άνευ λιπιδίων.
 δ: βιομάζα σε υπόστρωμα από φλούδες πορτοκαλιού, ε: λιπίδια και στ: βιομάζα άνευ λιπιδίων



Διάγραμμα 3.20 Συγκριτική παρουσίαση παραγωγής καροτενοειδών.

4. Συμπεράσματα

Στο πλαίσιο της παρούσας πτυχιακής εργασίας ερευνήθηκε η ικανότητα ανάπτυξης και παραγωγής λιπιδίων και καροτενοειδών από το στέλεχος *Rhodospiridium rubridigenum* 2664 σε συνθετικά υποστρώματα και σε ένα υπόστρωμα από απόβλητα (νωπές φλούδες πορτοκαλιού), μέσα από μια σειρά πειραματικών διαδικασιών. Τα τελικά δεδομένα παρατίθενται στους πίνακες 3. και 4.

Πίνακας 3. Μέγιστες τιμές παραγωγής καροτενοειδών και βιομάζας

Υπόστρωμα	Χρόνος (h)	Καροτενοειδή (mg/L)	Βιομάζα (g/L)
Γλυκόζη	80	0,96	5,34
Σουκρόζη	100	1,42	6,45
Φρουκτόζη	108	1,55	8,47
1:1 Γλυκόζη-Γαλακτόζη	94	0,85	7,82
Πορτοκάλι	102	2,08	13,45

Πίνακας 4. Μέγιστες τιμές παραγωγής λιπιδίων, περιεκτικότητας λιπιδίων % και βιομάζας χωρίς λιπίδια

Υπόστρωμα	Χρόνος (h)	Λιπίδια (g/L)	Περιεκτικότητα (%)	Βιομάζα άνευ λιπιδίων (g/L)
Γλυκόζη	28	1,93	63,7	1,1
Σουκρόζη	24	1,28	19,2	3,2
Φρουκτόζη	48	3,48	64,1	1,9
1:1 Γλυκόζη-Γαλακτόζη	48	2,94	53,9	2,5
Πορτοκάλι	96	3,77	28,0	9,7

Αν και στο συνθετικό υπόστρωμα φρουκτόζης παρήχθησαν υψηλές ποσότητες λιπιδίων και καροτενοειδών, στο υπόστρωμα από νωπές φλούδες πορτοκαλιού η κινητική παραγωγής ήταν ακόμα υψηλότερη. Αυτό ενδέχεται να οφείλεται στην περιεκτικότητα του πορτοκαλιού σε διάφορα θρεπτικά συστατικά και σάκχαρα. Η παραγωγή υποστρωμάτων από απόβλητα, όπως οι φλούδες πορτοκαλιού, μπορεί να αποτελέσει μια μελλοντική πηγή παραγωγής λιπιδίων και χρωστικών με δυνητικά οφέλη, τόσο για την βιομηχανία όσο και για ένα βιώσιμο μοντέλο παραγωγής τους. Η αξιοποίηση αυτών των αποβλήτων προσφέρει τη δυνατότητα μείωσης της εξάρτησης από παραδοσιακές πηγές που επιβαρύνουν το περιβάλλον αλλά και τους περιορισμένους φυσικούς πόρους.

Βιβλιογραφικά το στέλεχος *Rhodospiridium paludigenum* 2664 δεν έχει μελετηθεί ως προς τις βέλτιστες συνθήκες ανάπτυξης του ή τα προϊόντα που παράγει. Ωστόσο, οι [Yimyoo & Limtong \(2011\)](#) μελέτησαν την παραγωγή καροτενοειδών από το στέλεχος *Rhodospiridium*

paludigenum DMKU3-LPK4 σε υπόστρωμα γλυκερόλης. Η βέλτιστη θερμοκρασία φαίνεται να ήταν οι 32°C και το αρχικό pH 6. Η μέγιστη τιμή των καροτενοειδών ήταν 3,42 mg/L στις 132 ώρες, αρκετά υψηλότερη από την μέγιστη απόδοση του στελέχους *R. paludigenum* 2664 (2,08 mg/L). Στην έρευνα των [Warjoto et al \(2020\)](#) μελετήθηκε το στέλεχος *R. paludigenum* InaCC Y-236, το οποίο σε υπόστρωμα από σάκχαρα φλούδων πορτοκαλιού στους 28°C και pH 6 είχε μέγιστη τιμή καροτενοειδών 107,63 μg/g. Την παραγωγή λιπιδίων από διάφορα στελέχη, μεταξύ αυτών και τα *R. paludigenum* DMKU-RE124 και *R. paludigenum* DMKU-CE20, ερεύνησαν οι [Poontawee, et al \(2017\)](#). Όπως φαίνεται και τα δύο στελέχη σε υπόστρωμα γλυκόζης παρήγαγαν 3,2 g/L λιπιδίων ενώ σε υπόστρωμα ξυλόζης το *R. paludigenum* DMKU-RE124 είχε μέγιστο 1,2 g/L και το *R. paludigenum* DMKU-CE20 0,3 g/L, και τα δύο στελέχη παρήγαγαν μικρότερη ποσότητα λιπιδίων ανά λίτρο υποστρώματος από *R. paludigenum* 2664. Φαίνεται λοιπόν βάσει της βιβλιογραφίας πως το στέλεχος *R. paludigenum* 2664 μπορεί να παράξει ικανές ποσότητες καροτενοειδών και λιπιδίων, ακόμα και σε μη συνθετικά υποστρώματα.

5. Βιβλιογραφικές αναφορές

Aksu, Z., & Eren, A. T. (2005). Carotenoids production by the yeast *Rhodotorula mucilaginosa*: Use of agricultural wastes as a carbon source. *Process Biochemistry*, 40(9), 2985–2991.

Popova, A.V., Andreeva, A.S. 2013. Carotenoid-Lipid interactions p. 215-236. *Advances in Planar Lipid Bilayers and Liposomes*. Academic Press.

Beopoulos, A., Nicaud, JM., Gaillardin, C., 2011. An overview of lipid metabolism in yeasts and its impact on biotechnological processes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, p. 1193-1206.

Bushway, R.J., 1986. Determination of α - and β -carotene in some raw fruits and vegetables by high-performance liquid chromatography. *J. Agric. Food Chem.* 34, 409–412

Buzzini, P., Innocenti, M., Turchetti, B., Libkind, D., Van Broock, M., Mulinacci, N., 2007. Carotenoid profiles of yeasts belonging to the genera *Rhodotorula*, *Rhodospiridium*, *Sporobolomyces*, and *Sporidiobolus*. *Can. J. Microbiol.* 53, 1024–1031

Britton, G., Jensen, S.L., Pfander, H., 2004. *Carotenoid Handbook* Birkhauser Verlag. Birkhäuser Verlag, AG Basel, Boston.

Venil, C. K., Zakaria, Z. A., Ahmad, W. A., 2013. Bacterial pigments and their applications, *Process Biochemistry*, Volume 48, Issue 7, p. 1065-1079

Scheiner, D. 1976. Determination of ammonia and Kjeldahl nitrogen by indophenol method, *Water research*, volume 10, issue 1, p. 31-36

Sereti, F., Papadaki, A., Alexandri, M., Kachrimanidou, V., Kopsahelis, N. Exploring the potential of novel *R. kratochvilovae* red yeasts towards the sustainable synthesis of natural carotenoids, 2023. Sustainable Chemistry and Pharmacy, Volume 31.

Folch, J., Lees, M., Sloane Stanley, G., 1987. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. J. Biol. Chem. 55, 999–1033.

Chandi, G.K., Gill, B.S. 2011. Production and Characterization of Microbial Carotenoids as an Alternative to Synthetic Colors: a Review, International Journal of Food Properties, 14:3, 503-513

Malik, K., Tokkas, J., Goyal, S., 2012. Microbial Pigments: A review. International Journal of Microbial Resource Technology, Volume 1, Issue 4

Leif H. Skibsted, 2012. Carotenoids in Antioxidant Networks. Colorants or Radical Scavengers. Journal of Agricultural and Food Chemistry 2409-2417

Lie, S., 1973. The EBC-ninhydrin method for determination of free alpha amino nitrogen, Journal of the Institute of brewing, Volume 79, issue 1, p. 37-41

Lopes, N.A., Remedi, R.D., dos Santos Sá, C., Burkert, C.A.V., de Medeiros Burkert, J.F., 2017. Different cell disruption methods for obtaining carotenoids by *Sporodiobolus pararoseus* and *Rhodothorula mucilaginosa*. Food Sci. Biotechnol. 26, 759–766

Mussagy, C., Winterburn, J., Ebinuma, V., Pereira, J. (2019). Production and extraction of carotenoids produced by microorganisms. Applied Microbiology and Biotechnology. 103. 10.1007/s00253-018-9557-5.

Patel, A., Pruthi, V., Singh, R.P., Pruthi, P.A., 2015. Synergistic effect of fermentable and non-fermentable carbon sources enhances TAG accumulation in oleaginous yeast *Rhodospiridium kratochvilovae* HIMPA1. *Bioresour. Technol.* 188, 136–144

Poontawee, R., Yongmanitchai, W., Limtong, S., Efficient oleaginous yeasts for lipid production from lignocellulosic sugars and effects of lignocellulose degradation compounds on growth and lipid production, 2017. *Process Biochemistry*, Volume 53.

Ghazani, S. M., Marangoni, A. G., 2022. Microbial lipids for foods, *Trends in Food Science & Technology*, p. 593-607

Tanuka, S., Barrow, C. J., Deshmukh S. K., Microbial Pigments in the Food Industry—Challenges and the Way Forward 2019. *Frontiers in Nutrition*, Volume 6

Papanikolaou, S., Aggelis, G. 2011. Lipids of oleaginous yeasts. Part 1: Biochemistry of single cell oil production. *European Journal of Lipid Science and Technology*, p. 1031-1051

Yimyoo, T., Yongmanitchai, W., Limtong, S., (2011) “Carotenoid Production by *Rhodospiridium paludigenum* DMKU3-LPK4 using Glycerol as the Carbon Source”, *Agriculture and Natural Resources* . Bangkok, Thailand, 45(1), pp. 90–100.

Vachali, P. et al., 2012. “Microbial carotenoids.” in *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, vol. 898, p. 41-59.

Vargas-Sinisterra, A.F., Ramírez-Castrillón, M. 2021. Yeast carotenoids: production and activity as antimicrobial biomolecule. *Arch Microbiol* 203:873–888

Walker , G.M., 2009. Yeasts p 1174-1187 in Schaechter M. Desk Encyclopedia of Microbiology. Academic Press

Warjoto, R. E., Jennifer, J., & Lay, B. W. (2020). Carotenoid Production by *Rhodospiridium paludigenum* Using Orange Peel Extract as Substrate. Biosaintifika: Journal of Biology & Biology Education, 12(3), 319-328

Liu, Z., Feist, A. M., Dragone, G., Mussatto, S. I., Lipid and carotenoid production from wheat straw hydrolysates by different oleaginous yeasts,2020. Journal of Cleaner Production, Volume 249.