

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

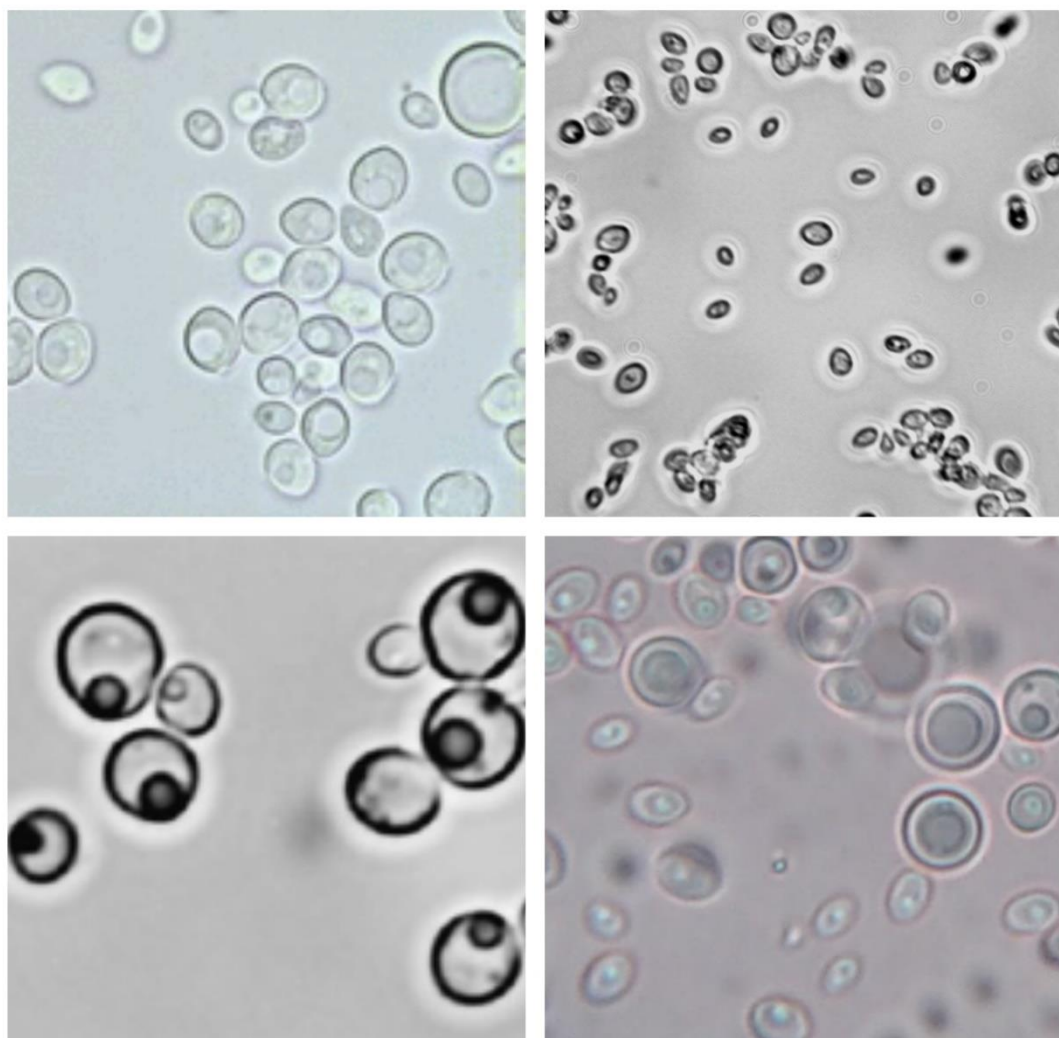
Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου

Εργαστήριο Μηχανικής Τροφίμων,
Επεξεργασίας & Συντήρησης Γεωργικών Προϊόντων

ΠΜΣ: Επιστήμη και Τεχνολογία Τροφίμων και Διατροφή του Ανθρώπου

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

*Αξιολόγηση και βελτιστοποίηση της παραγωγής μεταβολικών προϊόντων με
χρήση ελαιογόνων ζυμών*



Μαρία-Νεφέλη Π. Ευθυμίου

Επιβλέπων:

*Απόστολος Κουτίνας, Επίκουρος
Καθηγητής*

ΑΘΗΝΑ 2015

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου

**Εργαστήριο Μηχανικής Τροφίμων,
Επεξεργασίας & Συντήρησης Γεωργικών Προϊόντων**

**ΠΜΣ: Επιστήμη και Τεχνολογία Τροφίμων και Διατροφή του
Ανθρώπου**

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

*«Αξιολόγηση και βελτιστοποίηση της παραγωγής μεταβολικών
προϊόντων με χρήση ελαιογόνων ζυμών»*

Επιβλέπων:

Απόστολος Κουτίνας, Επίκουρος Καθηγητής

Μαρία-Νεφέλη Π. Ευθυμίου

ΑΘΗΝΑ 2015

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

*«Αξιολόγηση και βελτιστοποίηση της παραγωγής μεταβολικών
προϊόντων με χρήση ελαιογόνων ζυμών»*

Εξεταστική Επιτροπή:

*Κουτίνας Απόστολος, Επίκουρος Καθηγητής
Παπανικολάου Σεραφείμ, Αναπληρωτής Καθηγητής
Μαλλούχος Αθανάσιος, Λέκτορας*

Επιβλέπων:

Απόστολος Κουτίνας, Επίκουρος Καθηγητής

Μαρία-Νεφέλη Π. Ευθυμίου

ΑΘΗΝΑ 2015

*Στους γονείς μου , Παντελή & Νίκη
στις αδερφές μου, Βαλεντίνα & Δημητρα*

Ευχαριστίες

Η παρούσα μελέτη εκπονήθηκε στο εργαστήριο Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, στα πλαίσια του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών «Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου».

Με την ολοκλήρωση της, ο κύκλος των μεταπτυχιακών μου σπουδών κλείνει, αφήνοντας μου ποικίλες αναμνήσεις και συναίσθημα. Στα πλαίσια της μελέτης αυτής, μου δόθηκε η ευκαιρία να συνεργαστώ εποικοδομητικά με εξαιρετικούς ανθρώπους και να αποκομίσω χρήσιμες εμπειρίες αλλά και γνώσεις που θα με συνοδεύουν στη μετέπειτα ζωή μου.

Στο σημείο αυτό θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους τους ακαδημαϊκούς δασκάλους και τους συναδέλφους που συνέβαλαν στη μέχρι τώρα πορεία μου και ιδιαίτερα, όλους εκείνους που ασχολήθηκαν με την παρούσα μελέτη και βοήθησαν στην υλοποίησή της.

Πρωτίστως θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επίκουρο καθηγητή κ. Απόστολο Κουτίνα, για την ανάθεση και την επίβλεψη της παρούσας μελέτης, καθώς και για τις ευκαιρίες που μου έδωσε και την εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπό μου καθ' όλη τη διάρκεια της συνεργασίας μας.

Τον αναπληρωτή καθηγητή κ. Σεραφείμ Παπανικολάου ευχαριστώ για τις εύστοχες παρατηρήσεις του και τις καίριες συμβουλές του, οι οποίες συνέβαλαν καθοριστικά στην παρούσα μελέτη, καθώς και για τη συμμετοχή του στην τριμελή εξεταστική επιτροπή.

Τον λέκτορα κ. Αθανάσιο Μαλλούχο ευχαριστώ για τη συμμετοχή του στην τριμελή εξεταστική επιτροπή καθώς και για το χρόνο που αφιέρωσε για τη μελέτη του παρόντος κειμένου.

Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω την υποψήφια διδάκτωρ Κατερίνα Παπαδάκη, με την οποία είχα την τύχη να συνεργαστώ κατά τη διεξαγωγή της παρούσας μελέτης. Η καθοδήγηση και η βοήθεια που μου προσέφερε καθ' όλη τη διάρκεια της συνεργασίας μας υπήρξε σημαντική για μένα και καθοριστική για την ολοκλήρωση της μελέτης αυτής. Κυρίως θα ήθελα να την ευχαριστήσω για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε και για όλα όσα με δίδαξε.

Τον μεταδιδακτορικό ερευνητή Ανέστη Βλυσίδη, ευχαριστώ για την ευασχόληση του με το στατιστικό κομμάτι της παρούσας μελέτης καθώς και την καθοδήγησή του στο κομμάτι αυτό. Σε αυτό το σημείο θα ήθελα να ευχαριστήσω και τα λοιπά μέλη της ερευνητικής ομάδας του εργαστηρίου Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων που μοιράστηκαν τις ανησυχίες μου και βοήθησαν, με το δικό του τρόπο ο καθένας, στη διεξαγωγή αυτής της μελέτης. Φυσικά δεν θα μπορούσα να παραλείψω την κ. Χρυσανγή Γαρδέλη μέλος ΕΕΑΙΠ, που με προέτρεψε να ακολουθήσω αυτόν τον κλάδο, την οποία ευχαριστώ για το χρόνο που μου αφιέρωσε τόσο σε ακαδημαϊκό όσο και σε προσωπικό επίπεδο.

Το πιο μεγάλο «ευχαριστώ» το οφείλω στους δικούς μου ανθρώπους, τους γονείς μου Παντελή και Νίκη και τις αδερφές μου Βαλεντίνα και Δήμητρα, για την αγάπη τους και τη στήριξη τους σε κάθε απόφαση της ζωής μου, και τον Νίκο που στέκεται πλάι μου καθημερινά, στηρίζοντας τις προσπάθειές μου με υπομονή και κατανόηση.

Μ. Ν. Ευθυμίου

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός της παρούσας πτυχιακής μελέτης ήταν η διερεύνηση της δυνατότητας παραγωγής μικροβιακού λίπους τριών πρόσφατα απομονωμένων στελεχών ζυμών, PC_A2, PP_D3, MD_F1, τα οποία σε προηγούμενες μελέτες έδειξαν δείγματα λιποσυσσώρευσης, και η επιλογή του καταλληλότερου στελέχους για περαιτέρω μελέτη αξιολόγησης των βέλτιστων παραμέτρων που επηρεάζουν τη διαδικασία της ζύμωσης. Παράλληλα διερευνήθηκε και η παραγωγή άλλων μεταβολικών προϊόντων που δύνανται να προκύψουν από τις ζυμώσεις αυτές. Για το σκοπό αυτό, στα πρωταρχικά πειράματα χρησιμοποιήθηκε ως θρεπτικό μέσο διάλυμα γλυκόζης συγκέντρωσης 10 g/L, ενώ ο μεταβαλλόμενος παράγοντας ήταν η θερμοκρασία, η οποία κυμάνθηκε εντός του εύρους 22-35 °C.

Και τα τρία στελέχη, PC_A2, PP_D3, MD_F1, αναπτύχθηκαν ικανοποιητικά σε όλο το εύρος των εξεταζόμενων θερμοκρασιών με τις συγκεντρώσεις της μικροβιακής μάζας να κυμαίνονται μεταξύ 3,1-5,5 g/L, 4,0-6,8 g/L και 3,3-5,8 g/L για το κάθε στέλεχος αντίστοιχα. Η συγκέντρωση του παραγόμενου λίπους κυμάνθηκε μεταξύ 0,62-1,71 g/L για το στέλεχος PC_A2, 0,7-1,94 g/L για το στέλεχος PP_D3 και 0,73-2,05 g/L για το στέλεχος MD_F1. Τη μέγιστη συγκέντρωση παραγόμενου λίπους (2,05 g/L) παρουσίασε το στέλεχος MD_F1 κατά την καλλιέργειά του στους 22 °C, το οποίο και επιλέχθηκε για περαιτέρω μελέτη.

Άλλα παραγόμενα μεταβολικά προϊόντα που εντοπίστηκαν στο τέλος της ζύμωσης ήταν η αιθανόλη και η αραβιτόλη, η συσσώρευση των οποίων παρουσιάστηκε στις υψηλότερες θερμοκρασίες των 32 και 35 °C.

Στο δεύτερο μέρος της μελέτης, επιλέχθηκε το στέλεχος που παρουσίασε την μεγαλύτερη δυνατότητα λιποσυσσώρευσης με βάση τα προηγούμενα αποτελέσματα, και πραγματοποιήθηκε πειραματικός σχεδιασμός με τη βοήθεια λογισμικού με στόχο τον προσδιορισμό των συνθηκών που επηρεάζουν τη συγκέντρωση του μικροβιακού λίπους, της αιθανόλης και της αραβιτόλης, καθώς και την μεταξύ τους σχέση.

Ένα 3² κεντρικό σύνθετο σχέδιο (CCD) αναπτύχθηκε έτσι ώστε να εισάγει τετραγωνικούς όρους, και ως εκ τούτου, να επιτρέψει την εκτίμηση της καμπυλότητας για την πρόβλεψη της συγκέντρωσης παραγόμενου μικροβιακού λίπους αλλά και του λόγου αραβιτόλη/αιθανόλη.

Όσον αφορά το παραγόμενο μικροβιακό λίπος, σύμφωνα με τα αποτελέσματα του μοντέλου φαίνεται ότι οι χαμηλότερες τιμές θερμοκρασίας (< 28 °C) οδηγούν σε μειωμένη συγκέντρωση λίπους για το σύνολο του εύρους των τιμών της αρχικής συγκέντρωσης σακχάρων. Ωστόσο η αξιολόγηση της σημαντικότητας του μοντέλου μέσω του F-test καθώς και οι πολύ χαμηλοί συντελεστές R² και adj R² υπέδειξαν ότι το μοντέλο αποτυγχάνει να προβλέψει σωστά τις βέλτιστες τιμές θερμοκρασίας και αρχικής συγκέντρωσης σακχάρων που απαιτούνται για την βέλτιστη παραγωγή μικροβιακού λίπους.

Σχετικά με το λόγο αραβιτόλη/αιθανόλη το μοντέλο κρίθηκε σημαντικό για επίπεδο σημαντικότητας $\alpha=0,1$. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα του μοντέλου για αρχική συγκέντρωση σακχάρων μεταξύ 50-100 g/L σε συνδυασμό με χαμηλές θερμοκρασίες (< 24 °C), ο λόγος αραβιτόλη/αιθανόλη παρουσιάζει μείωση (τιμές $\leq 0,2$) γεγονός που υποδηλώνει την αυξημένη παραγωγή αιθανόλης έναντι της αραβιτόλης. Επιπλέον, σε όλο το εύρος των θερμοκρασιών, για αρχική συγκέντρωση σακχάρων έως 40 g/L ή μεγαλύτερη από 100 g/L, υπάρχει αύξηση του λόγου αραβιτόλη/αιθανόλη σε τιμές μεγαλύτερες του 0,2. Συγκεκριμένα, οι βέλτιστες τιμές των παραμέτρων σύμφωνα με τις προβλέψεις του μοντέλου, βρέθηκαν 33,1 °C και 16,9 g/L αρχικής συγκέντρωσης σακχάρων, οι οποίες αντιστοιχούν σε λόγο αραβιτόλη/αιθανόλη ίσο με 0,68.

Όσον αφορά τους παράγοντες που επηρεάζουν περισσότερο το λόγο παραγόμενη αραβιτόλη / παραγόμενη αιθανόλη, η αρχική συγκέντρωση των σακχάρων στο μέσο της καλλιέργειας παρουσίασε τη σημαντικότερη επίδραση, ενώ η αμέσως επόμενη σημαντικότερη επίδραση ασκείται από την θερμοκρασία.

Λέξεις κλειδιά: ζύμες, *Metschnikowia*, μικροβιακό λίπος, αραβιτόλη, αιθανόλη, βελτιστοποίηση

ABSTRACT

The aim of the present MSc dissertation was to investigate the potential production of microbial oil from three newly isolated yeast strains, PC_A2, PP_D3 and MD_F1, which have previously shown evidence of lipid accumulation, and the selection of the most suitable strain for further study to evaluate the optimal parameters influencing the production of microbial oil during fermentation. Furthermore, the production of other metabolic products was also investigated. Preliminary fermentations were carried out at initial glucose concentration of 10 g/L, while temperature was varied in the range of 22 to 35 °C.

All three strains grew satisfactorily in the entire range of the examined temperatures, with the total dry weights ranging between 3.1-5.5 g /L, 4.0-6.8 g /L and 3.3 to 5 .8 g /L for the strains PC_A2, PP_D3 and MD_F1, respectively. The concentration of the obtained single cell oil ranged between 0,62-1,71 g/L for strain PC_A2, 0,7-1,94 g/L for strain PP_D3 and 0,73-2,05 g/L for strain MD_F1. Yeast strain MD_F1, which was selected for further study, produced the highest concentration of single cell oil (2,05 g/L), when cultivated at 22 ° C.

Other metabolic products obtained at the end of the fermentation were ethanol and arabitol, the accumulation of which occurred at higher temperatures of 32 and 35 °C.

In the second part of the study, the yeast strain which presented the greatest potential to produce single cell oil was selected and an experimental design was developed to identify the conditions that affect the production of microbial oil, ethanol and arabitol, as well as the relationship between them.

A 3² central composite design (CCD) was developed so as to introduce quadratic terms, and hence, allow the estimation of curvature for the prediction of the lipid concentration and the arabitol/ethanol ratio.

The results obtained concerning the microbial oil production showed that lower temperatures (< 28 °C) led to reduced oil concentration for the entire range of the initial concentration of sugars. However, the significance of the model assessed via the F-test, as well as the very low values of R² and R² adj demonstrated that the model fails to predict correctly the optimum temperature and the initial concentration of sugars required for optimal production of microbial oil.

Concerning the arabitol/ethanol ratio, the model was found significant for level of significance α equal to 0.1. According to the results, for initial concentrations of sugars between 50-100 g/L in combination with low temperatures (< 24 ° C), the arabitol/ethanol ratio was decreased (values \leq 0.2) suggesting increased production of ethanol over arabitol. Moreover, increase of the arabitol/ethanol ratio was observed in the entire range of temperature for initial concentration of sugars up to 40 g/L or higher than 100 g/L, at values higher than 0.2. Specifically, the optimum values for

the examined parameters according to the model's estimations were 33,1 °C and 16,9 g/L of initial sugar concentration, which correspond to a ratio of arabitol/ethanol equal to 0,68.

Regarding the most important factors that influence the arabitol/ethanol ratio, the initial concentration of sugars is the most important parameter followed by temperature.

Key words: yeasts, *Metschnikowia*, single cell oil, arabitol, ethanol, optimization

Περιεχόμενα

1.Εισαγωγή.....	1
1.1.Γενικά.....	1
1.2. Φυτικά έλαια	3
1.3. Μικροβιακή παραγωγή λιπιδίων	4
1.3.1. Μικροβιακό λίπος & ελαιογόνοι μικροοργανισμοί.....	4
1.3.2. Εφαρμογές μικροβιακού λίπους.....	7
1.3.3. Βιοχημεία σύνθεσης λιπιδίων.....	9
1.4. Μικροβιακή Παραγωγή Αιθανόλης και Πολυολών	12
1.4.1. Αιθανόλη	13
1.4.2. Αραβιτόλη	17
1.5. Ζύμες του γένους <i>Metschnikowia</i>	25
1.6.Σκοπός της παρούσας μελέτης	30
2.Υλικά και μέθοδοι	31
2.1. Βιολογικό υλικό	31
2.2. Παρασκευή εμβολίου	31
2.3. Θρεπτικό μέσο και συνθήκες ζυμώσεων υγρής κατάστασης.....	32
2.4. Αναλυτικές μέθοδοι.....	32
2.4.1.Προσδιορισμός βιομάζας	32
2.4.2. Προσδιορισμός σακχάρων και μεταβολιτών.....	32
2.4.3. Προσδιορισμός αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων (FAN).....	33
2.4.4. Εκχύλιση ενδοκυτταρικού λίπους	34
2.4.5. Προσδιορισμός pH	34
2.5. Βελτιστοποίηση εξεταζόμενων παραμέτρων	34
2.5.1. Σχεδιασμός πειραμάτων – Κεντρικός Σύνθετος Σχέδιασμός (Central Composite Design)	35
3. Αποτελέσματα	37
3.1. Επίδραση της θερμοκρασίας κατά την υγρή ζύμωση του απομονωμένου στελέχους PC_A2	37
3.2. Επίδραση της θερμοκρασίας κατά την υγρή ζύμωση του απομονωμένου στελέχους PP_D3.....	40
3.3. Επίδραση της θερμοκρασίας κατά την υγρή ζύμωση του απομονωμένου στελέχους MD_F1	43
3.4. Συγκριτική αξιολόγηση των στελεχών PC_A2, PP_D3 και MD_F1 κατά την υγρή καλλιέργειά τους υπό την επίδραση διαφορετικών θερμοκρασιών.....	46

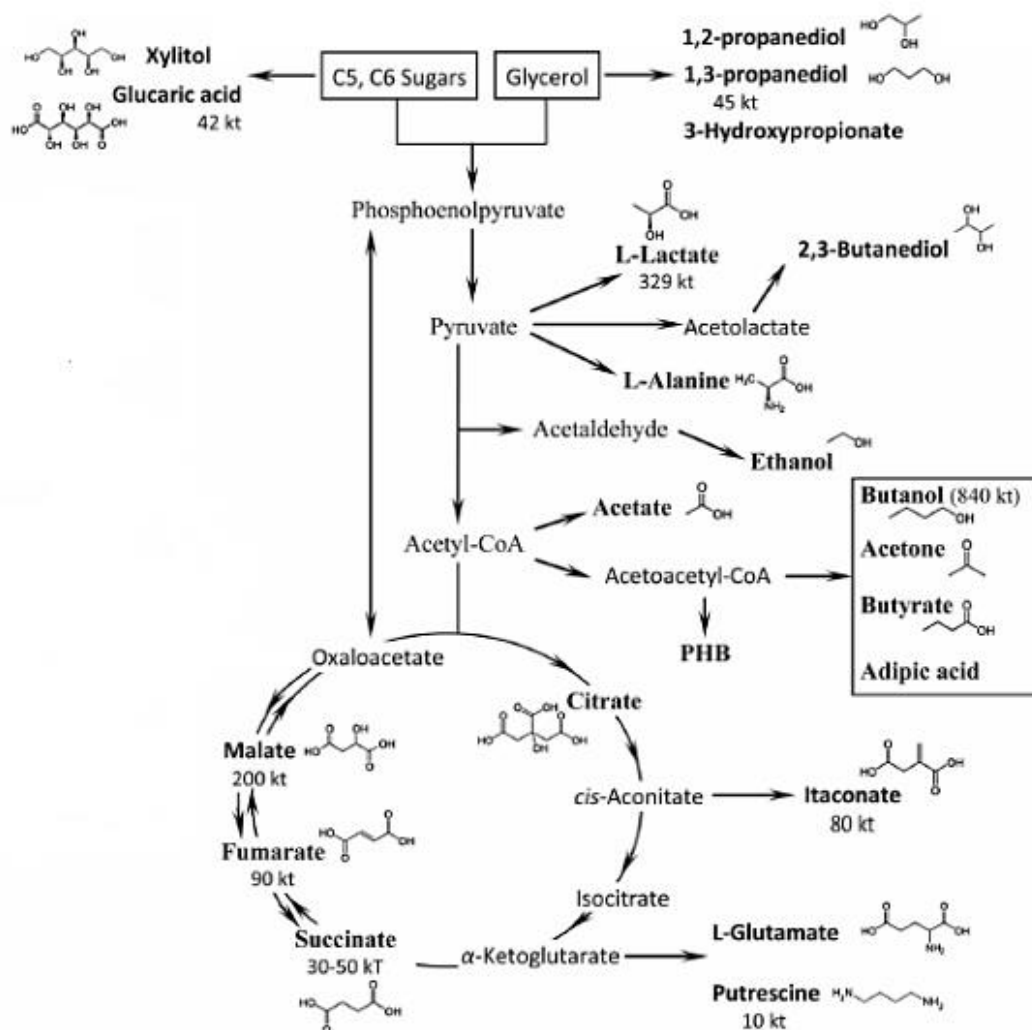
3.5. Αποτελέσματα μοντέλου CCD, σχετικά με την παραγωγή μικροβιακού λίπους, κατά την καλλιέργεια του στελέχους MD_F1.....	49
3.6. Αποτελέσματα μοντέλου CCD, σχετικά με την παραγωγή αιθανόλης και αραβιτόλης, κατά την καλλιέργεια του στελέχους MD_F1.....	51
4. Συζήτηση.....	56
5. Μελλοντικές Μελέτες.....	66
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	68

1.Εισαγωγή

1.1.Γενικά

Η εφαρμογή βιοδιυλιστηρίων στις μέρες μας αποτελεί πλέον αναγκαιότητα καθώς τα αποθέματα ορυκτών καυσίμων εξαντλούνται, η ανακύκλωση των αποβλήτων γίνεται όλο και πιο δαπανηρή και προβληματική, η υπερθέρμανση του πλανήτη αποτελεί πραγματικότητα, ενώ ο ολοένα αυξανόμενος πληθυσμός της γης θα απαιτεί όλο και περισσότερη κατανάλωση ενέργειας και καταναλωτικών αγαθών.

Στα πλαίσια αυτά, τα τελευταία χρόνια το ερευνητικό ενδιαφέρον έχει στραφεί προς εναλλακτικές τεχνολογίες παραγωγής χημικών και καυσίμων (π.χ. τεχνολογία μικροβιακών ζυμώσεων). Στη σύγχρονη βιομηχανική πρακτική το μεγαλύτερο μέρος των παραγόμενων χημικών προέρχεται από την πετροχημική βιομηχανία, ωστόσο πολλά από αυτά δύνανται να παραχθούν μέσω μικροβιακών ζυμώσεων (Εικόνα 1).



Εικόνα 1: Χημικά που δύνανται να παραχθούν μέσω μικροβιακών ζυμώσεων (Koutinas et al., 2014a).

Μέσω των μικροβιακών ζυμώσεων δύνανται να αξιοποιηθούν ροές αποβλήτων και παραπροϊόντων, τα οποία δημιουργούνται κατά μήκος οποιουδήποτε βιομηχανικού τομέα της αλυσίδας εφοδιασμού τροφίμων. Υπολογίζεται ότι περίπου 89 εκατομμύρια τόνοι αποβλήτων τροφίμων παράγονται στην Ε.Ε. ετησίως, εκ των οποίων τα 27 εκατομμύρια είναι αποτέλεσμα της παραγωγής τροφίμων (39%), των νοικοκυριών (42%), των υπηρεσιών τροφοδοσίας τροφίμων (14%) και λιανικής ή χονδρικής πώλησης προϊόντων διατροφής (Monier et al., 2010).

Μελέτες που έχουν δημοσιευθεί από τον FAO εκτιμούν ότι περισσότερο από 1,3 εκατομμύρια τόνοι των ετησίων αποβλήτων της αλυσίδας τροφίμων, αντιστοιχούν στο 50% των τροφίμων που θα χαθεί ή θα δαπανηθεί κατά μήκος της αλυσίδας εφοδιασμού από τον γεωργικό τομέα στον καταναλωτή (Parfitt et al., 2010).

Συνεπώς η αξιοποίηση των αποβλήτων και των παραπροϊόντων που δημιουργούνται από τις τρέχουσες βιομηχανικές διεργασίες θα μπορούσε να οδηγήσει στην ανάπτυξη νέων βιώσιμων διαδικασιών (Koutinas et al., 2014a, b).

1.2. Φυτικά έλαια

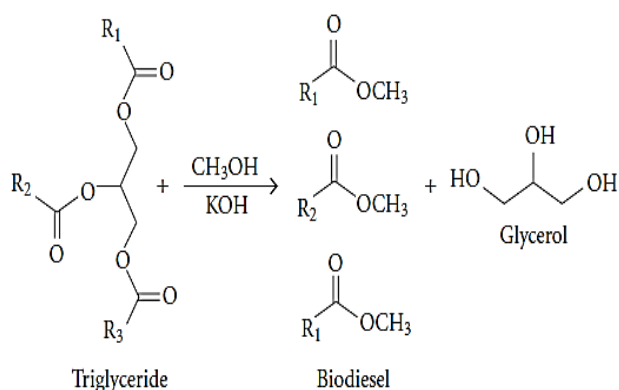
Οι ελαιούχοι σπόροι χρησιμοποιούνται συνήθως για την παραγωγή φυτικών ελαίων και αλεύρων πλούσιων σε πρωτεΐνη (oilcakes) που χρησιμοποιούνται ως ζωοτροφή. Παρέχουν ακόμα μια μοναδική ευκαιρία για την παραγωγή βιοκαυσίμων αλλά και λιπαρών οξέων, τα οποία μπορούν να αντικαταστήσουν χημικές ουσίες που παράγονται μέσω της πετροχημικής βιομηχανίας με πληθώρα εφαρμογών όπως λιπαντικά, επιφανειοδραστικές ουσίες και απορρυπαντικά (Octave and Thomas, 2009). Τα φυτικά έλαια αποτελούνται κατά κύριο λόγο από τριγλυκερίδια, τα οποία περιέχουν λιπαρά οξέα με 8-24 άτομα άνθρακα. Τα πιο αντιπροσωπευτικά φυτικά έλαια φέρουν λιπαρά οξέα με 16 και 18 άτομα άνθρακα. Λόγω των ιδιοτήτων τους δύνανται να χρησιμοποιηθούν ευρέως προς παραγωγή:

- i. βιοκαυσίμων πρώτης γενιάς (βιοντίζελ)
- ii. επιφανειοδραστικών ουσιών
- iii. βιοδιασπώμενων λιπαντικών και υδραυλικών υγρών
- iv. πολυακόρεστων λιπαρών οξέων που μπορούν να χρησιμοποιηθούν από τη βιομηχανία τροφίμων και φαρμάκων.

Η ανάγκη αντικατάστασης των προϊόντων της πετροχημικής βιομηχανίας με νέα βιοτεχνολογικά προϊόντα είχε σαν αποτέλεσμα την στροφή της έρευνας προς τη χρήση φυτικών ελαίων για την παραγωγή ελαιοχημικών προϊόντων καθώς αποτελούν προϊόντα μη-τοξικά και άμεσα βιοαποικοδομήσιμα (Böttcher et al., 2009; Buchholz and Bornscheuer, 2005; Tsakona et al., 2014).

Η παραγωγή βιοαιθανόλης (κυρίως από σακχαρόζη και αμυλούχους καρπούς) και βιοντίζελ αποτελούν τα κυριότερα βιοκαύσιμα πρώτης γενιάς που παράγονται σήμερα σε βιομηχανική κλίμακα. Το βιοντίζελ παράγεται μέσω *trans*-εστεροποίησης των τριγλυκεριδίων με μικρής αλυσίδας αλκοόλες (κυρίως μεθανόλη και αιθανόλη), παρουσία όξινων ή βασικών καταλυτών, που έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή μονοακυλ-εστέρων, γνωστοί ως μεθυλεστέρες λιπαρών οξέων (FAMES) και αιθυλεστέρες λιπαρών οξέων (FAEEs) (Εικόνα 2).

Η παγκόσμια παραγωγή βιοντίζελ στηρίζεται κυρίως στην αξιοποίηση απόβλητων ελαίων και ελαιούχων καρπών όπως ελαιοκράμβη, ηλίανθος και σόγια. Παρόλα αυτά η πρόσφατη κρίση που αφορά τα τρόφιμα υποδεικνύει ότι η έρευνα θα πρέπει να στραφεί στην ανάπτυξη βιοκαυσίμων δεύτερης γενιάς τα οποία θα



Εικόνα 2: Αντίδραση παραγωγής βιοντίζελ μέσω *trans*-εστεροποίησης, παρουσία βασικού καταλύτη KOH, με μεθανόλη.

χρησιμοποιούν ως πρώτη ύλη άλλες ανανεώσιμες πηγές για την παραγωγή τους όπως λιγνοκυτταρινούχες πρώτες ύλες και βιομηχανικά απόβλητα όπως αυτά της βιομηχανίας τροφίμων (Koutinas and Papanikolaou, 2011).

1.3. Μικροβιακή παραγωγή λιπιδίων

Κατά τη διάρκεια των τελευταίων δεκαετιών, η μικροβιακή παραγωγή λιπιδίων αποτελεί σημαντικό τομέα της έρευνας. Το ολοένα αυξανόμενο ενδιαφέρον ως προς τις εναλλακτικές οδούς για μια οικονομικά αποδοτική παραγωγή βιοκαυσίμων από ανανεώσιμες πρώτες ύλες έχει θέσει τις βάσεις για την εντατική αναζήτηση ετερότροφων (ζύμες και μύκητες) ή φωτοαυτότροφων (φύκια) μικροοργανισμών, οι οποίοι είναι ικανοί να συσσωρεύουν υψηλή περιεκτικότητα ελαίων (Papanikolaou and Aggelis, 2010).

Ωστόσο, η επιλογή του κατάλληλου κάθε φορά μικροοργανισμού παίζει σημαντικό ρόλο στη διευκόλυνση της βιομηχανικής εφαρμογής της παραγωγής του μικροβιακού λίπους. Για παράδειγμα, τα μικροφύκη μπορούν να συσσωρεύουν υψηλές ποσότητες λιπιδίων όμως δεν μπορούν σε καμία περίπτωση να συναγωνιστούν τους ελαιογόνους μύκητες ή ζύμες καθώς για την καλλιέργειά τους απαιτείται αρκετός χώρος και μακρά διάρκεια ζύμωσης (Koutinas and Papanikolaou, 2011).

1.3.1. Μικροβιακό λίπος & ελαιογόνοι μικροοργανισμοί

Πολλοί μικροοργανισμοί είναι σε θέση να συσσωρεύουν λιπίδια κάτω από ειδικές συνθήκες καλλιέργειας. Οι μικροοργανισμοί που έχουν την ικανότητα να λιποσυσσωρεύουν καλούνται ελαιογόνοι μικροοργανισμοί. Ως ελαιογόνοι νοούνται οι μικροοργανισμοί, οι οποίοι αναπτυσσόμενοι σε συγκεκριμένες συνθήκες περιβάλλοντος, μπορούν να συσσωρεύσουν λίπος εντός των κυττάρων τους σε ποσοστά μεγαλύτερα του 20% κατά βάρος επί ξηράς ουσίας. Μάλιστα ορισμένοι από αυτούς είναι ικανοί να συσσωρεύουν ενδοκυτταρικό λίπος σε ποσοστά έως και 70% κ.β. επί της ξηράς μάζας (Ratledge, 2002). Τα εν λόγω λιπίδια, είναι γνωστά ως μονοκυτταρικά έλαια (SCO-Single Cell Oil), χαρακτηρισμός που προσδιορίζει με σαφήνεια την προέλευσή τους από μικροοργανισμούς.

Τα μικροβιακά λιπίδια μπορεί να περιέχουν υψηλές ποσότητες πολυακόρεστων λιπαρών οξέων διατροφικής και φαρμακευτικής σημασίας. Συνίστανται από τριγλυκερίδια (TAGs), που αποτελούν το κυρίαρχο κλάσμα αυτών, αντιπροσωπεύοντας το 55-80% (w/w) των συνολικών κυτταρικών ελαίων (Papanikolaou et al., 2001; Fakas et al., 2006; Fakas et al., 2007), μαζί με τις ποσότητες των ελεύθερων λιπαρών οξέων και σε μικρότερο βαθμό, από στερόλες και άλλα πολικά κλάσματα όπως φωσφολιπίδια, γλυκολιπίδια κ.α. (Papanikolaou and Aggelis, 2011). Τα μικροβιακά τριγλυκερίδια είναι φυτικού τύπου καθώς η θέση sn2

της γλυκερόλης είναι εστεροποιημένη με ακόρεστο λιπαρό οξύ (Ratledge, 1994; Ratledge and Wynn, 2006).

Ανάλογα με το στέλεχος του μικροοργανισμού και το εφαρμοζόμενο σύστημα καλλιέργειας, τα μικροβιακά λιπίδια παρουσιάζουν μια διαφοροποιημένη σύνθεση λιπαρών οξέων αποδίδοντας ποικίλες ιδιότητες στο παραγόμενο κάθε φορά μικροβιακό λίπος (Tsakona et al., 2014).

Οι ελαιογόνοι μύκητες έχουν μελετηθεί εκτενώς ως προς την παραγωγή υψηλής αξίας πολυακόρεστων λιπαρών οξέων, καθώς το λίπος αυτών χαρακτηρίζεται από υψηλότερο επίπεδο ακορεστότητας συγκριτικά με τα λιπίδια που συσσωρεύονται από ζύμες. Αυτός είναι και ο κύριος λόγος για τον οποίο ελαιογόνοι μύκητες έχουν χρησιμοποιηθεί πρωταρχικά για την παραγωγή λιπαρών οξέων με ευεργετική επίδραση στον ανθρώπινο οργανισμό ή σπάνια απαντώμενα στη φύση όπως το αραχιδονικό (ARA), το δεικοσιδουα-εξα-εν-οϊκό οξύ (DHA), το γ-λινολενικό (GLA) και το εικοσαπενταενοϊκό οξύ (EPA) (Papanikolaou and Aggelis, 2011).

Η ικανότητα παραγωγής SCO των ζυμών έχει συγκριθεί με αυτήν άλλων ελαιογόνων μικροοργανισμών, χρησιμοποιώντας μία ποικιλία υποστρωμάτων χαμηλού κόστους, όπως τα γεωργικά υπολείμματα, τα απόβλητα τροφίμων και τα βιομηχανικά παραπροϊόντα. Το προφίλ των λιπιδίων του παραγόμενου SCO από ζύμες περιλαμβάνει κυρίως TAG και μικρότερες ποσότητες φωσφολιπιδίων, σφιγγολιπιδίων, στερολών και ελεύθερων λιπαρών οξέων (Ratledge and Hopkins, 2006; Subramaniam et al., 2010).

Στον Πίνακα 1.1 παρουσιάζονται τα κυριότερα στελέχη ζυμών που έχουν χρησιμοποιηθεί ως σήμερα και ενδείκνυνται για παραγωγή μικροβιακού λίπους (Koutinas and Papanikolaou, 2011). Είναι εμφανές ότι μπορούν να επιτευχθούν υψηλές συγκεντρώσεις κυττάρων ως και 185 g/L με ποσοστό συγκέντρωσης λίπους ως και 67,5 % (w/w), κυρίως σε καλλιέργειες ημισυνεχούς λειτουργίας.

Πίνακας 1.1: Παραγωγή μικροβιακού λίπους από διάφορα στελέχη ζυμών, διαφορετικές πηγές άνθρακα σε διάφορα συστήματα καλλιέργειας (Koutinas and Papanikolaou., 2011).

Στελέχη Ζυμών	Σύστημα Καλλιέργειας	Πηγή Άνθρακα	Συνολικό ξηρό βάρος (g/L)	SCO (%w/w)	Παραγωγικότητα ($g \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$)
<i>Yarrowia lipolytica</i>	continuous 1στάδιο	Γλυκόζη	9,2	25	0,08
	continuous 1στάδιο	Ακάθαρτη Γλυκερόλη	8,1	43	0,11
	shake flask	Στεαρίνη	15,2	52	-
<i>Candida sp 107</i>	continuous 1στάδιο	Γλυκόζη	18,1	37,1	0,4
		Γλυκόζη	13,5	29	0,16
		Σακχαρόζη	16	28	0,18

<i>Candida curvata</i>	continuous 1 στάδιο	Λακτόζη	18	31	0,22
		Ξυλόζη	15	37	0,27
		Αιθανόλη	11,5	35	0,2
<i>Apiotrichum curvatum</i>	batch batch με ανακύκλωση continuous με μερική ανακύκλωση	Γλυκόζη	14,5	45,6	-
		Τυρόγαλα	21,6	36	0,119
		Τυρόγαλα	85	35	0,372
		Τυρόγαλα	20	36	0,382
		Τυρόγαλα	91,4	33	0,995
<i>Cryptococcus curvatus</i>	fed-batch	Γλυκερόλη	118	25	0,59
<i>Lipomyces starkeyi</i>	shake flask shake flask shake flask fed-batch shake flask shake flask	Γλυκόζη & Ξυλόζη	20,5	61,5	-
		Γλυκόζη & απόβλητη λάσπη	9,4	68	-
		Γλυκόζη	153	54	0,59
		Γλυκόζη	24,1	56,6	-
		Σακχαρόζη	19,5	62,6	-
		Ξυλόζη	17,1	57,8	-
<i>Trichosporon fermentans</i>	shake flask shake flask shake flask shake flask shake flask shake flask shake flask	Λακτόζη	16,9	49,6	-
		Φρουκτόζη	21,5	40,7	-
		Μελάσα	36,4	35,3	-
		Υδρόλυμα άχυρου ρυζιού	28,6	40,1	-
		Μαννόζη	22,7	50,4	-
		Γαλακτόζη	23,6	59	-
		Κελλοβιόζη	15,8	65,6	-
<i>Rhodospiridium toruloides</i>	fed-batch	Γλυκόζη	106,5	67,5	0,54
<i>Rhodotorula gracilis</i>	continuous	Γλυκόζη	9,6	49,8	0,096
<i>Rhodotorula glutinis</i>	shake flask fed-batch	Απόβλητα όξινου γλουταμινικού νατρίου	25	20	-
		Γλυκόζη	185	40	0,88

- Δεν διατίθενται πληροφορίες

1.3.2. Εφαρμογές μικροβιακών λίπους

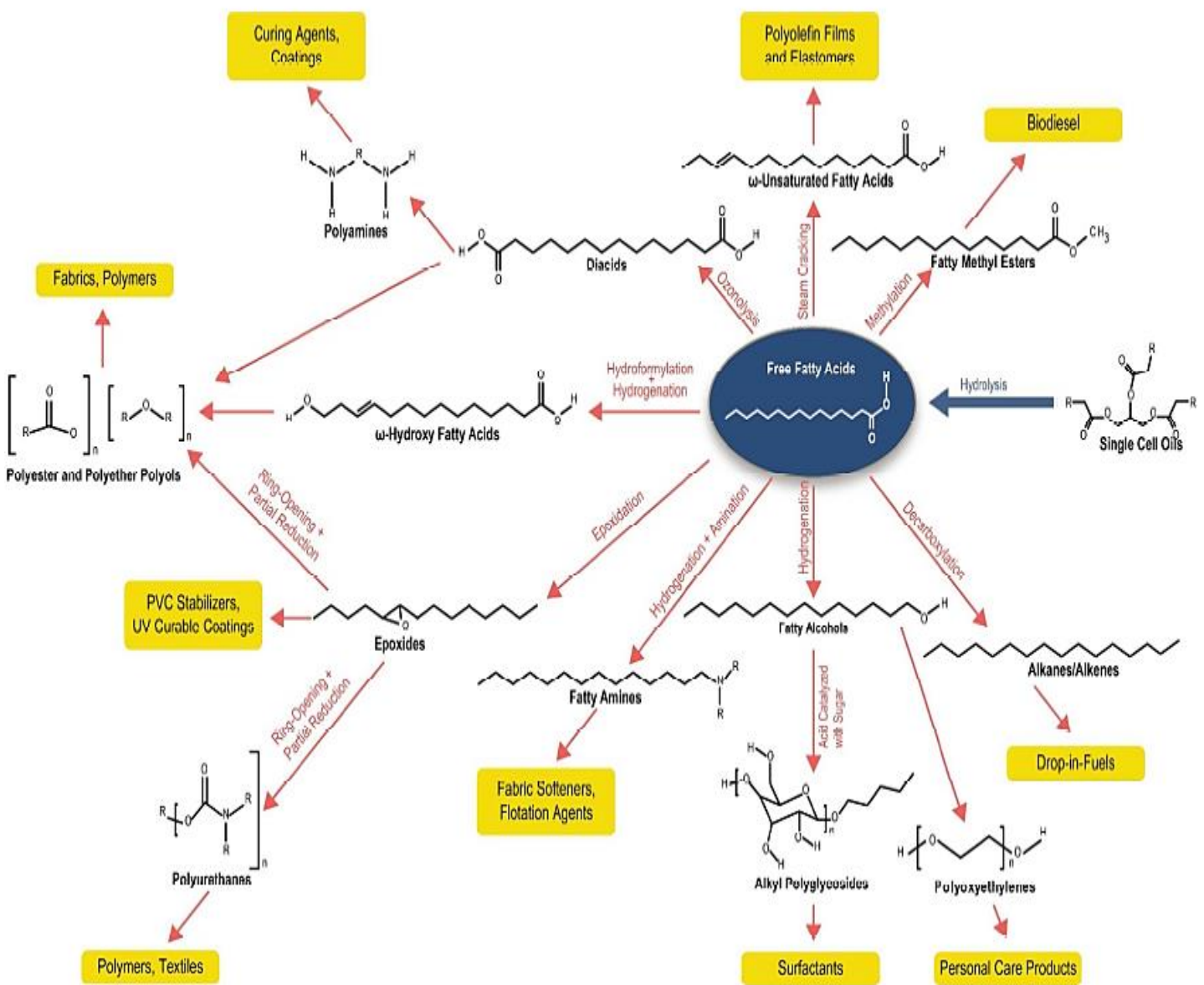
Το μικροβιακό λίπος δύναται να υποκαταστήσει διάφορα φυτικά έλαια και ζωικά λίπη, όπως έλαια πλούσια σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα σπανίως απαντώμενα στη φύση ή λίπη εξεζητημένης δομής όπως το λίπος του κακάο (Leiva-Candia et al., 2014; Papanikolaou and Aggelis, 2011; Ratledge, 2004). Επιπλέον, μπορεί να χρησιμοποιηθεί είτε για παραγωγή προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας, λόγω χάρη παραγωγή πρόσθετων ουσιών σε τρόφιμα, είτε για την παραγωγή βιοκαυσίμων (βιοντίζελ).

Η βιομηχανική εφαρμογή του μικροβιακού λίπους για παραγωγή βιοντίζελ στηρίζεται στην ανάπτυξη μίας διαδικασίας ζύμωσης, η οποία παρέχει υψηλή απόδοση μετατροπής μιας πηγής άνθρακα σε SCO, υψηλή παραγωγικότητα, υψηλό ποσοστό λιπιδίων που συσσωρεύονται στην κυτταρική μάζα και υψηλές συγκεντρώσεις SCO (Koutinas and Papanikolaou, 2011). Τα παραπάνω κριτήρια αποτελούν ένα χρήσιμο εργαλείο στην επιλογή του κατάλληλου μικροοργανισμού με σκοπό την διευκόλυνση της βιομηχανικής παραγωγής βιοντίζελ από SCO.

Η προτεινόμενη στρατηγική είναι εφικτό να παρέχει μια πιο αποτελεσματική περιβαλλοντικά και βιώσιμη επιλογή, συγκρινόμενη με αυτή των βιοκαυσίμων πρώτης γενιάς (Koutinas and Papanikolaou, 2011). Πιθανά πλεονεκτήματα αποτελούν τα ακόλουθα:

- i.** Οι πρώτες ύλες που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την παραγωγή βιοντίζελ με βάση το μικροβιακό λίπος, δεν ανταγωνίζονται την παραγωγή τροφίμων. Υπ' αυτή την έννοια η καλλιέργεια της γης για παραγωγή τροφίμων καθώς και η βιομηχανική τους επεξεργασία μπορούν να πραγματοποιούνται ταυτόχρονα με την παραγωγή βιοντίζελ μέσω της αξιοποίησης των υπολειμμάτων και των αγροτοβιομηχανικών αποβλήτων.
- ii.** Το μικροβιακό λίπος μπορεί να παραχθεί από διάφορες πηγές άνθρακα (π.χ. γλυκόζη, λακτόζη, ξυλόζη, σακχαρόζη, γλυκερόλη κ.ά.) χρησιμοποιώντας διάφορους μικροοργανισμούς σε αντίθεση με αυτούς που χρησιμοποιούνται συνήθως για την βιομηχανική παραγωγή βιοαιθανόλης οι οποίοι αξιοποιούν κυρίως τη γλυκόζη και τη σακχαρόζη.
- iii.** Η παραγωγή βιοντίζελ από ελαιούχους σπόρους και απόβλητα ελαίων δεν είναι ικανή να παρέχει επαρκείς ποσότητες βιοντίζελ για την κάλυψη των παγκόσμιων απαιτήσεων. Επιπλέον, το κόστος παραγωγής των ελαιούχων καρπών ανέρχεται σχεδόν στο 80-90% του συνολικού κόστους παραγωγής του βιοντίζελ. Σε αντίθεση η παραγωγή βιοντίζελ από μικροβιακό λίπος εξαρτάται από την αξιοποίηση υπολειμμάτων ή αποβλήτων χαμηλής αξίας και συνεπώς μπορεί να προσφέρει μια βιώσιμη επιλογή για την παραγωγή βιοκαυσίμων.
- iv.** Η trans-εστεροποίηση του μικροβιακού λίπους έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή ακάθαρτης γλυκερόλης που μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως ενδιάμεσο για την παραγωγή βιοκαυσίμων και βιοαποικοδομησίμων πλαστικών.

Το μικροβιακό λίπος μπορεί να αποτελέσει πρώτη ύλη για την παραγωγή ελαιοχημικών, τα οποία αυτή τη στιγμή παράγονται κατά κανόνα μέσω της βιομηχανίας του πετρελαίου. Μέσω της χρήσης ποικίλων χημικών, φυσικών και / ή βιοχημικών τεχνικών εκτός από τους μεθυλεστέρες λιπαρών οξέων, δύναται να παραχθούν άλλα παράγωγα του μικροβιακού λίπους, όπως λιπαρά οξέα, γλυκερόλη και υδρογονωμένα προϊόντα μεθυλεστέρων λιπαρών οξέων και λιπαρών αλκοολών, εποξειδία κ.ά., τα οποία αποτελούν υλικό βάσης για ένα ευρύ φάσμα ελαιοχημικών προϊόντων όπως επιφανειοδραστικές ουσίες, λιπαντικά, πολυμερή και πλαστικά (Naik et al., 2010; Probst, 2014). Μία σύνοψη των παραπάνω όσον αφορά τα λιπαρά οξέα παρουσιάζεται στο Σχήμα 1.1.



Σχήμα 1.1: Σύνοψη διαφόρων οδών μέσω των οποίων τα λιπαρά οξέα μικροβιακού λίπους μετατρέπονται σε ανανεώσιμα ελαιοχημικά προϊόντα και οι τελικές τους χρήσεις (Probst, 2014).

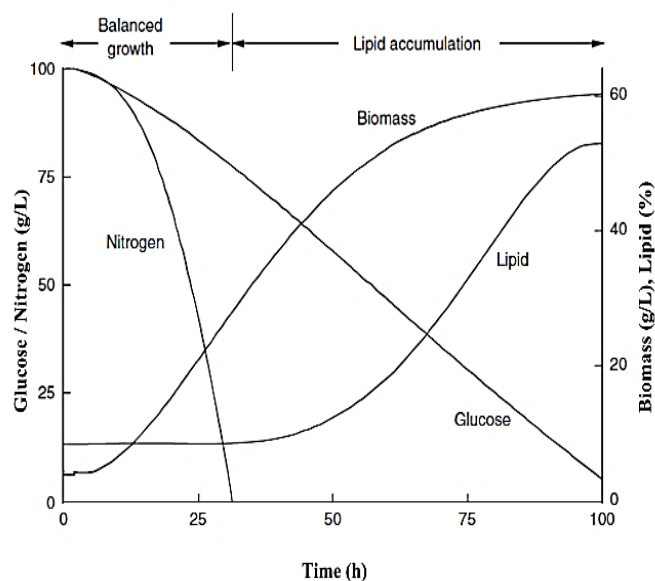
Η χρήση μικροβιακού λίπους θα μπορούσε να στοχεύει στην παραγωγή συγκεκριμένων ελαιοχημικών καθώς ορισμένες ελαιογόνες ζύμες είναι σε θέση να συσσωρεύουν κατά φυσικό τρόπο υψηλότερες ποσότητες συγκεκριμένων λιπαρών οξέων. Σύμφωνα με αποτελέσματα ερευνών διάφορα είδη *Candida* παράγουν υψηλότερα ποσοστά παλμιτικού οξέος που μπορεί να ανέλθουν ως και στο 40% επί του συνόλου των λιπαρών οξέων, η ζύμη *Yarrowia lipolytica* δύναται να παράγει ποσοστά μεγαλύτερα του 50% σε λινελαϊκό οξύ, ενώ ζύμες όπως *Cryptococcus albidus* και *Lipomyces starkeyi* είναι ικανές να παράγουν ελαϊκό οξύ σε ποσοστά έως και 75% (Probost, 2014).

Η αξιοποίηση των μικροβιακών λιπιδίων ως πρόδρομες ενώσεις για την παραγωγή ελαιοχημικών προϊόντων μπορεί να θεωρηθεί ως μια ελπιδοφόρα πορεία, ιδιαίτερα στα πλαίσια της έννοιας του βιοδιωλιστηρίου. Ωστόσο η παραγωγή μικροβιακού λίπους σε βιομηχανική κλίμακα βρίσκεται ακόμη σε πρώιμα στάδια και δεν έχει υιοθετηθεί ευρέως κυρίως λόγω του υψηλού κόστους και των τεχνολογικών περιορισμών που προκύπτουν. Περαιτέρω έρευνα δύναται να ενισχύσει την πιθανότητα εφαρμογής μιας πιο ολοκληρωμένης πλατφόρμας παραγωγής SCO η οποία θα περιλαμβάνει βελτιωμένες τεχνικές ζύμωσης, αξιοποίηση χαμηλής αξίας πρώτων υλών καθώς και βιώσιμες και αποτελεσματικές διαδικασίες παραλαβής του μικροβιακού λίπους.

1.3.3. Βιοχημεία σύνθεσης λιπιδίων

Όλοι οι μικροοργανισμοί είναι ικανοί να συνθέσουν λιπίδια, αν και μόνο τα ελαιογόνα στελέχη μπορούν να συσσωρεύουν στο εσωτερικό των κυττάρων τους σημαντικές ποσότητες λιπιδίων (> 20% w/w, επί ξηρού βάρους).

Η συσσώρευση ενδοκυτταρικού λίπους στους μικροοργανισμούς περιγράφεται παρακάτω (Σχήμα 1.2). Κατά βάση, ο μικροοργανισμός καλλιεργείται σε θρεπτικό υπόστρωμα με περίσσεια πηγής άνθρακα (συνήθως γλυκόζη ή συναφή σάκχαρα), ενώ επικρατούν περιοριστικές συνθήκες σε άζωτο. Έχει αποδειχθεί ότι ο μικροοργανισμός αρχικά εξαντλεί την πηγή αζώτου αλλά συνεχίζει να αφομοιώνει την πηγή άνθρακα. Με την έλλειψη αζώτου σταματά η κυτταρική αύξηση, αφού το άζωτο είναι απαραίτητο για τη σύνθεση πρωτεϊνών και νουκλεοτιδίων, τα οποία είναι ζωτικής σημασίας



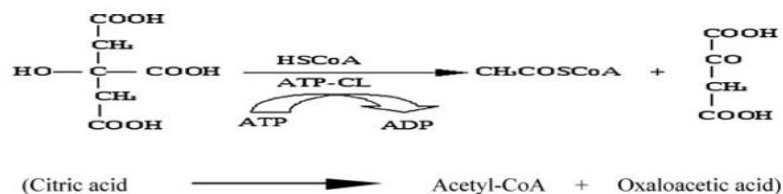
Σχήμα 1.2: Κινητική συσσώρευσης ενδοκυτταρικού λίπους από τους ελαιογόνους μικροοργανισμούς (Ratledge and Wynn, 2006).

για τη δημιουργία νέων κυττάρων. Στους ελαιογόνους μικροοργανισμούς η συνεχής κατανάλωση της πηγής άνθρακα έχει ως αποτέλεσμα τη μετατροπή της σε ενδοκυτταρικό λίπος. Η συσσώρευση του μικροβιακού λίπους συνεχίζεται μέχρι ενός ορίου, το οποίο είναι γενετικά καθορισμένο για κάθε μικροοργανισμό και κυμαίνεται από 20%–60% (w/w επί ξ.β.) (Ratledge and Wynn, 2006). Σε αντίθεση, οι μη-ελαιογόνοι μικροοργανισμοί δεν έχουν την ικανότητα να συσσωρεύουν λίπος σε ποσοστό πάνω από 10% επί της ξηρής μάζας τους. Έτσι, κατά την καλλιέργεια τους σε αντίστοιχες συνθήκες, η συνεχής αφομοίωση της πηγής άνθρακα οδηγεί είτε στην ανάπτυξη νέων κυττάρων, είτε στην ενδοκυτταρική συσσώρευση διαφόρων μεταβολικών προϊόντων, είτε στην έκκριση άλλων μεταβολιτών (π.χ. οργανικά οξέα).

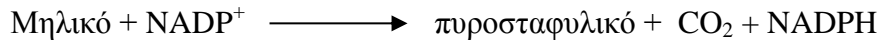
Συνεπώς, η συσσώρευση ενδοκυτταρικού λίπους στον εκάστοτε μικροοργανισμό εξαρτάται από δύο παράγοντες (Ratledge, 2004; Papanikolaou and Aggelis, 2011):

- i. την ικανότητα του μικροοργανισμού να παράγει συνεχώς ακετυλοσυνένζυμο Α (Acetyl-CoA) απευθείας στο κυτταρόπλασμα του κυττάρου, το οποίο αποτελεί πρόδρομη ένωση για τη σύνθεση των λιπαρών οξέων,
- ii. τη δυνατότητα του μικροοργανισμού να παρέχει επαρκείς ποσότητες NADPH, το οποίο αποτελεί βασικό αναγωγικό μέσο για τη βιοσύνθεση των λιπαρών οξέων.

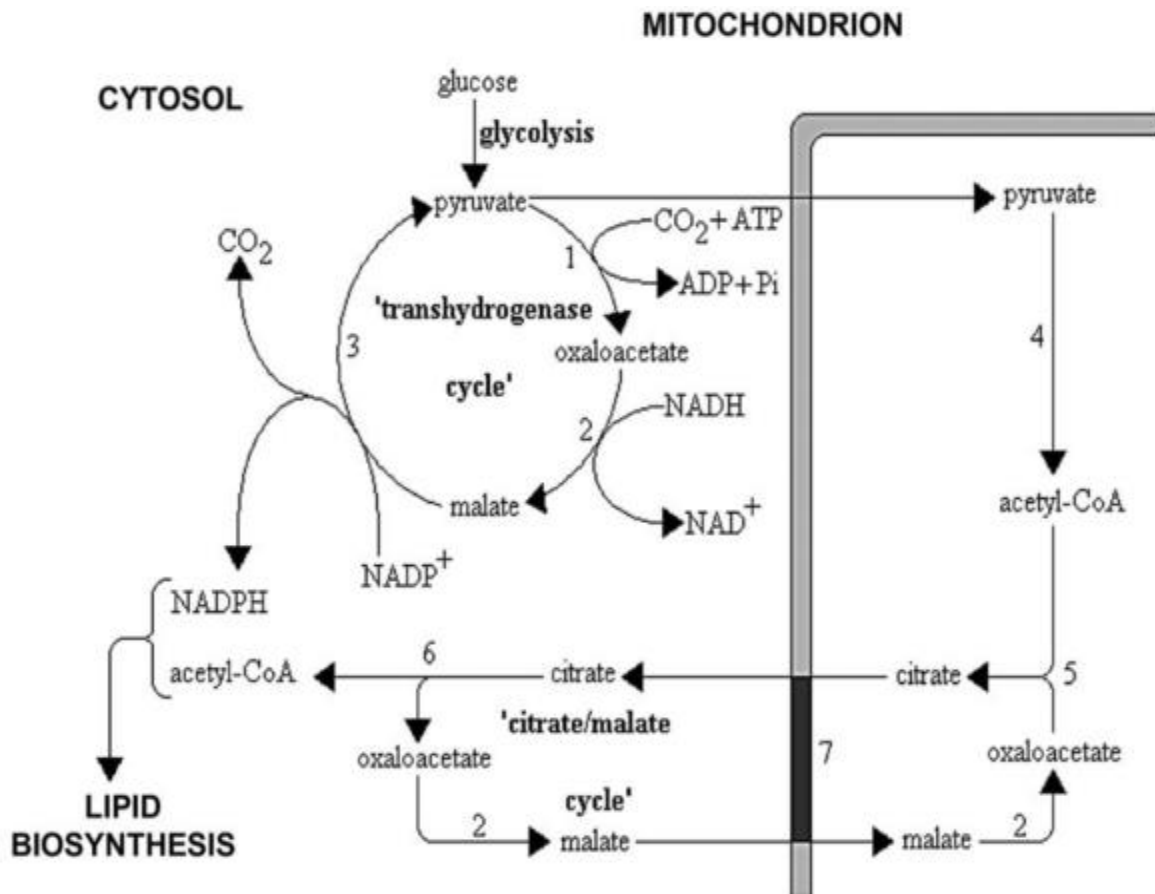
Ο σχηματισμός του ακετυλο-CoA στους ελαιογόνους μικροοργανισμούς αποδίδεται στην παρουσία της ATP: κιτρικής λυάσης (ACL), η οποία δεν απαντάται στην πλειοψηφία των μη-ελαιογόνων μικροοργανισμών. Η εξάντληση της πηγής αζώτου στο μέσο της καλλιέργειας οδηγεί σε μια σειρά αντιδράσεων με αποτέλεσμα το σχηματισμό του ακετυλο-CoA. Κατά την κατανάλωση του αζώτου ενεργοποιείται το ένζυμο AMP-απαμινάση με αποτέλεσμα την ταχύτατη πτώση της περιεκτικότητας του κυττάρου σε AMP και την παρεμπόδιση της δράσης του ενζύμου ισοκιτρική αφυδρογονάση. Αποτέλεσμα αυτής της παρεμπόδισης είναι η συσσώρευση του κιτρικού οξέος εντός του μιτοχονδρίου, το οποίο όταν υπερβεί μια κρίσιμη συγκέντρωση εξέρχεται από το μιτοχόνδριο στο κυτταρόπλασμα, όπου εν συνεχεία παρουσία της ATP: κιτρικής λυάσης διασπάται σε ακετυλο-CoA και σε οξαλοξικό οξύ. Το ακετυλο-CoA χρησιμοποιείται ως πρόδρομη ουσία για τη βιοσύνθεση των λιπαρών οξέων, ενώ το οξαλοξικό οξύ μετατρέπεται μέσω της αφυδρογονάσης του μηλικού οξέος σε μηλικό, το οποίο στη συνέχεια χρησιμοποιείται στο κύκλο του κιτρικού/μηλικού οξέος (Ratledge, 2002; Ratledge, 2004) (Σχήμα 1.3). Η αντίδραση που λαμβάνει χώρα είναι η εξής:



Για τη βιοσύνθεση των λιπαρών οξέων, εκτός από την παραγωγή του ακετυλο-CoA, είναι απαραίτητη η παροχή επαρκούς ποσότητας NADPH. Το μηλικό ένζυμο λειτουργεί ως προμηθευτής NADPH κατά την ακόλουθη αντίδραση:



Η δραστηριότητα του μηλικού ενζύμου απαντάται στην πλειονοψηφία των ελαιογόνων μικροοργανισμών και αποτελεί ένα μεταβολικό σύμπλοκο, το οποίο δρα συνεργιστικά με την ATP: κιτρική λυάση και τη συνθάση των λιπαρών οξέων, έτσι ώστε να εξασφαλίζεται άμεση επικοινωνία κατά τη μετατροπή του ακετυλο-CoA σε λιπαρά οξέα. Τα λιπαρά οξέα που βιοσυντίθενται, εστεροποιούνται με γλυκερόλη προς παραγωγή τριγλυκεριδίων και ενσωματώνονται μέσω του ενδοπλασματικού δικτύου σε σταγονίδια λιπαρών οξέων (Ratledge, 2004).



Σχήμα 1.3: Απεικόνιση του κύκλου του Krebs και του κύκλου κιτρικού/μηλικού στην παροχή ακετυλο-CoA και NADPH, για τη λιπογένεση στους ελαιογόνους μικροοργανισμούς. Ένζυμα: 1. αποκαρβοξυλάση του πυροσταφυλικού οξέος, 2. αφυδρογονάση του μηλικού οξέος, 3. μηλικό ένζυμο, 4. αφυδρογονάση του πυροσταφυλικού οξέος, 5. κιτρική συνθάση, 6. ATP: κιτρική λυάση, 7. ένζυμο υπεύθυνο για τη λειτουργία του συστήματος μεταφοράς κιτρικού/μηλικού οξέος μεταξύ μιτοχονδρίου και κυτταροπλάσματος (Ratledge, 2004).

1.4. Μικροβιακή Παραγωγή Αιθανόλης και Πολυολών

Η αιθανόλη σήμερα παράγεται μέσω αξιοποίησης ανανεώσιμων πρώτων υλών πλούσιων σε σάκχαρα (π.χ. υπολείμματα ζαχαροκάλαμου-bagasse, καλαμπόκι, άχυρο σίτου, ζαχαρότευτλα κλπ), η χρησιμοποίηση των οποίων έχει αρκετά μειονεκτήματα, το κυριότερο των οποίων είναι ότι χρησιμοποιούνται κυρίως ως τρόφιμα. Μερικά από τα μειονεκτήματα είναι η δημιουργία μεγαλύτερου ανταγωνισμού στην αγορά για τα προϊόντα αυτά, η εποχικότητα της παραγωγής των καλλιέργειών που σημαίνει ότι η τοπική διαθεσιμότητα της βιομάζας δεν είναι συνεχής, και οι απαιτήσεις για αποθήκευση ή μεταφορά από άλλες αγροτικές περιοχές. Αυτή η τεχνολογία «Πρώτης γενιάς» αποτελεί κατά κύριο λόγο αντικείμενο εκμετάλλευσης στη Βραζιλία και στις ΗΠΑ, οι οποίες ηγούνται σήμερα της παραγωγής βιοαιθανόλης, παράγοντας συνολικά το 86% περίπου της παγκόσμιας παραγωγής (20 εκατομμύρια γαλόνια/χρόνο ή 76×10^9 L/χρόνο) (Licht, 2011).

Για τους λόγους αυτούς η έρευνα και η βιομηχανία τα τελευταία χρόνια έχουν στραφεί προς τις διεργασίες δεύτερης γενιάς, οι οποίες αξιοποιούν λιγνοκυτταρινούχα υλικά, γενικά απόβλητα της γεωργικής παραγωγής, αλλά και λιγνοκυτταρινούχες καλλιέργειες όπως αυτή του *Miscanthus giganteus*, που θεωρούνται δυνητικά χρήσιμες πηγές πρώτων υλών από τις οποίες είναι εφικτό να παραχθεί η αιθανόλη.

Οι διεργασίες παραγωγής αιθανόλης ή άλλων αλκοολών δεύτερης γενιάς στηρίζονται στην επεξεργασία της φυτικής βιομάζας (πλούσια σε κυτταρίνη) εντός τεσσάρων κύριων βημάτων (Elliston, 2012):

- i. Προ-επεξεργασία, με σκοπό την ενίσχυση της προσβασιμότητας των υδρολυτικών ενζύμων στο κυτταρινούχο υπόστρωμα, μέσω αφαίρεσης της λιγνίνης και της ημικυτταρίνης.
- ii. Υδρόλυση με σκοπό την μετατροπή των πολυσακχαριτών σε μονοσακχαρίτες. Συνήθως πραγματοποιείται ενζυμική ή όξινη υδρόλυση.
- iii. Ζύμωση, κατά την οποία η γλυκόζη και άλλα αφομοιώσιμα σάκχαρα αξιοποιούνται για την παραγωγή αλκοολών. Τα στελέχη ζυμών χρησιμοποιούνται γενικά για την παραγωγή αιθανόλης, ωστόσο όμως άλλοι μικροοργανισμοί, όπως το *Clostridium acetobutylicum* μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την παραγωγή ανώτερων αλκοολών, σε αυτή την περίπτωση βουτανόλη (Fouad et al., 1976).
- iv. Ανάκτηση ή καθαρισμός, όπου η παραγόμενη αλκοόλη ανακτάται συνήθως με απόσταξη ή αλλιώς απλά υφίσταται εξυγίανση σε συγκεντρώσεις που είναι εμπορικώς αξιοποιήσιμες.

Ωστόσο, η οικονομική βιωσιμότητα της παραγωγής βιοαλκοολών δεύτερης γενιάς απαιτεί την επίλυση διαφόρων προβλημάτων, μεγάλο μέρος των οποίων προέρχεται από τη μεταβλητότητα, τη διαθεσιμότητα και την ετερογένεια των πρώτων υλών. Συγκεκριμένα, απαιτείται έντονη προ-επεξεργασία για την

διευκόλυνση της υδρόλυσης των κυτταρινούχων συστατικών, η υδρόλυση δεν είναι αντιπροσωπευτική σε υψηλές ποσότητες υποστρώματος, και η ζύμωση μπορεί να παρεμποδίζεται από ενώσεις που δημιουργούνται κατά τη διάρκεια ορισμένων διεργασιών προ-επεξεργασίας της βιομάζας (Waldron, 2010).

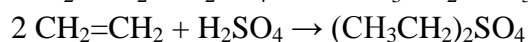
Συνεπώς μια ολοκληρωμένη προσέγγιση για την αντιμετώπιση των προβλημάτων που σχετίζονται με την παραπάνω διαδικασία κρίνεται απαραίτητη, ώστε η παραγωγή βιοαλκοολών δεύτερης γενιάς να αποτελέσει μια βιώσιμη πραγματικότητα.

1.4.1. Αιθανόλη

Η αιθανόλη είναι μια ευρέως χρησιμοποιούμενη οργανική ένωση η δραστηριότητα της οποίας βασίζεται κυρίως στην ομάδα υδροξυλίου που φέρει (Riitonen et al., 2013). Αποτελεί πολικό διαλύτη με υψηλή διαλυτότητα στο νερό και έχει σημείο ανάφλεξης στους 55 ° F (~13 ° C). Παρουσιάζει μικρότερη τοξικότητα από άλλες αλκοόλες, όπως η μεθανόλη, ενώ ταυτόχρονα διαλύματα καθαρής αιθανόλης δεν περιλαμβάνουν καρκινογόνες ενώσεις.

1.4.1.1. Μέθοδοι Παραγωγής Αιθανόλης

Οι παλαιότερες βιομηχανικές μέθοδοι παραγωγής αιθανόλης έχουν ως βάση την μετατροπή του αιθυλενίου το οποίο προέρχεται από πετροχημικές πρώτες ύλες. Η μέθοδος σχετίζεται με έμμεση διαδικασία ενυδάτωσης παρουσία οξέος σύμφωνα με τις παρακάτω αντιδράσεις:



Στις αρχές του 1970, η διαδικασία αναπτύχθηκε περαιτέρω με αποτέλεσμα την εξάλειψη της χρήσης θειικού οξέος και τη διαδικασία να πραγματοποιείται σε αέρια φάση. Ωστόσο, λόγω της αειφόρου ανάπτυξης και της βιομηχανικής βιοτεχνολογίας, οι προτιμώμενοι τρόποι σύνθεσης βασίζονται στη ζύμωση της βιομάζας για την απόκτηση σακχάρων τα οποία μπορούν εύκολα να μετασχηματιστούν σε αιθανόλη (Riitonen et al., 2013).

Η παραγωγή αιθανόλης μέσω μικροβιακών ζυμώσεων έχει μελετηθεί εκτενώς καθώς έχει κερδίσει ιδιαίτερη προσοχή από τους ερευνητές, λόγω της αυξημένης χρήσης της ως καυσίμου. Είναι ευρέως γνωστό ότι η βιοαιθανόλη μπορεί να παραχθεί εύκολα από μια πληθώρα στελεχών ζυμών, με κύριο εκπρόσωπο τη ζύμη *Saccharomyces cerevisiae*. Τα στελέχη αυτά αφομοιώνουν τη γλυκόζη και άλλους μονοσακχαρίτες που προέρχονται από την υδρόλυση λιγνοκυτταρινούχων υλικών και του αμύλου (Vasconcelos, Lopes & Franca, 2004; Petersson et al., 2007; Gupta,

Sharma, 2009; Ferreira et al., 2011; Elliston, 2012; Guan et al., 2013; Kumdam, 2013).

Η πιο διαδεδομένη μέθοδος που χρησιμοποιείται για την παραγωγή βιοαιθανόλης περιλαμβάνει υδρόλυση και ζύμωση ξεχωριστά (Separate Hydrolysis & Fermentation - SFH). Η μέθοδος αυτή, όπως υποδηλώνει το όνομά της, περιλαμβάνει αρχικά τη διεξαγωγή χημικής ή ενζυμικής υδρόλυσης και σε μετέπειτα στάδιο διεξάγεται η ζύμωση με την πλήρη υδρολυμένη πηγή άνθρακα (Elliston, 2012). Ωστόσο, σύμφωνα με μελέτες έχουν καταγραφεί και στελέχη που δύνανται να παράξουν ένζυμα απαραίτητα για τη διάσπαση πιο σύνθετων πηγών άνθρακα, με ταυτόχρονη παραγωγή αιθανόλης. Οι Tanimura et al. (2015) ανέφεραν τον πιθανό μηχανισμό παραγωγής βιοαιθανόλης απευθείας από άμυλο. Παρατήρησαν ότι στελέχη του μικροοργανισμού *Scheffersomyces shehatae* δύνανται να παράγουν αιθανόλη σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες των 6 g/L, μετά από καλλιέργεια αυτών για 6 ημέρες σε διάλυμα υγρού αμύλου 10%. Τέτοιου είδους παρατηρήσεις οδήγησαν στο να προταθούν άλλες μέθοδοι που μπορούν να βελτιώσουν την παραπάνω διαδικασία συνδυάζοντας την ταυτόχρονη διεξαγωγή των δύο αυτών σταδίων. Οι μέθοδοι ταυτόχρονης σακχαροποίησης και ζύμωσης (SSF), ημι-ταυτόχρονη σακχαροποίηση και ζύμωση (SSSF), ταυτόχρονη σακχαροποίηση και συν-ζύμωσης (SSCF) είναι μερικές από αυτές. Τα συνδυαστικά συστήματα βιοεπεξεργασίας (Consolidated Bio-Processing, CBP), τα οποία συνδυάζουν την παραγωγή ενζύμων, την σακχαροποίηση και την ζύμωση σε μια διαδικασία ενός σταδίου, αποτελούν μια πολλά υποσχόμενη στρατηγική για την οικονομικά αποδοτική παραγωγή αιθανόλης, κυρίως από αμυλούχα βιομάζα. Στον Πίνακα 1.2 παρουσιάζονται διάφορα στελέχη μικροοργανισμών που χρησιμοποιήθηκαν για την παραγωγή βιοαιθανόλης με εφαρμογή συστημάτων CBP.

Πίνακας 1.2: Στελέχη μικροοργανισμών που χρησιμοποιήθηκαν για την παραγωγή βιοαιθανόλης με εφαρμογή συστημάτων CBP με χρήση διαφόρων υποστρωμάτων (Tanimura et al., 2015).

Μικροοργανισμός	Υπόστρωμα	Αιθανόλης (g/L)	Διάρκεια ζύμωσης (h)
<i>Clostridium thermocellum</i>	πολτός Cassava	8,8	120
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Άμυλο αραβοσίτου	9	240
<i>Paecilomyces variotii</i>	πίτυρο σίτου	1,2	312
<i>Trametes hirsuta</i>	Άμυλο	9,1 [†]	96
<i>Tramete hirsuta</i>	Άχυρο ρυζιού	3 [†]	96
<i>Clostridium phytofermentans</i>	Κοτσάνια καλαμποκιού	2,8	240
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> F2	Ακατέργαστο άμυλο	2,6	240
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> F6	Ακατέργαστο άμυλο	2,1	240
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> SR93	Διάλυμα αμύλου	14,3	140
<i>Scheffersomyces shehatae</i>	Διάλυμα αμύλου	9,2	240

[†] Απαιτήθηκε προκαλλιέργεια μιας εβδομάδας πριν τον εμβολιασμό

1.4.1.2. Εφαρμογές Βιοαιθανόλης

Όπως είναι γνωστό η αιθανόλη έχει διάφορες χρήσεις και παράγεται σε ευρεία κλίμακα με σκοπό την κάλυψη ποικίλων αναγκών. Οι κυριότερες εφαρμογές της σχετίζονται με την βιομηχανία τροφίμων και ποτών, φαρμάκων και καλλυντικών και βιοκαυσίμων. Συνοπτικά αναφέρονται:

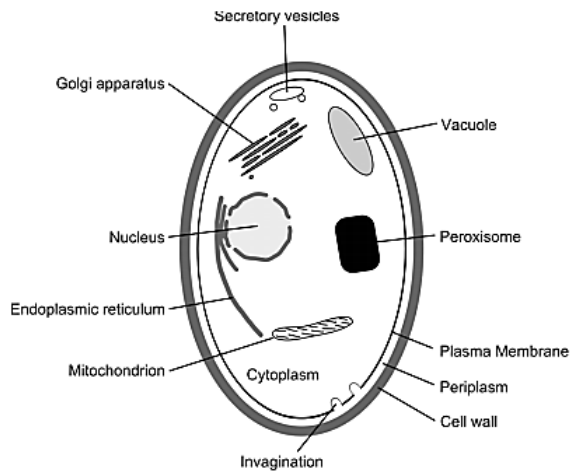
- i. Παρασκευή αλκοολούχων ποτών, όπως κρασί, μύρα κτλ.
- ii. Χρήση ως διαλύτης και ως συστατικό για την παρασκευή βαφών, αρωμάτων, φαρμάκων, καλλυντικών κ.α.
- iii. Θερμόμετρα αιθανόλης (χρήση σε θερμοκρασίες μικρότερες των $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$) και χρήση ως αντιψυκτικό διάλυμα.
- iv. Υλικό εκκίνησης για παραγωγή χημικών όπως ακεταλδεΐδη, οξικό οξύ, βουτυλική αλκοόλη, διαιθυλαιθέρας κ.α..
- v. Ως καύσιμο που αντικαθιστά την βενζίνη στους κινητήρες εσωτερικής καύσης, στα πλαίσια της χρήσης εναλλακτικών πηγών ενέργειας.

Η ανάγκη εκπλήρωσης των ενεργειακών απαιτήσεων λαμβάνοντας υπόψη το αντίκτυπο στο περιβάλλον και τα αποθέματα μη ανανεώσιμων ορυκτών καυσίμων προέκυψε από έρευνες σχετικές με ανανεώσιμες και περιβαλλοντικά φιλικές πηγές ενέργειας, μία εκ' των οποίων είναι η βιοαιθανόλη (Aditiya et al., 2015). Οι υψηλότεροι αριθμοί οκτανίων είναι πιο επιθυμητοί, καθώς επιτρέπουν στους κινητήρες να λειτουργούν σε υψηλές πιέσεις χωρίς να προκαλείται αυτο-ανάφλεξη του καυσίμου με αποτέλεσμα η συνολική αποτελεσματικότητα να είναι μεγαλύτερη (Aditiya et al., 2015; Elliston, 2012). Μελέτες έχουν δείξει ότι η αιθανόλη περιέχει υψηλότερο αριθμό οκτανίων συγκριτικά με την αμόλυβδη βενζίνη όμως πάσχει από μικρότερη ενεργειακή πυκνότητα (η καύση της αποδίδει 68% λιγότερη ενέργεια). Παρά το γεγονός αυτό, η υψηλή περιεκτικότητα της βιοαιθανόλης σε οξυγόνο κάνει την καύση καθαρότερη με αποτέλεσμα να επιτυγχάνονται μειωμένες εκπομπές τοξικών ουσιών (Aditiya et al., 2015; Eyidogan et al., 2010; Elliston, 2012; Riitonen et al., 2013). Η χρήση της βιοαιθανόλης βοηθά επίσης στην μείωση των εκπομπών CO_2 έως και 80% σε σχέση με τη χρήση της βενζίνης, προωθώντας έτσι ένα καθαρότερο περιβάλλον για το μέλλον (Aditiya et al., 2015).

Όσον αφορά την παραγωγή χημικών ουσιών, η βιοαιθανόλη θεωρείται μία από τις πιο ευπροσάρμοστες και πολλά υποσχόμενες μελλοντικά, υποψήφιες πρώτες ύλες. Η αιθανόλη μπορεί να αναβαθμιστεί απευθείας σε ορισμένες χημικές ουσίες υψηλού ενδιαφέροντος, όπως η ακεταλδεΐδη, το οξικό οξύ, η βουτυλική αλκοόλη, κ.ά., χωρίς οποιαδήποτε προσθήκη άλλων αντιδρώντων. Το αποτέλεσμα της διαδικασίας είναι ανάλογο με την επιλογή του καταλύτη και τις συνθήκες της διαδικασίας που θα ακολουθηθεί (Riitonen et al., 2013).

1.4.1.3. Βιοχημικό μονοπάτι σύνθεσης Αιθανόλης

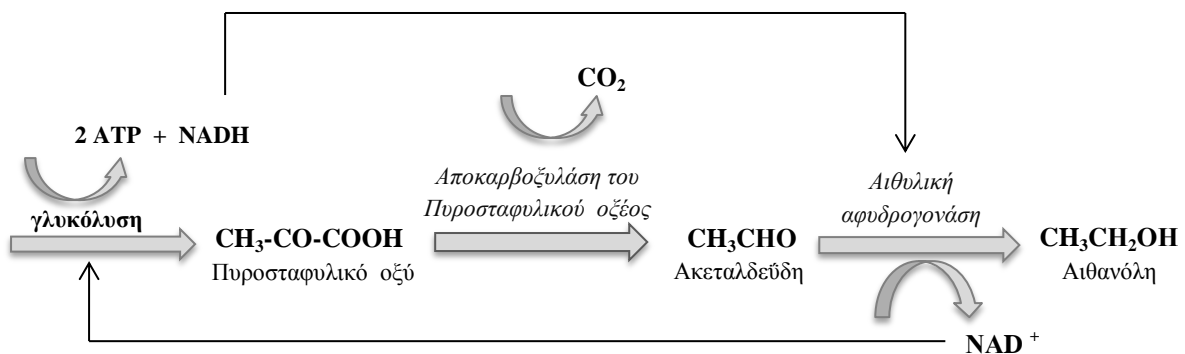
Οι ζύμες αποτελούνται από μια τυπική δομή ευκαρυωτικού κυττάρου, με ένα εξωτερικό κυτταρικό τοίχωμα το οποίο περιβάλλει τις εσωτερικές δομές οργανιδίων (Εικόνα 3). Μια σημαντική δομή στο ευκαρυωτικό κύτταρο είναι το μιτοχόνδριο στο οποίο συντελείται ο κύκλος των τρικαρβοξυλικών οξέων (κύκλος Krebs) και η παραγωγή ATP μέσω χημικής ώσμωσης (Walker, 1998; Αγγελής, 2007).



Εικόνα 3: Δομή κυττάρου ζύμης (Walker, 1998).

Σε αερόβιες συνθήκες η γλυκόζη καταβολίζεται σε πυροσταφυλικό οξύ μέσω της γλυκόλυσης. Το πυροσταφυλικό με τη σειρά του μετατρέπεται σε ακετυλο-CoA, το οποίο χρησιμοποιείται για την παραγωγή ενέργειας στο μιτοχόνδριο μέσω του κύκλου του Krebs (Berry, 1982).

Αντιθέτως, σε αναερόβιες συνθήκες το πυροσταφυλικό που προκύπτει από τη διαδικασία της γλυκόλυσης χρησιμοποιείται μέσω της ζύμωσης για την παραγωγή αιθανόλης όπως φαίνεται στο Σχήμα 1.4.



Σχήμα 1.4: Παραγωγή αιθανόλης υπό αναερόβιες συνθήκες.

Η ζύμωση αποδίδει σημαντικά χαμηλότερη ενέργεια συγκριτικά με εκείνη της αερόβιας αναπνοής μέσω του κύκλου του Krebs, καθώς για κάθε 1 mole καταβολιζόμενης γλυκόζης παράγονται μόνο 2 moles ATP, συγκριτικά με τα 38 moles ATP που παράγονται για κάθε 1 mole καταβολιζόμενης γλυκόζης κατά την αναπνοή (Lehninger et al., 2008). Αυτό οδηγεί στο φαινόμενο που είναι γνωστό ως φαινόμενο Pasteur, κατά το οποίο περισσότερη γλυκόζη καταναλώνεται σε αναερόβιες συνθήκες, σε σύγκριση με μία αερόβια διεργασία (Strathern et al., 1981).

Οι ζύμες όταν αναπτύσσονται υπό αερόβιες συνθήκες, ως εκ τούτου, τείνουν να αυξήσουν περισσότερο την κυτταρική τους μάζα σε σύγκριση με τις ζύμες που αναπτύσσονται υπό αναερόβιες συνθήκες.

Είναι επίσης γνωστό ότι ο κυτταρικός μεταβολισμός δύναται να στραφεί προς ζύμωση και υπό αερόβιες συνθήκες, όταν τα διαθέσιμα επίπεδα της γλυκόζης στο περιβάλλον της αύξησης υπερβαίνουν μια κρίσιμη τιμή. Στην περίπτωση αυτή τα πρώτα ένζυμα του κύκλου των τρικαρβοξυλικών οξέων καθώς και τα ένζυμα των κυτοχρωμάτων της αναπνευστικής αλυσίδας υφίστανται καταβολική καταστολή με αποτέλεσμα να καταστέλλεται το αερόβιο μεταβολικό μονοπάτι και ο κυτταρικός μεταβολισμός να στρέφεται προς ζύμωση. Το φαινόμενο αυτό είναι γνωστό ως φαινόμενο Crabtree (De Deken, 1966; Παπανικολάου, 2013).

Σε περίπτωση πλήρους εξάντλησης της πηγής άνθρακα στο θρεπτικό μέσο της αύξησης οι ζύμες είναι σε θέση να χρησιμοποιήσουν οποιοδήποτε ποσότητα αιθανόλης που έχει προηγουμένως παραχθεί ως πηγή άνθρακα. Σε αερόβιες συνθήκες η αιθανόλη μπορεί να μετατραπεί σε ακεταλδεΐδη, στη συνέχεια, σε οξικό και εν τέλει σε ακετυλο-CoA το οποίο χρησιμοποιείται στον κύκλο του Krebs όπως συζητήθηκε ανωτέρω (Berry, 1982).

1.4.2. Αραβιτόλη

Η ανάπτυξη των μικροοργανισμών συχνά παρεμποδίζεται σε περιβάλλοντα όπου η ενεργότητα του νερού είναι πολύ μειωμένη. Ωστόσο, ορισμένοι μικροοργανισμοί έχουν αναπτύξει διάφορες στρατηγικές προκειμένου να αντισταθούν στις καταπονήσεις στις οποίες εκτίθενται. Η ικανότητα προσαρμογής στις διακυμάνσεις της εξωτερικής ωσμωτικότητας και οι μηχανισμοί ρύθμισής της έχουν διασαφηνιστεί σε ορισμένους από τους μικροοργανισμούς.

Τόσο οι προκαρυωτικοί όσο και οι ευκαρυωτικοί μικροοργανισμοί περιλαμβάνουν είδη που μπορούν να προσαρμόζονται σε ένα ευρύ φάσμα συγκεντρώσεων αλάτων ή / και σακχάρων στο μέσο καλλιέργειας κατά τη διάρκεια της ανάπτυξής τους. Τα είδη αυτά καλούνται ωσμωανθεκτικά (Μπαλατσούρας 2006; Figueroa and Lucca, 2001).

Για την εξασφάλιση της ανάπτυξης και επιβίωσης των μικροοργανισμών το ενδοκυτταρικό περιβάλλον των κυττάρων τους οφείλει να παραμένει σχετικά σταθερό σε ιοντική ισχύ, pH και επίπεδα μεταβολιτών. Για το λόγο αυτό, σε μέσα χαμηλής ωσμωτικότητας, οι μικροοργανισμοί αναπτύσσουν ομοιοστατικούς μηχανισμούς που διατηρούν αυτές τις παραμέτρους εντός των απαιτούμενων ορίων.

Μετά από μεταφορά του μικροοργανισμού σε ένα υπερτονικό μέσο, η προσαρμογή στην αλλαγή είναι απαραίτητη. Για τους περισσότερους μικροοργανισμούς, η προσαρμοστική απάντηση σε αυτή την αλλαγή είναι η ενδοκυτταρική συσσώρευση οργανικών ενώσεων, οι οποίες δρουν ως συμβατά

διαλυμένες ουσίες που δεν είναι τοξικές για τα κύτταρα, ακόμη και σε υψηλές συγκεντρώσεις που απαιτούνται για τη σταθεροποίηση της ωσμωτικής ισορροπίας. Όσον αφορά τις ζύμες, οι ουσίες αυτές είναι πολυ-υδροξυ αλκοόλες, όπως γλυκερόλη, αραβιτόλη, ερυθριτόλη, και ξυλιτόλη (Figueroa and Lucca, 2001; Koganti et al., 2011). Γενικά στη φύση οι πολυόλες συναντώνται σε μικρές ποσότητες κυρίως στα φρούτα και τα λαχανικά (Suryadi et al., 2000) ενώ συγκεκριμένα η αραβιτόλη συναντάται σε μανιτάρια και λειχήνες (Kumdam, Murthy & Gummadi, 2014).

Οι πολυόλες παρουσιάζουν ενδιαφέρουσες ιδιότητες και δύνανται να χρησιμοποιηθούν από τη βιομηχανία φαρμάκων και τροφίμων καθώς, παρουσιάζουν κατασταλτική δράση κατά της τερηδόνας, βελτιώνουν τα προϊόντα ζαχαροπλαστικής και συνίστανται σε ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη, καρδιοπάθεια και καρκίνο της γαστρεντερικής οδού. Επιπροσθέτως μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως υλικά εκκίνησης για μικροβιακή παραγωγή σπάνιων σακχάρων όπως D-ταγατόζη, L-ξυλουλόζη και L-σορβόζη (Suryadi et al., 2000).

Η αραβιτόλη, αλλιώς γνωστή ως αραβιτιτόλη ή λυξιτόλη, είναι μία σακχαρική αλκοόλη 5 ατόμων άνθρακα (πεντιτόλη) που συναντάται σε δύο μορφές D και L. Είναι γλυκιά, άχρωμη, κρυσταλλική ένωση, διαλυτή στο νερό με σημείο τήξης στους 103 °C (Koganti et al., 2011; Kumdam, Murthy & Gummadi, 2013; Kumdam, Murthy & Gummadi, 2014; Kordowska-Wiater, 2015). Μαζί με την ξυλιτόλη, η αραβιτόλη χρησιμοποιείται ευρέως ως φυσικό γλυκαντικό.

Τον τελευταίο καιρό η ζήτηση για εναλλακτικά σάκχαρα παρουσιάζει άνοδο λόγω των ευεργετικών ιδιοτήτων τους. Οι ιδιότητες που απαιτείται να έχουν τα εναλλακτικά σάκχαρα είναι χαμηλό θερμιδικό περιεχόμενο (0.2 kcal / g), να μην λειτουργούν επιβαρυντικά σε περιπτώσεις διαβήτη, να περιορίζουν την εμφάνιση και την εξάπλωση της τερηδόνας, να έχουν γλυκύτητα παρόμοια με αυτή της σακχαρόζης, να είναι άχρωμα, άοσμα και να μεταβολίζονται κανονικά από τον οργανισμό. Η αραβιτόλη συνδυάζοντας τις παραπάνω ιδιότητες μπορεί να θεωρηθεί ως εναλλακτική γλυκαντική ουσία (Koganti et al., 2011; Kumdam, Murthy & Gummadi, 2014; Kordowska-Wiater, 2015).

1.4.2.1. Μέθοδοι Παραγωγής Αραβιτόλης

Σήμερα, η D-αραβιτόλη σε βιομηχανική κλίμακα παράγεται κυρίως μέσω καταλυτικής αναγωγής της D-αραβινοζης ή D-λυξόζης, ή χημική αναγωγή λακτονών του αραβινοϊκού και του λυξονικού οξέος (Suryadi et al., 2000; Kumdam, Murthy & Gummadi, 2013; Kumdam, Murthy & Gummadi, 2014; Kordowska-Wiater, 2015). Η διαδικασία αυτή απαιτεί υψηλές θερμοκρασίες της τάξεως των 100 °C και χρήση ακριβών καταλυτών.

Η παραγωγή D-αραβιτόλης σύμφωνα με τα παραπάνω έχει επιτευχθεί με χρήση κράματος υδραργύρου - νατρίου (sodium amalgam). Καταλυτική υδρογόνωση

της L-αραβινόζης δίνει L-αραβιτόλη, διαδικασία η οποία λαμβάνει χώρα σε ειδικούς αντιδραστήρες. Και οι δύο διαδικασίες απαιτούν αυξημένη πίεση υδρογόνου (40-60 bar), χρήση ακριβού καταλύτη καθώς και εφαρμογή υψηλής θερμοκρασίας (90 – 120 °C), καθιστώντας έτσι τη χημική παραγωγή αραβιτόλης πολύ ακριβή και χρονοβόρα (Kumdam, Murthy & Gummadi, 2014). Ακόμη οι δυσκολίες που παρουσιάζονται κατά το στάδιο του καθαρισμού, που έπεται της καταλυτικής αναγωγής, στρέφουν όλο και περισσότερο την προσοχή των ερευνητών προς τη μικροβιακή παραγωγή πολυολών (Suryadi et al., 2000; Saha, Sakakibara & Cotta, 2007; Kordowska-Wiater, 2015).

Η διαδικασία βιομετατροπής θεωρείται «περιβαλλοντικά φιλική» και πιο αποδοτική, καθώς δεν απαιτεί την χρήση καθαρών υποστρωμάτων σακχάρων και χημικών καταλυτών. Περιλαμβάνει την εφαρμογή μικροβιακών κυττάρων, τα οποία εκτελούν πολλαπλές αντιδράσεις καταλυόμενες από ένζυμα. Τα παραπροϊόντα που παράγονται από τέτοιου είδους διαδικασίες είναι συνήθως πολύ ευκολότερο να απομακρυνθούν με διαχωρισμό (Kordowska-Wiater, 2015).

1.4.2.2. Χρησιμοποιούμενα υποστρώματα

Πολλά φυσικά υποστρώματα όπως λιγνοκυτταρινούχα υδρολύματα και υδρόλυμα σακχαροκάλαμου (bagasse) δύνανται να χρησιμοποιηθούν αποτελεσματικά για την παραγωγή αραβιτόλης και άλλων πολυολών.

Ένα από τα υποστρώματα που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την παραγωγή L-αραβιτόλης είναι η ημικυτταρίνη που προέρχεται από ανανεώσιμες λιγνοκυτταρινούχες πρώτες ύλες. Η ημικυτταρίνη καθίσταται ιδιαίτερα πολύτιμη λόγω της πολυπλοκότητας της δομής της, περιέχοντας εξόζες (γλυκόζη, μαννόζη) και πεντόζες (ξυλόζη, αραβινόζη) (Kumdam, Murthy & Gummadi, 2014; Kordowska-Wiater, 2015). Η σχετική αναλογία των μεμονωμένων σακχάρων εξαρτάται από την πρώτη ύλη που χρησιμοποιείται. Για παράδειγμα, σκληρά ξύλα και γεωργικά υπολείμματα είναι πλούσια σε πεντόζες που μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως υπόστρωμα κατά τη βιοτεχνολογική παραγωγή πολυολών από στελέχη ζυμών που είναι ικανά να αφομοιώνουν τις πεντόζες. Στα παραπάνω στελέχη ζυμών συγκαταλέγονται εγγενή στελέχη ζυμών καθώς και γενετικά τροποποιημένα στελέχη του *Saccharomyces cerevisiae*, που είναι ικανά να αφομοιώνουν την L-αραβινόζη. Ωστόσο, η παραπάνω διαδικασία συνεπάγεται υψηλό κόστος προετοιμασίας (π.χ. προ-επεξεργασία λιγνοκυτταρινούχων υλικών, υδρόλυση καθώς και απομάκρυνση τοξικών και παρεμποδιστικών ουσιών) και καθαρισμό του τελικού προϊόντος από το μίγμα των πολυολών (Kumdam, Murthy & Gummadi, 2014; Kordowska-Wiater, 2015).

Το καλύτερο υλικό εκκίνησης για την παραγωγή D-αραβιτόλης αποτελεί η γλυκόζη, ένας μονοσακχαρίτης που παραλαμβάνεται φθηνά λόγω της αφθονίας του στη φύση. Η γλυκόζη δύναται να παραχθεί ενζυμικά από άμυλο και κυτταρίνη. Η γλυκόζη αποτελεί το πιο συχνά χρησιμοποιούμενο υπόστρωμα για την παραγωγή

αραβιτόλης μέσω μικροβιακών ζυμώσεων (Kumdam, Murthy & Gummadi, 2013; Kordowska-Wiater, 2015).

Ένα ακόμη υπόστρωμα που έχει προταθεί για παραγωγή αραβιτόλης είναι η γλυκερόλη (Koganti et al, 2011). Η βιοτεχνολογική εφαρμογή της γλυκερόλης φαίνεται να αποτελεί ενδιαφέρουσα επιλογή καθώς η κατακόρυφη πτώση της τιμής της, ως συνέπεια της πρόσφατης ταχείας ανάπτυξης της βιομηχανίας παραγωγής βιοντίζελ, την καθιστά ένα δυνητικά φθηνό υπόστρωμα που θα μπορούσε να μειώσει το κόστος παραγωγής αραβιτόλης.

Τα στελέχη των ζυμών που χρησιμοποιούνται παίζουν σημαντικό ρόλο στην παραγωγή αραβιτόλης. Όπως προαναφέρθηκε, πολλά ωσμόφιλα είδη ζυμών, παράγουν πολυ-υδροξυ αλκοόλες ως αναπόσπαστο μέρος της κανονικής διαδικασίας ανάπτυξής τους (Kumdam, Murthy & Gummadi, 2014; Kordowska-Wiater, 2015). Ωστόσο, η παραγωγή και οι αποδόσεις των πολυολών επηρεάζονται από τις εκάστοτε συνθήκες ανάπτυξης. Οι Girio et al. (2000) μελέτησαν την ικανότητα του *Debaryomyces hansenii* (που είχε προηγουμένως απομονωθεί από σακχαροκάλαμο) να αφομοιώνει πεντόζες και εξόζες προερχόμενες από ημικυτταρίνη. Στα πειράματά τους, η μέγιστη συγκέντρωση της παραχθείσας αραβιτόλης από L-αραβινόζη ήταν μόνο 2,86 g/L ανά 35 g/L L-αραβινόζη, μετά από 120 ώρες καλλιέργειας, και συνεπώς η καθοριζόμενη απόδοση ήταν επίσης σε χαμηλά επίπεδα.

Στον Πίνακα 1.3 συνοψίζονται οι παράμετροι ζύμωσης κατά την παραγωγή αραβιτόλης από διάφορα είδη ζυμών και οι αποδόσεις τους. Είναι εμφανές ότι μπορούν να επιτευχθούν υψηλές συγκεντρώσεις αραβιτόλης ως και 83,4 g/L με αποδόσεις που μπορούν να φτάσουν ως και 0,77 g/g .

Πίνακας 1.3: Συνοπτική παρουσίαση παραγωγής αραβιτόλης από διάφορα στελέχη ζυμών σε batch και fed-batch καλλιέργειες (Kumdam, Murthy & Gummadi, 2014).

Στελέχη Ζυμών	Πηγή Άνθρακα	Αραβιτόλη g/L	$Y_{A/S}$ g/g	Σύστημα Καλλιέργειας
<i>Metschnikowia reukaufii</i>	Γλυκόζη 200 g/L	81,4	0,41	Batch Fermenter 34 °C / 600 rpm
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	Γλυκόζη 175 g/L	83,4	0,48	30 °C / 350 rpm
<i>Kodamae ohmeri</i>	Γλυκόζη 200 g/L	81,2	0,41	Batch shake flasks 37 °C / 220 rpm
<i>Hansenula polymorpha</i>	Γλυκόζη <30 g/L	18,8	0,14	Fed batch Fermenter 45 °C / 1000 rpm
<i>Pichia guilliermondii</i>	L-αραβινόζη 50 g/L	33,4	0,54	Batch 34 °C / 200 rpm
<i>Candida entomeae</i>	L-αραβινόζη 50 g/L	34,7	0,77	Batch shake flasks 34 °C / 200 rpm
<i>Kluyveromyces lactis</i>	Λακτόζη 188 g/L	14	0,25	Batch Fermenter 30 °C / 450 rpm

<i>Endomycopsis chodati</i>	Γλυκόζη 100 g/L	35-40% του αξιοποιήσιμου σακχάρου	0,34	Batch shake flasks 30 °C
	Γλυκόζη 100 g/L	14	0,10	
<i>Debaryomyces nepalensis</i>	Γλυκόζη 100 g/L	11,5	0,15	Batch shake flasks 30 °C / 180 rpm
	Αραβινόζη 100 g/L	24,6	0,32	

Όσον αφορά την παραγωγή αραβιτόλης χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα καθαρή γλυκόζη, ποίκιλα είδη ωσμόφιλων ζυμών όπως *Zygosaccharomyces*, *Saccharomyces*, *Debaryomyces*, *Metschnikowia*, *Candida*, *Pichia*, κ.α. έχουν μελετηθεί αλλά συνήθως ο χρόνος επώασης που απαιτείται είναι μεγάλος και οι αποδόσεις που επιτυγχάνονται είναι πολύ μικρές για να είναι βιομηχανικά αποδεκτές (Kumdam, Murthy & Gummadi, 2014; Kordowska-Wiater, 2015).

Οι Saha, Sakakibara και Cotta (2007) απομόνωσαν ζύμες από κυψέλες μελισσών και επέλεξαν το στελέχος *Zygosaccharomyces rouxii*, το οποίο παρήγαγε περίπου 83,4 g/L D-αραβιτόλης από 175 g/L γλυκόζης, σε ασυνεχή καλλιέργεια 240 ωρών, χρησιμοποιώντας 5% εμβόλιο. Οι ερευνητές βελτιστοποίησαν τη διαδικασία χρησιμοποιώντας μια μεταβλητή ανά πείραμα και υπέδειξαν ότι οι βέλτιστες συνθήκες καλλιέργειας του *Z. rouxii* για παραγωγή D-αραβιτόλης, είναι θερμοκρασία 30 °C, pH 5.0, με τη βέλτιστη ταχύτητα ανάδευσης να κυμαίνεται εντός του εύρος 300-450 rpm. Εκτός από τη γλυκόζη, το εν λόγω στελέχος μπόρεσε να αφομοιώσει μια ποικιλία μονοσακχαριτών, όπως φρουκτόζη, γαλακτόζη, μαννόζη και ξυλόζη, προς παραγωγή D-αραβιτόλης, όμως δεν μπόρεσε να αξιοποιήσει την L-αραβινόζη (Saha, Sakakibara & Cotta, 2007). Ορισμένα στελέχη ζυμών που είναι ικανά να παράξουν D-αραβιτόλη από γλυκόζη παρουσιάζονται στον Πίνακα 1.4 (Kordowska-Wiater, 2015).

Πίνακας 1.4: Στελέχη ζυμών ικανά να παράξουν D-αραβιτόλη από γλυκόζη (Kordowska-Wiater, 2015).

Ζύμη	Προέλευση στελέχους	$Y_{A/S}$ g/g	Συνθήκες καλλιέργειας	Άλλα παραγόμενα προϊόντα
<i>Pichia ohmeri</i>	Culture collection	0,43	30 °C 125 rpm	Δεν ανιχνεύθηκαν
<i>Hansenula polymorpha</i>	Culture collection	0,14	45 °C 1000 rpm	ΔΑ †
<i>Metschnikowia reukaufii</i>	Φυσική πηγή	0,52	33 °C 350 rpm	ΔΑ †
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	Κυψέλη μελισσών	0,48	30 °C 350 rpm	Γλυκερόλη & Αιθανόλη
<i>Kodamaea ohmeri</i>	Κυψέλη μελισσών	0,41	37 °C 220 rpm	Γλυκερόλη & Αιθανόλη
<i>Debaryomyces nepalensis</i>	Σάπιο μήλο	0,02	30 °C 180 rpm	Αιθανόλη
<i>Pichia anomala</i>	Φυσικό περιβάλλον	0,22	30 °C 250 rpm	Ριβιτόλη

† Δεν αναφέρονται παραγόμενα προϊόντα.

1.4.2.3. Εφαρμογές D- και L- αραβιτόλης

Η D-αραβιτόλη δύναται να χρησιμοποιηθεί για τη σύνθεση ενώσεων υψηλής σημασίας που περιέχουν ένα εναντιομερές, εμφανίζουν φαρμακευτικές ιδιότητες και ως εκ τούτου μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην παρασκευή ζιζανιοκτόνων, ανοσοκατασταλικών φαρμάκων και αντι-παθογόνων (Kumdam, Murthy & Gummadi, 2013; Kumdam, Murthy & Gummadi, 2014).

Η αραβιτόλη θεωρείται ότι δρα κατασταλτικά στην εμφάνιση της τερηδόνας καθώς η γλωρίδα του στόματος δεν μπορεί να μεταβολίσει αυτή τη σακχαρική αλκοόλη και ως εκ τούτου η στοματική κοιλότητα προστατεύεται. Επιπλέον ο ρόλος της σε ενεργειακά ελεγχόμενες δίαιτες είναι επίσης πολύ σημαντικός καθώς απορροφάται αργά από το ανθρώπινο πεπτικό σύστημα και έχει όπως προαναφέρθηκε χαμηλή θερμιδική περιεκτικότητα (Koganti et al., 2011; Kumdam, Murthy & Gummadi, 2013; Kumdam, Murthy & Gummadi, 2014; Kordowska-Wiater, 2015).

Η L-αραβιτόλη παρουσιάζει παρόμοια φυσιολογική δράση με την ξυλιτόλη και ταυτόχρονα χαμηλότερη θερμιδική περιεκτικότητα συνεπώς δύναται να μειώσει την εναπόθεση λίπους στην πεπτική οδό καθώς και το λιπώδη ιστό του σώματος. Λόγω της χαμηλότερης θερμιδικής της περιεκτικότητας συγκριτικά με την ξυλιτόλη, αποτελεί ένα σύνηθες χρησιμοποιούμενο συστατικό σε είδη της βιομηχανίας τροφίμων όπως τσίχλες (Kumdam, Murthy & Gummadi, 2013; Kumdam, Murthy & Gummadi, 2014).

Σύμφωνα με μελέτες ηλεκτρική ενέργεια μπορεί να παραχθεί απευθείας από πολυόλες (Kumdam, Murthy & Gummadi, 2014). Η αραβιτόλη, η ξυλιτόλη και η σορβιτόλη αποτελούν τις τρεις πεντιτόλες από τις οποίες δύναται να παραχθεί ηλεκτρική ενέργεια, γεγονός που παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον καθώς οι πολυόλες μπορούν να προκύψουν ως παραπροϊόντα της ζύμωσης της αιθανόλης. Ως γνωστόν οι πολυόλες αυτές αποτελούν παράγωγα υδατανθράκων λιγνοκυτταρινικής προέλευσης. Η αραβιτόλη φαίνεται να δημιουργεί μια μέγιστη πυκνότητα ισχύος ίση με $2070 \pm 10 \text{ mW} / \text{m}^2$ σε μία πυκνότητα ρεύματος $0.68 \text{ mA} / \text{cm}^2$ (Kumdam, Murthy & Gummadi, 2014).

Συνεπώς, η αποτελεσματική χρήση αυτής της πολυόλης θα μπορούσε να αποτελέσει ένα σημαντικό βήμα στην αξιοποίηση της βιομάζας με στόχο την οικονομική παραγωγή ενέργειας από ανανεώσιμες πρώτες ύλες.

Η αραβιτόλη μαζί με την ξυλιτόλη, σύμφωνα με την λίστα του Υπουργείου Ενέργειας των Η.Π.Α. βρίσκονται μεταξύ των 30 μονομερών που περιέχουν έως 6 άτομα άνθρακα τα οποία θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως βασικές χημικές ενώσεις για τη μελλοντική χημική βιομηχανία. Πριν το 2000, ο αριθμός των ερευνών σχετικά με τη μικροβιακή παραγωγή αραβιτόλης ήταν μάλλον περιορισμένος, αλλά το ενδιαφέρον έχει εμφανώς αυξηθεί κατά την τελευταία δεκαετία. Η έρευνα στον τομέα αυτόν, επικεντρώνεται κυρίως στην επιλογή μικροοργανισμών που είναι σε θέση να παράγουν αραβιτόλη από φθηνά απόβλητα και παραπροϊόντα (π.χ.

γλυκερόλη). Επιπλέον, προτείνονται νέες τεχνολογίες και διερευνάται πώς τα επιμέρους στάδια της διαδικασίας θα μπορούσαν να βελτιστοποιηθούν με σκοπό να ανταποκριθούν στις απαιτήσεις της αγοράς (Kordowska-Wiater, 2015).

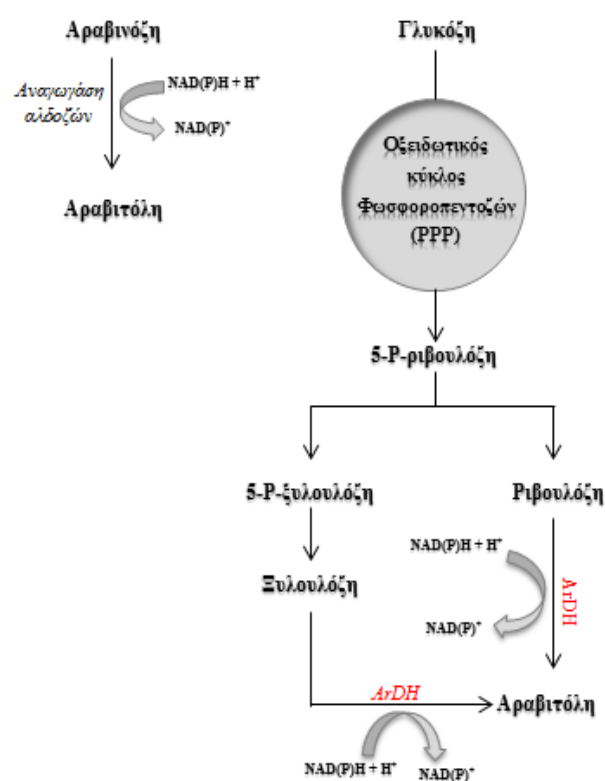
Η έρευνα σχετικά με την μικροβιακή παραγωγή αραβιτόλης από ζύμες βρίσκεται ακόμη σε πρωταρχικά στάδια, ωστόσο εκτιμάται ότι στο μέλλον οι διεργασίες βιομετατροπής φθινών υποστρωμάτων καθώς και η πρόοδος των μεθόδων ανάκτησης του επιθυμητού τελικού προϊόντος θα είναι αξιοσημείωτες. Η εμπορευματοποίηση των νέων τεχνολογιών θα αποτελέσει το επόμενο βήμα προς την εισαγωγή αυξημένων ποσοτήτων του βιολογικού αυτού προϊόντος στην αγορά που θα έχει ως αποτέλεσμα και την πτώση της τιμής της (Kordowska-Wiater, 2015).

1.4.2.4. Βιοχημικό μονοπάτι σύνθεσης Αραβιτόλης

Η βιοχημεία σύνθεσης της D-αραβιτόλης έχει αποκαλυφθεί σε κάποιο βαθμό για ορισμένους οργανισμούς. Στο Σχήμα 1.5 παρουσιάζονται οι πιθανές μεταβολικοί οδοί που χρησιμοποιούνται για την σύνθεση της αραβιτόλης από γλυκόζη και αραβινόζη. Οι περισσότερες μελέτες που εστιάζονται στην βιοχημική σύνθεση της αραβιτόλης βασίζονται στην ανάπτυξη των μικροοργανισμών σε ραδιοϊσοτοπικά επισήμασμένη γλυκόζη. Με αυτόν τον τρόπο, συγκεκριμένα για τον μικροοργανισμό *Debaryomyces hansenii*, βρέθηκε ότι το μεταβολικό μονοπάτι των φωσφοροπεντοζών παίζει σημαντικό ρόλο στο σχηματισμό αραβιτόλης, με την 5-P-ριβουλόζη να αποτελεί πρόδρομο αυτής (Kumdam, Murthy & Gummadi, 2014).

Η βιοσύνθεση της αραβιτόλης δεν έχει ακόμη μελετηθεί εκτενώς. Πολλές πτυχές σχετικά με τα ένζυμα που εμπλέκονται στο μεταβολικό μονοπάτι καθώς και των βιοχημικών μηχανισμών που χρησιμοποιούνται είναι ακόμα ασαφείς.

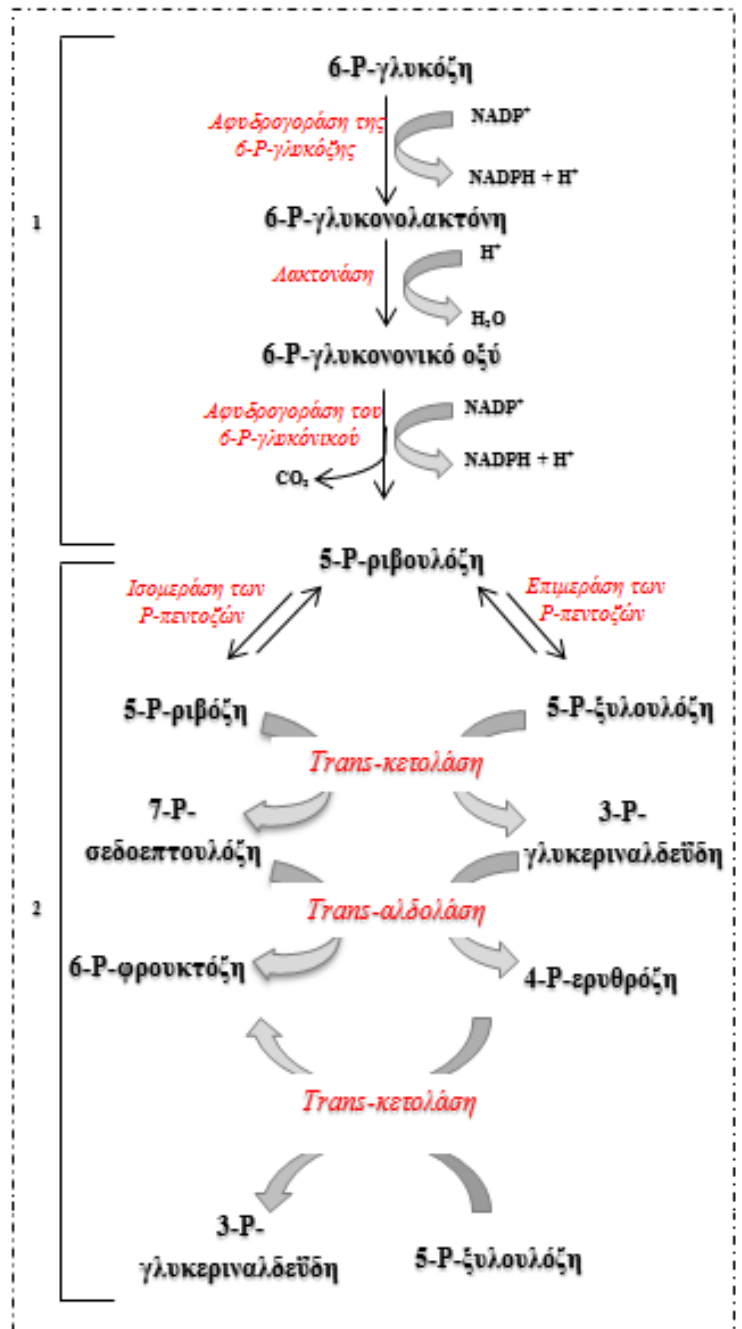
Σύμφωνα με πρωταρχικές μελέτες, όσον αφορά τον μικροοργανισμό *Candida albicans*, η αφυδρογονάση της αραβιτόλης (ArDH) φάνηκε ότι καταλύει την αναγωγή της D-ριβουλόζης σε D-αραβιτόλης.



Σχήμα 1.5: Πιθανές μεταβολικοί οδοί που χρησιμοποιούνται για την σύνθεση αραβιτόλης από γλυκόζη και αραβινόζη κατά τους Kumdam, Murthy & Gummadi, (2014).

Αργότερα διαπιστώθηκε ότι το ένζυμο μεσολαβεί στο πρώτο στάδιο του καταβολισμού της αραβιτόλης. Η παρατήρηση αυτή ενισχύεται από την αδυναμία που παρατηρήθηκε σε μεταλλαγμένες μορφές, που στερούνταν του ενζύμου ArDH, να αυξηθούν σε θρεπτικό μέσο που περιείχε D-αραβιτόλη. Αντιθέτως, οι μεταλλαγμένες αυτές μορφές ήταν σε θέση να συνθέτουν D-αραβιτόλη όταν αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό μέσο γλυκόζης, γεγονός που απέδειξε ότι η αφυδρογονάση της αραβιτόλης δεν συμμετείχε στη σύνθεση της D-αραβιτόλης.

Ένα πιθανό μεταβολικό μονοπάτι προτάθηκε από τους Wong et al. (1993). Οι παραπάνω ερευνητές χρησιμοποιώντας επισημασμένη γλυκόζη ^{14}C , κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι ο μικροοργανισμός *Candida albicans* συνθέτει D-αραβιτόλη χρησιμοποιώντας ένα μεταβολικό μονοπάτι που περιλαμβάνει, την αναγωγή της 5-P-ριβουλόζης σε 5-P-αραβιτόλη, μέσω της δράσης μιας αναγωγάσης, και έπειτα ακολουθεί αποφωσφορλίωση αυτής. Η αφυδρογονάση της αραβιτόλης χρησιμοποιήθηκε ως διαγνωστικός δείκτης. Ένα παρόμοιο μονοπάτι που περιλαμβάνει αναγωγή της ριβουλόζης προτάθηκε και από τους Weimberg και Orton, για τη σύνθεση αραβιτόλης από τον μικροοργανισμό *Saccharomyces mellis*. Ωστόσο οι Blakely et al. (1962) ανέφεραν ότι η σύνθεση της αραβιτόλης από τον *Saccharomyces rouxii*, πραγματοποιείται χρησιμοποιώντας ως πρόδρομη ένωση αυτής, ένα διαφορετικό ενδιάμεσο του κύκλου των φωσφοροπεντοζών και συγκεκριμένα την 5-P-ξυλουλόζη (Kumdam, Murthy & Gummadi, 2014).



Σχήμα 1.6: Οξειδωτική οδός των φωσφοροπεντοζών (Pentose Phosphate Pathway). 1. Οξειδωτική φάση κατά την οποία η γλυκόζη μετατρέπεται σε πεντόζη με παραγωγή CO_2 . Το στάδιο της οξειδωτικής φάσης αποδίδει 2 ανηγμένα συνένζυμα NADPH. 2. Μη οξειδωτική αλληλομετατροπή σακχάρων όπου μέσω αντιστρεπτών αντιδράσεων παράγονται μόρια με 3 έως 7 άτομα άνθρακα, έως ότου επιτευχθεί ισορροπία. (Αγγελής, 2007-τροποποιημένο)

Συνοπτικά, σε γενικά πλαίσια όσον αφορά την βιοσύνθεση αραβιτόλης από γλυκόζη ισχύουν τα ακόλουθα (Kumdam, Murthy & Gummadi, 2014; Kordowska-Wiater, 2015). Η D-αραβιτόλη παράγεται μέσω δύο εναλλακτικών οδών.

Κατά την πρώτη, η εξόζη αυτή φωσφορυλιώνεται προς 6-φωσφορο-γλυκόζη, η οποία στην συνέχεια εισέρχεται στον οξειδωτικό κύκλο των φωσφοροπεντοζών (Pentose Phosphate Pathway - PPP) (Σχήμα 1.6). Ορισμένοι μικροοργανισμοί μπορούν να μετατρέπουν την 6-φωσφορο-γλυκόζη σε D-5-φωσφορο-ριβουλόζη, η οποία έπειτα από αποφωσφορυλίωση ανάγεται από D-ριβουλόζη σε D-αραβιτόλη, από μια NADP-εξαρτημένη αφυδρογονάση (μεταβολική οδός σχηματισμού D-ριβουλόζης).

Άλλα στελέχη μικροοργανισμών δύνανται να μετατρέψουν την 6-φωσφορο-γλυκόζη σε D-5-φωσφορο-ξυλουλόζη, όπου στην πορεία έπειτα από αποφωσφορυλίωση, η τελευταία ανάγεται από D-ξυλουλόζη σε D-αραβιτόλη, από μια NAD-εξαρτημένη αφυδρογονάση (μεταβολική οδός σχηματισμού D-ξυλουλόζης).

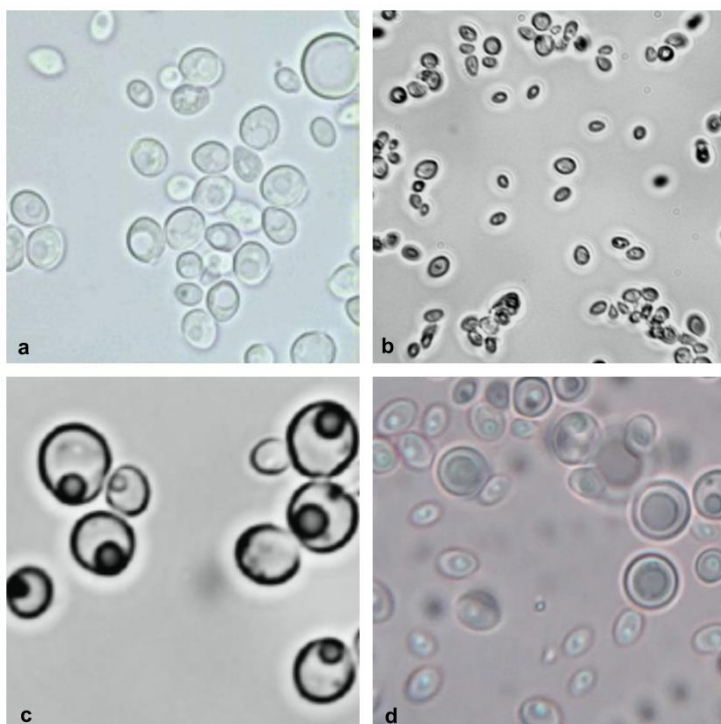
1.5. Ζύμες του γένους *Metschnikowia*

Το γένος *Metschnikowia* αποτελεί ένα καλά τεκμηριωμένο γένος τελεομορφικών ζυμών της τάξης Ascomycete. Το φύλο Ascomycota αποτελεί ένα ευρύτατο άθροισμα 18.000 σαπροφυτικών και παρασιτικών ειδών και περιλαμβάνει έναν εξίσου μεγάλο αριθμό (περίπου 14.000) ειδών που δημιουργούν λειχήνες (Μακρή, 2011).

Από την πρώτη καταγραφή του γένους *Metschnikowia*, περισσότερα από 40 είδη έχουν ενταχθεί σε αυτό, συμπεριλαμβανομένων αρκετών ειδών *Candida*. Τα είδη του γένους *Metschnikowia* χαρακτηρίζονται από τον σχηματισμό μακρών βελονοειδών ασκοσπορίων (Mendonca-Hagler, Hagler & Kurtzman, 1993; Sjamsuridzal et al., 2013). Υπάρχουν σχετικά λίγες διαφορές σε φυσιολογικά χαρακτηριστικά μεταξύ των ειδών του γένους. Τα είδη που έχουν απομονωθεί από χερσαίους οικοτόπους, τυπικά σχετίζονται με λουλούδια ή φρούτα και έντομα, ενώ εκείνα που έχουν απομονωθεί από υδάτινα περιβάλλοντα είναι συχνά παρασιτικά σε ασπόνδυλα είτε έχουν απομονωθεί ως μορφές ελεύθερης διαβίωσης σε νερό (Mendonca-Hagler, Hagler & Kurtzman, 1993).

Η ασυνήθιστη μορφολογία των ασκοσπορίων αυτών των μικροοργανισμών καθώς και η συσχέτισή τους με άλλους μικροοργανισμούς προσέκλυσαν την προσοχή των ερευνητών. Ο Metschnikoff, το 1884 περιέγραψε για πρώτη φορά ένα είδος αυτής της ομάδας ως *Monospora hicuspidata*, ενώ επεσήμανε επίσης τη λειτουργία των βελονοειδούς σχήματος σπορίων στην παρασιτική εισβολή του *Daphnia magna*. Το όνομα *Metschnikowia* εισήχθη αργότερα από τον Kamienski (1899), ενώ ακολούθησαν οι περιγραφές δύο χερσαίων ειδών *Metschnikowia*, *Candida pulcherrima* και *Candida reukaufii* (Mendonca-Hagler, Hagler & Kurtzman, 1993).

Τα βελονοειδούς σχήματος ασκοσπόρια που παρατηρήθηκαν και στα δύο παραπάνω στελέχη υποδεικνύουν ότι αυτοί οι μικροοργανισμοί αποτελούν μέλη του γένους *Metschnikowia*.



Εικόνα 4: Κύτταρα διαφόρων ειδών του γένους *Metschnikowia*. a. *Metschnikowia* spp. (Savini et al., 2013), b. *Metschnikowia pulcherrima* (<http://wineserver.ucdavis.edu>), c. *Metschnikowia fructicola* (Kurtzman & Droby, 2001), d. Ζύμη MD_F1, που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη και έχει παρουσιάσει σημαντική συγγένεια με το γένος *Metschnikowia*.

Μέχρι το 1993, δεδομένα συγγένειας DNA και γενετικού υβριδισμού είχαν καθορίσει με σαφήνεια οκτώ είδη στο γένος *Metschnikowia* (Mendonca-Hagler, Hagler & Kurtzman, 1993). Η τάξη αυτή μπορούσε να διαχωριστεί σε μία ομάδα τεσσάρων ειδών που κατά κύριο λόγο συνδέονται με υδάτινα περιβάλλοντα, και μια δεύτερη που περιλαμβάνει χερσαία είδη. Μέχρι σήμερα έχουν καθοριστεί με σαφήνεια 35 είδη που ανήκουν στο εν λόγω γένος (Savini et al., 2013).

Τα περισσότερα χερσαία είδη *Metschnikowia* συναντώνται στο νέκταρ ή τη στεφάνη των λουλουδιών καθώς και σε φρούτα ή φυτικούς ιστούς που βρίσκονται σε αποσύνθεση. Μεταφέρονται σε νέους ξενιστές από έντομα, όπως η μέλισσα και η δροσόφιλα (Mendonca-Hagler, Hagler & Kurtzman, 1993; Savini et al., 2013; Sjamsuridzal et al., 2013).

Η ζύμη *Metschnikowia pulcherrima*, είναι γνωστό ότι περιορίζει σημαντικά την ανάπτυξη άλλων μικροοργανισμών στο φυσικό περιβάλλον και κατά συνέπεια χρησιμοποιείται στο εμπόριο ως παράγοντας ελέγχου μετά τη συγκομιδή (Savini et al., 2013; Santamauro et al., 2014). Ωστόσο, η οικολογική σημασία και οι ακριβείς μηχανισμοί εξακολουθούν να είναι ελάχιστα κατανοητοί, αλλά προσφέρουν τη δυνατότητα για εμπορική εκμετάλλευση.

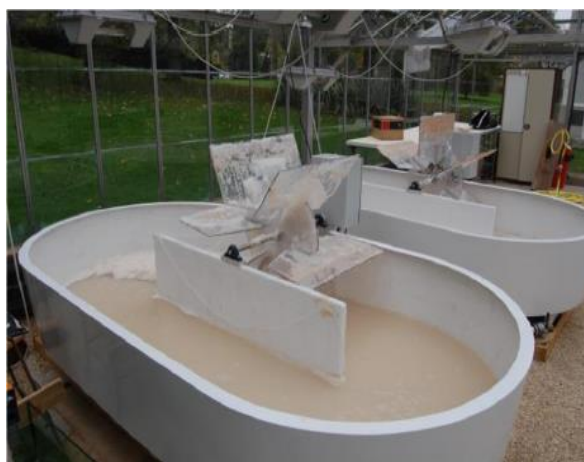
Η *Metschnikowia pulcherrima*, επίσης ανέφερόμενη στη βιβλιογραφία ως *Candida pulcherrima* (anamorph), *Saccharomyces pulcherrimus*, *Rhodotorula pulcherrima*, *Torula pulcherrima*, *Cryptococcus castellanii* και *Torulopsis pulcherrima*, συναντάται συνήθως στο νέκταρ των λουλουδιών και την επιφάνεια των φρούτων, καθώς και στο γλεύκος των σταφυλιών μετά το πάτημα, συμβάλλοντας στη

διαμόρφωση της γεύσης και του αρώματος του κρασιού (Savini et al., 2013; Santamauro et al., 2014). Η εν λόγω ζύμη ευδοκίμει στο γλεύκος, παρά την υψηλή του οξύτητα (pH 3 έως 4) και τη συγκέντρωση σακχάρων (>100 g/L), και αντιστέκεται στην ανταγωνιστική μικροχλωρίδα του γλεύκους.

Η *Metschnikowia pulcherrima* είναι γνωστή για την παραγωγή κόκκινης χρωστικής, (πουλχεριμίνη) που σχηματίζεται από την μη αναστρέψιμη σύνδεση του πουλχεριμικού οξέος και του περιβαλλοντικού σιδήρου. Το γεγονός αυτό αποτρέπει στην ανταγωνιστική μικροχλωρίδα την πρόσβαση σε σίδηρο, και αποτελεί την βάση της χρήσης της ζύμης ως βιο-μυκητοκτόνο για τον έλεγχο ασθενειών που προκύπτουν μετά τη συγκομιδή. Ως εκ τούτου, η εν λόγω ζύμη μελετήθηκε περαιτέρω από τους ερευνητές, με σκοπό τη δυναμική καλλιέργεια χαμηλού κόστους σε μη αποστειρωμένες συνθήκες, λόγω της έκκρισης ισχυρών αντιμικροβιακών ενώσεων, (πουλχεριμικό οξύ και 2-φαινυλαιθανόλη) καθώς και της ανθεκτικότητάς της στην υψηλή σχετικά οξύτητα (Santamauro et al., 2014).

Κατά τη διάρκεια της ανάπτυξής της στην επιφάνεια των σταφυλιών η *Metschnikowia pulcherrima* θεωρείται ότι καταβολίζει συστατικά του φυτικού κυτταρικού τοιχώματος, καθώς και σάκχαρα προερχόμενα από το εσωτερικό των σταφυλιών. Το γεγονός αυτό, συνάδει με πρόσφατες μελέτες που αποδεικνύουν ότι η *Metschnikowia pulcherrima* παράγει ένα ευρύ φάσμα ενζύμων αποικοδόμησης του κυτταρικού τοιχώματος. Η ιδιότητα αυτή υποδεικνύει ένα βαθμό μεταβολικής προσαρμοστικότητας που ενδείκνυται για βιομηχανικές εφαρμογές στην οινολογία (Santamauro et al., 2014).

Παρά το γεγονός ότι, η ικανότητα της εν λόγω ζύμης να αυξάνεται σε χαμηλό pH και θερμοκρασία, σε συνδυασμό με την παραγωγή πουλχεριμίνης, θα διευκόλυνε την καλλιέργειά της υπό σχετικά ανέξοδες μη αποστειρωμένες συνθήκες, μελέτες που αφορούν την μικροβιακή παραγωγή λιπιδίων έχουν καταλήξει στο συμπέρασμα ότι το είδος δεν είναι ελαιογόνο. Ωστόσο, όταν υποβάλλεται σε περιβαλλοντικό στρες, για παράδειγμα περιοριστικές συνθήκες σε άζωτο, ένα υποσύνολο των κυττάρων εντός της καλλιέργειας αρχίζει να σποριογονεί μέσω ενός «μεταβατικού τύπου» κυττάρου το οποίο έχει παρουσιάσει κάποιες ενδείξεις λιπιδικής συσσώρευσης (Santamauro et al., 2014).



Εικόνα 5: Καλλιέργεια της ζύμης *Metschnikowia pulcherrima* σε υπαίθρια δεξαμενή αντιδραστήρα 500 L (Santamauro et al., 2014).

Σύμφωνα με τους Santamauro et al. (2014), η αύξηση της αναλογίας των κυττάρων που σχηματίζονται σε απόκριση ενός κατάλληλου ερεθίσματος σε

συνδυασμό με κάποιο μέσο για την πρόληψη της ανάπτυξης αυτών σε φτωχά σε έλαιο σπόρια, δύναται να αυξήσει τη συνολική παραγωγή λιπιδίων του *Metschnikowia pulcherrima*, εντός του εύρους των ελαιογόνων μικροοργανισμών. Οι ερευνητές υπέδειξαν ότι επιτυχημένη μεταχείριση της καλλιέργειας αύξησε το ποσοστό των πλούσιων σε έλαιο κυττάρων, ενώ η συνολική ενδοκυτταρική συσσώρευση λιπιδίων που επιτεύχθηκε ήταν της τάξης του 40% κ.β.. Ακόμη, η ζύμη δύναται να μεταβολίσει τη γλυκερόλη καθώς και μια ποικιλία άλλων σακχάρων, γεγονός που υποδηλώνει ότι η ετερογενής βιομάζα θα μπορούσε να αποτελεί κατάλληλη πηγή άνθρακα. Τέλος, απεικονίζουν τη δυνατότητα παραγωγής λιπιδίων ανέξοδα, σε βιομηχανική κλίμακα μέσω της καλλιέργειας *Metschnikowia pulcherrima* σε ανοικτό αντιδραστήρα ολικού όγκου 500 L.

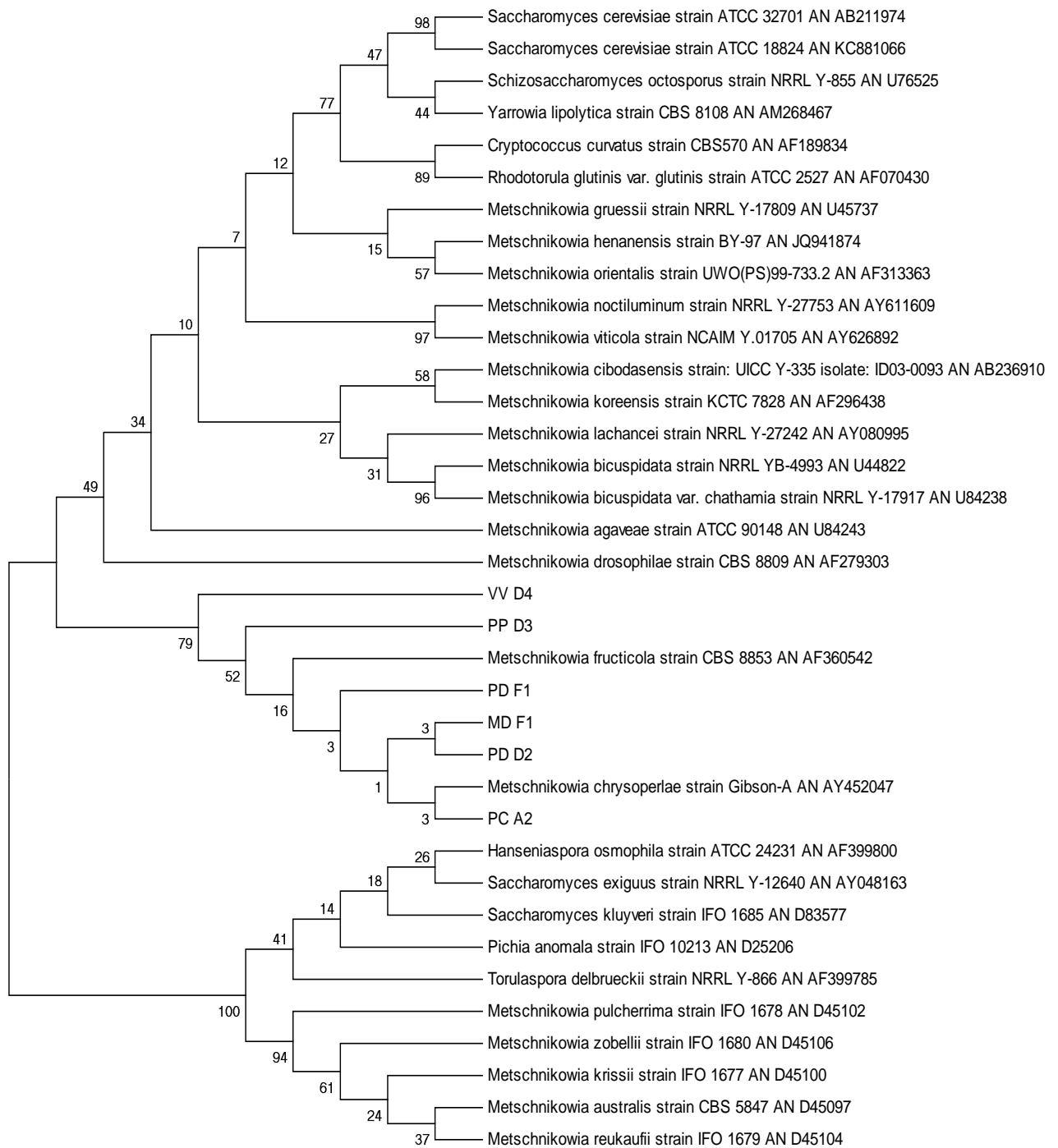
Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν τρία στελέχη ζυμών της συλλογής του εργαστηρίου Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων τα οποία είχαν προηγουμένως απομονωθεί από διαφορετικές φυσικές πηγές με υψηλά επίπεδα σακχάρων (γλυκόζη, φρουκτόζη, σακχαρόζη). Συγκεκριμένα η απομόνωση πραγματοποιήθηκε από την επιφάνεια και τη σάρκα μήλων (*Malus domestica*), αχλαδιών (*Pyrus communis*) και αχλαδόμηλων (*Pyrus pyrifolia*).

Σε προηγούμενες εργαστηριακές μελέτες (Maina et al., 2015), ταυτοποιήθηκε η ενισχυμένη 26S αλληλουχία του ριβοσωμικού RNA των παραπάνω ζυμών και τα αποτελέσματα έδειξαν σημαντική συγγένεια με το γένος *Metschnikowia* (Πίνακας 1.5).

Πίνακας 1.5: Αποτελέσματα συγγένειας με βάση την ταυτοποίηση της ενισχυμένης 26S αλληλουχίας του ριβοσωμικού RNA (Maina et al., 2015).

Κωδικός	Είδος με βάση την ενισχυμένη αλληλουχία 26S rRNA	Identity	Accession number
PC_A2	<i>Metschnikowia pulcherrima</i> strain B-NC-13-F08	99%	KJ794649
PP_D3	<i>Metschnikowia pulcherrima</i> strain BZYXYL-1	97%	JX041890
MD_F1	<i>Metschnikowia aff. pulcherrima</i> P01A016	99%	JX188181

Όπως είναι εμφανές και από το φυλογενετικό δέντρο (Σχήμα 1.7) που προέκυψε από την ίδια μελέτη με βάση την 26S αλληλουχία του ριβοσωμικού RNA με τυπικά στελέχη (type strains) ελαιογόνων ζυμών, όλα τα στελέχη, φαίνεται ότι ανήκουν στο γένος *Metschnikowia* με ποσοστό ομοιότητας με το κοντινότερο στέλεχος από 97-99%.



Σχήμα 1.7: Φυλογενετικό δέντρο όπως προέκυψε μετά την ταυτοποίηση της 26S ριβοσωμικής RNA αλληλουχίας (Maina et al., 2015).

1.6.Σκοπός της παρούσας μελέτης

Η παραγωγή ενδοκυτταρικού λίπους καθώς και αιθανόλης και πολυολών, που δύνανται να αποτελέσουν μια εναλλακτική πρώτη ύλη για την παραγωγή ενός ευρέος φάσματος προϊόντων, από βιοκαύσιμα έως πρόσθετες ουσίες για τη βιομηχανία τροφίμων, αποτελεί έναν προφανή στόχο για τον κλάδο της Βιοτεχνολογίας και της Τεχνολογίας μικροβιακών ζυμώσεων.

Ωστόσο, η βιομηχανική παραγωγή τους, ιδίως στην περίπτωση του μικροβιακού λίπους, εξακολουθεί να αποτελεί μια δαπανηρή διεργασία. Για το λόγο αυτό κρίνεται επιτακτική η ανάγκη εξεύρεσης νέων ελαιογόνων στελεχών ικανών να παράγουν σημαντικές ποσότητες ενδοκυτταρικού λίπους χρησιμοποιώντας ευτελούς ή μηδενικής αξίας πρώτες ύλες για την καλλιέργειά τους.

Ως εκ τούτου, ο σκοπός της παρούσας πτυχιακής μελέτης ήταν η διερεύνηση της δυνατότητας παραγωγής μικροβιακού λίπους από τριών στελεχών ζυμών, τα οποία σε προηγούμενες μελέτες έδειξαν δείγματα λιποσυσσώρευσης, και η επιλογή του καταλληλότερου στελέχους για περαιτέρω μελέτη αξιολόγησης των βέλτιστων παραμέτρων που επηρεάζουν τη διαδικασία της ζύμωσης. Παράλληλα, διερευνήθηκε και η παραγωγή άλλων μεταβολικών προϊόντων που δύνανται να προκύψουν από τις ζυμώσεις αυτές.

Για το σκοπό αυτό στα πρωταρχικά πειράματα χρησιμοποιήθηκε ως θρεπτικό μέσο διάλυμα γλυκόζης με συγκέντρωση 10 g/L, ενώ ο μεταβαλλόμενος παράγοντας ήταν η θερμοκρασία η οποία κυμάνθηκε εντός του εύρους 22-35 °C.

Όπως προαναφέρθηκε, οι κύριες πρώτες ύλες που χρησιμοποιούνται στον τομέα παραγωγής ενέργειας και υλικών εξακολουθούν να έχουν ως βάση το πετρέλαιο. Ωστόσο, το γεγονός αυτό δύναται να ξεπεραστεί μέσω της μείωσης του κόστους παραγωγής μεταβολικών προϊόντων μέσω ζυμώσεων, όπως το μικροβιακό λίπος, η αιθανόλη και οι πολυόλες. Η μείωση του κόστους παραγωγής, που σχετίζεται με τη διαδικασία της ζύμωσης εξακολουθεί να είναι υψίστης σημασίας, με σκοπό η βιομηχανική παραγωγή τέτοιων χημικών ουσιών να γίνει οικονομικά εφικτή.

Ωστόσο, η διαδικασία της ζύμωσης, τα τελικά παραγόμενα προϊόντα (απόδοση ή/και συγκέντρωση) κι ως εκ τούτου το κόστος παραγωγής δύνανται να επηρεαστούν από τις συνθήκες της ζύμωσης, όπως είναι η θερμοκρασία και η συγκέντρωση του υποστρώματος

Ως εκ τούτου, στο δεύτερο μέρος της μελέτης, επιλέχθηκε το στέλεχος ζύμης που παρουσίασε την μεγαλύτερη δυνατότητα λιποσυσσώρευσης με βάση τα προηγούμενα αποτελέσματα, και πραγματοποιήθηκε πειραματικός σχεδιασμός με τη βοήθεια λογισμικού με στόχο τον προσδιορισμό των συνθηκών που επηρεάζουν την σύνθεση, συγκέντρωση του μικροβιακού λίπους, της αιθανόλης και της αραβιτόλης, καθώς και την μεταξύ τους σχέση.

2. Υλικά και μέθοδοι

2.1. Βιολογικό υλικό

Στην παρούσα πτυχιακή μελέτη οι μικροοργανισμοί που εξετάστηκαν ανήκουν στην κατηγορία των ζυμών. Τα τρία στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν απομονώθηκαν στο Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών και επιλέχθηκαν μεταξύ άλλων βάσει των ενδείξεων λιποσυσσώρευσης που παρουσίασαν σε προηγούμενες μελέτες. Στον Πίνακα 2.1 παρουσιάζονται αναλυτικά τα στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν καθώς και η σχέση συγγένειας είδους που παρουσίασαν με βάση προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων (Μάινα, 2013).

Πίνακας 2.1: Αναλυτικός Πίνακας στελεχών ζυμών που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη.

<i>Κωδικός</i>	<i>Πηγή Απομόνωσης</i>	<i>Είδος με βάση την ενισχυμένη αλληλουχία 26S rRNA</i>
PC_A2	<i>Pyrus communis</i>	<i>Metschnikowia pulcherrima</i> strain B-NC-13-F08
PP_D3	<i>Pyrus pyrifolia</i>	<i>Metschnikowia pulcherrima</i> strain BZYXYL-
MD_F1	<i>Malus domestica</i>	<i>Metschnikowia aff. pulcherrima</i> P01A016

Οι εν λόγω καλλιέργειες διατηρούνταν σε τριβλία Petri πληρωμένα με θρεπτικό μέσο YGC (Yeast Extract Glucose Chloramphenicol Agar), το οποίο αναστέλλει την ανάπτυξη βακτηρίων λόγω της παρουσίας χλωραμφενικόλης, στους 4 °C. Η ανανέωση τους λάμβανε χώρα ανά τακτά χρονικά διαστήματα προκειμένου να διατηρηθεί η ζωτικότητα τους.

2.2. Παρασκευή εμβολίου

Για την παρασκευή και ανάπτυξη του εμβολίου τα παραπάνω στελέχη καλλιεργήθηκαν αρχικά σε θρεπτικό μέσο YPD (10% εκχύλισμα ζύμης, 10% πεπτόνη, 10% γλυκόζη) για 24 h, σε θερμοκρασία από 22-35 °C ανάλογα με τις απαιτήσεις του εκάστοτε πειράματος. Στη συνέχεια το εμβόλιο (10% v/v) μεταφερόταν υπό ασηπτικές συνθήκες σε θρεπτικό μέσο με σύσταση που περιγράφεται στην παράγραφο 2.3.

2.3. Θρεπτικό μέσο και συνθήκες ζυμώσεων υγρής κατάστασης

Για την παραγωγή μικροβιακού λίπους και άλλων μεταβολιτών τα παραπάνω στελέχη καλλιιεργήθηκαν σε θρεπτικό μέσο με σύσταση: 10 g/L γλυκόζη, 0,15 g/L εκχύλισμα ζύμης, 0,5 mL/L corn steep liquor, 11,7 g/L $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1,5 g/L K_2HPO_4 , 1 g/L NaCl, 1 g/L $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,04 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0,044 g/L $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ και 0,016 g/L $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. Σε κάθε περίπτωση ο λόγος C/N ήταν υψηλός (~ 260 mol/mol) ώστε να ευνοηθεί η συσσώρευση ενδοκυτταρικού λίπους.

Οι ζυμώσεις πραγματοποιήθηκαν σε κωνικές φιάλες των 100mL, με 20 mL τελικό όγκο ζύμωσης για να επιτευχθεί επαρκώς αερόβιο περιβάλλον, υπό ανάδευση 180 rpm. Τα υλικά και θρεπτικά μέσα που χρησιμοποιήθηκαν αποστειρώθηκαν σε αυτόκλειστο στους 121 °C για 20 min.

Τα πειράματα των ζυμώσεων υγρής κατάστασης που πραγματοποιήθηκαν με σκοπό την μελέτη της βέλτιστης θερμοκρασίας παραγωγής μικροβιακού λίπους και άλλων μεταβολιτών έλαβαν μέρος στους 22, 25, 30, 32 και 35 °C υπό συνθήκες ανάδευσης (180 rpm).

2.4. Αναλυτικές μέθοδοι

2.4.1. Προσδιορισμός βιομάζας

Ανά τακτά χρονικά διαστήματα γινόταν συλλογή της βιομάζας και φυγοκέντρωση (9000 rpm, 10min) σε φυγόκεντρο τύπου Heraeus Sepatech Suprafuge 22. Ακολούθησε έκπλυση με προσθήκη απιονισμένου νερού και φυγοκέντρωση. Στη συνέχεια η καθαρή βιομάζα μεταφέρθηκε σε προζυγισμένα φιαλίδια McCartney και τοποθετήθηκε σε φούρνο ξήρανσης ($90 \pm 5^\circ\text{C}$) μέχρι σταθερού βάρους. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν σε g/L καλλιέργειας.

2.4.2. Προσδιορισμός σακχάρων και μεταβολιτών

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης της γλυκόζης και των παραγόμενων προϊόντων πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography, HPLC). Η ταυτοποίηση των μεταβολικών προϊόντων βασίστηκε στον χρόνο κατακράτησης, ο οποίος συγκρίθηκε με γνωστά πρότυπα αυτών. Ως κινητή φάση χρησιμοποιήθηκε υδατικό διάλυμα H_2SO_4 (10 mM), η ροή ρυθμίστηκε στα 0,6 mL/min και η θερμοκρασία στους 45 °C. Η στήλη με την οποία επιτεύχθηκε ο διαχωρισμός του μίγματος ήταν τύπου Aminex HPX- 87H (300mm × 7,8 mm).

Επίσης, όπου κρίθηκε απαραίτητο ο έλεγχος της συγκέντρωσης της γλυκόζης έγινε με την φωτομετρική μέθοδο του δινιτροσαλικυλικού οξέος (DNS), η οποία χρησιμοποιείται για των προσδιορισμό αναγόντων σακχάρων (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.

Εφαρμογή της μεθόδου:

Σε 0,5 mL κατάλληλα αραιωμένου δείγματος προστέθηκε 0,5 mL αντιδραστηρίου DNS και ακολούθησε ανάδευση σε vortex. Επιπλέον παρασκευάστηκε τυφλό στο οποίο αντί για την προσθήκη 0,5 mL δείγματος πραγματοποιήθηκε προσθήκη 0,5 mL απιονισμένου νερού. Ακολούθησε βρασμός των δειγμάτων και του τυφλού στους 100 °C για 5 min. Έπειτα ακολούθησε ταχεία ψύξη με νερό (~20°C), προσθήκη 5 mL απιονισμένου νερού και ανάδευση σε vortex. Τέλος μετρήθηκε η απορρόφηση στα 540 nm. Όλες οι απορροφήσεις μετρήθηκαν σε φασματοφωτόμετρο (Hitachi U-2000) και τα αποτελέσματα εκφράστηκαν με τη βοήθεια πρότυπης καμπύλης γλυκόζης.

Και στις δύο περιπτώσεις τα αποτελέσματα εκφράστηκαν σε g/L καλλιέργειας.

2.4.3. Προσδιορισμός αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων (FAN)

Η αναλυτική μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό του αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων και πεπτιδίων (FAN, Free Amino Nitrogen) στο μέσο της καλλιέργειας ήταν η φωτομετρική μέθοδος της νινυδρίνης (Lie, 1973).

Εφαρμογή της μεθόδου:

1 mL κατάλληλα αραιωμένου δείγματος μεταφέρθηκε σε δοκιμαστικό σωλήνα και προστέθηκε 0,5 mL αντιδραστηρίου χρώσης (color reagent). Οι δοκιμαστικοί πωματίστηκαν, ώστε να αποφευχθεί η εξάτμιση και ακολούθως τοποθετήθηκαν στους 100 °C για ακριβώς 16 min. Μετά το πέρας του βρασμού ακολούθησε ταχεία ψύξη σε νερό με πάγο (~4°C) για 20 min. Στη συνέχεια προστέθηκαν 2,5 mL αντιδραστηρίου αραιώσης (dilution reagent) και ακολούθησε ανάδευση σε vortex για 20 sec. Τέλος μετρήθηκε η απορρόφηση των δειγμάτων στα 570 nm σε φασματοφωτόμετρο (Hitachi U-2000). Το τυφλό που χρησιμοποιήθηκε για μηδενισμό του φασματοφωτομέτρου περιείχε 1mL απιονισμένο νερού αντί δείγματος.

Η συγκέντρωση του δείγματος σε άζωτο υπολογίστηκε με τη βοήθεια πρότυπης καμπύλης αναφοράς και εκφράστηκε σε mg/L FAN. Για την πρότυπη καμπύλη αναφοράς ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία, χρησιμοποιώντας διαφορετικές συγκεντρώσεις πρότυπου διαλύματος γλυκίνης.

Προετοιμασία-Παρασκευή Αντιδραστηρίων:

Αντιδραστήριο χρώσης (color reagent):

Το αντιδραστήριο αυτό αποτελείται από 49,71g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, 5g νινυδρίνη, 3g φρουκτόζη και 60g KH_2PO_4 διαλυμένα σε 1 L απεσταγμένου H_2O . Κατά τη διάρκεια παρασκευής του αντιδραστηρίου το pH πρέπει να κυμαίνεται από 6,6 - 6,8. Ως εκ τούτου όποτε κρίνεται αναγκαίο το pH διορθώνεται ούτως ώστε να

κυμαίνεται εντός του προαναφερθέντος εύρους, με προσθήκη κατάλληλης ποσότητας KH_2PO_4 . Το αντιδραστήριο αποθηκεύεται στους 4°C .

Αντιδραστήριο αραίωσης (dilution reagent):

Αρχικά 2g KIO_3 διαλύονται σε 616 mL απιονισμένου νερού. Ακολούθως 384 mL καθαρής αιθανόλης προστίθενται στο διάλυμα, το οποίο τελικά έχει όγκο 1L .

2.4.4. Εκχύλιση ενδοκυτταρικού λίπους

Για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης ενδοκυτταρικού λίπους που παράγεται κατά τη διάρκεια της υγρής ζύμωσης, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος του HCl (Taria et al., 2012). Έτσι, μετά τη ζύγιση της ξηρής βιομάζας προστέθηκαν 4 mL HCL 2M για κάθε 300 mg ξηρής βιομάζας και ακολούθησε θέρμανση στους 80°C για περίπου 45min . Στη συνέχεια, ακολούθησε φυγοκέντρωση (9000 rpm , 10 min) (Heraeus Sepatech Suprafuge 22) και αφού συλλέχθηκε το ίζημα τοποθετήθηκε σε φιαλίδιο Mc Cartney και προστέθηκε μίγμα διαλυτών $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ σε αναλογία $2:1$ (Folch et al., 1957). Κατόπιν τα φιαλίδια αποθηκεύονταν σε σκοτεινό και ξηρό μέρος, ώστε να αποφευχθεί η οξείδωση των λιπαρών οξέων του εκχυλισμένου λίπους. Με το συγκεκριμένο μίγμα διαλυτών εκχυλίζεται το συνολικό μικροβιακό λίπος, ήτοι και τα αποθηκευτικά και τα δομικά λιπίδια. Στη συνέχεια, η βιομάζα μαζί με το μίγμα διαλυτών υφίστατο διήθηση σε ηθμό. Το διήθημα συλλεγόταν σε προζυγισμένη φιάλη εξάτμισης και ακολούθησε εξάτμιση σε περιστροφικό εξάτμιστήρα (BUCHI Water bath B-480, BUCHI Rotavapor R-114) για την απομάκρυνση των διαλυτών. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν σε g/g ξηρής μάζας και g/L καλλιέργειας.

2.4.5. Προσδιορισμός pH

Στα πειράματα επιλογής βέλτιστης θερμοκρασίας έγινε απλή καταγραφή των μετρούμενων τιμών pH, το οποίο ήταν μη ελεγχόμενο κατά τη διάρκεια της ζύμωσης.

2.5. Βελτιστοποίηση εξεταζόμενων παραμέτρων

Για τον καθορισμό των βέλτιστων παραμέτρων της θερμοκρασίας και της συγκέντρωσης υποστρώματος, όσον αφορά τη λιποσυσσώρευση και την παραγωγή βιοαλκοολών, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος Επιφάνειας Απόκρισης (Response Surface Methodology - RSM).

Κατά τη μέθοδο αυτή ένα πείραμα σχεδιάζεται ώστε να επιτρέπει την εκτίμηση της αλληλεπίδρασης των εξεταζόμενων παραγόντων, και ως εκ τούτου δύναται να δώσει μία ιδέα του σχήματος της επιφάνειας απόκρισης που ερευνάται. Η εν λόγω μέθοδος μπορεί να χρησιμοποιηθεί με σκοπό τα παρακάτω:

- i. Εκτίμηση βελτιωμένων ή βέλτιστων παραγόντων που επηρεάζουν μια διαδικασία.
- ii. Αντιμετώπιση προβλημάτων που συναντώνται κατά την εκτέλεση μιας διαδικασίας και εκτίμηση των αδύναμων σημείων αυτής.

- iii. Ισχυροποίηση μιας διαδικασίας ή ενός προϊόντος έναντι εξωτερικών ή μη ελεγχόμενων παραγόντων. Με τον όρο «ισχυροποίηση» νοείται η επίτευξη της ελάχιστης επιρροής που ασκούν οι εξωτερικοί ή μη ελεγχόμενοι παράγοντες.

Υπ' αυτήν την έννοια, υπάρχει μια πληθώρα λειτουργιών για τους οποίους θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ένα σχέδιο RSM. Για παράδειγμα, ένα πείραμα θα μπορούσε να σχεδιαστεί ώστε να αντιμετωπιστούν προβλήματα που τυχόν σχετίζονται με μια διαδικασία, ή για τον προσδιορισμό αδύναμων σημείων, ή με σκοπό να καθοριστεί ποια συνιστώσα ενός προϊόντος παρουσιάζει μεγαλύτερη ανάγκη βελτίωσης. Ακόμη τέτοιου είδους πειράματα θα μπορούσαν να σχεδιαστούν με σκοπό τη βελτιστοποίηση της απόδοσης ή για την ελαχιστοποίηση των επιπέδων ελαττωμάτων. Όλοι αυτοί οι στόχοι μπορούν να επιτευχθούν με τη χρήση παραγοντικών σχεδίων σε συνδυασμό με τις κατάλληλες σχεδιαστικές βελτιώσεις.

Ένας συμμετρικός παραγοντικός σχεδιασμός είναι μια πειραματική διεύθυνση στην οποία επιλέγεται ένας μικρός ακέραιος αριθμός επιπέδων (p) για κάθε έναν από τους εξεταζόμενους παράγοντες (k) και διεξάγονται p^k πειράματα τα οποία αποτελούν τους συνδυασμούς των επιπέδων αυτών. Στην περίπτωση που ο αριθμός των επιπέδων είναι $p=3$ τότε πρόκειται για 2^{nc} τάξεως σχεδιασμό και στα πειραματικά δεδομένα μπορεί να προσαρμοστεί μέχρι 2^{ov} βαθμού εξίσωση.

2.5.1. Σχεδιασμός πειραμάτων – Κεντρικός Σύνθετος Σχεδιασμός (Central Composite Design)

Μετά την επιλογή του στελέχους που παρουσίασε τη μεγαλύτερη λιποσυσσώρευση, οι διαδικασίες των ζυμώσεων αποτέλεσαν αντικείμενο στατιστικής βελτιστοποίησης. Για την επίτευξη του παραπάνω σκοπού χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό JMP 8.

Δύο από τις σημαντικότερες παραμέτρους που επηρεάζουν λιποσυσσώρευση και την παραγωγή βιοαλκοολών επιλέχθηκαν για τον πειραματικό σχεδιασμό: η θερμοκρασία (X_1) και η συγκέντρωση του υποστρώματος (X_2). Ένα κεντρικό σύνθετο σχέδιο (CCD), υλοποιήθηκε εντός ενός εύρους θερμοκρασιών και συγκεντρώσεων υποστρώματος, το οποίο επιλέχθηκε με βάση τα προκαταρκτικά πειράματα.

Ένα 3^2 κεντρικό σύνθετο σχέδιο (CCD) αναπτύχθηκε έτσι ώστε να εισάγει τετραγωνικούς όρους, και ως εκ τούτου, να επιτρέψει την εκτίμηση της καμπυλότητας για την πρόβλεψη της συγκέντρωσης παραγόμενου μικροβιακού λίπους αλλά και του λόγου αραβιτόλη/αιθανόλη. Στον Πίνακα 2.2 απεικονίζεται ο σχεδιασμός των πειραμάτων και του αντίστοιχου εύρους για κάθε έναν από τους εξεταζόμενους παράγοντες. Για τις ανάγκες του μοντέλου πραγματοποιήθηκαν δώδεκα πειράματα, τέσσερα σε κάθε επίπεδο, τα οποία αντιπροσωπεύουν όλους τους πιθανούς συνδυασμούς των εξεταζόμενων παραμέτρων των επιπέδων αυτών. Όλα τα

πειράματα πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν πλην των τεσσάρων πειραμάτων που έγιναν στο βασικό επίπεδο και ουσιαστικά αποτελούν επαναλήψεις.

Για την κωδικοποίηση των εξεταζόμενων μεταβλητών χρησιμοποιήθηκε η Εξίσωση 1.

$$x_i = \frac{X_i - X_i^{CP}}{\Delta X_i} \quad \text{Εξίσωση 1.}$$

Όπου: i είναι οι ανεξάρτητες μεταβλητές (θερμοκρασία, συγκέντρωση υποστρώματος), x_i είναι η κωδικοποιημένη τιμή, X_i είναι η πραγματική τιμή, X_i^{CP} είναι η πραγματική τιμή της εξεταζόμενης μεταβλητής στο βασικό επίπεδο και ΔX_i είναι η τιμή του βήματος αλλαγής.

Η απόκριση του μοντέλου προβλέφθηκε χρησιμοποιώντας μια πολυωνυμική εξίσωση 2^{ου} βαθμού (Εξίσωση 2).

$$Y = b_1 + b_2x_1 + b_3x_2 + b_4x_1x_2 + b_5x_1^2 + b_6x_2^2 \quad \text{Εξίσωση 2.}$$

Όπου: το Y είναι η απόκριση του μοντέλου η οποία στη συγκεκριμένη περίπτωση είναι η συγκέντρωση παραγόμενου λίπους σε g/L ή ο λόγος Αραβιτόλης/Αιθανόλης, $b_{(j)}$ είναι το διάνυσμα των παραμέτρων, b_1 είναι το στοιχείο τομής, b_2 και b_3 είναι οι γραμμικές επιδράσεις των παραμέτρων θερμοκρασία και συγκέντρωση υποστρώματος αντίστοιχα, b_4 είναι η παράμετρος αλληλεπίδρασης και b_5 και b_6 είναι οι τετραγωνικές παράμετροι για τη θερμοκρασία και τη συγκέντρωση υποστρώματος, αντίστοιχα. Οι παράμετροι υπολογίστηκαν με την μέθοδο της γραμμικής παλινδρόμησης ελαχιστοποιώντας τις προβλεπόμενες με τις πειραματικές τιμές.

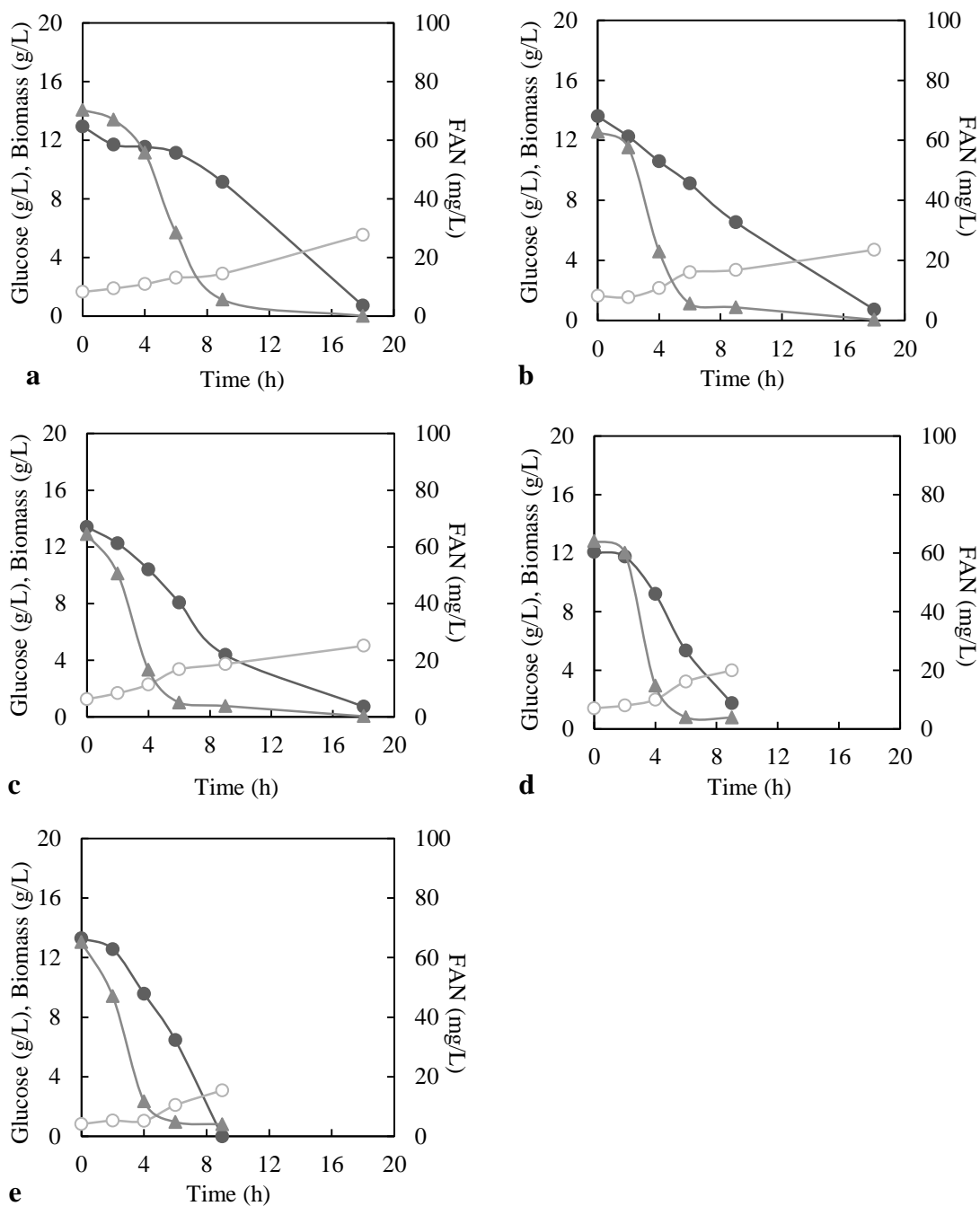
Πίνακας 2.2: Εξεταζόμενες τιμές εύρους των παραγόντων θερμοκρασία και συγκέντρωση υποστρώματος για τις ανάγκες του μοντέλου CCD.

Επίπεδο	Θερμοκρασία: X_1 (oC)	Αρχική συγκέντρωση σακχάρων: X_2 (g/L)
1,4142	34,0	100,0
1	32,2	88,3
0	28,0	60,0
-1	23,8	31,7
-1,4142	22,0	20,0

3. Αποτελέσματα

3.1. Επίδραση της θερμοκρασίας κατά την υγρή ζύμωση του απομονωμένου στελέχους PC_A2

Η κινητική της παραγωγής βιομάζας, της κατανάλωσης της γλυκόζης καθώς και της κατανάλωσης του FAN από το στέλεχος PC_A2, παρουσιάζεται στο Σχήμα 3.1 για τους 22, 25, 28, 32 και 35 °C



Σχήμα 3.1: Κινητική παραγωγής βιομάζας (○), κατανάλωσης γλυκόζης (●) και FAN (▲) κατά την υγρή καλλιέργεια του PC_A2 σε διαφορετικές θερμοκρασίες: (a) 22 °C, (b) 25 °C, (c) 28 °C, (d) 32 °C & (e) 35 °C

Σε κάθε περίπτωση η αύξηση του εν λόγω στελέχους μπορεί να χαρακτηριστεί ως ικανοποιητική. Η κατανάλωση της πηγής άνθρακα ξεκινά σε μικρό χρονικό διάστημα μετά την πραγματοποίηση του εμβολιασμού, στην πλειοψηφία των ζυμώσεων εντός των 2 πρώτων ωρών της ζύμωσης, χωρίς να παρατηρείται ιδιαίτερα μεγάλη λανθάνουσα φάση ανάπτυξης. Η κατανάλωση της γλυκόζης που σημειώθηκε ήταν 85% στους 32 °C, περίπου 95% στις θερμοκρασίες 22 °C, 25 °C και 28 °C και 100% στους 35 °C.

Παρατηρείται ακόμη ότι σε όλες τις περιπτώσεις το FAN καταναλώθηκε σχετικά γρήγορα, πλην της περίπτωσης των 22 °C όπου η κατανάλωση του μεγαλύτερου ποσοστού του αζώτου παρατηρείται περίπου στις 9 h, συγκριτικά με τη συνολική διάρκεια της ζύμωσης η οποία ήταν 18 h.

Στον Πίνακα 3.1 παρουσιάζονται συνοπτικά τα τελικά σημεία των ζυμώσεων για καθεμιά από τις εξεταζόμενες θερμοκρασίες, στα οποία προσδιορίστηκε και ποσοτικοποιήθηκε η περιεκτικότητα του στελέχους PC_A2 σε μικροβιακά λιπίδια και η παραγωγή άλλων μεταβολιτών.

Πίνακας 3.1: Συγκεντρωτικός πίνακας αποτελεσμάτων της καλλιέργειας του στελέχους PC_A2 σε διαφορετικές θερμοκρασίες και σε περιοριστικές σε άζωτο συνθήκες, με χρησιμοποιούμενη πηγή άνθρακα διάλυμα γλυκόζης ~10 g/L.

Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος (h)	S_0 (g/L)	S_r (g/L)	Q_s (g/L·h)	X (g/L)	L (g/L)	$Y_{L/X}$ (% w/w)	$Y_{L/S}$ (g/g)	Arab (g/L)	EtOH (g/L)
22	18	12,9	0,7	0,5	5,5	1,29	23,8	0,12	-	-
25	18	13,6	0,7	0,7	4,7	1,35	28,8	0,11	-	-
28	18	13,4	0,7	0,8	5,0	1,71	34,4	0,13	-	-
32	9	12,1	1,8	0,8	4	1,22	30,5	0,12	1,2	2,4
35	9	13,3	0	1,0	3,1	0,62	20,2	0,05	1,9	2,5

- : Δεν ανιχνεύθηκε προϊόν.

S_0 : Αρχική συγκέντρωση γλυκόζης (g/L).

S_r : Συγκέντρωση εναπομείναντος γλυκόζης (g/L).

Q_s : Μέση κατανάλωση γλυκόζης (g/L·h)

X : Συγκέντρωση παραχθείσας βιομάζας (g/L).

L : Συγκέντρωση παραγόμενου μικροβιακού λίπους (g/L).

$Y_{L/X}$: Συντελεστής απόδοσης παραγόμενου μικροβιακού λίπους επί ξηρής βιομάζας (% w/w)

$Y_{L/S}$: Συντελεστής απόδοσης παραγόμενου μικροβιακού λίπους ανά μονάδα καταναλισκόμενου υποστρώματος (g/g)

Arab: Συγκέντρωση παραγόμενης αραβιτόλης (g/L).

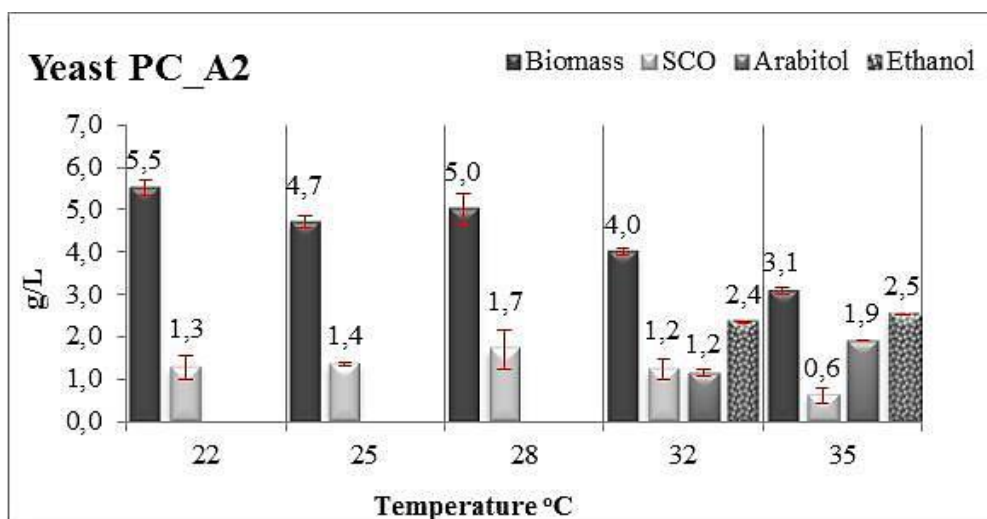
EtOH: Συγκέντρωση παραγόμενης αιθανόλης (g/L).

Η παραγόμενη βιομάζα για το εν λόγω στέλεχος κυμάνθηκε από 3,1-5,5 g/L ενώ η συγκέντρωση του ενδοκυτταρικού λίπους από 0,62- 1,71 g/L. Παρατηρείται ότι

όσον αφορά τη συγκέντρωση του παραγόμενου μικροβιακού λίπους, στις θερμοκρασίες 22-32 °C δεν παρουσιάζονται ιδιαίτερες διαφορές, πλην της θερμοκρασίας 28 °C όπου το στέλεχος PC_A2 παρουσίασε και τη μέγιστη λιποσυσσώρευση με τιμή 1,71 g/L. Αντιθέτως, στην υψηλότερη θερμοκρασία των 35 °C, το στέλεχος παρουσίασε μειωμένη λιποσυσσώρευση (0,62 g/L) η οποία συνοδεύεται από μειωμένη παραγωγή βιομάζας (3,1 g/L). Ως εκ τούτου, η μέγιστη τιμή (34,4 % w/w) του συντελεστή απόδοσης παραγόμενου μικροβιακού λίπους επί της ξηρής βιομάζας ($Y_{L/X}$) σημειώθηκε στην θερμοκρασία των 28 °C ενώ η μικρότερη (20,2 % w/w) στην θερμοκρασία των 35 °C. Επιπρόσθετα, όσον αφορά στον ρυθμό κατανάλωσης της γλυκόζης διαπιστώνεται ότι αυξάνεται (μέχρι και 1 g/L/h στους 35 °C) με την αύξηση της θερμοκρασίας.

Σχετικά με την παραγωγή αραβιτόλης και αιθανόλης, αυτή παρατηρείται μόνο στις μεγαλύτερες θερμοκρασίες των 32 και 35 °C, με τις μέγιστες τιμές αυτών να παρουσιάζονται στους 35 °C (1,9 και 2,5 g/L για αραβιτόλη και αιθανόλη αντίστοιχα), ενώ παραγωγή των δύο αυτών μεταβολικών προϊόντων δεν ανιχνεύθηκε σε καμία από τις χαμηλότερες θερμοκρασίες.

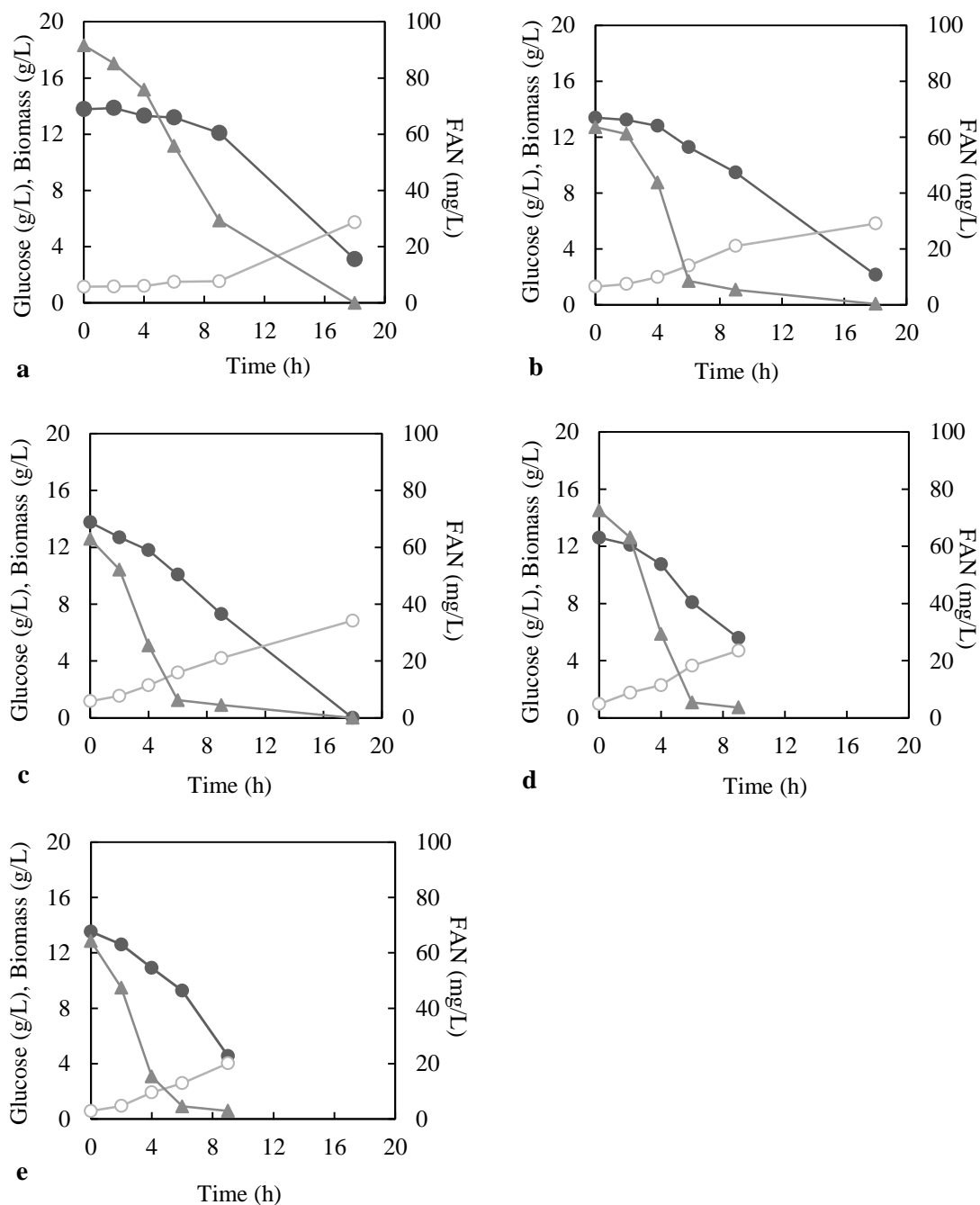
Στο Σχήμα 3.2 παρουσιάζονται συγκριτικά τα αποτελέσματα σχετικά με την παραγωγή της βιομάζας και των λοιπών μεταβολικών προϊόντων κατά την καλλιέργεια του στελέχους PC_A2 στις διάφορες θερμοκρασίες. Είναι προφανές ότι η θερμοκρασία της ζύμωσης επηρεάζει σημαντικά τον μεταβολισμό της εν λόγω ζύμης, αφού στις χαμηλές θερμοκρασίες ευνοείται η λιποσυσσώρευση, ενώ στις πιο υψηλές ο μεταβολισμός στρέφεται προς την παραγωγή βιοαλκοολών.



Σχήμα 3.2: Παραγωγή βιομάζας και λοιπών μεταβολικών προϊόντων κατά την καλλιέργεια του στελέχους PC_A2 σε θρεπτικό μέσο με ~10g/L γλυκόζη ως πηγή άνθρακα, υπό την επίδραση διαφόρων θερμοκρασιών..

3.2. Επίδραση της θερμοκρασίας κατά την υγρή ζύμωση του απομονωμένου στελέχους PP_D3

Η κινητική της παραγωγής βιομάζας, της κατανάλωσης της γλυκόζης καθώς και της κατανάλωσης του FAN από το στέλεχος PP_D3, παρουσιάζεται στο Σχήμα 3.3 για τους 22, 25, 28, 32 και 35 °C



Σχήμα 3.3: Κινητική παραγωγής βιομάζας (○), κατανάλωσης γλυκόζης (●) και FAN (▲) κατά την υγρή καλλιέργεια του PP_D3 σε διαφορετικές θερμοκρασίες: (a) 22 °C, (b) 25 °C, (c) 28 °C, (d) 32 °C & (e) 35 °C.

Και σε αυτήν την περίπτωση, η αύξηση του εν λόγω στελέχους σε όλο το εύρος θερμοκρασιών μπορεί να χαρακτηριστεί ως ικανοποιητική.

Η κατανάλωση της γλυκόζης ξεκινά σε σχετικά μικρό χρονικό διάστημα μετά την πραγματοποίηση του εμβολιασμού στην πλειοψηφία των ζυμώσεων, εντός των 4 πρώτων ωρών της ζύμωσης ωστόσο παρατηρήθηκε μειωμένος ρυθμός κατανάλωσης συγκριτικά με τα άλλα δύο εξεταζόμενα στελέχη. Επίσης παρατηρήθηκαν και περιπτώσεις όπου μετά το τέλος της ζύμωσης, ένα εύλογο ποσοστό της αρχικής συγκέντρωσης γλυκόζης παρέμεινε ακατανάλωτο. Συγκεκριμένα κατά την καλλιέργεια του PP_C3 στις θερμοκρασίες 22-28 °C, η κατανάλωση της γλυκόζης ήταν μεγαλύτερη του 77% της αρχικής συγκέντρωσης γλυκόζης, ενώ στις θερμοκρασίες των 32 και των 35 °C, ένα ποσοστό της τάξης του 34-44% της αρχικής συγκέντρωσης γλυκόζης παρέμεινε ακατανάλωτο.

Παρατηρείται ακόμη ότι για το σύνολο των εξεταζόμενων θερμοκρασιών η κατανάλωση του FAN ξεκινά σε σχετικά μικρό χρονικό διάστημα μετά τον εμβολιασμό ενώ η κατανάλωση του μεγαλύτερου ποσοστού αυτού για την πλειοψηφία των περιπτώσεων πραγματοποιείται εντός των 6 πρώτων ωρών της ζύμωσης. Εξάιρεση αποτελεί η περίπτωση των 22 °C όπου παρατηρείται βραδύτερη κατανάλωση FAN με το μεγαλύτερο ποσοστό αυτού να καταναλώνεται εντός των 8 πρώτων ωρών της ζύμωσης.

Σημειώνεται ότι ιδίως στις περιπτώσεις των 32 και 35 °C το εν λόγω στέλεχος κατανάλωνε την χρησιμοποιούμενη πηγή άνθρακα βραδύτερα από τα άλλα εξεταζόμενα στελέχη, αφού στις ίδιες ώρες ζύμωσης (9 h) είχε καταναλώσει περίπου 30-35% λιγότερη γλυκόζη σε σχέση με το στέλεχος PC_A2 που εξετάστηκε στην προηγούμενη παράγραφο.

Στον Πίνακα 3.2 παρουσιάζονται συνοπτικά τα τελικά σημεία των ζυμώσεων για καθεμία από τις εξεταζόμενες θερμοκρασίες, στα οποία προσδιορίστηκε και ποσοτικοποιήθηκε η περιεκτικότητα του στελέχους PP_D3 σε μικροβιακά λιπίδια και η παραγωγή άλλων μεταβολικών προϊόντων.

Πίνακας 3.2: Συγκεντρωτικός πίνακας αποτελεσμάτων της καλλιέργειας του στελέχους PP_D3 σε διαφορετικές θερμοκρασίες και σε περιοριστικές σε άζωτο συνθήκες, με χρησιμοποιούμενη πηγή άνθρακα διάλυμα γλυκόζης ~10 g/L.

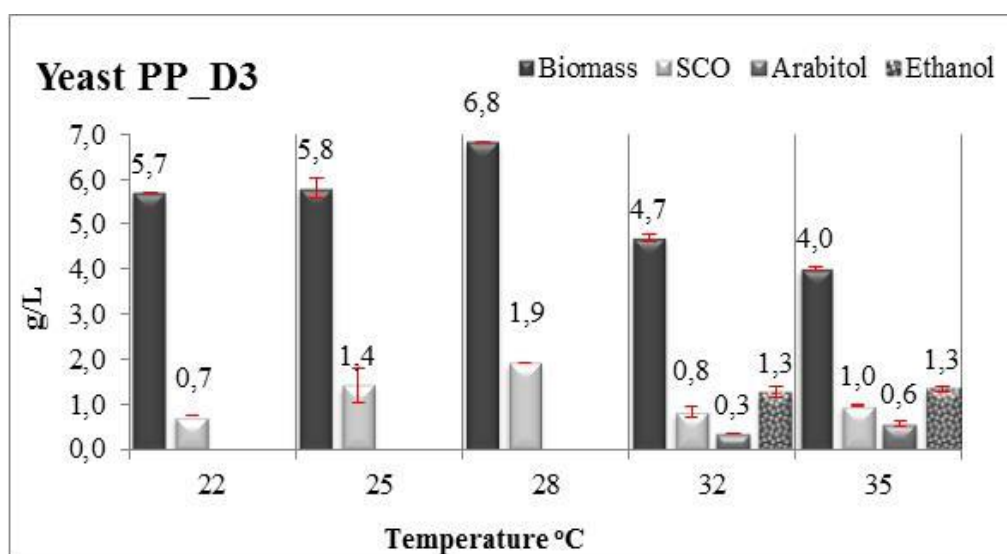
Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος (h)	S_0 (g/L)	S_r (g/L)	Q_s (g/L·h)	X (g/L)	L (g/L)	$Y_{L/X}$ (% w/w)	$Y_{L/S}$ (g/g)	Arab (g/L)	EtOH (g/L)
22	18	13,8	3,1	0,2	5,7	0,7	12,7	0,07	-	-
25	18	13,4	2,1	0,3	5,8	1,42	24,4	0,13	-	-
28	18	13,8	0	0,6	6,8	1,94	28,3	0,14	-	-
32	9	12,6	0,6	0,6	4,7	0,82	17,5	0,12	0,3	1,3
35	9	13,5	4,6	0,7	4,0	0,97	24,0	0,11	0,6	1,3

- : Δεν ανιχνεύθηκε προϊόν.

Η παραγόμενη βιομάζα για το εν λόγω στέλεχος κυμάνθηκε από 4,0-6,8 g/L, ενώ η συσσώρευση του ενδοκυτταρικού λίπους κυμάνθηκε από 0,7-1,94 g/L. Το στέλεχος PP_D3 φαίνεται να ευνοείται περισσότερο στις θερμοκρασίες των 25 και των 28 °C όσον αφορά στη λιποσυσσώρευση, καθώς σε αυτές παρουσιάζονται οι υψηλότερες συγκεντρώσεις παραγόμενου λίπους με τιμές 1,42 και 1,94 g/L αντίστοιχα. Αντίθετα, στις υψηλότερες θερμοκρασίες των 32 και των 35 °C, το στέλεχος παρουσίασε μειωμένη λιποσυσσώρευση (0,82 και 0,97 g/L αντίστοιχα). Το ίδιο φαινόμενο παρατηρείται και για τη χαμηλότερη θερμοκρασία των 22 °C όπου παρουσιάζεται η ελάχιστη συγκέντρωση παραγόμενου λίπους (0,7 g/L). Ως εκ τούτου, η μέγιστη τιμή του συντελεστή Y_{LX} σημειώθηκε στην θερμοκρασία των 28 °C με τιμή 28,3 % (w/w), ενώ η ελάχιστη στους 22 °C (12,7 %, w/w). Αναφορικά με τη μέση κατανάλωση γλυκόζης παρατηρείται αύξηση αυτής με την αύξηση της θερμοκρασίας. Συγκεκριμένα ο μέγιστος ρυθμός κατανάλωσης παρατηρείται στη θερμοκρασία των 35 °C (0,7 g/L·h), ενώ ο ελάχιστος στη θερμοκρασία των 22 °C (0,2 g/L·h).

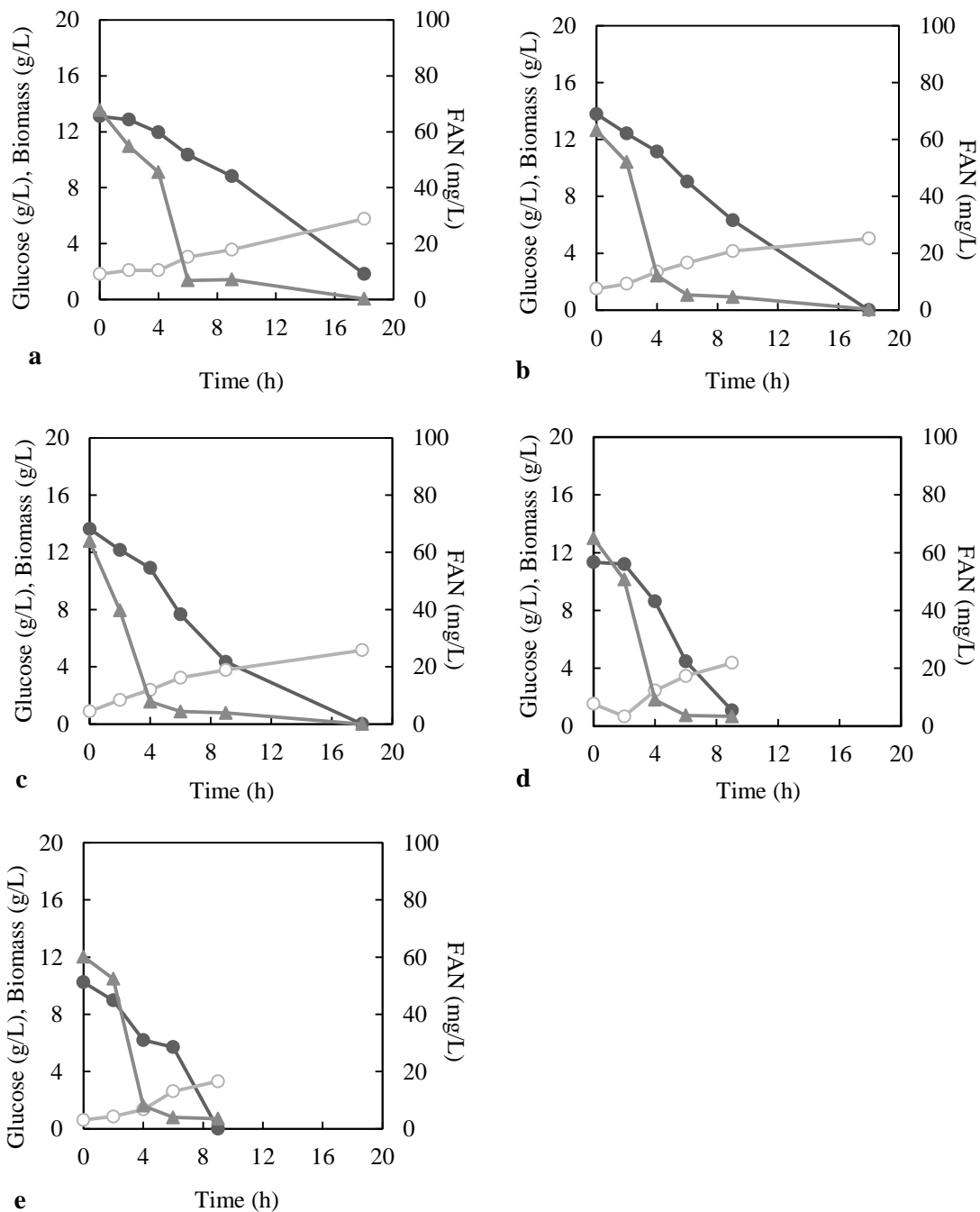
Αναφορικά με την παραγωγή αιθανόλης και αραβιτόλης, η μέγιστη παραγωγή αιθανόλης ήταν 1,3 g/L στις θερμοκρασίες των 32 και 35 °C, ενώ στις ίδιες θερμοκρασίες ανιχνεύθηκε και μικρή ποσότητα αραβιτόλης (0,3 και 0,6 g/L, αντίστοιχα).

Στο Σχήμα 3.4 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα σχετικά με την παραγωγή της βιομάζας και των λοιπών μεταβολικών προϊόντων κατά την καλλιέργεια του στελέχους PP_D3 στις διάφορες θερμοκρασίες. Είναι εμφανές ότι και σε αυτήν την περίπτωση η θερμοκρασία της ζύμωσης επηρεάζει σημαντικά τον μεταβολισμό της εν λόγω ζύμης, καθώς στις χαμηλότερες θερμοκρασίες ευνοείται η λιποσυσσώρευση, ενώ στις υψηλότερες ο μεταβολισμός στρέφεται προς την παραγωγή αιθανόλης και αραβιτόλης.



Σχήμα 3.4 Παραγωγή βιομάζας και λοιπών μεταβολικών προϊόντων κατά την καλλιέργεια του στελέχους PP_D3 σε θρεπτικό μέσο με ~10g/L γλυκόζη ως πηγή άνθρακα, υπό την επίδραση διαφόρων θερμοκρασιών.

3.3. Επίδραση της θερμοκρασίας κατά την υγρή ζύμωση του απομονωμένου στελέχους MD_F1



Σχήμα 3.5: Κινητική παραγωγής βιομάζας (○), κατανάλωσης γλυκόζης (●) και FAN (▲) κατά την υγρή καλλιέργεια του MD_F1 σε διαφορετικές θερμοκρασίες: (a) 22 °C, (b) 25 °C, (c) 28 °C, (d) 32 °C & (e) 35 °C.

Η κινητική της παραγωγής βιομάζας, της κατανάλωσης της γλυκόζης καθώς και της κατανάλωσης του FAN από το στέλεχος MD_F1, παρουσιάζεται στο Σχήμα 3.5 για τους 22, 25, 28, 32 και 35 °C

Η αύξηση του εν λόγω στελέχους είναι ικανοποιητική και η ταχύτητα κατανάλωσης του FAN και της πηγής άνθρακα είναι συγκρινόμενη με το στέλεχος PC_A2 που εξετάστηκε στην παράγραφο 3.1. Ειδικότερα, η κατανάλωση του υποστρώματος ξεκινά αρκετά γρήγορα μετά την πραγματοποίηση του εμβολιασμού, χωρίς να παρατηρείται ιδιαίτερα μεγάλη λανθάνουσα φάση ανάπτυξης. Η κατανάλωση της γλυκόζης που σημειώθηκε ήταν 86% στους 22 °C, περίπου 90% στους 32 °C και 100% για τις θερμοκρασίες των 25 °C, 28 °C και 35 °C.

Παρατηρείται ακόμη ότι σε όλες τις περιπτώσεις, το εν λόγω στέλεχος κατανάλωσε το FAN σχετικά γρήγορα, εντός των 4-6 πρώτων ωρών της ζύμωσης, και μάλιστα γρηγορότερα συγκριτικά με τα άλλα δύο εξεταζόμενα στελέχη. Ωστόσο στην περίπτωση των 22 °C σημειώθηκε βραδύτερη κατανάλωση FAN συγκριτικά με τις υπόλοιπες θερμοκρασίες.

Ακολουθεί ο Πίνακας 3.4 όπου παρουσιάζονται συνοπτικά τα τελικά σημεία των ζυμώσεων για καθεμιά από τις εξεταζόμενες θερμοκρασίες, κατά την καλλιέργεια του στελέχους MD_F1 στα οποία προσδιορίστηκε και ποσοτικοποιήθηκε η περιεκτικότητά του σε μικροβιακά λιπίδια και η παραγωγή βιοαλκοολών.

Πίνακας 3.4: Συγκεντρωτικός πίνακας αποτελεσμάτων της καλλιέργειας του στελέχους MD_F1 σε διαφορετικές θερμοκρασίες και σε περιοριστικές σε άζωτο συνθήκες, με χρησιμοποιούμενη πηγή άνθρακα διάλυμα γλυκόζης ~10 g/L.

Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος (h)	S_0 (g/L)	S_r (g/L)	Q_s (g/L·h)	X (g/L)	L (g/L)	$Y_{L/X}$ (% w/w)	$Y_{L/S}$ (g/g)	Arab (g/L)	EtOH (g/L)
22	18	13,1	1,8	0,4	5,8	2,05	41,4	0,19	-	-
25	18	13,8	0	0,7	5,0	1,29	25,6	0,09	-	-
28	18	13,6	0	0,8	5,2	1,16	22,5	0,09	-	-
32	9	11,3	1,1	0,8	4,4	0,73	16,6	0,07	1,2	2,7
35	9	10,2	0	0,9	3,3	0,73	22,1	0,07	1,97	2,5

- : Δεν ανιχνεύθηκε προϊόν.

S_0 , S_r , X , L , $Y_{L/X}$, $Y_{L/S}$, Arab, EtOH: βλ. Πίνακα 3.2.

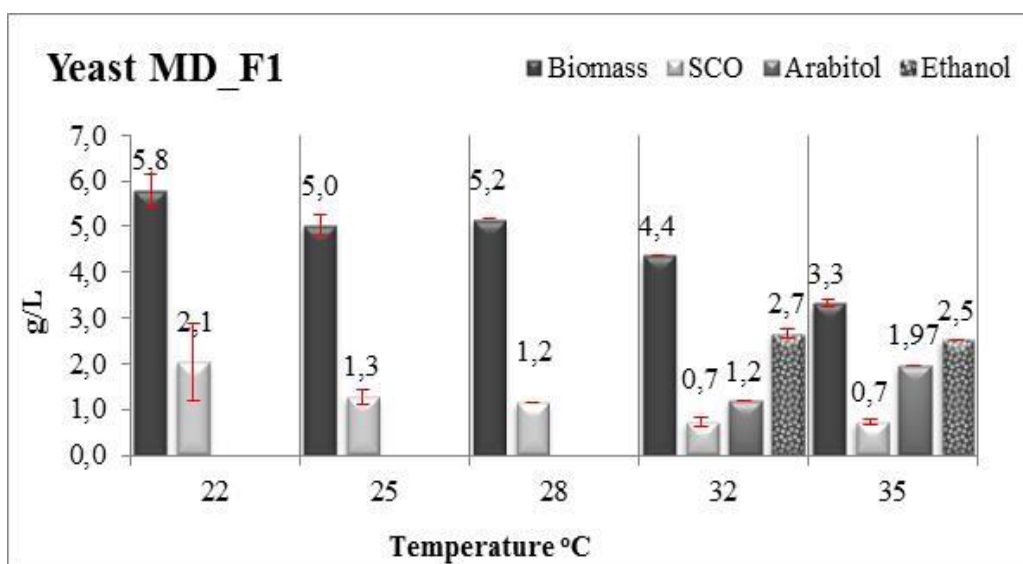
Όπως είναι εμφανές η παραγωγή βιομάζας του στελέχους MD_F1 σε όλο το εύρος των θερμοκρασιών που εξετάστηκαν, κυμάνθηκε από 3,3-5,8 g/L. Η συσσώρευση δε, του ενδοκυτταρικού λίπους κυμάνθηκε από 0,73-2,05 g/L. Παρατηρείται ότι η μέγιστη λιποσυσσώρευση, παρουσιάζεται στην θερμοκρασία των 22 °C, με τιμή 2,05 g/L η οποία αποτελεί και την μέγιστη συγκέντρωση παραγόμενου λίπους που παρουσιάστηκε στην παρούσα μελέτη.

Σε όλες τις υπόλοιπες θερμοκρασίες η συγκέντρωση του παραγόμενου μικροβιακού λίπους από το εν λόγω στέλεχος, φαίνεται να είναι σημαντικά

χαμηλότερη με την ελάχιστη τιμή αυτής να παρουσιάζεται στις θερμοκρασίες 32 και 35 °C (0,73 g/L). Επίσης, η μειωμένη αυτή συγκέντρωση μικροβιακού λίπους στις παραπάνω θερμοκρασίες συνοδεύεται από μειωμένη παραγωγή βιομάζας, 4,4 και 3,3 g/L στους 32 και στους 35 °C αντίστοιχα. Ως εκ τούτου, η μέγιστη τιμή του συντελεστή $Y_{L/X}$ σημειώθηκε στην θερμοκρασία των 22 °C, με τιμή 41,1% (w/w). Επιπροσθέτως, όσον αφορά στον ρυθμό κατανάλωσης της γλυκόζης διαπιστώνεται ότι αυξάνεται (μέχρι και 0,9 g/L/h στους 35 °C) με την αύξηση της θερμοκρασίας, ενώ μπορεί να συγκριθεί με τον αντίστοιχο ρυθμό κατανάλωσης του στελέχους PC_A2.

Όσον αφορά στην παραγωγή αραβιτόλης και αιθανόλης, και σε αυτήν την περίπτωση παρατηρείται μόνο στις υψηλές θερμοκρασίες των 32 και 35 °C, με μέγιστη συγκέντρωση παραγόμενης αραβιτόλης 1,97 g/L στους 35 °C και μέγιστη συγκέντρωση παραγόμενης αιθανόλης 2,7 g/L στους 32 °C.

Στο Σχήμα 3.5 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα σχετικά με την παραγωγή της βιομάζας και των λοιπών μεταβολικών προϊόντων κατά την καλλιέργεια του στελέχους MD_F1 στις διάφορες θερμοκρασίες. Είναι προφανές ότι ο μεταβολισμός του στελέχους MD_F1 επηρεάζεται σημαντικά από τη θερμοκρασία της ζύμωσης. Συγκεκριμένα, οι χαμηλές θερμοκρασίες στρέφουν το μεταβολισμό προς παραγωγή μικροβιακού λίπους, ενώ οι υψηλότερες θερμοκρασίες ευνοούν την παραγωγή αιθανόλης και αραβιτόλης.



Σχήμα 3.5: Μικροβιακή αύξηση και παραγόμενα μεταβολικά προϊόντα κατά την καλλιέργεια του στελέχους MD_F1 σε θρεπτικό μέσο με ~10g/L γλυκόζη ως πηγή άνθρακα, υπό την επίδραση διαφόρων θερμοκρασιών..

3.4. Συγκριτική αξιολόγηση των στελεχών PC_A2, PP_D3 και MD_F1 κατά την υγρή καλλιέργειά τους υπό την επίδραση διαφορετικών θερμοκρασιών

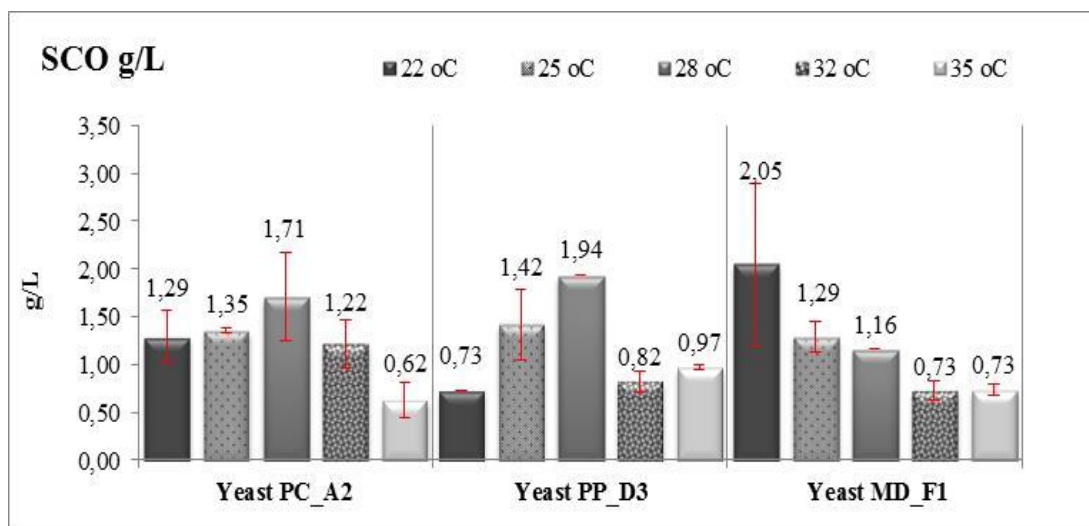
Συνοψίζοντας τα αποτελέσματα και των τριών εξεταζόμενων στελεχών διαπιστώνεται ότι τη μέγιστη παραγωγή βιομάζας παρουσίασε το στέλεχος PP_D3 κατά την καλλιέργειά του στους 28 °C με τιμή 6,8 g/L, ενώ τα άλλα δύο στελέχη παρουσίασαν την μεγαλύτερη παραγωγή στους 22 °C. Η ελάχιστη συγκέντρωση βιομάζας σημειώθηκε κατά την καλλιέργειά του στελέχους PC_A2 στους 35 °C με τιμή 3,1 g/L.

Όσον αφορά την κατανάλωση του υποστρώματος, στην πλειοψηφία των ζυμώσεων καταναλώθηκε περισσότερο του 80% της αρχικής συγκέντρωσης σακχάρων, με μόνη εξαίρεση το στέλεχος PP_D3. Συγκεκριμένα για το στέλεχος PP_D3 στην πλειοψηφία των ζυμώσεων καταναλώθηκε περισσότερο του 80% περίπου της αρχικής συγκέντρωσης σακχάρων ενώ σημειώθηκαν και περιπτώσεις όπου ένα ποσοστό της τάξης του 34-44% παρέμεινε ακατανάλωτο. Επιπλέον το εν λόγω στέλεχος παρουσίασε μειωμένη μέση κατανάλωση γλυκόζης ανά ώρα σε όλο το εύρος των θερμοκρασιών συγκριτικά με τα άλλα δύο εξεταζόμενα στελέχη, με μέγιστο ρυθμό κατανάλωσης 0,7 g/L·h στους 35 °C έναντι των 1 g/L·h (PC_A2) και 0,9 g/L·h (MD_F1) στην αντίστοιχη θερμοκρασία. Το γεγονός αυτό συνοδεύεται από μία μεγαλύτερη διάρκεια λανθάνουσας φάσης, γεγονός ιδιαίτερα εμφανές κατά την καλλιέργεια του μικροοργανισμού στη θερμοκρασία των 22 °C, αλλά και βραδύτερη κατανάλωση του ελεύθερου αζώτου σε όλο το εύρος των θερμοκρασιών σε σχέση με τα στελέχη PC_A2 και MD_F1.

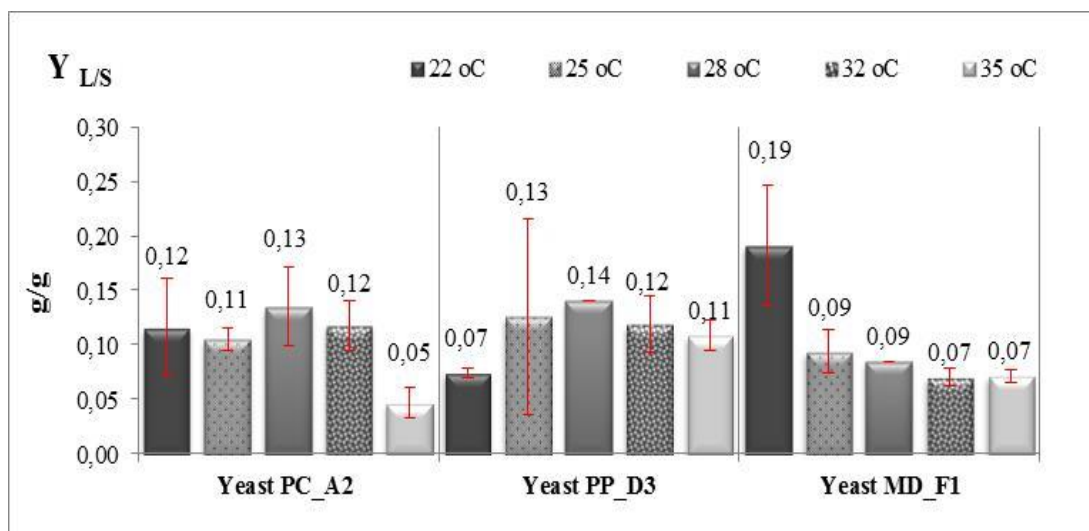
Αναφορικά με την κινητική κατανάλωσης FAN, η αρχική συγκέντρωση FAN σε όλες τις ζυμώσεις κυμάνθηκε περίπου στα επίπεδα των 60-70 mg/L, ενώ στο τελικό σημείο της εκάστοτε ζύμωσης η συγκέντρωση του αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων που ανιχνεύθηκε ήταν από αμελητέα ως μηδενική. Στην πλειοψηφία των περιπτώσεων το FAN καταναλώθηκε σχετικά γρήγορα, με εξαίρεση την περίπτωση των 22 °C όπου παρατηρείται βραδύτερη κατανάλωση συγκριτικά με τις αντίστοιχες ζυμώσεις των άλλων θερμοκρασιών, για το σύνολο των εξεταζόμενων στελεχών. Ωστόσο το στέλεχος MD_F1 φαίνεται να καταναλώνει ταχύτερα το ελεύθερο άζωτο ακόμη και στην χαμηλή θερμοκρασία των 22 °C, συγκριτικά με τα άλλα εξεταζόμενα στελέχη.

Σχετικά με τη συγκέντρωση του παραγόμενου μικροβιακού λίπους (Σχήμα 3.6), τη μέγιστη τιμή 2,05 g/L παρουσίασε το στέλεχος MD_F1 στην θερμοκρασία των 22 °C. Για τα στελέχη PC_A2 και PP_D3 η βέλτιστη θερμοκρασία για την παραγωγή μικροβιακού λίπους φαίνεται να είναι οι 28 °C, καθώς σε αυτήν παρουσιάστηκε η μέγιστη συγκέντρωση παραγόμενου λίπους, με τιμές 1,71 και 1,94 g/L αντίστοιχα.

Η υψηλότερη θερμοκρασία των 35 °C φαίνεται να μην ενδείκνυται για την παραγωγή μικροβιακού λίπους καθώς σε αυτή παρουσιάστηκε η ελάχιστη συγκέντρωση παραγόμενου μικροβιακού λίπους για την πλειοψηφία των στελεχών. Η παρατήρηση αυτή συνοδεύεται από την εμφάνιση της ελάχιστης τιμής του συντελεστή απόδοσης παραγόμενου μικροβιακού λίπους ανά μονάδα καταναλωθέντος υποστρώματος ($Y_{L/S}$) για την πλειοψηφία των στελεχών (Σχήμα 3.7).



Σχήμα 3.6: Συγκριτική αξιολόγηση του παραγόμενου μικροβιακού λίπους κατά την καλλιέργεια των στελεχών PC_A2, PP_D3 και MD_F1 σε θρεπτικό μέσο με ~10g/L γλυκόζη ως πηγή άνθρακα, υπό την επίδραση διαφόρων θερμοκρασιών.

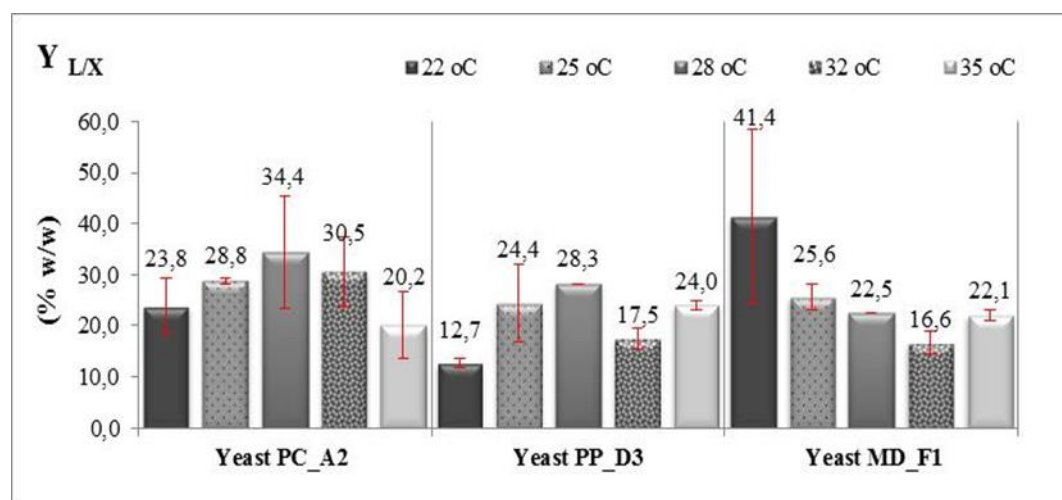


Σχήμα 3.7: Συγκριτική αξιολόγηση του συντελεστή απόδοσης παραγόμενου μικροβιακού λίπους ανά μονάδα καταναλωθέντος υποστρώματος ($Y_{L/S}$), κατά την καλλιέργεια των στελεχών PC_A2, PP_D3 και MD_F1 σε θρεπτικό μέσο με ~10g/L γλυκόζη ως πηγή άνθρακα, υπό την επίδραση διαφόρων θερμοκρασιών.

Το γεγονός αυτό πιθανόν να υποδηλώνει ότι ο μεταβολισμός των εν λόγω στελεχών στρέφεται προς την παραγωγή άλλων μεταβολικών προϊόντων, υπό την επίρεια υψηλών θερμοκρασιών, όπως αυτή των 35 °C. Άλλωστε, όπως προαναφέρθηκε, στη θερμοκρασία αυτή παρατηρήθηκε σημαντική παραγωγή αραβιτόλης και αιθανόλης και για τα τρία εξεταζόμενα στελέχη.

Γενικότερα όσον αφορά τον συντελεστή $Y_{L/S}$ (Σχήμα 3.7), τον υψηλότερο παρουσίασε το στέλεχος MD_F1 στην θερμοκρασία των 22 °C (0,19 g/g), όπου εμφανίζεται και η μέγιστη συγκέντρωση παραγόμενου λίπους του στελέχους, ενώ τον χαμηλότερο παρουσίασε το στέλεχος PC_A2 κατά την καλλιέργειά του στους 35 °C με τιμή 0,05 g/g.

Σχετικά με την λιποπεριεκτικότητα $Y_{L/X}$ (Σχήμα 3.8) το στέλεχος PC_A2 δύναται να συσσωρεύσει λιπίδια σε ποσοστό ως και 34,4% επί ξηρού στους 28 °C. Στην αντίστοιχη θερμοκρασία το στέλεχος PP_D3 παρουσιάζει λιποσυσσώρευση σε ποσοστό της τάξης του 28,3% (w/w). Το μεγαλύτερο δε συντελεστή $Y_{L/X}$ παρουσίασε το στέλεχος MD_F1 το οποίο φαίνεται ότι είναι ικανό να συσσωρεύσει λιπίδια έως και 41,4%, ποσοστό που ξεπερνά σημαντικά τις αντίστοιχες μέγιστες τιμές των άλλων εξεταζόμενων στελεχών.



Σχήμα 3.8: Συγκριτική αξιολόγηση συντελεστή απόδοσης παραγόμενου μικροβιακού λίπους % επί ξηρής βιομάζας ($Y_{L/X}$), κατά την καλλιέργεια των στελεχών PC_A2, PP_D3 και MD_F1 σε θρεπτικό μέσο με μόνη πηγή άνθρακα διάλυμα γλυκόζης ~10g/L, υπό την επίδραση διαφόρων θερμοκρασιών.

Αφού λήφθηκαν υπόψη τα παραπάνω αποτελέσματα το στέλεχος MD_F1 το οποίο παρουσίασε τη μέγιστη λιποσυσσώρευση, συγκριτικά με τα υπόλοιπα εξεταζόμενα στελέχη, επιλέχθηκε για περαιτέρω μελέτη με σκοπό τον προσδιορισμό της βέλτιστης θερμοκρασίας και αρχικής συγκέντρωσης σακχάρων για την παραγωγή μικροβιακού λίπους, αιθανόλης και αραβιτόλης. Τα σχετικά αποτελέσματα αναλύονται στις επόμενες παραγράφους.

3.5. Αποτελέσματα μοντέλου CCD, σχετικά με την παραγωγή μικροβιακού λίπους, κατά την καλλιέργεια του στελέχους MD_F1

Τα αποτελέσματα του μοντέλου που χρησιμοποιήθηκε για τη στατιστική επεξεργασία των πειραματικών αποτελεσμάτων και των καθορισμό των βέλτιστων εξεταζόμενων παραγόντων (θερμοκρασία και αρχική συγκέντρωση σακχάρων) παρουσιάζονται στους Πίνακες 3.5, 3.6 και 3.7. Στον Πίνακα 3.5 παρουσιάζονται οι πειραματικές και οι προβλεπόμενες τιμές που ελήφθησαν μαζί με την αντίστοιχη απόλυτη διαφορά. Στους Πίνακες 3.6 και 3.7, παρουσιάζονται μια σύνοψη του μοντέλου και τα αποτελέσματα με τη μορφή ανάλυσης διακύμανσης (ANOVA), αντίστοιχα.

Πίνακας 3.5: Πειραματικές τιμές και προβλέψεις του μοντέλου όσον αφορά την απόκριση της παραγωγής λίπους για τις εξεταζόμενες μεταβλητές T και C_0 κατά την καλλιέργεια του στελέχους MD_F1.

Αριθμός Πειράματος	Κωδικοποιημένες Τιμές		Πραγματικές τιμές		Συγκέντρωση λίπους στο τέλος της ζύμωσης (g/L)		
	x_1 Θερμοκρασία (T)	x_2 Αρχική Συγκέντρωση Σακχάρων (C_0)	X_1 (T, °C)	X_2 (C_0 , g/L)	Πειραματική τιμή	Προβλέπιμη τιμή	Σφάλμα
1	1	1	32,2	88,3	0,42	1,04	0,44
2	1	-1	32,2	31,7	1,65	1,84	0,13
3	-1	1	23,7	88,3	0,62	0,57	0,03
4	-1	-1	23,7	31,7	2,01	1,53	0,34
5	1,4142	0	34	60	2,12	1,58	0,38
6	-1,4142	0	22	60	0,64	1,04	0,28
7	0	1,4142	28	100	0,93	0,56	0,26
8	0	-1,4142	28	20	1,57	1,80	0,16
9	0	0	28	60	1,55	1,45	0,07
10	0	0	28	60	1,33	1,45	0,08
11	0	0	28	60	1,25	1,45	0,14
12	0	0	28	60	1,66	1,45	0,15

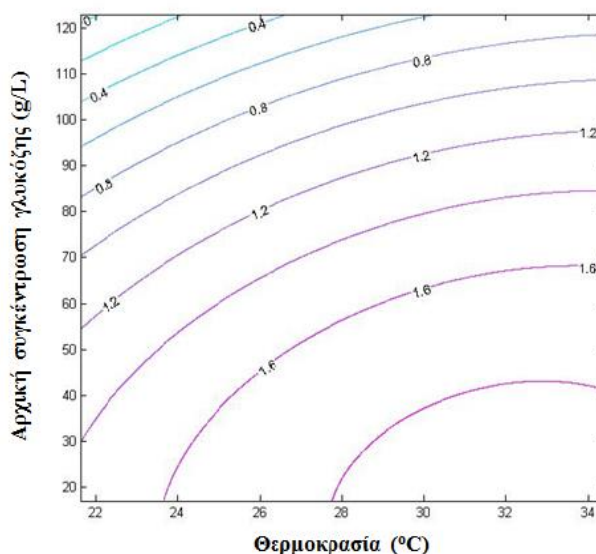
Στο Σχήμα 3.9 απεικονίζεται ολόκληρο το φάσμα των προβλέψεων του μοντέλου σχετικά με την συγκέντρωση παραγόμενου λίπους για το σύνολο του εύρους των δύο εξεταζόμενων παραμέτρων, θερμοκρασία (T) και αρχική συγκέντρωση σακχάρων (C_0).

Σύμφωνα με αυτό φαίνεται ότι, οι χαμηλότερες τιμές θερμοκρασίας (< 28 °C) οδηγούν σε μειωμένη συγκέντρωση παραγόμενου λίπους για το σύνολο του εύρους των τιμών της αρχικής συγκέντρωσης σακχάρων. Μάλιστα όσο υψηλότερη η αρχική

συγκέντρωση σακχάρων τόσο χαμηλότερη η τιμή της συγκέντρωσης του παραγόμενου λίπους.

Υψηλότερες συγκεντρώσεις ($> 1.6 \text{ g/L}$) παραγόμενου λίπους, φαίνεται να επιτυγχάνονται κατά την εφαρμογή υψηλότερων θερμοκρασιών σε συνδυασμό με σχετικά χαμηλή αρχική συγκέντρωση σακχάρων ($< 40 \text{ g/L}$).

Ωστόσο τα προηγούμενα πειραματικά αποτελέσματα για το στέλεχος MD_F1 έρχονται σε αντίθεση με τις προβλέψεις του μοντέλου καθώς η μεγαλύτερη συγκέντρωση παραγόμενου λίπους, η οποία συνοδεύεται και από τη μεγαλύτερη απόδοση σε λίπος ανά μονάδα καταναλισκόμενου υποστρώματος, επιτεύχθηκε στην θερμοκρασία των $22 \text{ }^\circ\text{C}$.



Σχήμα 3.9: Counter plot σχετικά με την παραγωγή λίπους για τις εξεταζόμενες μεταβλητές T και C_0 κατά την καλλιέργεια του στελέχους MD_F1, όπως προέκυψε από την στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων.

Πίνακας 3.6: Σύνοψη μοντέλου σχετικά με την παραγωγή λίπους για τις εξεταζόμενες μεταβλητές T και C_0 κατά την καλλιέργεια του στελέχους MD_F1.

Summary of Fit	
R^2	0,587
Προσαρμοσμένο R^2	0,242
Τυπική απόκλιση μέσου όρου(RMSE)	0,482
Μέση απόκριση	1,313
Παρατηρήσεις	12

Πίνακας 3.7: Ανάλυση διακύμανσης σχετικά με την παραγωγή λίπους για τις εξεταζόμενες μεταβλητές T και C_0 , κατά την καλλιέργεια του στελέχους MD_F1.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F value	Prob > F
Model	5	1,9797	0,3959	1,703	0,2670
Total Error	6	1,3951	0,2325		
Lack Of Fit	3	1,2866	0,4289	11,861	0,0359
Pure Error	3	0,1085	0,0362		
Total	11	3,3748			

Σύμφωνα με τους Πίνακες 3.6 και 3.7 παρατηρείται ότι το μοντέλο αποτυγχάνει να προβλέψει σωστά τις βέλτιστες τιμές θερμοκρασίας και αρχικής συγκέντρωσης σακχάρων που απαιτούνται για την βέλτιστη παραγωγή μικροβιακού λίπους. Το γεγονός αυτό επιβεβαιώνεται από τις πολύ χαμηλές τιμές του συντελεστή προσδιορισμού ($R^2=0,587$) και του προσαρμοσμένου συντελεστή προσδιορισμού ($R^2 \text{ adj}= 0,242$), όπως παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.6.

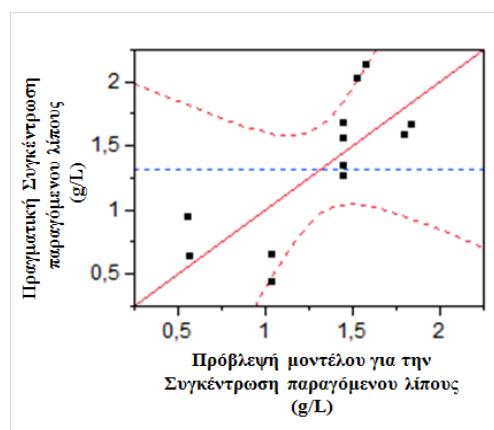
Επιπλέον, η αξιολόγηση της σημαντικότητας του μοντέλου μέσω του F-test επιβεβαιώνει το παραπάνω καθώς η τιμή F όπως φαίνεται στον Πίνακα 3.7 είναι 1,703, η οποία είναι πολύ μικρότερη από την αντίστοιχη τιμή $F_{(5,6)}=10,672$ που λαμβάνεται από πίνακες για επίπεδο εμπιστοσύνης 0,01. Για την ακρίβεια ακόμη και αν αλλάξει το επίπεδο εμπιστοσύνης από $\alpha=0,01$ σε $\alpha=0,1$, γεγονός που υποδεικνύει ότι στην περίπτωση αυτή εμπεριέχεται σημαντικότερο σφάλμα, η τιμή F του μοντέλου εξακολουθεί να είναι σημαντικά μικρότερη της αντίστοιχης τιμής των πινάκων ($F_{(5,6)}=3,4051$). Η κακή προβλεψιμότητα του μοντέλου, που παρατηρείται, πιθανόν να οφείλεται και στο μεγάλο εύρος τιμών που χρησιμοποιήθηκαν όσον αφορά την εξεταζόμενη μεταβλητή της αρχικής συγκέντρωσης σακχάρων X_2 .

Στο Σχήμα 3.10 παρουσιάζεται η γραφική αναπαράσταση των προβλέψεων του μοντέλου έναντι των πειραματικών σημείων. Είναι εμφανές ότι τα πειραματικά σημεία αποκλίνουν συγκριτικά με τις προβλέψεις του μοντέλου, γεγονός το οποίο αποτελεί ένα πρώτο δείγμα αξιολόγησης της κακής προβλεψιμότητας του μοντέλου και συνεπώς επιβεβαιώνει τα παραπάνω.

Η σημαντικότητα των συντελεστών της Εξίσωσης 2 (παράγραφος 2.5.1) εκτιμήθηκε μέσω της κατανομής Student's t. Ωστόσο τα αποτελέσματα δεν θα αναφερθούν δεδομένου ότι το μοντέλου κρίθηκε ως μη σημαντικό.

3.6. Αποτελέσματα μοντέλου CCD, σχετικά με την παραγωγή αιθανόλης και αραβιτόλης, κατά την καλλιέργεια του στελέχους MD_F1

Τα αποτελέσματα του μοντέλου που χρησιμοποιήθηκε για τη στατιστική επεξεργασία των πειραματικών αποτελεσμάτων και τον καθορισμό των βέλτιστων εξεταζόμενων παραγόντων (θερμοκρασία και αρχική συγκέντρωση σακχάρων) όσον αφορά στην παραγωγή αιθανόλης και αραβιτόλης παρουσιάζονται στους Πίνακες 3.8, 3.9 και 3.10. Στον Πίνακα 3.8 παρουσιάζονται οι πειραματικές και οι προβλεπόμενες τιμές που ελήφθησαν μαζί με την αντίστοιχη απόλυτη διαφορά. Στους Πίνακες 3.9 και 3.10, παρουσιάζονται αντίστοιχα, μια σύνοψη του μοντέλου και τα αποτελέσματα με τη μορφή ανάλυσης διακύμανσης (ANOVA) καθώς και οι συντελεστές $b_{(j)}$ της Εξίσωσης 2 όπως αυτοί υπολογίστηκαν.



Σχήμα 3.10: Γραφική απεικόνιση των προβλέψεων του μοντέλου έναντι των πειραματικών σημείων, όσον αφορά τη συγκέντρωση παραγόμενου μικροβιακού λίπους για τις εξεταζόμενες μεταβλητές T και C_0 , κατά την καλλιέργεια του στελέχους MD_F1.

Πίνακας 3.8: Πειραματικές τιμές και προβλέψεις του μοντέλου όσον αφορά την απόκριση του λόγου των παραγόμενων βιοαλκοολών, για τις εξεταζόμενες μεταβλητές T και C_0 κατά την καλλιέργεια του στελέχους MD_F1.

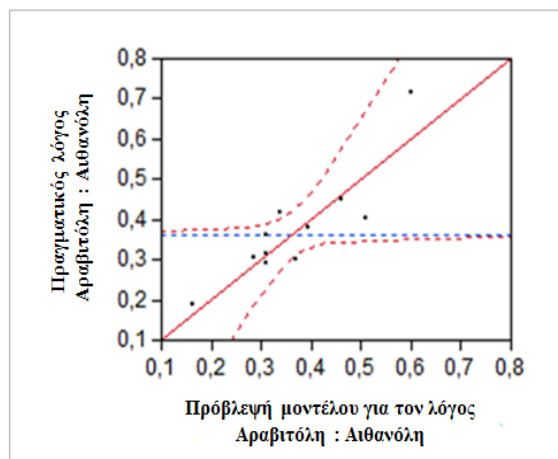
Αριθμός Πειράματος	Κωδικοποιημένες Τιμές		Πραγματικές τιμές		Λόγος Αραβιτόλης/ Αιθανόλης στο τέλος της ζύμωσης		
	x_1 (T)	x_2 (C_0)	X_1 (T, °C)	X_2 (C_0 , g/L)	Πειραματική τιμή	Προβλέπιμη τιμή	Σφάλμα
1	1	1	32,2	88,3	0,37	0,40	0,02
2	1	-1	32,2	31,7	0,40	0,51	0,08
3	-1	1	23,7	88,3	0,30	0,29	0,01
4	-1	-1	23,7	31,7	0,30	0,37	0,05
5	1,4142	0	34	60	0,41	0,34	0,05
6	-1,4142	0	22	60	0,18	0,16	0,02
7	0	1,4142	28	100	0,44	0,46	0,01
8	0	-1,4142	28	20	0,71	0,60	0,08
9	0	0	28	60	0,36	0,31	0,03
10	0	0	28	60	0,28	0,31	0,02
11	0	0	28	60	0,29	0,31	0,02
12	0	0	28	60	0,31	0,31	0,00

Πίνακας 3.9: Σύνοψη μοντέλου σχετικά με την παραγωγή βιοαλκοολών για τις εξεταζόμενες μεταβλητές T και C_0 κατά την καλλιέργεια του στελέχους MD_F1.

Summary of Fit	
R^2	0,781
Προσαρμοσμένο R^2	0,599
Τυπική απόκλιση μέσου όρου(RMSE)	0,083
Μέση απόκριση	0,364
Παρατηρήσεις	12

Στο Σχήμα 3.12 παρουσιάζεται η γραφική απεικόνιση των προβλέψεων του μοντέλου έναντι των πειραματικών σημείων.

Η σημαντικότητα του μοντέλου αξιολογήθηκε επίσης μέσω του F-test. Στην περίπτωση αυτή, η τιμή F, όπως φαίνεται στον Πίνακα 3.10, είναι ίση με 4,284 η οποία είναι υψηλότερη από την αντίστοιχη τιμή των πινάκων για επίπεδο εμπιστοσύνης 0,1 ($F_{(5,6)}=3,4051$). Το γεγονός αυτό υποδεικνύει ότι το μοντέλο είναι σημαντικό. Ωστόσο θα πρέπει να σημειωθεί ότι για μικρότερο επίπεδο εμπιστοσύνης (π.χ $\alpha=0,05$) το μοντέλο δεν θεωρείται σημαντικό καθώς η τιμή F είναι μικρότερη από τις αντίστοιχες τιμές $F_{(5,6)}$ των πινάκων. Συνεπώς η ικανότητα πρόβλεψης του μοντέλου μπορεί να θεωρηθεί επαρκής, γεγονός που επιβεβαιώνεται από τους αντίστοιχους συντελεστές προσδιορισμού R^2 και $\text{adj } R^2$ με τιμές 0,781 και 0,599 αντίστοιχα (Πίνακα 3.9).



Σχήμα 3.11: Γραφική απεικόνιση των προβλέψεων του μοντέλου έναντι των πειραματικών σημείων, όσον αφορά τον λόγο Αραβιτόλη/Αιθανόλη για τις εξεταζόμενες μεταβλητές T και C_0 , κατά την καλλιέργεια του στελέχους MD_F1.

Η σημαντικότητα των συντελεστών της Εξίσωσης 2 (παράγραφος 2.5.1) εκτιμήθηκε μέσω της κατανομής Student's t. Μέσω του t Ratio εξετάζεται αν η πραγματική τιμή του συντελεστή είναι 0. Υψηλότερες τιμές t και σε συνδυασμό με χαμηλότερες τιμές p υποδεικνύουν τους περισσότερο σημαντικούς συντελεστές. Σύμφωνα με το t-test, ο τετραγωνικός όρος της Εξίσωσης 2 b_6^2 , παρουσιάζει τη σημαντικότερη επίδραση, καθώς παρουσιάζει και την υψηλότερη τιμή t-Ratio (3,37). Ακόμη σημαντική επίδραση ασκεί και η παράμετρος X_1 , η οποία είναι η θερμοκρασία, καθώς η αντίστοιχη τιμή t-Ratio που παρουσιάζει είναι 2,11. Η επίδραση των λοιπών συντελεστών (b_3 , b_4 και b_5^2) θεωρείται αμελητέα δεδομένου ότι και οι τρεις παρουσιάζουν χαμηλές τιμές t-Ratio ίσες με 1,7, 0,17 και 0,93 αντίστοιχα.

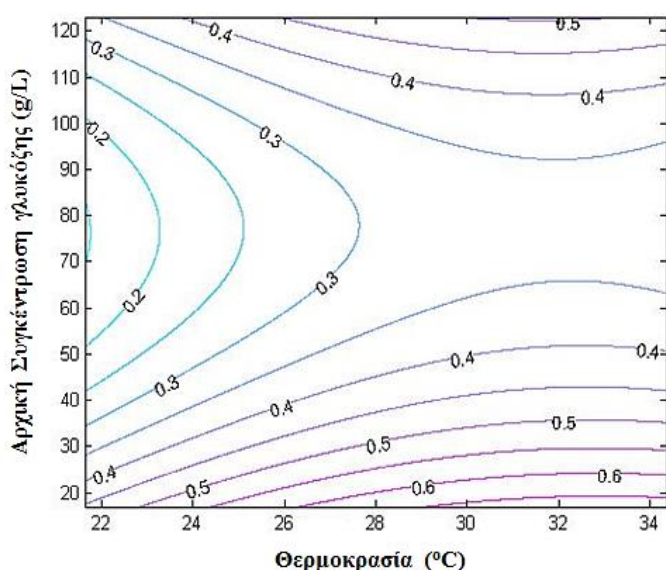
Σύμφωνα λοιπόν με τις εκτιμήσεις των παραμέτρων του Πίνακα 3.10, η Εξίσωση 2 γίνεται:

$$Y_2 = 0,3104 + 0,016x_1 - 0,0495x_2 - 0,0068x_1x_2 - 0,304x_1^2 + 0,1101x_2^2$$

Πίνακας 3.10: Ανάλυση διακύμανσης εκτιμώμενοι συντελεστές σχετικά με την παραγωγή βιοαλκοολών για τις εξεταζόμενες μεταβλητές T και C_0 , κατά την καλλιέργεια του στελέχους MD_F1.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F value	Prob > F
Model	5	0,1462	0,0292	4,284	0,0526
Error	6	0,0410	0,0068		
Lack Of Fit	3	0,0375	0,0125	10,738	0,0411
Pure Error	3	0,0035	0,0012		
Total	11	0,1872			

Parameters	Estimate	Standard Error	t Ratio	Prob > t
b_1 (intercept)	0,31045	0,041311	7,51	0,0003
b_2 (X_1)	0,0616856	0,029211	2,11	0,0792
b_3 (X_2)	-0,049555	0,029211	-1,7	0,1407
b_4 (X_1X_2)	-0,00685	0,041311	-0,17	0,8737
b_5^2 (X_1) ²	-0,030481	0,032659	-0,93	0,3867
b_6^2 (X_2) ²	0,1100938	0,032659	3,37	0,015



Σχήμα 3.12: Counter plot όσον αφορά τον λόγο των παραγόμενων βιοαλκοολών (Arabitol: EtOH) για τις εξεταζόμενες μεταβλητές T και C_0 κατά την καλλιέργεια του στελέχους MD_F1, όπως προέκυψε από την στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων

Στο Σχήμα 3.12 απεικονίζεται ολόκληρο το φάσμα των προβλέψεων του μοντέλου σχετικά με τον λόγο των παραγόμενων μεταβολικών προϊόντων για το σύνολο του εύρους των δύο εξεταζόμενων παραμέτρων, θερμοκρασία (T) και αρχική συγκέντρωση σακχάρων (C_0). Σύμφωνα με αυτό παρατηρείται ότι, για αρχική συγκέντρωση σακχάρων μεταξύ 50-100 g/L σε συνδυασμό με χαμηλές θερμοκρασίες (< 24 °C), ο λόγος αραβιτόλη/αιθανόλη παρουσιάζει μείωση (τιμές ≤ 0,2) γεγονός που υποδηλώνει

την αυξημένη παραγωγή αιθανόλης έναντι αραβιτόλης. Επιπλέον, σε όλο το εύρος των θερμοκρασιών, για αρχική συγκέντρωση σακχάρων έως 40 g/L ή μεγαλύτερη από 100 g/L, υπάρχει αύξηση του λόγου αραβιτόλη/αιθανόλη σε τιμές μεγαλύτερες του 0,2. Συγκεκριμένα η μέγιστη τιμή του λόγου παρατηρείται για θερμοκρασίες μεγαλύτερες των 28 °C και αρχική συγκέντρωση σακχάρων μικρότερη των 20 g/L.

Αντίστοιχα στην ίδια θερμοκρασία υψηλές αποκρίσεις ($> 0,50$) δύναται να εντοπιστούν σε υψηλές συγκεντρώσεις σακχάρων μεγαλύτερες από τα όρια του σχεδιασμού (>120 g/L). Όσον αφορά τις βέλτιστες τιμές των παραμέτρων σύμφωνα με τις προβλέψεις του μοντέλου, η βέλτιστη θερμοκρασία είναι $33,1$ °C ενώ η βέλτιστη αρχική συγκέντρωση σακχάρων είναι $16,9$ g/L, οι οποίες αντιστοιχούν σε λόγο αραβιτόλη/αιθανόλη ίσο με $0,68$.

4. Συζήτηση

Η μελέτη της παραγωγής μικροβιακών λιπιδίων και άλλων μεταβολικών προϊόντων αποτελεί ένα σημαντικό κομμάτι της έρευνας σχετικά με την κατανόηση της φυσιολογίας και της βιοχημείας των μικροοργανισμών.

Επιπλέον, η εξάντληση των αποθεμάτων των ορυκτών καυσίμων, που συνεπάγεται αύξηση της τιμής τους, σε συνδυασμό με την ανησυχία για τις κλιματικές αλλαγές στρέφουν το ενδιαφέρον των ερευνητών προς εναλλακτικές τεχνολογίες παραγωγής χημικών ουσιών και καυσίμων. Μέχρι σήμερα οι κύριες πρώτες ύλες που χρησιμοποιούνται στον τομέα παραγωγής ενέργειας και υλικών εξακολουθούν να παράγονται μέσω της πετροχημικής βιομηχανίας. Ωστόσο, το γεγονός αυτό δύναται να ξεπεραστεί μέσω της μείωση του κόστους της παραγωγής μεταβολικών προϊόντων. Η μείωση του κόστους παραγωγής, που σχετίζεται με τη διαδικασία της ζύμωσης εξακολουθεί να είναι υψίστης σημασίας, με σκοπό η βιομηχανική παραγωγή μεταβολικών προϊόντων να γίνει οικονομικά εφικτή.

Κατά τη διάρκεια των τελευταίων δεκαετιών, η μικροβιακή παραγωγή λιπιδίων αποτελεί σημαντικό τομέα της έρευνας. Όπως προαναφέρθηκε τα μικροβιακά λιπίδια δύνανται να χρησιμοποιηθούν στην παραγωγή πρόσθετων ουσιών σε τρόφιμα υψηλής διατροφικής αξίας, στην παρασκευή συμπληρωμάτων διατροφής και φαρμακευτικών σκευασμάτων, καθώς και στην παραγωγή καυσίμων βιολογικής προέλευσης (βιοντίζελ). Το ολοένα αυξανόμενο ενδιαφέρον ως προς τις εναλλακτικές οδούς για μια οικονομικά αποδοτική παραγωγή βιοκαυσίμων από ανανεώσιμες πηγές ενέργειας έχει θέσει τις βάσεις για την εντατική αναζήτηση ετερότροφων ή φωτοαυτότροφων οργανισμών, οι οποίοι είναι ικανοί να συσσωρεύουν υψηλή περιεκτικότητα ελαίων, που συνοδεύεται από υψηλές αποδόσεις βιομετατροπής. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον στις εφαρμογές αυτές παρουσιάζει η χρήση ζυμών, λόγω των ιδιαίτερων χαρακτηριστικών που παρουσιάζουν. Σε αντίθεση με τους φωτοαυτότροφους οργανισμούς οι ζύμες δεν επηρεάζονται από τις κλιματικές αλλαγές ενώ παράλληλα δύνανται να αξιοποιήσουν μια πληθώρα διαφορετικών πηγών άνθρακα σε υψηλότερα επίπεδα συγκριτικά με άλλους μικροοργανισμούς. Επιπλέον παρουσιάζουν μεγαλύτερη ανοχή σε υψηλές συγκεντρώσεις σακχάρων, σε μεταλλικά ιόντα καθώς και σε χαμηλή διαθεσιμότητα οξυγόνου συγκριτικά με τους μύκητες (Abghari & Chen, 2014).

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η διερεύνηση της δυνατότητας παραγωγής μικροβιακών λιπιδίων από στελέχη ζυμών που προηγουμένως απομονώθηκαν από φυσικές πηγές και παρουσίασαν δείγματα λιποσυσσώρευσης. Παράλληλα διερευνήθηκε και η παραγωγή άλλων μεταβολικών προϊόντων που δύνανται να προκύψουν από τις ζυμώσεις αυτές ενώ το στέλεχος που παρουσίασε τη μέγιστη λιποσυσσώρευση επιλέχθηκε για περαιτέρω μελέτη αξιολόγησης των βέλτιστων παραμέτρων που επηρεάζουν τη διαδικασία της ζύμωσης.

Πίνακας 4.1: Μικροβιακή παραγωγή λιπιδίων από διάφορα στελέχη ζυμών, υπό καλλιέργεια διαφορετικών συνθηκών με χρήση διαφορετικών πηγών άνθρακα, όπως συγκεντρώθηκαν από διάφορες βιβλιογραφικές αναφορές.

Στέλεχος	Συνθήκες Καλλιέργειας	Πηγή Άνθρακα	Βιομάζα (g/L)	Λίπος (g/L)	Y_{LX} (g/g)	Χρόνος (h)	Αναφορά
<i>Yarrowia lipolytica</i> ACA-YC 5028	Shake flasks 250 mL	Γλυκόζη 35 g/L	7	1,2	0,18	144	
	28 °C / 180rpm	OMW† 35 g/L σάκχαρα	5,5	0,2	0,04	144	
<i>Yarrowia lipolytica</i> W29	Shake flasks 250 mL	Γλυκόζη 35 g/L	5,9	0,5	0,08	144	Sarris et al., 2001
	28 °C / 180rpm	OMW† 35 g/L σάκχαρα	5,1	1,3	0,25	144	
<i>Yarrowia lipolytica</i> ACA-YC 5033	Shake flasks 250 mL	Γλυκόζη 35 g/L	5,5	0,4	0,07	120	
	28 °C / 180rpm	OMW† 35 g/L σάκχαρα	5,1	0,5	0,1	144	
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	Falcon tubes 50 mL /15 °C	Γλυκερόλη 30 g/L	7,4	3,1	0,40	360	Santamauro et al., 2014
<i>Lipomyces starkey</i> DSM70296	Shake flasks 250 mL	Υδρολυμένο απόβλητο πλούσιο σε άμυλο 109g/L γλυκόζη	30,5	12,3	0,4	200	Tsakona et al., 2014
	30 °C / 180rpm	Γλυκόζη 105 g/L	21,6	7,6	0,35	200	
	Fed-batch Bioreactor 30 °C / 150-500 rpm	Υδρολυμένο απόβλητο πλούσιο σε άμυλο 90g/L γλυκόζη	109	64,5	0,59	175	
<i>Yarrowia lipolytica</i>	Shake flasks 250 mL	Στεατίνη 10g/L	~ 8,5	~ 3,9	0,44	-	Papanikolaou et al.,2007
	28 °C / 180rpm	Στεατίνη 20g/L	~ 15,1	~ 7,9	0,52	-	
	Batch Bioreactor 28 °C /650 rpm	Στεατίνη 20g/L	~ 30,5	2,5 - 4,0	0,07 - 0,16	-	
<i>Lipomyces starkey</i> DSM70296	Batch culture 28 °C /400 rpm	Ημικυτταρινούχο υδρόλημα 13,5 g/L ξυλόζη	13,3	2,3	0,17	-	Xavier & Franco, 2014
	Continious culture 28 °C /400 rpm	2,86 g/L γλυκόζη 2,62 g/L αραβινόζη	13,9	3,7	0,26	144	
<i>Rhodosporidium toruloides</i>			12,5	4,8	0,39	-	
<i>Candida pulcherrima</i>			6,5	1,95	0,3	-	
<i>Rhodotorula glutinis</i>	Shake flasks 250 mL	Ξυλόζη 40 g/L	7	2,2	0,32	-	Pan et al., 2009
	28 °C / 180rpm						
<i>Lipomyces lipoferus</i>			10,5	2,7	0,25	-	
<i>Lipomyces starkey</i>			16,3	3,8	0,23	-	
<i>Cryptococcus podzolicus</i> DMS27192	Fed-batch Bioreactor	Γλυκόζη 50g/L	56,2	19	0,11	188	Schulze et al., 2014
<i>Trichosporum porosum</i> DMS27194	20 °C / 600 rpm	Ξυλόζη 50 g/L	41,5	11,1	0,09	-	
		Γλυκόζη 50g/L	49,9	17	0,11	161	
		Ξυλόζη 50 g/L	41,5	13,9	0,12	-	

- Δεν διατίθενται πληροφορίες

† Υγρά απόβλητα ελαιουργείου (Oil Mill Wastewaters)

Στον Πίνακα 4.1 και 4.2 παρουσιάζονται αποτελέσματα μελετών σχετικά με την παραγωγή μικροβιακών λιπιδίων από στελέχη ζυμών, με βάση τη σύγχρονη βιβλιογραφία και την παρούσα μελέτη αντίστοιχα. Είναι γεγονός ότι ανάλογα με τις συνθήκες καλλιέργειας, το στέλεχος και το χρησιμοποιούμενο υπόστρωμα, οι ελαιογόνες ζύμες δύνανται να συσσωρεύσουν μικροβιακά λιπίδια σε υψηλά ποσοστά. Διαφορετικά στελέχη *Yarrowia lipolytica* έχουν την ικανότητα να συσσωρεύουν λίπος σε ποσοστά 20-40% ή και μεγαλύτερα (ανάλογα τις συνθήκες της καλλιέργειας) κατά την καλλιέργεια τους σε διάφορα υποστρώματα όπως γλυκόζη, σακχαρόζη, γλυκερόλη και απόβλητα ελαιουργείου (Papanikolaou & Aggelis, 2009; Papanikolaou & Aggelis, 2011; Sarris et.al.,2001), ενώ η αύξηση σε υδρόφοβα υποστρώματα δύναται να αυξήσει την περιεκτικότητα του λίπους σε ποσοστά έως και 60% (Papanikolaou et al., 2007).

Πίνακας 4.2: Μικροβιακή παραγωγή λιπιδίων από τα εξεταζόμενα στελέχη ζυμών, κατά την καλλιέργεια την σε υπόστρωμα γλυκόζης ~ 10 g/L και εφαρμογή διαφόρων θερμοκρασιών.

Στέλεχος	Συνθήκες Καλλιέργειας	Θερμοκρασία (°C)	Βιομάζα (g/L)	Λίπος (g/L)	Y_{LX} (g/g)	Χρόνος (h)	Αναφορά
PC_A2	Shake flasks 180rpm	22	5,5	1,3	0,24	18	
		25	4,7	1,4	0,27	18	
		28	5	1,7	0,34	18	
		32	4	1,2	0,31	9	
		35	3,1	0,6	0,20	9	
PP_D3	Shake flasks 180rpm	22	5,7	0,7	0,13	18	Παρούσα μελέτη
		25	5,8	1,4	0,24	18	
		28	6,8	1,9	0,28	18	
		32	4,7	0,8	0,17	9	
		35	4	1,0	0,24	9	
MD_F1	Shake flasks 180rpm	22	5,8	2,1	0,41	18	
		25	5	1,3	0,26	18	
		28	5,2	1,2	0,23	18	
		32	4,4	0,7	0,17	9	
		35	3,3	0,7	0,22	9	

Και τα τρία εξεταζόμενα στελέχη παρουσίασαν ικανοποιητική ανάπτυξη σε όλο το εύρος των υπό εξέταση θερμοκρασιών. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, όσον αφορά τη λιποσυσσώρευση, τα εν λόγω στελέχη μπορούν να θεωρηθούν ελαιογόνα, καθώς εμφάνισαν ποσοστό συσσώρευσης μικροβιακού λίπους μεγαλύτερο του 20% (w/w), για την πλειοψηφία των ζυμώσεων, επιβεβαιώνοντας με αυτόν τον τρόπο προηγούμενα αποτελέσματα μελετών του εργαστηρίου Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων σχετικά με τα στελέχη αυτά (Μάινα, 2013, Maina et al., 2015). Συγκρινόμενα με τη διεθνή βιβλιογραφία, τα εξεταζόμενα στελέχη μπορούν να θεωρηθούν ανταγωνιστικά ως προς την παραγωγή μικροβιακών λιπιδίων, καθώς παρουσίασαν ποσοστά συσσώρευσης μικροβιακού λίπους έως και 40%. Όσον αφορά στη σχετικά χαμηλή τιμή της συγκέντρωσης του παραγόμενου μικροβιακού λίπους θα

πρέπει να σημειωθεί ότι δεδομένων των συνθηκών καλλιέργειας (ασυνεχής καλλιέργεια) και της αρχικής συγκέντρωσης σακχάρων (10 g/L), η συγκεκριμένη τιμή κρίνεται ικανοποιητική.

Σε γενικά πλαίσια η ελαιογόνος ζύμη *Yarrowia lipolytica* φαίνεται να λιποσυσσωρεύει περισσότερο κατά την εφαρμογή θερμοκρασιών 25 - 30°C και pH 3-6, ενώ συγκεκριμένα για το στέλεχος *Yarrowia lipolytica* M7 έχει βρεθεί ότι οι βέλτιστες συνθήκες για παραγωγή λίπους είναι 25°C, pH 5, 200 rpm και 72 h καλλιέργειας (Abghari & Chen S., 2014). Στην παρούσα μελέτη το στέλεχος PP_D3 συσσώρευσε υψηλότερη συγκέντρωση λίπους (1,4 και 1,9 g/L) κατά την εφαρμογή μέσω των θερμοκρασιών (23 και 25°C αντίστοιχα) στις συνθήκες της καλλιέργειας, συγκριτικά με τις λοιπές εξεταζόμενες θερμοκρασίες.

Τη μεγαλύτερη λιποσυσσώρευση, συγκριτικά με όλα τα εξεταζόμενα στελέχη, παρουσίασε το στέλεχος MD_F1 το οποίο σύμφωνα με τους Maina et al. (2015) παρουσίασε συγγένεια με το είδος *Metschnikowia pulcherrima*. Σύμφωνα με τους Santamauro et al. (2014) η ζύμη αυτή, η οποία με βάση προηγούμενες μελέτες είχε καταταχθεί στις μη ελαιογόνες ζύμες, είναι ικανή να συσσωρεύσει λιπίδια σε ποσοστό έως και 40% υπό ορισμένες συνθήκες θερμοκρασίας και pH. Ειδικότερα κατά την καλλιέργεια της ζύμης *Metschnikowia pulcherrima*, στους 15-20 °C σε υπόστρωμα γλυκερόλης 10 g/L, παρουσιάστηκε ικανοποιητική ανάπτυξη, με την τιμή τις βιομάζας να ανέρχεται στα 6 g/L, ενώ στους 15 °C συσσωρεύτηκε και το μέγιστο ποσοστό λιπιδίων (26% w/w). Οι θερμοκρασίες αυτές όχι μόνο είναι πολύ χαμηλές για την ανάπτυξη των περισσότερων βακτηρίων αλλά θεωρούνται επίσης ιδανικές για την παραγωγή καυσίμων στην Βόρεια Ευρώπη, χωρίς να απαιτούν υψηλό κόστος ενέργειας για θέρμανση.

Η υψηλή συγκέντρωση σακχάρων δύναται να παρεμποδίσει την πρόσληψη οξυγόνου από τους μικροοργανισμούς ή /και να δημιουργήσει οσμωτική πίεση ικανή να παρεμποδίσει την ανάπτυξή τους. Ωστόσο η ζύμη *Metschnikowia pulcherrima* φαίνεται να αναπτύσσεται σε ένα μεγάλο εύρος συγκεντρώσεων γλυκερόλης (10-250 g/L) παρουσιάζοντας λιποσυσσώρευση συγκρίσιμη με αυτή άλλων ειδών *Candida* καλλιεργούμενων σε γλυκερόλη (Santamauro et al., 2014). Στην παρούσα μελέτη το στέλεχος MD_F1 παρουσίασε τη μέγιστη λιποπεριεκτικότητα, με τιμή 41% w/w, κατά την καλλιέργειά του στους 22 °C, γεγονός το οποίο συνάδει με τα αποτελέσματα των Santamauro et al. (2014), ενώ στις υπόλοιπες θερμοκρασίες η συγκέντρωση του παραγόμενου λίπους ήταν σημαντικά χαμηλότερη.

Το στέλεχος PC_A2 παρουσίασε ικανοποιητική αύξηση σε όλο το εύρος των θερμοκρασιών που εξεταστήκαν. Η συγκέντρωση του παραγόμενου μικροβιακού λίπους για το εν λόγω στέλεχος στο εύρος των θερμοκρασιών 22-32 °C δεν παρουσίασε ιδιαίτερες διαφορές (1,22-1,71 g/L), με εξαίρεση την θερμοκρασία των 28 °C όπου παρουσιάστηκε και η μέγιστη συγκέντρωση παραγόμενου λίπους (1,71 g/L). Ωστόσο όσον αφορά την θερμοκρασία των 35 °C, φαίνεται να μην ενδείκνυται για την παραγωγή μικροβιακού λίπους καθώς σε αυτή παρατηρήθηκε μειωμένη

λιποσυσσώρευση (0,62 g/L) η οποία συνοδεύτηκε από μειωμένη τιμή παραγόμενης βιομάζας (3,1 g/L).

Γενικότερα, η υψηλότερη θερμοκρασία των 35 °C δεν ήταν ευνοϊκή για την παραγωγή μικροβιακού λίπους καθώς σε αυτή παρουσιάστηκε η ελάχιστη συγκέντρωση παραγόμενου μικροβιακού λίπους για την πλειοψηφία των στελεχών. Η παρατήρηση αυτή συνοδεύεται από την εμφάνιση της ελάχιστης τιμής του συντελεστή απόδοσης παραγόμενου μικροβιακού λίπους ανά μονάδα καταναλωθέντος υποστρώματος (Y_{LS}). Το γεγονός αυτό πιθανόν να υποδηλώνει ότι η θερμοκρασία της ζύμωσης επιδρά σημαντικά στον μεταβολισμό των εν λόγω στελεχών, ο οποίος και στρέφεται προς την παραγωγή άλλων μεταβολικών προϊόντων.

Αναφορικά με το κομμάτι της βελτιστοποίησης σχετικά με την παραγωγή μικροβιακού λίπους από το στέλεχος MD_F1, σύμφωνα με τα αποτελέσματα του μοντέλου φαίνεται ότι οι χαμηλότερες τιμές θερμοκρασίας (< 28 °C) οδηγούν σε μειωμένη συγκέντρωση παραγόμενου λίπους για το σύνολο του εύρους των τιμών της αρχικής συγκέντρωσης σακχάρων. Μάλιστα όσο υψηλότερη είναι η αρχική συγκέντρωση σακχάρων τόσο χαμηλότερη η τιμή της συγκέντρωσης του παραγόμενου λίπους. Υψηλότερες συγκεντρώσεις (>1.6 g/L) παραγόμενου λίπους, φαίνεται να επιτυγχάνονται κατά την εφαρμογή υψηλότερων θερμοκρασιών σε συνδυασμό με σχετικά χαμηλή αρχική συγκέντρωση σακχάρων (< 40 g/L). Ωστόσο τα αποτελέσματα αυτά έρχονται σε αντίθεση με τα προηγούμενα πειραματικά αποτελέσματα της παρούσας μελέτης για το στέλεχος MD_F1, καθώς όπως προαναφέρθηκε η μεγαλύτερη συγκέντρωση παραγόμενου λίπους, η οποία συνοδεύεται και από τη μεγαλύτερη απόδοση σε λίπος ανά μονάδα καταναλισκόμενου υποστρώματος, επιτεύχθηκε στην θερμοκρασία των 22 °C. Η αξιολόγηση της σημαντικότητας του μοντέλου μέσω του F-test καθώς και οι πολύ χαμηλοί συντελεστές R^2 και $\text{adj } R^2$ (0,587 και 0,242 αντίστοιχα) αποδεικνύουν ότι το μοντέλο αποτυγχάνει να προβλέψει σωστά τις βέλτιστες τιμές θερμοκρασίας και αρχικής συγκέντρωσης σακχάρων που απαιτούνται για την βέλτιστη παραγωγή μικροβιακού λίπους. Η κακή προβλεψιμότητα του μοντέλου, πιθανόν να οφείλεται στο μεγάλο εύρος τιμών που χρησιμοποιήθηκαν όσον αφορά την εξεταζόμενη μεταβλητή της αρχικής συγκέντρωσης σακχάρων X_2 .

Η μικροβιακή παραγωγή αιθανόλης έχει μελετηθεί εκτενώς. Στον Πίνακα 4.3 παρουσιάζονται μερικά από τα στελέχη ζυμών που μελετήθηκαν κατά την τελευταία δεκαετία και ενδείκνυνται για παραγωγή βιοαιθανόλης, όπως συγκεντρώθηκαν από τη βιβλιογραφία, ενώ στον Πίνακα 4.4 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης σχετικά με την παραγωγή βιοαιθανόλης.

Πίνακας 4.3: Στελέχη ζυμών που έχουν μελετηθεί ως προς την παραγωγή βιοαιθανόλης με χρήση διαφόρων υποστρωμάτων και εφαρμογή διαφόρων συστημάτων καλλιέργειας.

Στελέχη Ζυμών	Σύστημα Καλλιέργειας	Πηγή Ανθρακα	Αιθανόλη (g/L)	Ethanol Yield	Αναφορά	
<i>Scheffersomyces shehatae</i>	Microplates 25 °C / 0 rpm	Διάλυμα αμόλου 10%	9,78	Y Eth/S -	Tamimura et al., 2015	
Ακίνητοποιημένες ζύμες σε κοτσάνια ζαχαροκάλαμου	Continuous Fermenter 33 °C	Μελάσα 111,67 g/L ολικά ανάγοντα σάκχαρα	36 - 40	Y Eth/S g/g	0,38 -0,42 Vasconcelos, Lopes & França, 2004	
<i>Scheffersomyces stipitis</i>	Batch culture 30 °C/200 rpm	Υδρόλυμα Sugar cane bagasse 52,5 g/L ζυλόζη	9,1	Y Eth/S g/g	0,17 Ferreira et al., 2011	
<i>Debaryomyces hansenii</i>	Batch culture 30 °C/150 rpm	Γλυκόζη 28 g/L	~6	Y Eth/S g/g	0,23 Giorio et al.,2000	
		Ξυλόζη 38 g/L	~1			0,01
<i>Debaryomyces nepalensis</i>	Shake flasks 30 °C/180rpm	Γλυκόζη 100 g/L	9,05	Y Eth/S g/g	0,11 0,12 0,12 0,03 0,02 Kumdam , Murthy & Gummadi, 2013	
		Φρουκτόζη 100 g/L	9,84			0,12
		Σουκρόζη 100 g/L	9,9			0,12
		Αραβινόζη 100 g/L	2,43			0,03
		Γλυκερόλη 100 g/L	0,77			0,02
Batch Fermenter 33 °C	Γλυκόζη	13,9	0,14			
<i>Pichia stipitis</i>	Batch Fermenter 30°C/ 150 rpm	Ημικυτταρινούχο Υδρόλυμα ξύλου 18,24 g/L σάκχαρα	7,13	Y Eth/S g/g	0,39 Gupta, Sharma & Kuhad, 2009	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>		Κυτταρινούχο Υδρόλυμα ξύλου 37,47 g/L σάκχαρα	18,52			0,49
		Γλυκόζη 100 g/L	42,5		0,43	
<i>Kluyveromyces marxianus</i> Y179	Fed-batch Fermenter 33 °C/250rpm	Υπόστρωμα αγκινάρας 210 g/L σάκχαρα	71,2	Y Eth/S g/g	0,36 Yuan et al., 2011	
<i>K.marxianus</i> ATCC8554			65		0,34	

- Δεν διατίθενται πληροφορίες

Οι αποδόσεις βιοαιθανόλης ($Y_{Eth/S}$, g/g) που επιτεύχθηκαν κατά την καλλιέργεια των εξεταζόμενων στελεχών, στην παρούσα μελέτη μπορούν να θεωρηθούν συγκρίσιμες με αυτές της βιβλιογραφίας. Ωστόσο, οι συγκεντρώσεις της παραγόμενης βιοαιθανόλης για τα στελέχη PC_A2, PP_D3 και MD_F1, παρουσιάζονται συγκριτικά μικρότερες γεγονός που εν μέρει οφείλεται στην μικρή αρχική συγκέντρωση των σακχάρων καθώς και στο σύστημα καλλιέργειας που χρησιμοποιήθηκε. Άλλωστε, όσον αφορά την αρχική συγκέντρωση των σακχάρων,

είναι γνωστό ότι λόγω του φαινομένου Crabtree αναμένεται παραγωγή υψηλότερης συγκέντρωσης αιθανόλης σε υψηλές συγκεντρώσεις σακχάρων.

Πίνακας 4.4: Μικροβιακή παραγωγή αιθανόλης από τα εξεταζόμενα στελέχη ζυμών, κατά την καλλιέργεια την σε υπόστρωμα γλυκόζης ~ 10 g/L και εφαρμογή διαφόρων θερμοκρασιών.

Στέλεχος	Συνθήκες Καλλιέργειας	Θερμοκρασία (°C)	Αιθανόλη (g/L)	$Y_{E/S}$ (g/g)	Αναφορά
PC_A2	Shake flasks 180rpm	22	-	-	
		25	-	-	
		28	-	-	
		32	2,4	0,23	
		35	2,5	0,19	
PP_D3	Shake flasks 180rpm	22	-	-	Παρούσα μελέτη
		25	-	-	
		28	-	-	
		32	1,3	0,18	
		35	1,3	0,15	
MD_F1	Shake flasks 180rpm	22	-	-	
		25	-	-	
		28	-	-	
		32	2,7	0,26	
		35	2,5	0,25	

- : Δεν ανιχνεύθηκε προϊόν.

Ακόμη σύμφωνα με τον Πίνακα 4.4 παρατηρείται ότι η παραγωγή βιοαιθανόλης επηρεάζεται από την θερμοκρασία της εκάστοτε καλλιέργειας. Στην παρούσα μελέτη η παραγωγή βιοαιθανόλης εντοπίζεται στις υψηλότερες θερμοκρασίες των 32 και 35 °C. Τα αποτελέσματα αυτά παρουσιάζουν συνάφεια με τη βιβλιογραφία όπως φαίνεται και στον Πίνακα 4.3.

Θα πρέπει να σημειωθεί ότι κατά την καλλιέργειά του στελέχους MD_F1 στους 35 °C παρατηρείται μία μικρή μείωση στην συγκέντρωση της παραγόμενης αιθανόλης της τάξης του 0,2 g/L, συγκριτικά με την αντίστοιχη τιμή για τους 32°C (2,7 g/L). Αν και η διαφορά αυτή μπορεί να θεωρηθεί αμελητέα, θα πρέπει να τονιστεί ότι σε περίπτωση πλήρους εξάντλησης της πηγής άνθρακα στο θρεπτικό μέσο της αύξησης (όπως αυτή των 35 °C) οι ζύμες είναι σε θέση να χρησιμοποιήσουν οποιαδήποτε ποσότητα αιθανόλης έχει προηγουμένως παραχθεί ως πηγή άνθρακα.

Έχουν πραγματοποιηθεί αρκετές μελέτες αναφορικά με την παραγωγή αραβιτόλης από ωσμώφιλα ή ωσμιοανθεκτικά στελέχη ζυμών όπως *Zygosaccharomyces rouxii* (Saha, Sakakibara & Cotta, 2007), *Debaryomyces nepalensis* (Kumdam, Murthy & Gummadi, 2013), *Candida entomaea* (Saha & Bothast, 1996), *Metschnikowia reukaufii* (Nozaki et al., 2003) κ.ά., ωστόσο η παραγωγή αραβιτόλης έχει μελετηθεί πολύ λιγότερο συγκριτικά με αυτήν της αιθανόλης. Στον Πίνακα 4.5 παρουσιάζονται αποτελέσματα της βιβλιογραφίας για ορισμένα στελέχη ζυμών που έχουν μελετηθεί ως προς την παραγωγή αραβιτόλης, ενώ στον Πίνακα 4.6 παρουσιάζονται τα αντίστοιχα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης για τα στελέχη PC_A2, PP_D3 και MD_F1.

Πίνακας 4.5: Στελέχη ζυμών που έχουν μελετηθεί ως προς την παραγωγή αραβιτόλης με χρήση διαφόρων υποστρωμάτων και εφαρμογή διαφόρων συστημάτων καλλιέργειας.

Στελέχη Ζυμών	Συνθήκες Καλλιέργειας	Πηγή Ανθρακα	Αραβιτόλη (g/L)	Y_{AS} (g/g)	Χρόνος (h)	Αναφορά
<i>Debaryomyces nepalensis</i> NCYC 3413	Shake flasks 30°C/180rpm	Σουκρόζη 100 g/L	3,7	0,05	120	Kumdam, Murthy & Gummedi, 2013
		Γλυκόζη 100 g/L	7,3	0,09	120	
		Φρουκτόζη 100 g/L	0,7	0,01	120	
		Αραβινόζη 110 g/L	22,7	0,26	120	
		Γλυκερόλη 115 g/L	0,0	0,00	120	
	Batch Bioreactor 30°C/700rpm	Γλυκόζη 100 g/L	3,5	0,04	120	
<i>Metschnikowia reukaufii</i> AJ14787	Shake flasks με feeding / 33°C	Γλυκόζη 200 g/L	84,4	-	~87	Nozaki et al., 2003
		Fed-batch Bioreactor 34 °C/600 rpm	Γλυκόζη 50 g/L	102,0	-	
<i>Candida parapsilosis</i> DSM 70125	Shake flasks 28°C/150 rpm	L-αραβινόζη 32,5 g/L	15,5	0,48	48	Kordowska-Wiater, Komar & Targoński, 2013
<i>Kodamaea ohmeri</i>	Shake flasks 37 °C/220 rpm	Γλυκόζη 200 g/L	81,2	0,41	72	Zhu et al, 2010
<i>Candida entomaea</i> <i>Pichia guilliermondii</i>	Shake flasks 34°C/200rpm	L-αραβινόζη 50 g/L	33,0	0,66	96	Saha & Bothast, 1996
			31,5	0,63	96	
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	Shake flasks 30°C/350 rpm	Γλυκόζη 175 g/L	73,7	0,42	96	Saha, Sakakibara & Cotta, 2007

- Δεν διατίθενται πληροφορίες

Πίνακας 4.6: Μικροβιακή παραγωγή αραβιτόλης από τα εξεταζόμενα στελέχη ζυμών, κατά την καλλιέργεια την σε υπόστρωμα γλυκόζης ~ 10 g/L και εφαρμογή διαφόρων θερμοκρασιών.

Στέλεχος	Συνθήκες Καλλιέργειας	Θερμοκρασία (°C)	Αραβιτόλη (g/L)	Y_{AS} (g/g)	Αναφορά
PC_A2	Shake flasks 180rpm	22	-	-	Παρούσα μελέτη
		25	-	-	
		28	-	-	
		32	1,2	0,11	
		35	1,9	0,14	
PP_D3	Shake flasks 180rpm	22	-	-	
		25	-	-	
		28	-	-	
		32	1,3	0,05	
		35	0,6	0,06	
MD_F1	Shake flasks 180rpm	22	-	-	
		25	-	-	
		28	-	-	
		32	1,2	0,12	
		35	2,0	0,19	

- Δεν ανιχνεύθηκε προϊόν

Η θερμοκρασία αποτελεί ένα από τους σημαντικότερους παράγοντες που επηρεάζουν την μικροβιακή παραγωγή αραβιτόλης. Αρκετοί ερευνητές αναφέρουν ως βέλτιστες θερμοκρασίες για την παραγωγή αραβιτόλης, τις θερμοκρασίες μεταξύ των 30-37 °C (Saha & Bothast, 1996; Nozaki et al., 2003; Saha, Sakakibara & Cotta, 2007; Zhu et al, 2010; Kumdam, Murthy & Gummadi, 2013). Ωστόσο έχουν αναφερθεί και περιπτώσεις όπου η βέλτιστη παραγωγή αραβιτόλης επιτεύχθηκε σε μικρότερη θερμοκρασία, όπως αυτή των Kordowska-Wiater, Komar & Targoński (2013) οι οποίοι ανέφεραν ότι η μέγιστη συγκέντρωση αραβιτόλης (15,5 g/L) από υπόστρωμα L-αραβινοζης για τη ζύμη *Candida parapsilosis*, επιτεύχθηκε σε θερμοκρασία 28 °C. Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης έρχονται σε συμφωνία με τη διεθνή βιβλιογραφία καθώς και για τα τρία εξεταζόμενα στελέχη η παραγωγή της αραβιτόλης εντοπίζεται στις θερμοκρασίες 32 και 35 °C.

Όσον αφορά τις παραγόμενες συγκεντρώσεις αραβιτόλης από τα τρία εξεταζόμενα στελέχη, είναι προφανές ότι καθώς η αραβιτόλη παράγεται ως μεταβολίτης εξισορρόπησης της ιοντικής ισχύος του ενδοκυτταρικού περιβάλλοντος των κυττάρων, η παραγωγή της επηρεάζεται σημαντικά από την συγκέντρωση σακχάρων στο μέσο της καλλιέργειας. Έτσι οι χαμηλότερες σχετικά συγκεντρώσεις αραβιτόλης που επιτεύχθηκαν συγκριτικά με τη βιβλιογραφία, δικαιολογούνται καθώς η αρχική συγκέντρωση γλυκόζης που χρησιμοποιήθηκε ήταν αρκετά χαμηλή (~10 g/L). Ακόμη, σύμφωνα με μελέτες έχει δειχθεί ότι ταχύτητες ανάδευσης μεταξύ 350-500 rpm επιφέρουν αύξηση στην τελική συγκέντρωση παραγόμενης αραβιτόλης (Saha, Sakakibara & Cotta, 2007; Kumdam, Murthy & Gummadi, 2013). Στην παρούσα μελέτη η ταχύτητα ανάδευσης που χρησιμοποιήθηκε ήταν 180 rpm, αρκετά χαμηλότερη από τις προαναφερθέντες τιμές, γεγονός που πιθανόν να επηρέασε την τελική συγκέντρωση παραγόμενης αραβιτόλης. Ωστόσο οι αποδόσεις αραβιτόλης ανά γραμμάριο υποστρώματος, 0,05-0,19 g/g, που επιτεύχθηκαν θεωρούνται συγκρίσιμες με τις αντίστοιχες της βιβλιογραφίας για παραγωγή αραβιτόλης από γλυκόζη, ενώ οι χαμηλότερες αποδόσεις ($Y_{A/S}$, g/g) συγκριτικά με τις αντίστοιχες για παραγωγή αραβιτόλης από αραβινόζη, δικαιολογούνται καθώς σύμφωνα με μελέτες (Kumdam, Murthy & Gummadi, 2013), η αραβινόζη μπορεί να θεωρηθεί καλύτερο υπόστρωμα για την παραγωγή αραβιτόλης από ζύμες συγκριτικά με την γλυκόζη.

Σχετικά με τη μειωμένη συγκέντρωση αραβιτόλης που παρατηρείται κατά την καλλιέργεια του στελέχους PP_D3 στους 35 °C (0,6 g/L) έναντι της αντίστοιχης κατά την καλλιέργειά του στους 32 °C (1,3 g/L) αξίζει να σημειωθεί ότι η μέγιστη παραγωγή αιθανόλης και αραβιτόλης δεν επιτυγχάνεται πάντα στο τελικό σημείο της ζύμωσης. Οι Kumdam, Murthy & Gummadi (2013) ανέφεραν ότι κατά την ανάπτυξη του *Debaryomyces nepalensis* σε κλειστή καλλιέργεια με αρχική συγκέντρωση γλυκόζης 100 g/L, στο τελικό σημείο της ζύμωσης (120 h) η συγκέντρωση της παραγόμενης αραβιτόλης βρέθηκε 3,5 g/L, ενώ η μέγιστη συγκέντρωση αραβιτόλης 5,8 g/L εντοπίστηκε στις 84 h, σημείο όπου η γλυκόζη είχε σχεδόν εξαντληθεί και τα παραγόμενα προϊόντα χρησιμοποιήθηκαν από τον οργανισμό για τα μετέπειτα στάδια της ζύμωσης. Στην περίπτωση του στελέχους PP_D3, τα εναπομείναντα σάκχαρα

υπολογίστηκαν ως 4,6 g/L, ωστόσο η ανακατανάλωση της παραγόμενης αραβιτόλης δεν μπορεί να θεωρηθεί απίθανη.

Αναφορικά με το κομμάτι της βελτιστοποίησης σχετικά με τον λόγο παραγόμενη αραβιτόλη προς παραγόμενη αιθανόλη από το στέλεχος MD_F1, σύμφωνα με τα αποτελέσματα του μοντέλου παρατηρείται ότι, για αρχική συγκέντρωση σακχάρων μεταξύ 50-100 g/L σε συνδυασμό με χαμηλές θερμοκρασίες (< 24 °C), ο λόγος αραβιτόλη/αιθανόλη παρουσιάζει μείωση (τιμές $\leq 0,2$) γεγονός που υποδηλώνει την αυξημένη παραγωγή αιθανόλης έναντι αραβιτόλης. Επιπλέον σε όλο το εύρος των θερμοκρασιών, για αρχική συγκέντρωση σακχάρων έως 40 g/L ή μεγαλύτερη από 100 g/L, υπάρχει αύξηση του λόγου αραβιτόλη/αιθανόλη σε τιμές μεγαλύτερες του 0,2. Συγκεκριμένα οι βέλτιστες τιμές των παραμέτρων σύμφωνα με τις προβλέψεις του μοντέλου, βρέθηκαν 33,1 °C και 16,9 g/L, οι οποίες αντιστοιχούν σε λόγο αραβιτόλη/αιθανόλη ίσο με 0,68.

Τέλος, η σημαντικότητα του μοντέλου αξιολογήθηκε μέσω του F-test και τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το μοντέλο κρίνεται σημαντικό για επίπεδο εμπιστοσύνης 0,1. Συνεπώς η ικανότητα πρόβλεψης του μοντέλου μπορεί να θεωρηθεί επίσης αποδεκτή, γεγονός που επιβεβαιώνεται από τους αντίστοιχους συντελεστές προσδιορισμού R^2 και $\text{adj } R^2$ με τιμές 0,781 και 0,599 αντίστοιχα. Όσον αφορά τους παράγοντες που ασκούν μεγαλύτερη επιρροή στο λόγο παραγόμενη αραβιτόλη : παραγόμενη αιθανόλη, ο τετραγωνικός όρος της Εξίσωσης 2 (b_6^2), που σχετίζεται με την αρχική συγκέντρωση των σακχάρων στο μέσο της καλλιέργειας, παρουσίασε τη σημαντικότερη επίδραση ενώ η αμέσως επόμενη σημαντικότερη επίδραση ασκείται από την παράμετρο X_1 , η οποία είναι η θερμοκρασία. Ωστόσο, τα παραπάνω αποτελέσματα προέρχονται αποκλειστικά από τις προβλέψεις σχετικά με την εν λόγω διαδικασία, και ως εκ τούτου η επικύρωση ή απόρριψη αυτών, μέσω τις διεξαγωγής της αντίστοιχης πειραματικής διεργασίας, κρίνεται απαραίτητη.

5. Μελλοντικές Μελέτες

Η ικανότητα των μικροοργανισμών να λιποσυσσωρεύουν, εκτός από την θερμοκρασία, επηρεάζεται και από τη σύσταση του υποστρώματος. Είναι ευρέως γνωστό ότι περιοριστικά σε άζωτο υποστρώματα χρησιμοποιούνται κατά βάση για την παραγωγή μικροβιακού λίπους. Ωστόσο η σύσταση ενός υποστρώματος σε άλλα στοιχεία, όπως P, Zn, Fe, Mn και Mg δύναται να επιφέρει σημαντικές αλλαγές στο ποσοστό λιποσυσσώρευσης αλλά και στη σύσταση του παραγόμενου λίπους (Santamauro et al., 2014; Kolouchova et al. 2015). Σύμφωνα με τους Santamauro et al. (2014), μετά από τροποποίηση υποστρώματος γλυκερόλης (μείωση επιπέδων Mn, Fe και S) και καλλιέργεια για 3 ημέρες στους 25 °C και έπειτα για 12 ημέρες στους 15°C, η ζύμη *Metschnikowia pulcherrima* ανέπτυξε βιομάζα της τάξης των 7,9 g/L με συνολικό περιεχόμενο λιπιδίων 40%, ενώ το ίδιο καλά αξιοποίησε συνθετικό υπόστρωμα γλυκόζης, ξυλόζης, αραβινόζης και κελλοβιόζης. Συνεπώς, περαιτέρω μελέτη των στελεχών PC_A2, PP_D3 και MD_F1 σε αντίστοιχο υπόστρωμα γλυκόζης με τροποποιημένη σύσταση ως προς C/N, C/P ή/και τα λοιπά ιχνοστοιχεία, πιθανόν να μπορεί να δώσει βελτιωμένες αποδόσεις όσον αφορά τη λιποσυσσώρευση των εν λόγω στελεχών.

Η παρούσα μελέτη δεν επικεντρώθηκε στη σύσταση του παραγόμενου μικροβιακού λίπους. Ωστόσο, το ενδιαφέρον της έρευνας στο κομμάτι αυτό είναι μεγάλο λόγω του λίπους υψηλής αξίας πολυακόρεστων λιπαρών οξέων, που ορισμένοι ελαιογόνοι μικροοργανισμοί δύνανται να παράξουν. Η παραγωγή μικροβιακού λίπους εξεζητημένης σύστασης από ελαιογόνους μύκητες έχει μελετηθεί εκτενώς, καθώς το λίπος αυτών χαρακτηρίζεται από υψηλότερο επίπεδο ακορεστότητας συγκριτικά με τα λιπίδια που συσσωρεύονται από ζύμες (Hansson & Dostalek, 1988; Kristofika et al., 1991; Certik et al. 1997; Fakas et al., 2006; Fakas et al., 2007; Papanikolaou & Aggelis 2010; Papanikolaou & Aggelis, 2011). Παρά το γεγονός αυτό, στη σύγχρονη έρευνα γίνονται προσπάθειες παραγωγής λίπους αντίστοιχης σύστασης από ζύμες οι οποίες όμως εστιάζουν στη χρήση στελεχών γενετικά τροποποιημένων (Wang et al., 2011). Παρόλο που οι ελαιογόνες ζύμες δεν παράγουν φυσικά λίπος υψηλής ακορεστότητας, συγκριτικά με αυτό των μυκήτων, το λίπος τους μπορεί να περιέχει άλλα λιπαρά οξέα υψηλής σημασίας όπως είναι το παλμιτελαϊκό οξύ, το οποίο χρήζει υψηλού φαρμακευτικού ενδιαφέροντος. Οι Kolouchova et al. (2015) ανέφεραν ότι η ζύμη *Candida krusei* δύναται να παράξει λίπος αντίστοιχης σύστασης με αυτή του ελαίου του φυτού *Macadamia* και του λίπους ερμίνας, ενώ λόγω του υψηλού περιεχομένου του λίπους σε ελαϊκό και παλμιτελαϊκό οξύ, η εν λόγω ζύμη θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί και για διατροφικούς σκοπούς. Συνεπώς ο προσδιορισμός της σύστασης του παραγόμενου λίπους από τα στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα θα μπορούσε να αποτελέσει βάση επόμενων εργαστηριακών μελετών.

Όσον αφορά τη μικροβιακή παραγωγή αραβιτόλης, θα πρέπει να σημειωθεί ότι εκτός από την αρχική συγκέντρωση σακχάρων, η γενικότερη σύσταση του μέσου της καλλιέργειας φαίνεται να επηρεάζει. Σύμφωνα με τους Kumdam, Murthy &

Gummadi (2013), το θειικό αμμώνιο αποτέλεσε την καλύτερη πηγή αζώτου για τη ζύμη *Debaryomyces nepalensis*, ενώ υπό την παρουσία νιτρικών ο μικροοργανισμός απέτυχε να μεταβολίσει αποτελεσματικά την γλυκόζη προς παραγωγή αραβιτόλης. Οι ίδιοι ερευνητές αναφέρουν ότι μια συγκεκριμένη αύξηση στη συγκέντρωση του διαλυμένου αζώτου (<9 g/L), και συνεπώς μείωση του λόγου C/N, παρουσίασε θετική επίδραση τόσο στην παραγωγή αραβιτόλης όσο και στην παραγωγή αιθανόλης αυξάνοντας τις τελικές αποδόσεις των παραγόμενων μεταβολιτών. Ωστόσο περαιτέρω αύξηση της συγκέντρωσης αζώτου (9 g/L) είχε σαν αποτέλεσμα τη δραστική μείωση της απόδοσης σε αιθανόλη καθώς επίσης και του ποσοστού της γλυκόζης που καταναλώθηκε (40% του συνόλου της γλυκόζης). Υπερβολική συγκέντρωση αζώτου αποδείχθηκε επίσης δυσμενής για την παραγωγή αραβιτόλης από τη ζύμη *Kodamae ohmeri* (Zhu et al. 2010). Η συγκεκριμένη παρατήρηση παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον καθώς φαίνεται ότι ο λόγος C/N που απαιτείται για την παραγωγή αραβιτόλης και αιθανόλης διαφέρει συγκριτικά με αυτόν που απαιτείται για την παραγωγή μικροβιακού λίπους. Ωστόσο, περαιτέρω έρευνα πάνω σε αυτό το θέμα κρίνεται απαραίτητη για να προκύψουν συγκεκριμένα συμπεράσματα.

Μία από τις πλέον ελπιδοφόρες προοπτικές των ελαιογόνων ζυμών είναι η ικανότητά τους να αξιοποιούν την ημικυτταρίνη. Καθώς τα βιοδιυλιστήρια είναι σε θέση να παράγουν πολλά προϊόντα από φυτικής προέλευσης πρώτες ύλες, οι ελαιογόνες ζύμες μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως μέσο βιομετατροπής της ημικυτταρίνης. Όσον αφορά την παραγωγή βιοαιθανόλης, σύμφωνα με τους Gupta, Sharma και Kuhad (2009) μετά από καλλιέργεια του στελέχους *Pichia stipitis*, σε ημικυτταρινούχο υδρόλυμα (18,24 g/L ολικά σάκχαρα) παρήχθησαν 7,13 g/L αιθανόλης, με απόδοση ανά γραμμάριο καταναλωθέντος υποστρώματος 0,39 g/g, μετά από 24 h καλλιέργειας. Επιπλέον οι Saha & Bothast (1996), έδειξαν ότι με τα την καλλιέργεια των στελεχών *Candida entomaea* και *Pichia guilliermondii* σε συνθετικό υπόστρωμα D-γλυκόζης, D-ξυλόζης και L-αραβινόζης (1:1:1) παρουσίασαν ικανοποιητική ανάπτυξη αξιοποιώντας τις πηγές άνθρακα προς παραγωγή αιθανόλης, ξυλιτόλης και αραβιτόλης αντίστοιχα. Ως εκ τούτου περαιτέρω μελέτη καλλιέργειας των στελεχών PC_A2, PP_D3 και MD_F1 σχετικά με άλλα πιθανά αξιοποιήσιμα υποστρώματα παρουσιάζει ενδιαφέρον.

Τέλος, όσον αφορά το στέλεχος MD_F1, που παρουσίασε συγγένεια με το είδος *Metschnikowia pulcherrima*, η περαιτέρω μελέτη σχετικά με την δυνατότητα διεξαγωγής ζυμώνσεων σε μη αποστειρωμένες συνθήκες αποτελεί μια ελπιδοφόρα προοπτική, καθώς τέτοιου είδους ζυμώσεις δύνανται να μειώσουν σημαντικά το κόστος παραγωγής των επιθυμητών παραγόμενων μεταβολιτών.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Aditiya H.B., Chong W.T., Mahlia T.M.I., Sebayang A.H., Berawi M.A., Nur H., 2015. Second generation bioethanol potential from selected Malaysia's biodiversity biomasses: A review. *Waste Management*, (article in press).
- Abghari A., Chen S., 2014. *Yarrowia lipolytica* as an oleaginous cell factory platform for production of fatty acid-based biofuel and bioproducts. *Frontiers in Energy Resaerch* 2.
- Berry D.R., 1982. Biology of yeasts. London. Edward Arnold.
- Böttcher D., Schmidt M., Bornscheuer U.T., 2009. Alteration of substrate specificity and stereoselectivity of lipases and esterases. In: Lutz, S., Bornscheuer, U.T. (Eds.), Protein Engineering Handbook. Wiley-VCH, Weinheim, Germany, pp. 753–775.
- Buchholz K., Bornscheuer U.T., 2005. Highlights in biocatalysis – historical landmarks and current trends. *Eng. Life Sci.* 5, 309–323.
- Certik M., Shimizu S., 1999. Biosynthesis and Regulation of Microbial Polyunsaturated Fatty Acids Production. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 87, 1-14.
- Elliston A., 2012. *The exploitation of municipal solid waste (MSW) and related wastepaper streams in the production of bioalcohol.*, Unpublished Doctoral Dissertation, University of East Anglia, Norfolk, UK.
- Eyidogan M., Ozsezen A.N., Canakci M., Turkcan A., 2010. Impact of alcohol-gasoline fuel blends on the performance and combustion characteristics of an SI engine. *Fuel* 89, 2713–2720.
- Fakas S., Certik M., Papanikolaou S., Aggelis G., Komaitis M., Galiotou-Panayotou M., 2007. γ -linoleic acid production by *Cunninghamella echinulata* growing on complex organic nitrogen sources. *Bioresource Technology*.
- Fakas S., Papanikolaou S., Galiotou-Panayotou M., Komaitis M., Aggelis G., 2006. Lipids of *Cunninghamella echinulate* with emphasis to γ -linoleic acid distribution among lipid classes. *Applied Microbiology and Biotechnology* 73, 676-683.
- Ferreira A.D., Mussatto S.I., Cadete R.M., Rosa C. A. , Silva S.S., 2011. Ethanol production by a new pentose-fermenting yeast strain, *Scheffersomyces stipitis* UFMG-IMH 43.2, isolated from the Brazilian forest., *Yeast* 28, 547–554.
- Figueroa L. I. C., Lucca M. E., 2001. Production of Polyols by Osmotolerant Yeasts. In: Food Microbiology Protocols, Spencer J.F.T., Ragout de Spencer A. L. (Eds) Chapter 28, Humana Press Inc, Totowa, New Jersey, 233-241.
- Folch J., Lees M., Stanley G.H.S., 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J BiolChem* 226, 497-509.
- Girio F.M., Amaro C., Azinheira H., Pelica F., Amaral-Collaço M.T. Polyols production during single and mixed substrate fermentations in *Debaryomyces hansenii*. *Bioresource Technology* 71, 245-251.

- Guan D., Li, Y., Shiroma R., Ike, M., Tokuyasu K., 2013. Sequential incubation of *Candida shehatae* and ethanol-tolerant yeast cells for efficient ethanol production from a mixture of glucose, xylose and cellobiose. *Bioresour. Technol.* 132, 419–422.
- Gupta R., Sharma K. K., Kuhad R. C., 2009. Separate hydrolysis and fermentation (SHF) of *Prosopis juliflora*, a woody substrate, for the production of cellulosic ethanol by *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia stipitis*-NCIM 3498. *Bioresour. Technol.* 100, 1214–1220.
- Hansson L., Dostalek M., 1998. Effect of culture conditions on mycelian growth and production of γ -linolenic acid by fungus *Mortierella rammanniana*. *Appl Microbiol Biotechnol* 28, 240-246.
- Koganti S., Kuo T.M., Kurtzman C.P., Smith N., Ju L.K., 2011. Production of arabitol from glycerol: strain screening and study of factors affecting production yield. *Appl Microbiol Biotechnol* 90, 257–267.
- Kolouchova I., Sigler K., Schreiberova O., Masak J., Rezanka T., 2015. New yeast-based approaches in production of palmitoleic acid. *Bioresour. Technol.* 192, 726–734.
- Kordowska-Wiater M., 2015. Production of arabitol by yeasts: current status and future prospects. *Journal of Applied Microbiology*, 1-12.
- Kordowska-Wiater M., Komar A.K., Targoński Z., 2013. Application of response surface methodology for the optimization of arabinose biotransformation to arabitol by *Candida parapsilosis*. *Cent. Eur. J. Biol.* 8, 835-842.
- Koutinas A.A., Chatzifragkou A., Kopsahelis N., Papanikolaou S., Kookos I.K., 2014b. Design and techno-economic evaluation of microbial oil production as a renewable resource for biodiesel and oleochemical production. *Fuel* 116, 566–577.
- Koutinas A.A., Papanikolaou S., 2011. Biodiesel production from microbial oil. In: *Handbook of Biofuels Production: Processes and Technologies*, Luque R., Campelo J., Clark J. (Eds) Chapter 8, Woodhead Publishing Limited, Cambridge, UK, pp177-198.
- Koutinas A.A., Vlysidis A., Pleissner D., Kopsahelis N., Garcia I.L., Kookos I.K., Papanikolaou S., Kwan T.H., Lin C.S.K., 2014a. Valorization of industrial waste and by-product streams via fermentation for the production of chemicals and biopolymers. *Chem. Soc. Rev.* 43, 2587–2627.
- Kristofikova L., Rosenberg M., Vlnova A., Sajbidor J., Certik M., 1991. Selection of *Rhizopus* strains for L (+)-lactic acid and γ -linolenic acid production. *Folia Microbiol* 36, 451-455.
- Kurtzman C., Droby S., 2001. *Metschnikowia fructicola*, a New Ascosporic Yeast with Potential for Biocontrol of Postharvest Fruit Rots. *System. Appl. Microbiol.* 24, 395–399.
- Kumdam H., Murthy S.N., Gummadi S.N., 2013. Production of ethanol and arabitol by *Debaryomyces nepalensis*: influence of process parameters. *AMB Express* 3:23.

- Kumdam H., Murthy S.N., Gummadi S.N., 2014. Arabitol production by microbial fermentation - biosynthesis and future applications. *International Journal of Sciences & Applied Research 1* , 1-12.
- Leiva-Candia D.E, Pinzi S, Redel-Macias M.D, Koutinas A, Webb C, Dorado M.P. 2014. The potential for agro-industrial waste utilization using oleaginous yeast for the production of biodiesel. *Fuel 123*, 33-42.
- Licht F. O., 2011. *World Ethanol and Biofuels Report*, London, Agra Informa, UK, Ltd.
- Lie S., 1973. The EBC-ninhydrin method for determination of free alpha amino nitrogen. *Journal of the Institute of Brewing 79*, 37-41.
- Maina S., Pateraki C., Kopsahelis N., Paramithiotis S., Drosinos E.H., Papanikolaou S., Koutinas A., 2015. Microbial oil production from various carbon sources by newly isolated oleaginous yeasts. *Bioresource technology (submitted article)*
- Mendonca-Hagler L.C., Hagler A.N. & Kurtzman C.P., 1993. Phylogeny of *Metschnikowia* Species Estimated from Partial rRNA Sequences. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 368-373.
- Miller G.L., 1959. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Anal.Chem 31*, 426-428.
- Monier V., Mudgal S., Escalon V., O'Connor C., Gibon, T., Anderson, G., Montoux H., Reisinger H., Dolley P., Ogilvie S., Morton G., 2010. Preparatory study on food waste across EU-27. Technical Report – 2010 – 054. http://ec.europa.eu/food/safety/food_waste/library/docs/bio_foodwaste_report_en.pdf (visited: 10/07/2015).
- Naik S.N., Goud V.V., Rout P.K., Dalai A.K., 2010. Production of first and second generation biofuels: a comprehensive review. *Renew. Sust. Energ. Rev. 14*, 578-597.
- Nozaki H., Suzuki S., Tsuyoshi N., Yokozeki K., 2003. Production of D-Arabitol by *Metschnikowia reukaufii* AJ14787. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 67, 1923-1929.
- Octave S., Thomas D., 2009. Biorefinery: Toward an industrial metabolism. *Biochimie 91*, 659-664.
- Pan L.X., Yang D.F., Shao L., Li W., Chen G.G., Liang Z.Q., 2009. Isolation of Oleaginous Yeasts, *Food Technol. Biotechnol. 47* , 215-220 .
- Papanikolaou S., Aggelis G., 2009. Biotechnological valorization of biodiesel derived glycerol waste through production of single cell oil and citric acid by *Yarrowia lipolytica*. *Lipid Technology 21*, 83-87.
- Papanikolaou S., Aggelis G., 2010. *Yarrowia lipolytica*: a model microorganism used for the production of tailor-made lipids. *Eur. J. Lipid Sci. Technol. 112*, 639-654.
- Papanikolaou S., Aggelis G., 2011. Lipids of oleaginous yeasts. Part I: biochemistry

- of single cell oil production. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 113, 1031–1051.
- Papanikolaou, S., Chevalot, I., Galiotou-Panayotou, M., Komaitis, M., Marc I., Aggelis G., 2007. Industrial derivative of tallow: A promising renewable substrate for microbial lipid, single-cell protein and lipase production by *Yarrowia lipolytica*. *Electron. J. Biotechnol.* 10, 425–435.
- Papanikolaou S., Chevalot I., Komaitis M., Aggelis G., Marc I., 2001. Kinetic profile of the cellular lipid composition in oleaginous *Yarrowia lipolytica* capable of producing a cocoa-butter substitute from industrial fats. *Antoine van Leeuwenhoek* 80, 215-224.
- Parfitt J., Barthel M., Macnaughton S., 2010. Food waste within food supply chains: quantification and potential for change to 2050. *Philos. Trans. Roy. Soc. B* 365, 3065–3081.
- Petersson A., Thomsen M.H., Hauggaard-Nielsen H., Thomsen A.B., 2007. Potential bioethanol and biogas production using lignocellulosic biomass from winter rye, oilseed rape and faba bean. *Biomass and Bioenergy* 31, 812–819.
- Ratledge C., 1994. Yeasts, molds, algae and bacteria as sources of lipids. In: Technological advances in improved and alternative sources of lipids, Kamel B.S., Kakuda Y. (Eds), Blackie academic and professional, London, 235-291.
- Ratledge C., 2002. Regulation of lipid accumulation in oleaginous microorganisms. *Biochemical Society*, 1047-1050.
- Ratledge C., 2004. Fatty acid biosynthesis in microorganisms being used for Single Cell Oil production. *Biochimie* 86, 807-815.
- Ratledge C, Hopkins S., 2006. Lipids from microbial sources. In: Gunstone FD, ed. Modifying lipids for use in food. England, Woodhead Publishing Limited, 80-113.
- Ratledge C., Wynn J.P., 2006. Microbial production of oils and fats. In: *Food Biotechnology*. Second Edition. Taylor & Fancis, 460-481.
- Riitonen T., Eta V., Hyvärinen S., Jönsson L.J., Mikkola J.P., 2013. Engineering Aspects of Bioethanol Synthesis. In: Advances in Chemical Engineering, Volume 42, Murzin D.Y. (Eds) Chapter 1, Elsevier Inc., 1-73.
- Saha B.C., Bothast R.J., 1996. Production of L-arabitol from L-arabinose by *Candida entomaea* and *Pichia guilliermondii*. *Appl Microbiol Biotechnol* 45, 299-306.
- Saha B.C., Sakakibara Y., Cotta M.A., 2007. Production of D-arabitol by a newly isolated *Zygosaccharomyces rouxii*. *J Ind Microbiol Biotechnol* 34, 519–523.
- Sam K.K., 2012. Industrial Alcohol Production from Ethylene and Sulphuric Acid. <http://www.inclusive-science-engineering.com/industrial-alcohol-production-from-ethylene-and-sulphuric-acid> (visited: 18/07/2015).
- Santamauro F., Whiffin F.M., Scott R.J., Chuck C.J., 2014. Low-cost lipid production by an oleaginous yeast cultured in non-sterile conditions using model waste resources. *Biotechnology for Biofuels* 7, 34-45.

- Sarris D., Galiotou-Panayotou M., Koutinas A.A., Komaitis M., Papanikolaou S., 2011. Citric acid, biomass and cellular lipid production by *Yarrowia lipolytica* strains cultivated on olive mill wastewater-based media. *J Chem Technol Biotechnol*, 86, 1439–1448.
- Savini V., Hendrickx M., Sisti M., Masciarelli G., Favaro M., Fontana C., Pitzurra L., Arzeni D., Astofli D., Catavittello C., Polilli E., Farina C., Fazii P., Antonio D.D., Stube D., 2013. An atypical, pigment-producing *Metschnikowia* strain from a leukaemia patient. *Medical Mycology* May 51, 438–443.
- Schulze I., Hansen S., Großhans S., Rudsuck T., Ochsenreither K., Syldatk C., Neumann A., 2014. Characterization of newly isolated oleaginous yeasts – *Cryptococcus podzolicus*, *Trichosporon porosum* and *Pichia segobiensis*. *AMB Express* 4, 24.
- Sjamsuridzal W., Oetari A., Nakashima C., Kanti A., Saraswati A., Widyastuti Y., Ando K., 2013. New Species of the Genus *Metschnikowia* Isolated from Flowers in Indonesia, *Metschnikowia cibodasensis* sp. nov. *J. Microbiol. Biotechnol.* 23, 905–912.
- Subramaniam R., Dufreche S., Zappi M., Bajpai R., 2010. Microbial lipids from renewable resources: production and characterization, *J Ind Microbiol Biotechnol* 37,1271- 1287.
- Suryadi H., Katsuragi T., Yoshida N., Suzuki S., Tani Y., 2000. Polyol Production by Culture of Methanol-Utilizing Yeast. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 89, 236-240.
- Tanimura A., Kikukawa M., Yamaguchi S., Kishino S., Ogawa J., Shima J., 2015. Direct ethanol production from starch using a natural isolate, *Scheffersomyces shehatae*: Toward consolidated bioprocessing. *Scientific Reports* 5:9593.
- Tsakona S., Kopsahelis N., Chatzifragkou A., Papanikolaou S., Kookos I.K., Koutinas A.A., 2014. Formulation of fermentation media from flour-rich waste streams for microbial lipid production by *Lipomyces starkeyi*. *Journal of Biotechnology* 189, 36-45.
- Vasconcelos J.N., Lopes C.E., Franca F.P., 2004. Continuous ethanol production using yeast immobilized on sugar-cane stalks. *Brazilian Journal of Chemical Engineering* Vol. 21, 357 – 365.
- Walker G. M., 1998. *Yeast physiology and biotechnology*, Chichester, J. Wiley.
- Waldron K., 2010. *Bioalcohol production: biochemical conversion of lignocellulosic biomass*, Oxford, Woodhead.
- Wang P., Wan X., Zhang Y., Jiang M., 2011. Production of c-linolenic acid using a novel heterologous expression system in the oleaginous yeast *Lipomyces kononenkoae*. *Biotechnol Lett* 33, 1993–1998.
- Wong B., Murray J.S., Castellanos M., Croen K.D., 1993. D-Arabitol Metabolism in *Candida albicans*: Studies of the Biosynthetic Pathway and the Gene That Encodes NAD-Dependent D-Arabitol Dehydrogenase. *Journal of Bacteriology* 175, 6314 - 6320.

- Xavier M.C.A. & Franco T.T., 2014. Batch and Continuous Culture of Hemicellulosic Hydrolysate from Sugarcane Bagasse for Lipids Production. *Chemical Engineering Transactions* 38, 385-390.
- Yuan W.J., Chang B.L., Ren J.G., Liu J.P., Bai F.W., Li Y.Y., 2011. Consolidated bioprocessing strategy for ethanol production from Jerusalem artichoke tubers by *Kluyveromyces marxianus* under high gravity conditions. *Journal of Applied Microbiology* 112, 38–44.
- Zhu H.-Y., Xu H., Dai X.-Y., Zhang Y., Ying H.-J., Ouyang P.-K., 2010. Production of D-arabitol by a newly isolated *Kodamaea ohmeri*. *Bioprocess Biosyst. Eng* 33, 565-571.
- Αγγελής Γ., 2007. Μικροβιολογία και Μικροβιακή Τεχνολογία. Εκδόσεις Σταμούλη, Αθήνα.
- Μακρή Α., 2011. *Μεταβολισμός της γλυκερόλης στη ζύμη Yarrowia lipolytica και προοπτικές ανάπτυξης νέων βιοδιεργασιών.*, Διδακτορική Διατριβή, Πανεπιστήμιο Πατρών, Πάτρα.
- Μάινα Σ., 2013. *Επιλογή στελεχών μυκήτων και ζυμών προς βιοτεχνολογική παραγωγή δευτερογενών μικροβιακών μεταβολιτών*, Μεταπτυχιακή Μελέτη, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα.
- Μπαλατσούρας Γ., 2006. Μικροβιολογία Τροφίμων. Εκδόσεις Έμβρυο, Αθήνα.
- Παπανικολάου Σ., 2013. Ενζυμικές και μικροβιακές διεργασίες τροφίμων. Πανεπιστημιακές Παραδόσεις, Γ.Π.Α., Αθήνα.