

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

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ, ΣΥΝΤΗΡΗΣΗ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΕΣ ΔΙΕΡΓΑΣΙΕΣ
ΤΡΟΦΙΜΩΝ – ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΒΙΟ-ΟΙΚΟΝΟΜΙΑΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Παραγωγή μεταβολικών προϊόντων κατά την αύξηση στελεχών
ζυγομυκήτων σε υποστρώματα με βάση την ακάθαρτη γλυκερόλη

Σωκράτης Π. Παπαθανασίου

Επιβλέπων καθηγητής:

Παπανικολάου Σεραφείμ, Καθηγητής ΓΠΑ

Αθήνα, 2020

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

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Παραγωγή μεταβολικών προϊόντων κατά την αύξηση στελεχών ζυγομυκήτων σε υποστρώματα με βάση την ακάθαρτη γλυκερόλη

“Production of metabolic products during the growth of zygomycetes strains on crude glycerol-based substrates”

Σωκράτης Π. Παπαθανασίου

Εξεταστική Επιτροπή

Επιβλέπων:

Παπανικολάου Σεραφείμ, Καθηγητής
Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών
Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου

Μέλη:

Κουτίνας Απόστολος, Αναπληρωτής Καθηγητής
Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών
Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου

Στοφόρος Νικόλαος, Καθηγητής
Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών
Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου

Παραγωγή μεταβολικών προϊόντων κατά την αύξηση στελεχών ζυγομυκήτων σε υποστρώματα με βάση την ακάθαρτη γλυκερόλη

Τμήμα επιστήμης και διατροφής του ανθρώπου

Εργαστήριο μικροβιολογίας και βιοτεχνολογίας τροφίμων

Περίληψη

Η παρούσα ερευνητική μελέτη έχει στόχο τη διερεύνηση της βίο-φυσιολογικής συμπεριφοράς των ζυγομυκήτων *Mortierella isabellina*, *Mortierella ramanniana*, *Thamnidium elegans* και *Cunninghamella echinulata*, την ικανότητα να αναπτύσσονται σε απόβλητη γλυκερόλη και να συσσωρεύουν ενδοκυτταρικά λιπίδια πλούσια σε γ-λινολενικό οξύ. Το γ-λινολενικό οξύ αποτελεί ένα από τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα της ομάδας ω-6 όντας πολύ υψηλής διατροφικής και φαρμακευτικής σημασίας. Αποτελεί πρόδρομη ουσία της προσταγλανδίνης E1 (PGE1) που το σώμα μας χρησιμοποιεί για την αντιμετώπιση των φλεγμονών και για την άμυνά του έναντι παθήσεων, όπως ο καρκίνος, οι καρδιοπάθειες, οι αλλεργίες, το άσθμα, η αρθρίτιδα και οι αυτοάνοσες ασθένειες, καθώς και για την αποφυγή της πρόωρης γήρανσης.

Πραγματοποιήθηκαν δύο σετ ζυμώσεων, στο πρώτο οι μύκητες καλλιεργήθηκαν σε υπόστρωμα με περιοριστικό παράγοντα αύξησης το άζωτο, προκειμένου να τους κατευθύνουμε στην ενδοκυτταρική συσσώρευση λιπιδίων. Στο δεύτερο σετ επαναλάβαμε τις ζυμώσεις αλλάζοντας την αρχική συγκέντρωση αζώτου και διατηρώντας όλες τις υπόλοιπες συνθήκες ίδιες με σκοπό να δημιουργήσουμε συνθήκες περίσσειας αζώτου και να ευνοηθεί η κυτταρική αύξηση. Όλες οι ζυμώσεις ήταν κλειστού τύπου και διεξήχθησαν σε κωνικές φιάλες Erlenmeyer των 250 ml υπό συνεχή ανάδευση και σταθερή θερμοκρασία. Σε όλες τις περιπτώσεις έγινε προσδιορισμός της κινητικής της αύξησης της βιομάζας, της κατανάλωσης του υποστρώματος και των παραχθέντων λιπιδίων. Προσδιορίστηκε επίσης το ποσοστό των λιπιδίων επί της ξηρής βιομάζας και αναλύθηκε η σύσταση των λιπιδίων στα αντίστοιχα λιπαρά οξέα.

Στις συνθήκες περιορισμού αζώτου η ανάπτυξη της βιομάζας ήταν περιορισμένη αλλά παρατηρήθηκε μεγάλο ποσοστό ενδοκυτταρικών λιπιδίων, όπως ήταν αναμενόμενο, φτάνοντας ακόμα και το 65% επί της ξηρής βιομάζας. Στην περίπτωση του *Thamnidium elegans* η συγκέντρωση των συνολικών λιπιδίων έφτασε τα $5,5 \text{ gL}^{-1}$ και η παραχθείσα βιομάζα τα $9,4 \text{ gL}^{-1}$ ενώ ο μύκητας *Mortierella ramanniana* ήταν αυτός με τη μεγαλύτερη παραχθείσα βιομάζα, φτάνοντας τα $11,4 \text{ gL}^{-1}$ αλλά με μικρότερο ποσοστό ενδοκυτταρικών λιπιδίων, λίγο κάτω από το 40% w/w.

Στις συνθήκες περίσσειας αζώτου παρατηρήθηκε σχεδόν διπλάσια κυτταρική ανάπτυξη αλλά μικρό ποσοστό των ενδοκυτταρικών λιπιδίων, περίπου 20-30% w/w. Ωστόσο, η τελική συγκέντρωση των παραχθέντων λιπιδίων ήταν μεγαλύτερη από εκείνη του πρώτου σετ πειραμάτων. Ο μύκητας *Mortierella ramanniana* παρήγαγε 22 gL⁻¹ βιομάζας και 5 gL⁻¹ ενδοκυτταρικού λίπους ενώ ο μύκητας *Thamnidium elegans* παρήγαγε 6,9 gL⁻¹ ενδοκυτταρικού λίπους σε ποσοστό 34% επί της ξηρής βιομάζας.

Τέλος πραγματοποιήθηκε ανάλυση της σύστασης των ενδοκυτταρικών λιπιδίων στα αντίστοιχα λιπαρά οξέα. Σε όλες τις περιπτώσεις υπήρχε παραγωγή γ-λινολενικού οξέος με μεγάλη όμως διακύμανση κατά τη διάρκεια των ζυμώσεων και ειδικότερα στα ίδια τα στελέχη όταν αναπτύχθηκαν σε διαφορετικές συνθήκες. Ειδικότερα οι μύκητες *Mortierella isabellina* και ο *Thamnidium elegans* σημείωσαν υψηλά επίπεδα γ-λινολενικού οξέος φτάνοντας το 8,5% και 6,5% επί των συνολικών λιπιδίων αντίστοιχα όταν αναπτύχθηκαν σε συνθήκες με περίσσεια αζώτου. Καλλιεργούμενοι σε συνθήκες περιορισμού αζώτου τα αντίστοιχα ποσοστά ήταν 3,5% και 2,4%.

Επιστημονική περιοχή: Διατροφή του ανθρώπου

Λέξεις κλειδιά: Ζυγομύκητες, Μικροβιακά λιπίδια, γ-Λινολενικό οξύ, Γλυκερόλη,

Production of metabolic products during the growth of zygomycetes strains on crude glycerol-based substrates

Department of Human Science and Nutrition

Laboratory of Microbiology and Food Biotechnology

Abstract

The aim of the present study was to investigate the bio-physiological behavior of four Zygomycetes strains belonging to the species *Mortierella isabellina*, *Mortierella ramanniana*, *Thamnidium elegans* and *Cunninghamella echinulata* and their ability to grow on raw glycerol and accumulate intracellular lipids rich in γ -linolenic acid. γ -linolenic acid is one of the polyunsaturated fatty acids in the omega-6 group of high nutritional and medicinal importance. It is a precursor to prostaglandin E1 (PGE1) which is used from our body in order to treat inflammation and to protect against diseases such as cancer, heart disease, allergies, asthma, arthritis and autoimmune diseases, as well as for avoiding premature aging.

Two sets of fermentations were performed, in the first, the fungi were cultured on a substrate under nitrogen limited conditions, in order to direct them to intracellular lipid accumulation. In a secondary set, experiments were repeated by changing the initial nitrogen concentration with keeping the rest of the parameters stable in order to create conditions of excess nitrogen and favor cell growth. All performed fermentations were batch type and conducted in 250 ml Erlenmeyer conical flasks under constant stirring and at a constant temperature. In all cases, the kinetics of the biomass increase, the consumption of substrate and the lipid accumulation were determined. The percentage of lipids on dry biomass was also determined and the composition of the lipids in the corresponding fatty acids was analyzed.

Under nitrogen restriction conditions, biomass growth was limited but a large percentage of intracellular lipids were observed, as it was expected, reaching as high as 65% w/w of dry biomass. In the case of *Thamnidium elegans* the concentration of total lipids reached 5.5 gL⁻¹ and the produced biomass 9.4 gL⁻¹ while the *Mortierella ramanniana* fungus was the one with the largest produced biomass, reaching 11.4 gL⁻¹ but with a lower percentage of intracellular lipids, slightly below 40% w/w.

In conditions of excess nitrogen, almost double cell growth was observed but a small percentage of intracellular lipids, about 20-30% w/w was produced. However, the final concentration of lipids produced was higher than that of the first set of experiments. The

strain *Mortierella ramanniana* produced 22 gL⁻¹ biomass and 5 gL⁻¹ intracellular fat, while *Thamnidium elegans* produced 6.9 gL⁻¹ intracellular lipids at 34% w/w on dry biomass.

Finally, the composition of intracellular lipids in the corresponding fatty acids was analyzed. In all cases γ -linolenic acid but with a large variation along fermentation time and especially between the same strains when they were cultured under different conditions. In particular, the fungi *Mortierella isabellina* and *Thamnidium elegans* produced high levels of γ -linolenic acid, reaching 8.5% and 6.5% of total lipids respectively, while cultured in conditions with excess nitrogen. When cultivated under nitrogen restriction conditions, the respective percentages were 3.5% and 2.4%.

Scientific area: Human nutrition

Key words: Zygomycetes, Microbial lipids, γ -Linolenic acid, Glycerol

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα μεταπτυχιακή μελέτη πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων του τμήματος Επιστήμης και Διατροφής του Ανθρώπου του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών υπό από την επίβλεψη του καθηγητή Σεραφείμ Παπανικολάου.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους όσους συντέλεσαν και βοήθησαν ώστε να ολοκληρώσω αυτή την μελέτη, ιδιαίτερα τον επιβλέποντα καθηγητή μου Σεραφείμ Παπανικολάου για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε για την ανάθεση της συγκεκριμένης μελέτης, την άριστη συνεργασία, το ενδιαφέρον και την καθοδήγησή του καθ' όλη τη διάρκεια των πειραματικών διαδικασιών και συγγραφή της μεταπτυχιακής μου μελέτης.

Τον αξιότιμο καθηγητή Νικόλαο Στοφόρο και τον αξιότιμο αναπληρωτή καθηγητή Απόστολο Κουτίνα που συνθέτουν την εξεταστική επιτροπή, για τον χρόνο που αφιέρωσαν στη διόρθωση και αξιολόγηση της παρούσας μεταπτυχιακής μελέτης.

Όλο το ανθρώπινο δυναμικό του εργαστηρίου Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων, τους υποψήφιους διδάκτορες, τους συμφοιτητές μου και ιδιαίτερα την κα Ουρανία Καλαντζή (ΕΔΠ) για όλη τη βοήθεια και την καθοδήγηση καθώς και για την άριστη συνεργασία και το ευχάριστο κλίμα στον χώρο του εργαστηρίου.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου, τους φίλους μου και ιδιαίτερα τον άνθρωπο που πίστεψε σε μένα, ήταν πάντα στο πλευρό μου και με στήριξε περισσότερο από τον καθένα, την κοπέλα μου Ιουλία.

Περιεχόμενα

1	Εισαγωγή	10
1.1	Ελαιόγνοιοι μικροοργανισμοί	10
1.2	Βιοχημεία ελαιόγνων μικροοργανισμών	12
1.2.1	<i>De novo</i> βιοσύνθεση των λιπαρών οξέων.....	12
1.2.2	Μικροβιακή παραγωγή λιπιδίων	13
1.2.3	Τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFAs).....	15
1.2.4	Βιοσύνθεση των PUFAs	17
1.2.5	Σχηματισμός των TAG.....	20
1.3	Τα PUFAs στην διατροφή του ανθρώπου	21
1.4	Ιστορική αναδρομή	26
1.5	Μύκητες για την παραγωγή ελαίου.....	29
1.6	Δομή των μυκήτων	31
1.7	Ζυγομύκητες.....	34
1.8	Η γλυκερόλη ως πηγή άνθρακα	37
1.9	Σκοπός της μελέτης	38
2	Υλικά και Μέθοδοι	40
2.1	Στελέχη Μυκήτων.....	40
2.2	Θρεπτικό μέσο.....	40
2.3	Προσδιορισμός διαλυτού οξυγόνου	41
2.4	Προσδιορισμός του pH.....	42
2.5	Προσδιορισμός της βιομάζας.....	42
2.6	Προσδιορισμός ενδοπολυσακχαριτών	42
2.7	Προσδιορισμός γλυκερόλης.....	43
2.8	Προσδιορισμός ανόργανων αμμωνιακών ιόντων	44
2.9	Ποσοτικός προσδιορισμός ενδοκυτταρικού λίπους	44
2.10	Μεθυλεστεροποίηση λιπαρών οξέων.....	44
2.11	Αέρια χρωματογραφία	45
3	Αποτελέσματα	47
3.1	Καλλιέργεια του μύκητα <i>Mortierella isabellina</i>	50
3.1.1	Σε χαμηλές συγκεντρώσεις αζώτου	50
3.1.2	Σε υψηλές συγκεντρώσεις αζώτου.....	52
3.2	Καλλιέργεια του μύκητα <i>Mortierella ramanniana</i>	54
3.2.1	Σε χαμηλές συγκεντρώσεις αζώτου	54
3.2.2	Σε υψηλές συγκεντρώσεις αζώτου.....	56

3.3	Καλλιέργεια του μύκητα <i>Thamnidium elegans</i>	58
3.3.1	Σε χαμηλές συγκεντρώσεις αζώτου	58
3.3.2	Σε υψηλές συγκεντρώσεις αζώτου.....	60
3.4	Καλλιέργεια του μύκητα <i>Cunninghamella echinulata</i>	62
3.4.1	Σε χαμηλές συγκεντρώσεις αζώτου	62
3.4.2	Σε υψηλές συγκεντρώσεις αζώτου.....	64
3.5	Διαγράμματα.....	66
4	Συζήτηση	68
4.1	Ανάπτυξη μυκήτων σε συνθήκες περιορισμού αζώτου	71
4.2	Ανάπτυξη μυκήτων σε συνθήκες περίσσειας αζώτου	73
5	Συμπεράσματα	76
6	Βιβλιογραφία.....	79

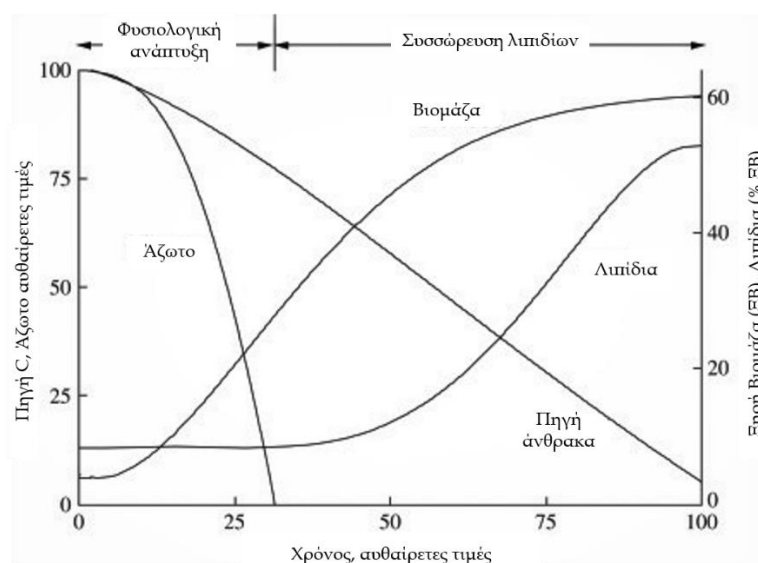
1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 ΕΛΑΙΟΓΟΝΟΙ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ

Η ικανότητα ενός μικροοργανισμού να παράγει και να συσσωρεύει υψηλά επίπεδα λιπιδίων στο εσωτερικό των κυττάρων του δεν είναι σύνηθες φαινόμενο στη φύση και απαντάται μόνο σε μειοψηφία ειδών (Ratledge, 2013). Οι μικροοργανισμοί εκείνοι οι οποίοι έχουν την δυνατότητα να συσσωρεύουν ενδοκυτταρικά λιπίδια πάνω από το 20% επί της ξηρής κυτταρικής τους μάζας όταν οι συνθήκες αύξησης ευνοούν τη συσσώρευση λιπιδίων (π.χ. αύξηση σε υποστρώματα τύπου γλυκόζης με περιορισμό σε άζωτο) καλούνται ελαιογόνοι (Thorpe & Ratledge, 1972; Paranikolaou & Aggelis, 2019). Το ελάχιστο όριο αυτό του 20% χρησιμοποιείται ως ένα εμπειρικό πρότυπο για τον καθορισμό της ελαιογονίας καθώς ποσότητες ελαφρώς μικρότερες από αυτές θα μπορούσαν να οφείλονται σε ιδιαιτερότητες της ανάπτυξης του μικροοργανισμού (Ratledge & Lippmeier, 2017). Το φαινόμενο συσσώρευσης λιπιδίων το συναντάμε κυρίως σε ευκαρυωτικούς οργανισμούς, όπως είναι τα μικροφύκη, οι ζύμες και οι μυκηλιακοί μύκητες και λιγότερο στα προκαρυωτικά βακτήρια. Ειδικότερα, στελέχη ζυγομυκήτων έχουν την ικανότητα να συσσωρεύουν λιπίδια ακόμα και πάνω από το 70% επί της ξηρής τους βιομάζας (Cescut, 2009; Ratledge, 2010; Ratledge, 2013). Μπορεί ωστόσο να υπάρξει σημαντική διακύμανση των επιπέδων λιπιδίων σε ένα είδος ελαιογόνου μικροοργανισμού ακόμα και σε επίπεδο στελέχους καθώς και από τον τρόπο με τον οποίο αυτός καλλιεργείται (Ratledge & Lippmeier, 2017).

Οι μικροοργανισμοί συνθέτουν λιπίδια, όπως όλοι οι ευκαρυωτικοί οργανισμοί, σε όλα τα στάδια της ανάπτυξής τους καθώς είναι απαραίτητα στοιχεία για δομικούς και λειτουργικούς ρόλους του κυττάρου. Χρησιμοποιούνται για τη δομή των κυτταροπλασματικών μεμβρανών (φωσφολιπίδια), τη βιοσύνθεση πρωτεϊνών καθώς και άλλων λειτουργικών δομών (Ratledge, 2013). Το φαινόμενο συσσώρευσης ωστόσο μεγάλων ποσοτήτων λιπιδίων είναι μια δευτερογενής αναβολική διεργασία η οποία λαμβάνει χώρα έπειτα από την εξάντληση κάποιων βασικών θρεπτικών συστατικών στο μέσο στο οποίο αναπτύσσεται ο μικροοργανισμός (Paranikolaou & Aggelis, 2011; Ratledge, 2013). Η εξάντληση του περιοριστικού παράγοντα αύξησης, που συνήθως είναι το άζωτο, περιορίζει διεργασίες του κυττάρου που αφορούν στην βιοσύνθεση πρωτεϊνών και νουκλεϊνικών οξέων. Έτσι τα κύτταρα δεν είναι σε θέση πλέον να πολλαπλασιάζονται, αλλά συνεχίζουν να είναι μεταβολικά ενεργά. Η περίσσεια του άνθρακα που είναι στην καλλιέργεια συνεχίζει να αφομοιώνεται από τα κύτταρα και χρησιμοποιείται για τη συσσώρευση ενδοκυτταρικού

κιτρικού οξέος το οποίο χρησιμοποιείται ως δότης acetyl-CoA στο κυτταρόπλασμα. Το acetyl-CoA στη συνέχεια χρησιμοποιείται για τη σύνθεση των λιπαρών οξέων τα οποία οι μικροοργανισμοί αποθηκεύουν τελικά ως τρι-άκυλο-γλυκερόλες. Για έναν μη ελαιογόνο μικροοργανισμό που θα αναπτυσσόταν στο ίδιο μέσο καλλιέργειας πιθανότατα θα χρησιμοποιούσε την περίσσεια άνθρακα για τη σύνθεση διάφορων ενδοπολυσακχαριτών ως αποθησαυριστικές ουσίες ενέργειας, όπως γλυκογόνο, γλυκάνες, μαννάνες κ.α. (Paranikolaou & Aggelis, 2011; 2019; Ratledge, 1984, 1997, 2004).



Διάγραμμα 1-1: Το τυπικό προφίλ της κινητικής ενός ελαιογόνου μικροοργανισμού που αναπτύσσεται σε υπόστρωμα με μία τυπική πηγή άνθρακα και με περιοριστικό παράγοντα το άζωτο. Η συσσώρευση λιπιδίων ξεκινάει όταν το άζωτο εξαντλείται από το μέσο, (Πηγή: Ratledge & Lippmeier, 2017).

Τα λιπίδια αυτά που συνθέτουν οι ελαιογόνοι μικροοργανισμοί *de novo* συσσωρεύονται ενδοκυτταρικά υπό τη μορφή σταγονιδίων (lipid droplets) τα οποία είναι εύκολα διακριτά στο οπτικό μικροσκόπιο (Εικόνα 1-1). Αν από το μέσο της καλλιέργειας εξαντληθεί ο άνθρακας, τα κύτταρα είναι σε θέση να χρησιμοποιήσουν αυτό το αποθεματικό υλικό ως νέα πηγή άνθρακα και ενέργειας (Ratledge, 2005).



Εικόνα 1-1: Σχηματισμένα λιπίδια με τη μορφή σταγονιδίων στα μυκήλια του μύκητα *Thamnidium elegans* όπως φαίνεται στο οπτικό μικροσκόπιο (X1000), (Πηγή: παρούσα μελέτη).

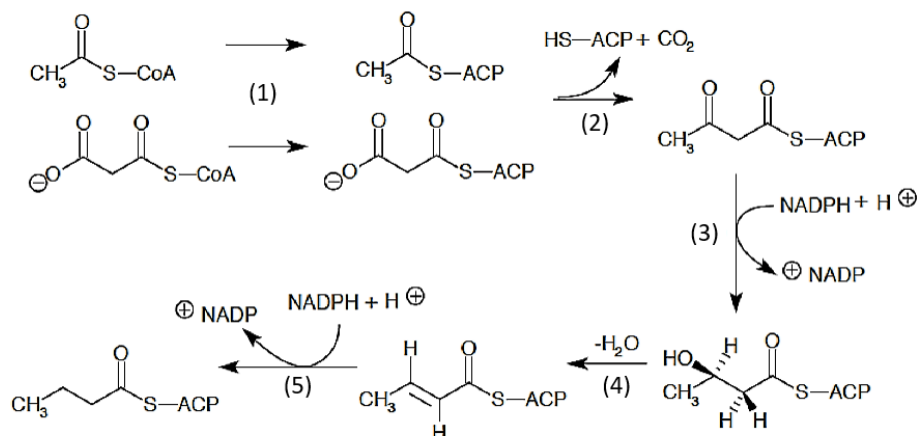
1.2 ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ ΕΛΑΙΟΓΟΝΩΝ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ

1.2.1 *De novo* βιοσύνθεση των λιπαρών οξέων

Στη βιοσυνθετική οδό των λιπαρών οξέων στους μικροοργανισμούς χρησιμοποιείται ως πρόδρομο μόριο το acetyl-CoA. Το acetyl-CoA παράγεται στα μιτοχόνδρια, ενώ η σύνθεση των λιπαρών οξέων γίνεται στο κυτταρόπλασμα των προκαρυωτικών και των ευκαρυωτικών κυττάρων. Στα ευκαρυωτικά κύτταρα, λόγω της αδυναμίας του acetyl-CoA να εξέλθει του μιτοχονδρίου, μεταφέρεται στο κυτταρόπλασμα μόνο η ακέτυλο-ομάδα ($\text{CH}_3 \text{CO}-$) μέσω του κιτρικού οξέος και στη συνέχεια ξανασηματίζεται acetyl-CoA.

Με την έξοδο του acetyl-CoA στο κυτταρόπλασμα αρχίζει η βιοσύνθεση των λιπαρών οξέων η οποία καταλύεται από ένα πολυένζυμο, τη συνθάση των λιπαρών οξέων. Η διαδικασία διαχωρίζεται σε 5 βασικά στάδια: (1) Στο πρώτο στάδιο της αντίδρασης έχουμε ενεργοποίηση του acetyl-CoA σε acetyl-ACP και του malonyl-CoA σε malonyl-ACP. Το malonyl-CoA σχηματίζεται από το acetyl-CoA καταλυόμενο από το ένζυμο Acetyl-CoA-carboxylase. (2) Στο επόμενο στάδιο το acetyl-ACP (C2) αντιδράει με το malonyl-ACP (C3) σχηματίζοντας acetoacetyl-ACP (C4) με απελευθέρωση ενός μορίου CO_2 και ACP. (3) Έπειτα, με τη συμμετοχή του αναγωγικού συνενζύμου NADPH_2^+ συμβαίνει αναγωγή του acetoacetyl-ACP σε D-3-hydroxybutyryl-ACP (C4). (4) Κατόπιν, λαμβάνει χώρα αντίδραση αφυδάτωσης προς

σχηματισμό του crotonyl-ACP (C4) και τελικά (5) αναγωγή του μορίου, με τη βοήθεια και πάλι ενός μορίου NADPH_2^+ και το σχηματισμό του butyryl-ACP (C4).



Σχήμα 1-1: Κύρια βιοσυνθετική οδός σχηματισμού λιπαρών οξέων μέχρι το στάδιο σχηματισμού του butyryl-ACP. Τα στάδια 2-5 επαναλαμβάνονται μέχρι τον τελικό σχεδιασμό των αντίστοιχων εστέρων των λιπαρών οξέων, (Πηγή: Wikipedia).

Τα στάδια 2-5 επαναλαμβάνονται, επιμηκύνοντας την ανθρακική αλυσίδα σε κάθε επανάληψη κατά δύο άτομα άνθρακα. Η διαδικασία τερματίζει έως ότου σχηματιστούν οι αντίστοιχοι εστέρες των λιπαρών οξέων, συνήθως 16 ή 18 ατόμων άνθρακα.

1.2.2 Μικροβιακή παραγωγή λιπιδίων

Η βιοσυνθετική οδός των λιπαρών οξέων στους περισσότερους ελαιογόνους μικροοργανισμούς είναι η ίδια με αυτή που απαντάται στους μη ελαιογόνους (1.2.1). Ωστόσο, οι ελαιογόνοι μικροοργανισμοί διαφοροποιούνται από τους μη ελαιογόνους για δύο βασικούς λόγους: α) από την ικανότητα να παράγουν και να τροφοδοτούν συνεχώς τα κύτταρα με acetyl-CoA (Paranikolaou & Aggelis, 2011), το οποίο αποτελεί πρόδρομη ουσία για την σύνθεση των λιπαρών οξέων και β) από την ικανότητα να παράγουν επαρκείς ποσότητες NADPH, απαραίτητος συμπράγοντας στη βιοσύνθεση των λιπαρών οξέων (Ratledge, 2004).

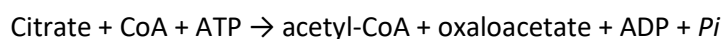
Η συνεχής παραγωγή και ανατροφοδότηση με acetyl-CoA και NADPH επιτυγχάνεται μέσα από μία σειρά διεργασιών, καταλυόμενες από τρία ένζυμα κλειδιά, η οποία διεγείρεται από την ένδεια του μέσου σε άζωτο (συνηθέστερος περιοριστικός για την αύξηση παράγοντας στο μέσο καλλιέργειας). Το κύτταρο κάτω από συνθήκες περιορισμού δεν έχει τις ίδιες

ανάγκες για μεγάλες ποσότητες ενέργειας λόγω του μειωμένου μεταβολισμού. Η ενέργεια έχει τη μορφή ATP (adenosine triphosphate) το οποίο παράγει το κύτταρο στα μιτοχόνδρια μέσω του κύκλου των τρικαρβοξυλικών οξέων (TCA cycle) και της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Ο κύκλος σταματάει στο επίπεδο του ισοκιτρικού καθώς απενεργοποιείται το πρώτο ένζυμο κλειδί, η ισοκιτρική αφυδρογονάση (ICDH), η οποία καταλύει την οξειδωτική αποκαρβοξυλίωση του ισοκιτρικού.

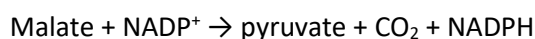
Το ένζυμο αυτό είναι εξαρτώμενο από τα επίπεδα του AMP (adenosine monophosphate). Σε συνθήκες περιορισμού αζώτου αυξάνεται η δράση της απαμινάσης του AMP (AD – AMP deaminase) η οποία διασπάει το AMP σε IMP (inosine monophosphate) και αμμωνία (NH₃) με αποτέλεσμα το κύτταρο να ξεμένει πολύ γρήγορα από AMP.



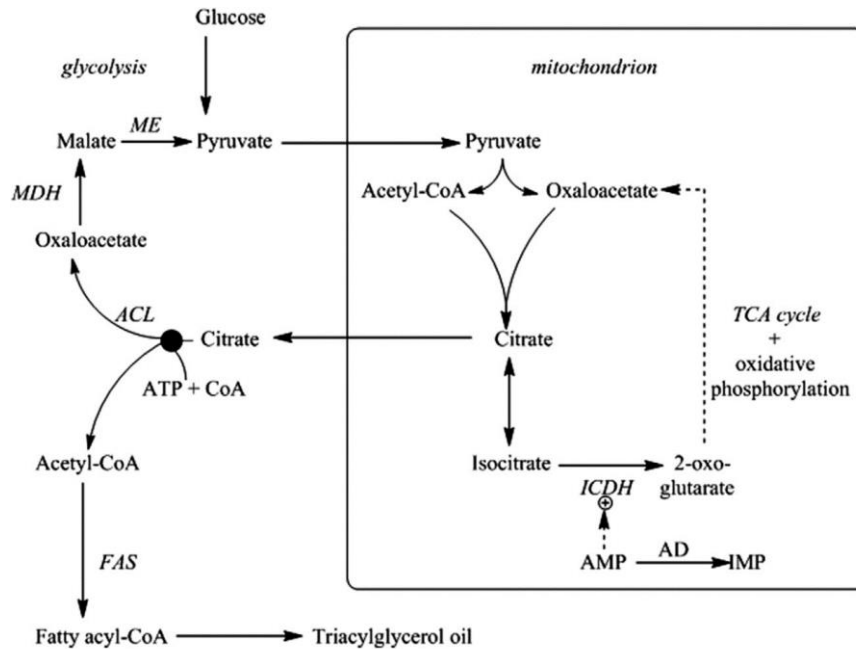
Αυτό φαίνεται να είναι μια προσπάθεια από τα κύτταρα να αποκτήσουν επιπλέον άζωτο από τους δικούς τους εσωτερικούς πόρους (Ratledge & Lippmeier 2017). Ως συνέπεια, το ισοκιτρικό οξύ που δεν μεταβολίζεται περαιτέρω συσσωρεύεται στο μιτοχόνδριο και στη συνέχεια εξισορροπείται με κιτρικό οξύ μέσω του ενζύμου ακονιτάση. Το κιτρικό οξύ στη συνέχεια εξέρχεται από το μιτοχόνδριο και χρησιμοποιείται ως υπόστρωμα από το δεύτερο ένζυμο κλειδί για την λιποσυσσώρευση, την ATP-κιτρική λυάση (ACL). Το ένζυμο αυτό, αποτελεί σήμα κατατεθέν για την ελαιογονία, καθώς απαντάται αποκλειστικά στους ελαιογόνους μικροοργανισμούς, (Ratledge & Lippmeier 2017) και είναι υπεύθυνο για την μετατροπή του κιτρικού οξέος, που πλέον βρίσκεται σε περίσσεια στο κυτταρόπλασμα, σε acetyl-CoA και οξαλοξικό οξύ.



Το κύτταρο χρησιμοποιεί το acetyl-CoA με το οποίο τροφοδοτείται συνεχώς για την βιοσύνθεση λιπαρών οξέων. Το οξαλοξικό οξύ από την άλλη πλευρά μετασχηματίζεται σε μηλικό και αυτό με τη σειρά του σε πυροσταφυλικό, αντίδραση καταλυόμενη από το τρίτο ένζυμο κλειδί, το μηλικό ένζυμο, απελευθερώνοντας ταυτόχρονα μόρια NADPH τα οποία είναι απαραίτητα για την αναβολική διεργασία βιοσύνθεσης των λιπαρών οξέων (16 moles NADPH₂⁺ για την σύνθεση του στεατικού οξέος – C18:0). Ο ρόλος του μηλικού ενζύμου είναι ζωτικής σημασίας όσο αφορά στην συσσώρευση των λιπαρών οξέων καθώς είναι ο κύριος προμηθευτής του κυττάρου με NADPH.



Το πυροσταφυλικό οξύ το οποίο εισέρχεται στο μιτοχόνδριο μετατρέπεται σε κιτρικό οξύ ξεκινώντας έτσι έναν νέο κύκλο διεργασιών.



Σχήμα 1-2: Περίγραμμα της κύριας ακολουθίας αντιδράσεων που οδηγούν στη συσσώρευση λιπιδίων στους ελαιογόνους μικροοργανισμούς. Ένζυμα που συμμετέχουν: AD: AMP-deaminase, ICDH: isocitric dehydrogenase, ACL: ATP-citric lyase, FAS: fatty acid synthetase, MDH: malate dehydrogenase, ME: malic enzyme, (Πηγή: Ratledge & Lippmeier, 2017).

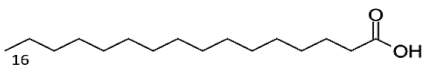
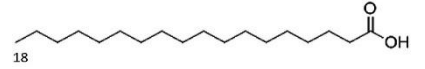
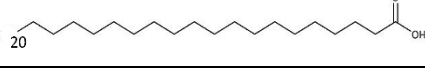
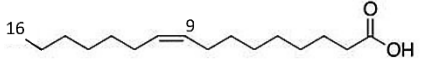
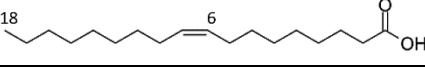
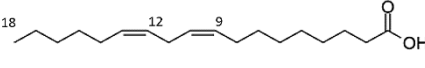
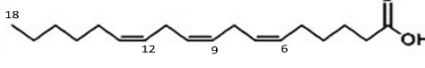
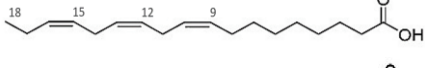
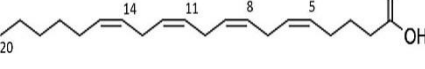
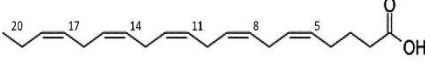
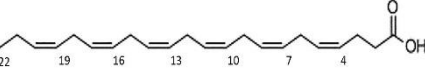
Η αλληλουχία αυτή των αντιδράσεων, η οποία φαίνεται και στο Σχήμα 1-2, μας παρέχει βασικές πληροφορίες για την κατανόηση της ελαιογονίας. Ωστόσο κάποιες διαφορές μπορεί να εμφανίζονται, καθώς δεν φαίνεται να έχουν ενεργό το μηλικό ένζυμο όλοι οι ελαιογόνοι μικροοργανισμοί, πχ *Yarrowia lipolytica* (Zhang *et al.*, 2013), διαφορετικές οδοί μπορεί να είναι υπεύθυνες για την απενεργοποίηση της ισοκιτρικής αφυδρογονάσης και τον έλεγχο του κύκλου των τρικαρβοξυλικών οξέων (TCA cycle).

1.2.3 Τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFAs)

Τα λιπαρά οξέα κατατάσσονται σε τρεις μεγαλύτερες κατηγορίες ανάλογα με τον αριθμό των διπλών δεσμών που διαθέτουν στο μόριο τους. Λιπαρά οξέα τα οποία δεν περιέχουν κανέναν διπλό δεσμό καλούνται κορεσμένα. Τα ακόρεστα λιπαρά οξέα χωρίζονται σε δυο υποκατηγορίες, στα μονοακόρεστα λιπαρά οξέα, με μόνο έναν διπλό δεσμό και στα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα, γνωστά ως PUFAs (Poly Unsaturated Fatty Acids), τα οποία

περιέχουν δύο τουλάχιστον διπλούς δεσμούς. Στα περισσότερα ακόρεστα λιπαρά οξέα που απαντώνται στη φύση, οι διπλοί δεσμοί απέχουν τρία άτομα άνθρακα μεταξύ τους. Ως εκ τούτου, κατά την ονομασία των λιπαρών οξέων, δηλώνουμε το άτομο άνθρακα στο οποίο βρίσκεται ο πρώτος διπλός δεσμός, απαριθμώντας συνήθως από το μεθυλικό άκρο (πχ: n-3 ή ω-3, ο πρώτος διπλός δεσμός βρίσκεται στον τρίτο άνθρακα από το μεθυλικό άκρο) και μπορούμε να προβλέψουμε τη θέση των υπολοίπων.

Πίνακας 1-1: Κορεσμένα λιπαρά οξέα (SFAs), Μονοακόρεστα (MUFAs), Πολυακόρεστα (PUFAs) λιπαρά οξέα και οι δομές τους όπου εμφανίζονται οι διπλοί δεσμοί. Cx:y, όπου x ο αριθμός ατόμων άνθρακα και y ο αριθμός των διπλών δεσμών, (Πηγή: Παρανικόλαου & Aggelis, 2019).

Κοινή Ονομασία	Σύντομη ονομασία	Χημική δομή
SFAs (Saturated Fatty Acids)		
Παλμιτικό οξύ	C16:0	
Στεατικό οξύ	C18:0	
Αραχιδικό οξύ	C20:0	
MUFAs (Mono Unsaturated Fatty Acids)		
Παλμιτελαϊκό οξύ	C16:1 ω-7	
Ελαϊκό οξύ	C18:1 ω-9	
PUFAs (Poly Unsaturated Fatty Acids)		
Λινελαϊκό οξύ	C18:2 ω-6	
γ-Λινολενικό οξύ	C18:3 ω-6	
α-Λινολενικό οξύ	C18:3 ω-3	
Αραχιδονικό οξύ	C20:4 ω-6	
Εικοσι-πενταενοϊκό οξύ - EPA	C20:5 ω-3	
Εικοσιδυ-εξαενοϊκό οξύ - DHA	C22:6 ω-3	

Οι αλυσίδες άνθρακος μπορεί να είναι διευθετημένες στον χώρο cis ή trans σε σχέση με τον διπλό δεσμό που υπάρχει. Στην διευθέτηση cis οι αλυσίδες του λιπαρού οξέος εκατέρωθεν του δεσμού είναι προσανατολισμένες στην ίδια κατεύθυνση με αποτέλεσμα τη συστροφή του μορίου στο χώρο. Αυτό τα εμποδίζει από το να στοιβάζονται κοντά το ένα με το άλλο με αποτέλεσμα να έχουν χαμηλό σημείο τήξης. Λιπίδια αποτελούμενα από ακόρεστα λιπαρά με διαμόρφωση cis, όπως είναι τα φυτικά λιπαρά, σε θερμοκρασία δωματίου είναι υγρά. Τα λιπαρά αυτά καλούνται έλαια. Στην διευθέτηση trans οι αλυσίδες είναι προσανατολισμένες σε αντίθετες κατευθύνσεις με αποτέλεσμα το μόριο να έχει δομή ευθείας αλυσίδας, παρόμοια με αυτή των κορεσμένων λιπαρών οξέων. Αποτέλεσμα της στερεοδομής αυτής είναι να έχουν μεγαλύτερο σημείο τήξης και σε θερμοκρασία δωματίου να είναι στερεά. Τα λιπαρά αυτά ονομάζονται λίπη (Anthea *et al*, 1993).

Τα λιπαρά οξέα τα οποία συναντάμε στη φύση αποτελούνται επί το πλείστον από άρτιο αριθμό ατόμων άνθρακα και εκείνα που έχουν διπλούς δεσμούς ακολουθούν διαμόρφωση cis. Τα trans λιπαρά είναι πάρα πολύ ασυνήθη, τα οποία είναι ουσιαστικά ισομερή του 18:1 προερχόμενα από μερικώς υδρογονωμένα φυτικά λιπαρά και η παρουσία τους, κυρίως σε επεξεργασμένα τρόφιμα, συνιστά κίνδυνο για την υγεία. Υπάρχουν επίσης υπόνοιες ότι σχετίζονται με παράγοντες οι οποίοι είναι υπεύθυνοι για την ανάπτυξη διάφορων τύπου καρκίνου (Chajes *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2007).

1.2.4 Βιοσύνθεση των PUFAs

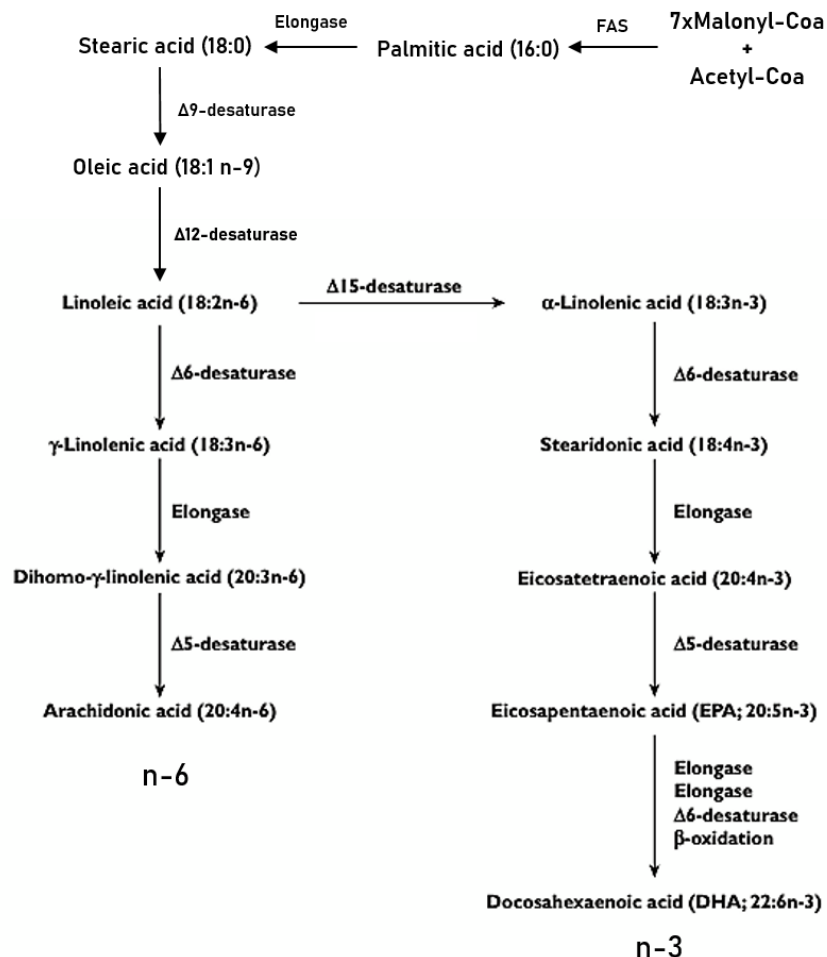
Η προγραφείσα βιοσύνθεση των λιπαρών οξέων καταλήγει σχεδόν σε κάθε οργανισμό με το σχηματισμό παλμιτικού (C16:0) ή στεατικού (C18:0) οξέος. Τα κορεσμένα αυτά λιπαρά στη συνέχεια τροποποιούνται μέσα από μία σειρά διεργασιών επιμήκυνσης και αποκορεσμού από ελονγκάσες και αποκορεσμάσες έτσι ώστε να παραχθούν ακόρεστα (MUFAs) και πολυακόρεστα λιπαρά οξέα μεγάλης αλειφατικής αλυσίδας (PUFAs). Τα λιπαρά οξέα που παράγονται σε μεγάλη αφθονία είναι διαφορετικά σε κάθε οργανισμό και εξαρτάται από το γενετικό προφίλ του κάθε είδους (Ratledge, 2004).

Η Δ9 αποκορεσμάση καταλύει την εισαγωγή του πρώτου διπλού δεσμού στα κορεσμένα λιπαρά οξέα μεταξύ των ανθράκων 9 και 10 της αλυσίδας. Ως εκ τούτου, μπορεί να θεωρηθεί ως το πρώτο καθοριστικό βήμα στη βιοσύνθεση των PUFAs. Η Δ9 αποκορεσμάση μπορεί να λειτουργήσει το ίδιο σε ένα από τα επικρατέστερα κορεσμένα λιπαρά οξέα σε μικροβιακά κύτταρα, το παλμιτικό (C16:0) και το στεατικό (C18:0), για να παράγει παλμιτελαϊκό (C16:1 n-7) ή ελαϊκό (C18:1 n-9), αντίστοιχα. Αν και η προτίμηση για την Δ9 αποκορεσμάση για αυτά

τα δύο πιθανά υποστρώματα ποικίλλει μεταξύ των συστημάτων, η Δ9 αποκορεσμάση στους μικροοργανισμούς φαίνεται να προτιμάει το C18:0 (Ratledge & Wynn, 2002).

Η Δ12 αποκορεσμάση καταλύει τη μετατροπή του ελαϊκού οξέος (C18:1 n-9), σε λινελαϊκό οξύ (18:2 n-6) με την εισαγωγή ενός διπλού δεσμού μεταξύ των ανθράκων 12 και 13 της αλυσίδας.

Το λινελαϊκό οξύ μετατρέπεται περαιτέρω σε α-λινολενικό οξύ (C18:3 n-3), το πιο απλό από τα ω-3 λιπαρά οξέα. Αντίδραση καταλυόμενη από την Δ15 αποκορεσμάση. Οι άνθρωποι, όπως και τα ζώα, δεν διαθέτουν αυτό το ένζυμο και ως εκ τούτου δεν μπορούν να συνθέσουν το α-λινολενικό οξύ. Παρόλα αυτά, έχουν την δυνατότητα να το μεταβολίσουν περαιτέρω μέσω αποκορεσμού και επιμήκυνσης της ανθρακικής αλυσίδας.



Σχήμα 1-3: Πορεία σχηματισμού πολυακόρεστων λιπαρών οξέων και τα ένζυμα που συμμετέχουν, (Πηγή: Ratledge & Lippmeier, 2017).

Όπως φαίνεται στο Σχήμα 1-3, το α-λινολενικό οξύ μπορεί να μετατραπεί σε στεαριδονικό οξύ (C18:4 n-3) από την Δ6 αποκορεσμάση προσθέτοντας έναν διπλό δεσμό μεταξύ των ατόμων άνθρακα 6 και 7.

Στη συνέχεια το στεαριδονικό οξύ μπορεί να επιμηκυνθεί στο εικοσιτετραενοϊκό οξύ (C20:4 n-3) και αυτό με μία αντίδραση αποκορεσμού μετατρέπεται στο εικοσιπενταενοϊκό οξύ (C20:5 n-3) γνωστό και ως EPA.

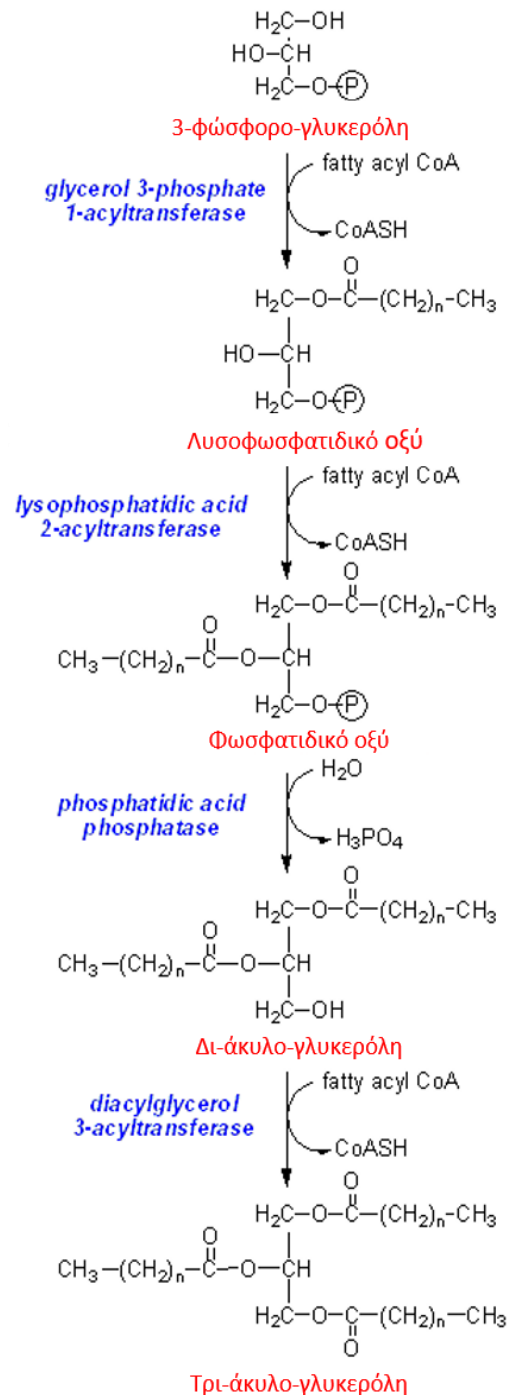
Το μονοπάτι για τη μετατροπή του EPA σε εικοσιδυεξαενοϊκό οξύ (C22:6 n-3, γνωστό ως DHA) περιλαμβάνει την προσθήκη δύο ατόμων άνθρακα στο EPA για να σχηματίσει εικοσιδυοπενταενοϊκό οξύ (C22:5 n-3, γνωστό ως DPA), προσθήκη δύο επιπλέον ατόμων άνθρακα προς το σχηματισμό του C24:5 n-3, αποκορεσμός στη θέση δέλτα-6 για σχηματισμό του C24:6 n-3, μετατόπιση του C24:6 n-3 από το ενδοπλασματικό δίκτυο σε υπεροξυσώματα όπου δύο άνθρακες αφαιρούνται με περιορισμένη β-οξείδωση για το σχηματισμό τελικώς του DHA (Ratlidge, 2004).

Εύκολα συμπεραίνουμε ότι το δυναμικό της ποσότητας και του τύπου των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων που παράγονται εξαρτάται από τα γονίδια των ελονγκασών και των αποκορεσμάσεων που υπάρχουν στο γονιδίωμα του αντίστοιχου ελαιογόνου μικροοργανισμού.

1.2.5 Σχηματισμός των TAG

Τα παραγόμενα λιπαρά οξέα, σπάνια εμφανίζονται ως έχουν στα κύτταρα λόγω της έμφυτης τοξικότητάς τους (Ratledge, 2013), για αυτό εστεροποιούνται με μόρια γλυκερόλης προς το σχηματισμό τρι-άκυλο-γλυκερολών (TAG) και διακινούνται μέσω του ενδοπλασματικού δικτύου προκειμένου να σχηματίσουν λιποσωμάτια (Ratledge, 2004). Οι TAGs παράγονται από το κύτταρο ως το κύριο αποθεματικό υλικό ενέργειας για μεταγενέστερο μεταβολισμό σε περίπτωση εξάντλησης του άνθρακα από το μέσο ανάπτυξης (Ratledge & Wynn, 2002).

Η σύνθεση των TAGs διεξάγεται κυρίως μέσω του μονοπατιού της φωσφορικής ακυλίωσης, γνωστό και ως βιοσυνθετική οδός Kennedy. Το πρώτο βήμα είναι η ακυλίωση της 3-φωσφορο-γλυκερόλης (G3P) με ένα μόριο acyl-CoA στη θέση sn1 από την 3-φωσφορο-γλυκερο-1-ακυλοτρανσφεράση, προς σχηματισμό του λυσοφωσφατιδικού οξέος (LPA). Το LPA ακυλιώνεται περαιτέρω με ένα ακόμη μόριο acyl-CoA στη θέση sn-2 και σχηματίζεται φωσφατιδικό οξύ (PA), αντίδραση καταλυόμενη από την λυσοφωσφατιδική-2-κυλοτρανσφεράση. Στη συνέχεια, με τη βοήθεια της φωσφατιδικής φωσφατάσης πραγματοποιείται αποφωσφορλίωση του φωσφατιδικού οξέος σε δι-άκυλο-γλυκερόλη (DAG) ακολουθούμενη από ένα τελικό στάδιο ακυλίωσης από την διάκυλο-γλυκερο-3-ακυλοτρανσφεράση και το σχηματισμό τελικώς τρι-άκυλο-γλυκερόλης (TAG).



Σχήμα 1-4: Πορεία σχηματισμού των τρι-άκυλο-γλυκερολών και τα ένζυμα που συμμετέχουν.

1.3 ΤΑ ΡUΦΑΣ ΣΤΗΝ ΔΙΑΤΡΟΦΗ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ

Καθώς τα λίπη είναι σε μεγάλο βαθμό υδρογονάνθρακες στη σύνθεσή τους αποδίδουν μεγάλες ποσότητες ενέργειας κατά τη διάρκεια του μεταβολισμού. Αποτελούν την πιο συμπυκνωμένη πηγή ενέργειας (37 kJ ή 9 kcal/g) που δύναται να καταναλωθεί και το ανθρώπινο σώμα έχει απεριόριστη ικανότητα να το αποθηκεύει (Sabikhi & Kumar, 2012). Ωστόσο, η σπουδαιότητα των διαιτητικών λιπαρών υλών υπερβαίνουν κατά πολύ τον ρόλο τους ως πηγές ενέργειας.

Τα λιπίδια είναι κρίσιμα για τη σωστή ανάπτυξη και επιβίωση κατά τα πρώτα στάδια της ζωής. Υπάρχουν αρκετές ενδείξεις ότι το λίπος είναι βασικό θρεπτικό συστατικό για την εμβρυϊκή ανάπτυξη, την πρώιμη ανάπτυξη μετά τη γέννηση, καθώς και κατά τη διάρκεια της βρεφικής και της παιδικής ηλικίας (Ratledge & Lippmeier 2017). Αποτελούν την κύρια πηγή ενέργειας στη βρεφική διατροφή και ειδικότερα αυτά που βρίσκονται φυσικά στο μητρικό γάλα. Είναι επίσης φορέας για τις λιποδιαλυτές βιταμίνες Α, D, Ε και Κ. Το λίπος αποτελεί το σημαντικότερο ενεργειακό απόθεμα στο σώμα. Το ενεργειακό περιεχόμενο του λιπώδους ιστού σε υγρή βάση είναι επτά έως οκτώ φορές υψηλότερο από αυτό του ιστού που περιέχει γλυκογόνο ή πρωτεΐνη. Καθώς το λίπος σχηματίζει ένα στρώμα ακριβώς κάτω από το δέρμα, παρέχει μόνωση και βοηθά στη διατήρηση της θερμοκρασίας του σώματος. Το λίπος απορροφά επίσης τα όργανα και τα προστατεύει από βλάβες, από πτώσεις, ή τραύματα. Η μυελίνη, το προστατευτικό περίβλημα που καλύπτει τους επικοινωνιακούς νευρώνες, αποτελείται από 30% πρωτεΐνη και 70% λίπος. Ένα από τα πιο κοινά λιπαρά οξέα στη μυελίνη είναι το ελαϊκό οξύ (C18:1), το οποίο είναι επίσης το πιο άφθονο λιπαρό οξύ στο ανθρώπινο γάλα και στη διατροφή μας (Sabikhi & Kumar, 2012).

Είναι γνωστό ήδη από τις αρχές του 20^{ου} αιώνα ότι κάποια πολυακόρεστα λιπαρά οξέα είναι απαραίτητα για την ευεξία των ανθρώπων. Υπάρχουν επίσης αρκετές μελέτες που δείχνουν ότι τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα μεγάλης αλυσίδας παίζουν σημαντικό ρόλο στην αντιμετώπιση ορισμένων ασθενειών. Ειδικότερα, τα λιπαρά οξέα της οικογένειας ω-3 και ω-6, εκτός ότι είναι απαραίτητα διαιτητικά λιπίδια, φαίνεται να έχουν ευεργετικά αποτελέσματα όσο αφορά στην πρόληψη και διαχείριση της στεφανιαίας νόσου (de Lorgeril *et al.*, 1999), της υπέρτασης (Appel *et al.*, 1994; Morris *et al.*, 1994), του τύπου 2 διαβήτη (Connor *et al.*, 1993; Raheja *et al.*, 1993), χρόνιας νεφρικής νόσου (de Caterina *et al.*, 1993; Donadio *et al.*, 1994), της ρευματοειδούς αρθρίτιδας (Kremer, 1996) της ελκώδους κολίτιδας (Stenson *et al.*, 1992) και της χρόνιας αποφρακτικής πνευμονοπάθειας (Shahar *et al.*, 1994).

- Το λινελαϊκό οξύ (C18:2 n-6) και το α-λινολενικό οξύ (C18:3 n-3) χαρακτηρίζονται ως απαραίτητα λιπαρά οξέα, καθώς δεν δύναται να τα συνθέσει το ανθρώπινο σώμα *de novo* και ως εκ τούτου πρέπει να λαμβάνονται μέσω της διατροφής. Παίζουν σημαντικό ρόλο κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης και της γαλουχίας. Αποτελούν επίσης δομικά στοιχεία για την ανάπτυξη του εγκεφάλου και του νευρικού συστήματος (Sabikhi & Kumar, 2012).

- Το γ-λινολενικό οξύ (GLA, C18:3 n-6) μπορεί να θεωρηθεί έμμεσα ως απαραίτητο λιπαρό οξύ καθώς σχηματίζεται από το λινελαϊκό οξύ (Σχήμα 1-3) το οποίο πρέπει να λαμβάνεται μέσω της διατροφής. Εκτός από τις διατροφικές του ιδιότητες υπάρχουν αρκετές αναφορές που η κατανάλωσή του συνδέεται με την αντιμετώπιση ασθενειών, συμπεριλαμβανομένης της πρόληψης της σκλήρυνσης των αρτηριών καθώς και άλλων φλεγμονών διαταραχών, των καρδιακών παθήσεων, της κίρρωσης, της ρευματοειδούς αρθρίτιδας, του ατοπικού εκζέματος και της υψηλής αρτηριακής πίεσης (Karoor & Nair, 2005; Wanasundara & Wanasundara, 2006; Horrobin, 1992; Belch & Muir, 1998). Περαιτέρω, σε σειρά πειραμάτων έχει δείχτει ότι τα άλατα λιπαρών οξέων του λιθίου ή του καλίου (fatty acid lithium salts - FALS και fatty acid potassium salts - FAPS) προερχόμενα από τα ολικά λιπίδια του ζυγομύκητα *Cunninghamella echinulata* (τα οποία περιέχουν GLA) εμφάνισαν κυτταροτοξικά αποτελέσματα έναντι των καρκινικών HL-60 κυττάρων (Alakhras *et al.*, 2015; Sayegh *et al.*, 2016). Το γ-λινολενικό οξύ μπορεί να μετατραπεί περαιτέρω σε δίχομο-γ-λινολενικό οξύ (DGLA, C20:3 ω-6) μέσω ενζύμων ελονγκασών. Το συγκεκριμένο οξύ αποτελεί πρόδρομο ουσία της προσταγλαδίνης 1 (PGE1) που το σώμα μας χρησιμοποιεί για την αντιμετώπιση των φλεγμονών (Fan & Charpin, 1998). Το DGLA μπορεί να υποστεί αποκορεσμό περαιτέρω σε αραχιδονικό οξύ [AA, C20:4 ω-6] με τη Δ5 αποκορεσμάση (Σχήμα 1-3). Ωστόσο, λόγω της περιορισμένης δραστηριότητας της Δ5 αποκορεσμάσης στους ανθρώπους, μόνο ένα μικρό ποσοστό από το DGLA μετατρέπεται σε AA. Αυτά τα δεδομένα δείχνουν ότι σε πολλούς τύπους κυττάρων, το DGLA, το προϊόν της ελονγκάσης του GLA, αλλά όχι το AA, συσσωρεύεται μετά από κατανάλωση του GLA (Wang *et al.*, 2012).

- Το αραχιδονικό οξύ (ARA C20:4 n-6) είναι ένα πολυακόρεστο λιπαρό οξύ μεγάλης αλυσίδας με 20 άτομα άνθρακα και θεωρείται αναμφισβήτητα το πιο σημαντικό ω-6 λιπαρό οξύ καθώς είναι ο κύριος πρόδρομος των προφλεγμονωδών προσταγλανδινών και των λευκοτριενίων. Αν και γενικά δεν συνιστάται για συμπλήρωση σε ενήλικες (που καταναλώνουν λιπαρά ωμέγα-6 σε περίσσεια), το ARA θεωρείται απαραίτητο για την ανάπτυξη ανοσολογικών λειτουργιών σε νεογέννητα μωρά. Το ARA σε συνδυασμό με το DHA (εικοσιδυεξανεννοϊκό οξύ C22:6 n3) είναι γνωστά για τα οφέλη τους για την βρεφική ανάπτυξη. Τα δύο αυτά λιπαρά οξέα βρίσκονται φυσικά στο μητρικό γάλα. Αυτός είναι ο πρωταρχικός λόγος για την ένταξή του μαζί με το DHA στις περισσότερες βρεφικές συνταγές

(Ratledge & Lippmeier, 2017). Ένας άλλος λόγος του συνδυασμού ARA και DHA βασίζεται στην παρατήρηση ότι κάθε μεμονωμένο PUFA με 20- ή 22 άτομα άνθρακα (ARA ή DHA) προκαλεί καταστολή μιας βασικής αποκορεσμάσης που εμπλέκεται στη μετατροπή των PUFAs με 18 άτομα άνθρακα στα προϊόντα τους με 20 ή 22 άτομα άνθρακα (Brenna, 2016; Hadley, *et al.*, 2016).

- Λιπαρά οξέα μεγάλης αλυσίδας όπως το εικοσιπενταενοϊκό οξύ (EPA C20:5 n-3) και το εικοσιδυεξανενοϊκό οξύ (DHA C22:6 n3) εκτελούν σημαντικούς ρόλους για το σώμα μας. Μετατρέπονται σε ομάδα εικοσανοειδών όπως είναι προσταγλανδίνες, θρομβοξάνες, λευκοτριένια, λιποξίνες, υδρόξυ- και υδρουπερόξυ- εικοσιτετραενοϊκά οξέα. Έχει πλέον αναγνωριστεί ότι τα εικοσανοειδή αυτά που παράγονται από τα λιπαρά οξέα συμμετέχουν στην ενεργοποίηση και την επίλυση της φλεγμονώδους διαδικασίας (Calder, 2006), αποτρέπουν την συσσώρευση αιμοπεταλίων και προάγουν την αγγειοδιαστολή (Serhan, 2005; Cottin *et al.*, 2011; Lands, 2014). Υπάρχουν ευεργετικά αποτελέσματα για την αποκατάσταση ασθενών που έχουν υποστεί οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου με υψηλές δόσεις αυτών των ω-3 λιπαρών οξέων (Heydari *et al.*, 2016). Έλαια τα οποία περιέχουν EPA και DHA έχουν προταθεί επίσης για την θεραπεία του εκφυλισμού της ωχράς κηλίδας καθώς και άλλες ασθένειες των ματιών που σχετίζονται με την ηλικία (SanGiovani *et al.*, 2009; Kraus & Pruit, 2015). Αυτό στηρίζεται στο γεγονός ότι το DHA βρίσκεται στη μεμβράνη του αμφιβληστροειδή του ματιού. Αποτελεί επίσης κυρίαρχο στοιχείο στα λιπίδια του εγκεφάλου και για αυτό προτείνεται η συμπερίληψη του DHA στη διατροφή των πρώων και νεογέννητων μωρών καθώς και των μικρών παιδιών.

Οι κύριες πηγές λιπιδίων που καταναλώνονται ως τρόφιμα είναι ζωικοί ιστοί και φυτικές πηγές όπως ελαιούχοι σπόροι, σπόροι και ξηροί καρποί λαχανικών και φρούτων (Πίνακας 1-2). Οι ζωικές πηγές λιπών, ιδίως το κόκκινο κρέας, τα μεταποιημένα κρέατα και τα γαλακτοκομικά προϊόντα, είναι πλούσια σε κορεσμένα λιπαρά και συνήθως στη συνολική ποσότητα λίπους που παρέχεται. Τα φυτικά τρόφιμα όπως ξηροί καρποί, προϊόντα ολικής άλεσης και φυτικά έλαια σπόρων έχουν γενικά υψηλή περιεκτικότητα σε πολυακόρεστα και μονοακόρεστα λιπαρά. Τα ψάρια και ειδικότερα τα λιπαρά ψάρια όπως είναι η ρέγκα, το σκουμπρί, ο σολομός, η πέστροφα κ.α., αντιπροσωπεύουν μια πλούσια πηγή σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα μεγάλης αλυσίδας (Πίνακας 1-2) και συνίσταται να τα συμπεριλαμβάνουμε στη δίαιτά μας. Ωστόσο υφίσταται κάποια προσοχή και να μην καταναλώνονται πάνω από δύο φορές την εβδομάδα, καθώς τα ιχθυέλαια μπορεί να περιέχουν ανεπιθύμητες ποσότητες περιβαλλοντικών ρύπων που λαμβάνονται από τα ψάρια. Περιεχόμενα βαρέων μετάλλων, συμπεριλαμβανομένου του υδραργύρου και των

διοξινών έχουν αναφερθεί σε ιχθυέλαια (Christophe *et al.*, 2019). Επίσης, τα έλαια που προέρχονται από τα ψάρια είναι πάντα μίγματα DHA και EPA σε διάφορες αναλογίες και δεν ενδείκνυται η χρήση τους σε ορισμένες εφαρμογές και ειδικότερα για ενσωμάτωση σε βρεφικές τροφές καθώς οδηγεί στη συνέχεια στην παραγωγή ανεπιθύμητων προσταγλανδινών και υδροξυ-PUFAs.

Πίνακας 1-2: Κορεσμένα λιπαρά οξέα μικρής (SCFA), μέτριας (MCFA), μεγάλης (LCFA) και πολύ μεγάλης (VLCFA) ανθρακικής αλυσίδας και κάποια από τα σημαντικότερα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFAs) σε αντιστοιχία με τις φυτικές και ζωικές πηγές από τις οποίες μπορούμε να τα λάβουμε (Πηγή: Sabikhi & Kumar, 2012).

Διατροφικά λιπίδια	Πηγή
SFAs	
SCFA (C3-C7)	Γαλακτοκομικά
MCFAs (C8-C13)	Γαλακτοκομικά, Λάδι καρύδας, Φοινικοκυρηνέλαιο
LCFAs (C14-C20)	Γαλακτοκομικά, ζωικά λίπη, Μαγειρικό λίπος, Φοινικέλαιο, Αραχιδέλαιο
VLCFAs (C21 και πάνω)	Αραχιδέλαιο
PUFAs	
Λινελαϊκό οξύ 18:2(ω-6)	Ηλίανθος, Κενταύριο, Καλαμποκέλαιο, Σόγια
α-Λινολενικό οξύ 18:3(ω-3)	Λινέλαιο, Ελαιοκράμβη, Σογιέλαιο, Καρύδια
γ-Λινολενικό οξύ 18:3(ω-6)	Νυχτολούλουδο, Μπουράντζα, Μαύρο φραγκοστάφυλο
Στεαριδονικό οξύ 18:4(ω-3)	Έλαια ψαριών, Μαύρο φραγκοστάφυλο, Έλαιο κάνναβης
Αραχιδονικό οξύ 20:4(ω-6)	Άπαχο κρέας, λιπίδια αυγού, ψάρια
EPA 20:5(ω-3)	Λιπαρά ψάρια (σολομός, ρέγκα, γαύρος, σκουμπρί, οσμηρίδα), οστρακόδερμα
DHA 22:6(ω-3)	Λιπαρά ψάρια (σολομός, ρέγκα, γαύρος, σκουμπρί, οσμηρίδα), οστρακόδερμα

Η προμήθεια των κυριότερων PUFAs μακράς αλυσίδας, DHA και EPA, ως μεμονωμένες οντότητες, είναι επομένως εξαιρετικά περιορισμένες και, εάν παράγονται από ιχθυέλαια, καθίστανται απαγορευτικά ακριβές καθώς ο τελικός καθαρισμός τους βασίζεται σε υγρή

χρωματογραφία υψηλής απόδοσης προπαρασκευαστικής κλίμακας. Επιπλέον, υπάρχει ένα πρόβλημα στη συμπλήρωση βρεφικών παρασκευασμάτων με έλαια πλούσια σε DHA, καθώς το DHA μετατρέπεται σε EPA και αυτό, για λόγους που αναφέραμε, δεν είναι επιθυμητό. Για να αποφευχθεί αυτή η μετατροπή, έχει κριθεί σκόπιμο να συμπεριληφθεί το αραχιδονικό οξύ (ARA) μαζί με το DHA στα συμπληρώματα διατροφής για βρέφη. Υπάρχει επομένως η ανάγκη για την παραγωγή ποικίλων λιπιδίων που θα είναι πλούσια σε ένα ή περισσότερα από τα διάφορα PUFAs και ειδικότερα τα μεγάλης αλυσίδας με 20 και 22 άτομα άνθρακα.

Η πλειοψηφία των λιπαρών υλών προέρχεται όπως αναφέραμε από τα φυτά και τα ζώα και μόνο ένα μικρό μέρος αυτών παράγεται μέσω βιοτεχνολογικών μεθόδων από μικροοργανισμούς. Η αύξηση της εκτίμησης της θρεπτικής αξίας των PUFAs στη διατροφή του ανθρώπου και των εφαρμογών τους στην κλινική ιατρική, έχει εστιάσει την προσοχή στις πιθανές εναλλακτικές πηγές τους. Για αυτόν τον λόγο, τα τελευταία 25 χρόνια έχει γίνει σημαντική δουλειά στην παραγωγή μεμονωμένων PUFAs με χρήση μικροβιακής τεχνολογίας. Ορισμένοι μικροοργανισμοί αποδείχθηκαν εξαιρετικά καλές πηγές αυτών των λιπαρών οξέων με αποτέλεσμα η εμπορική παραγωγή πολλών PUFAs να πραγματοποιείται τώρα χρησιμοποιώντας τεχνολογία ζύμωσης μεγάλης κλίμακας με πολλές εφαρμογές στη βιομηχανία τροφίμων και φαρμάκων (Ratlidge, 2013; Ratlidge & Lippmeier, 2017).

1.4 ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ

Η ιστορία των μικροβιακών ελαίων ξεκινάει αρκετά χρόνια πίσω, ήδη από τα τέλη του 19^{ου} αιώνα (Ficinus, 1873; Nageli & Loew, 1878; Nageli & Loew, 1880). Αρχικά, η σκέψη που υπήρχε ήταν να χρησιμοποιηθούν μικροοργανισμοί ως εναλλακτικές πηγές ελαίων και λιπών για κατανάλωση από τον άνθρωπο (Ratledge, 2010). Κυρίως είδη ζυμών και μυκήτων τα οποία παρήγαγαν μεγάλες ποσότητες εδωδιμων ελαίων σχεδόν όμοια με εκείνα που προέρχονται από το βασίλειο των φυτών.

Οι μεγαλύτερες προσπάθειες έγιναν από πλευράς Γερμανίας κατά τη διάρκεια τόσο του πρώτου όσο και του δεύτερου παγκοσμίου πολέμου ώστε να αναπτυχθούν οι διαδικασίες που θα παρείχαν χρήσιμες ποσότητες ελαίων και λιπών, καθώς την εποχή εκείνη δεν είχαν τη δυνατότητα να προμηθευτούν τέτοια προϊόντα (Linder, 1922; Ratledge & Wynn, 2002). Ενδιαφέρον σχετικά με τις εμπορικές πτυχές της ανάπτυξης μικροβιακών ελαίων ανέπτυξαν και άλλες χώρες στη συνέχεια. Ωστόσο, μετά τις τεράστιες εξελίξεις που συνέβησαν στη γεωργία κατά το δεύτερο μισό του 20^{ου} αιώνα, έγινε αντιληπτό ότι τα έλαια και τα λίπη που προέρχονταν από μικροοργανισμούς δεν θα ήταν ποτέ σε θέση να ανταγωνιστούν όσον αφορά στην τιμή με τα χύδην βασικά έλαια, όπως είναι το σογιέλαιο, το ηλιέλαιο και αργότερα το κραιβέλαιο. Η ανάπτυξη μεγάλης κλίμακας παραγωγής μικροβιακών ελαίων περιορίστηκε επίσης από την έλλειψη διαθεσιμότητας μεγάλων ζυμωτήρων για την ανάπτυξη βιομάζας σε υψηλές πυκνότητες καθώς την εποχή εκείνη ήταν σπάνιοι. Έτσι το ενδιαφέρον για την ανάπτυξη μικροβιακών ελαίων μέσω βιοτεχνολογικών διεργασιών έπαυσε. Παρόλα αυτά, από το 1920 έως το 1950 έγινε σημαντική δουλειά και έθεσε τα θεμέλια ώστε να κατανοήσουμε τον τρόπο με τον οποίο οι μικροοργανισμοί παράγουν λιπίδια. (Ratledge, 2010).

Το μεγαλύτερο ερέθισμα για την ανάπτυξη τεχνολογίας που θα επέτρεπαν ζυμώσεις σε μεγάλη κλίμακα ήταν πιθανώς η έλευση της παραγωγής μονοκυτταρικής πρωτεΐνης. Στα τέλη του 1950 και στις αρχές του 1960 ξεκίνησε να διερευνάται η καλλιέργεια επιλεγμένων ζυμών (ειδικότερα το είδος *Yarrowia lipolytica* γνωστό και παλαιότερα ως *Candida lipolytica*) σε φθηνά υποστρώματα τύπου υδρογονανθράκων που προέρχονταν από διυλιστήρια πετρελαίου. Η έννοια υιοθετήθηκε από τις περισσότερες μεγάλες πετρελαϊκές εταιρείες, κυρίως από την BP της Αγγλίας, ως ένα απλό μέσο παραγωγής φθηνών ζωοτροφών πλούσιες σε πρωτεΐνη και δεν εξαιρέθηκε η χρήση της για κατανάλωση από τον άνθρωπο. Καθώς οι κατασκευαστές αισθάνθηκαν ανήσυχτοι να περιγράψουν το προϊόν ως μικροβιακή πρωτεΐνη, δημιουργήθηκε ο όρος «Μονοκυτταρική πρωτεΐνη» (Single Cell Protein) (Ratledge, 2010). Ο όρος αυτός είχε σκοπό να μετριάσει τους φόβους σχετικά με την κατανάλωση μικροβίων

καθώς στο μυαλό των περισσότερων ανθρώπων είναι πιθανώς επιβλαβές. Σημαντικό κομμάτι της περιόδου αυτής είναι ότι αναπτύχθηκαν συστήματα για υγρές μικροβιακές καλλιέργειες σε αναδεδυμένους ζυμωτήρες αντικαθιστώντας τις παλιές στατικές καλλιέργειες. Τα νέα αυτά συστήματα ώθησαν την επιστήμη της Βιοτεχνολογίας όχι μόνο για την παραγωγή μονοκυτταρικής πρωτεΐνης και ελαίου αλλά και για την παραγωγή αντιβιοτικών, αμινοξέων και οργανικών οξέων μέσω μικροβιακών ζυμώσεων (Ratledge, 2010).

Με την έλευση των νέων τεχνολογιών επανεμφανίστηκε το ενδιαφέρον για την παραγωγή ελαίων από μικροοργανισμούς, κυρίως ζύμες και μύκητες οι οποίοι φαίνονταν να έχουν την ιδιότητα να συσσωρεύουν μεγάλα ποσοστά ενδοκυτταρικών ελαίων και η παραγωγή αυτών σε μεγάλη κλίμακα θα ήταν οικονομικά βιώσιμη (Ratledge, 1968a, 1968b; Thorpe & Ratledge, 1972).

Η άλλη κύρια εξέλιξη που εμφανίστηκε στις αρχές της δεκαετίας του 1960, η οποία ήταν πολύ σημαντική για τη μελέτη των μικροβιακών ελαίων, ήταν η ανάπτυξη της αέριας χρωματογραφίας η οποία έδωσε στους ερευνητές τη δυνατότητα να αναλύουν τη σύσταση των ελαίων γρήγορα και χρησιμοποιώντας πολύ μικρή ποσότητα δείγματος (Ratledge, 2010).

Παρόλο τη σημαντική δουλειά που είχε γίνει εργαστηριακά ώστε να κατανοήσουν τους μηχανισμούς με τους οποίους οι μικροοργανισμοί παράγουν έλαια με σκοπό να τελειοποιήσουν τη διαδικασία αυτή, στην αγορά δεν υπήρχε ξεκάθαρος στόχος ώστε τα μικρή κλίμακας προγράμματα να μετατραπούν σε βιομηχανικά.

Αρχικά ο Shaw (Shaw, 1965) και στη συνέχεια ο Ratledge (Ratledge, 1976) ήταν αυτοί που μελέτησαν την παρουσία ασυνήθιστων τύπων λιπιδίων, ασυνήθιστων λιπαρών οξέων ακόμα και ασυνήθιστων συνδυασμών λιπαρών οξέων στους μύκητες (περισσότερα από 300 είδη σε έξι χρόνια), τα οποία θα μπορούσαν να καταστήσουν τα μυκητιακά έλαια αρκετά ελκυστικά για την αγορά. Ο Ratledge δανείστηκε τον όρο Single Cell Protein που χρησιμοποιούταν για τα μικροβιακά προϊόντα πρωτεΐνης και τον χρησιμοποίησε για να περιγράψει τα βρώσιμα έλαια που παράγονται από τους μικροοργανισμούς ως Single Cell Oils (SCOs), δηλαδή έλαια μονοκυτταρικών οργανισμών (Ratledge, 1976). Ένας όρος που επικρατεί μέχρι τις μέρες μας.

Μέχρι εκείνη την περίοδο επικρατούσε η σκέψη για αντικατάσταση των φυτικών ελαίων με τα μικροβιακά. Η παρουσία ωστόσο υψηλών συγκεντρώσεων γ-λινολενικού οξέος σε ορισμένα είδη προσέδωσε το ενδιαφέρον για τη χρήση των μικροβιακών ελαίων ως πηγές αυτού του διαιτητικού βασικού λιπαρού οξέος. Το γ-λινολενικό οξύ συλλεγόταν αποκλειστικά από το έλαιο που περιέχουν οι καρποί του φυτού *Oenothera biennis* (κοινώς

νυχτολούλουδο) σε ποσοστό μόλις 8% επί των συνολικών ελαίων και καθώς η ζήτησή του συνεχώς αυξανόταν, λόγω των ισχυρισμών για τα πολλά πλεονεκτήματά του στην υγεία, επακόλουθο ήταν και η αύξηση της τιμής του ενώ ταυτόχρονα η ζήτηση άρχισε να ξεπερνάει την προμήθεια. Καθώς ήταν ήδη γνωστή η εμφάνιση του γ-λινολενικού οξέος σε ορισμένα είδη μυκήτων (Shaw, 1966) αναμενόμενα έγινε ακόμα πιο ελκυστική μία εναλλακτική βιοτεχνολογική οδός για την παραγωγή του.

Η πρώτη μεγάλης κλίμακας ζύμωση για την εμπορική παραγωγή του γ-λινολενικού οξέος πραγματοποιήθηκε το 1985 από την J. & E. Sturge Ltd στο Σέλμπι, στο Νότιο Γιορκσαϊρ του Ηνωμένου Βασιλείου με τέσσερις ζυμωτήρες των 220 m³ στη διάθεσή τους, οι οποίοι χρησιμοποιούνταν για την παραγωγή κιτρικού οξέος. Αρχικά τρία στελέχη μυκήτων τα οποία σύμφωνα με εργαστηριακές μελέτες παρήγαγαν σε μεγαλύτερο ποσοστό ενδοκυτταρικό λίπος και γ-λινολενικό οξύ αναπτύχθηκαν σε ζυμωτήρες πιλοτικής κλίμακας, μεγέθους 10 με 15 m³ ώστε να παρέχουν τις πληροφορίες για την επιλογή του καταλληλότερου στελέχους. Τελικώς, ο μικροοργανισμός *Mucor circinelloides* (γνωστός και ως *Mucor Javanicus*), το στέλεχος 119, ήταν αυτός που επιλέχθηκε για την παραγωγή γ-λινολενικού οξέος για πρώτη φορά σε βιομηχανική κλίμακα. Το έλαιο του *Javanicus*, όπως έγινε γνωστό, δεν είχε τόσο μεγάλη απήχηση στην αγορά, παρόλο που ήταν ανώτερο σε πολλά επίπεδα από το έλαιο νυχτολούλουδου.

Η πρώτη αυτή προσπάθεια παραγωγής και εμπορευματοποίησης γ-λινολενικού οξέος από μικροοργανισμούς δεν επέφερε εύλογο κέρδος στους παραγωγούς, κάτι που κατέληξε στον τερματισμό της διαδικασίας το 1990. Ωστόσο, υπήρξε σημαντικό ορόσημο στην ανάπτυξη και την παραγωγή πολλών άλλων μικροβιακών ελαίων καθώς και η αξιολόγησή του ως ασφαλούς και αξιόπιστου ελαίου βοήθησε τα επερχόμενα μονοκυτταρικά έλαια να γίνουν εξίσου αποδεκτά από τις ρυθμιστικές αρχές ως κατάλληλα για ανθρώπινη κατανάλωση (Ratledge and Wynn, 2002, Ratledge, 1982, 2005, 2010, 2013).

1.5 ΜΥΚΗΤΕΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΕΛΑΙΟΥ

Με την άφιξη των μικροβιακών ελαίων στην αγορά το 1985, σταδιακά έγιναν αυξανόμενης σημασίας και αξίας στην εξειδικευμένη αγορά διατροφικών φαρμακευτικών προϊόντων υψηλής αξίας. Τα τελευταία χρόνια το ερευνητικό ενδιαφέρον έχει στραφεί σε μικροοργανισμούς οι οποίοι έχουν τη δυνατότητα να συσσωρεύουν μεγάλες ποσότητες λιπιδίων. Τέτοιοι μικροοργανισμοί είναι κυρίως μύκητες και μικροφύκη οι οποίοι παράγουν λιπίδια με υψηλή περιεκτικότητα σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFAs) όπως γ-λινολενικό οξύ (GLA), αραχιδονικό οξύ (ARA), εικοσιδυεξαενοϊκό οξύ (DHA) και εικοσαπεντανοϊκό οξύ (EPA) τα οποία συγκεντρώνουν το μεγαλύτερο ενδιαφέρον καθώς είναι γνωστό ότι έχουν μια σειρά από φαρμακευτικές εφαρμογές. Τα έλαια που παράγονται από τους ελαιογόνους μύκητες και τα μικροφύκη, παρουσιάζουν μεγαλύτερη ακορεστότητα σε σχέση με εκείνα που παράγονται από ελαιογόνες ζύμες λόγω της υψηλότερης ενεργότητας ενζύμων που είναι υπεύθυνα για τον σχηματισμό αυτών των PUFAs (Σχήμα 1-3) (Ratledge & Wynn, 2002). Ορισμένοι από αυτούς τους οργανισμούς έχουν αναπτυχθεί στο εμπόριο ως εναλλακτικές πηγές πολυακόρεστων λιπαρών οξέων, με πωλήσεις αρκετών χιλιάδων τόνων ετησίως (Beligon *et al.*, 2016; Ratledge, 2013).

Τα μυκητιακά λιπίδια αποτελούν μια πιθανή πηγή εδώδιμου λίπους καθώς είναι πλούσια σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα. Αρκετά είδη νηματοειδών μυκήτων έχουν την ικανότητα να συσσωρεύουν μεγάλες ποσότητες λιπιδίων και ειδικότερα στελέχη του γένους *Mortierella* έχουν αναφερθεί ως πολλά υποσχόμενες πηγές μονοκυτταρικού ελαίου πλούσιο σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα ιατρικού και διαιτητικού ενδιαφέροντος (Sakuradani *et al.*, 2009; Ratledge, 1982; Hansson & Dostalek 1988; Papanikolaou & Aggelis, 2019; Papanikolaou *et al.*, 2004a,b; Gao *et al.*, 2014). Διάφοροι τύποι υδατανθράκων που χρησιμοποιούνται ως πρώτες ύλες για την παραγωγή μονοκυτταρικού ελαίου προέρχονται από αγρό-βιομηχανικές δραστηριότητες. Η παραγωγή μονοκυτταρικού ελαίου γίνεται αρκετά ελκυστική όταν αυτές οι οργανικές πρώτες ύλες που χρησιμοποιούνται έχουν πολύ μικρό έως μηδενικό κόστος καθώς χαρακτηρίζονται ως παραπροϊόντα της γραμμής παραγωγής ή «απόβλητα». Τέτοια υλικά μπορεί να είναι η σακχαρόζη και η μελάσα από ζαχαροκάλαμα και ζαχαρότευτλα, προϊόντα υδρόλυσης αμύλου όπως γλυκόζη και δεξτρίνες, φρουκτόζη που προέρχεται από ινουλίνη, ορό γάλακτος (ένα παραπροϊόν της παραγωγής τυριού) και, τέλος, διάφορα φυσικά υδρολύματα (π.χ. υδρολύματα απορριμμάτων τομάτας, υδρόλυση κόκκων ρυζιού κ.λπ) (Chatzifragkou *et al.*, 2010).

Πίνακας 1-3: Βιβλιογραφική αναφορά της παραχθείσας ξηρής βιομάζας (DW, gL⁻¹) και το ποσοστό λίπους επί της ξηρής βιομάζας (TL % w/w) από είδη μυκήτων που έχουν χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή λιπιδίων με διαφορετικές πηγές άνθρακα σε κωνικές φιάλες και βιοαντιδραστήρα.

Είδη μυκήτων	Καλλιέργεια	Πηγή άνθρακα	DW (gL ⁻¹)	TL (% w/w)	Παραπομπή
<i>Mortierella isabellina</i>	Φιάλες 250 ml	Γλυκερόλη 80%	6,20	53,2	Fakas <i>et al.</i> , 2009a
<i>Mortierella isabellina</i>	Φιάλες 250 ml	Ξυλόζη	9,5	64,2	Fakas <i>et al.</i> , 2009b
<i>Mortierella isabellina</i>	Φιάλες 250 ml	Γλυκόζη	27,0	44,6	Fakas <i>et al.</i> , 2009b
<i>Mortierella isabellina</i>	Φιάλες 250 ml	Γλυκόζη	13,5	56,0	Papanikolaou <i>et al.</i> , 2004a
<i>Mortierella isabellina</i>	Φιάλες 250 ml	Γλυκόζη/Ξυλόζη	15,6	59,7	Gardeli <i>et al.</i> , 2017
<i>Mortierella isabellina</i>	Φιάλες 250 ml	Ορός γάλακτος	32,0	25,3	Vamvakaki <i>et al.</i> , 2010
<i>Mortierella ramanniana</i>	Φιάλες 250 ml	Γλυκερόλη 98%	7,2	44,1	Bellou <i>et al.</i> , 2012
<i>Mortierella ramanniana</i>	Φιάλες 300 ml	Φρουκτόζη	12,0	24,9	Hansson & Dostálek, 1988
<i>Mortierella ramanniana</i>	Φιάλες 300 ml	Ξυλόζη	8,0	15,4	Hansson & Dostálek, 1988
<i>Mortierella ramanniana</i>	Βιο/στήρας	Γλυκόζη	62,3	50,5	Hiruta <i>et al.</i> , 1997
<i>Mortierella ramanniana</i>	Φιάλες 250 ml	Γλυκερόλη 81%	9,3	42,0	Papanikolaou <i>et al.</i> , 2016
<i>Thamnidium elegans</i>	Βιο/στήρας	Γλυκόζη	30,1	46,1	Zikou <i>et al.</i> , 2013
<i>Thamnidium elegans</i>	Φιάλες 250 ml	Γλυκόζη	31,9	15,0	Zikou <i>et al.</i> , 2013
<i>Thamnidium elegans</i>	Φιάλες 250 ml	Γλυκερόλη 80%	7,0	40,1	Chatzifragkou <i>et al.</i> , 2011a
<i>Thamnidium elegans</i>	Φιάλες 250 ml	Γλυκερόλη 98%	2,5	37,2	Bellou <i>et al.</i> , 2012
<i>Thamnidium elegans</i>	Φιάλες 250 ml	Γλυκερόλη 80%	20,9	38,3	Fakas <i>et al.</i> , 2009a
<i>Thamnidium elegans</i>	Φιάλες 250 ml	Σουκρόζη	13,3	70,0	Papanikolaou <i>et al.</i> , 2010
<i>Cunninghamella echinulata</i>	Φιάλες 250 ml	Γλυκερόλη 80%	6,6	19,5	Fakas <i>et al.</i> , 2009b
<i>Cunninghamella echinulata</i>	Φιάλες 250 ml	Ξυλόζη	3,4	64,2	Fakas <i>et al.</i> , 2009b
<i>Cunninghamella echinulata</i>	Φιάλες 250 ml	Γλυκερόλη 98%	3,9	31,7	Bellou <i>et al.</i> , 2012
<i>Cunninghamella echinulata</i>	Φιάλες 250 ml	Άμυλο	31,3	24,7	Chen & Chang, 1996
<i>Cunninghamella echinulata</i>	Φιάλες 250 ml	Γλυκόζη	8,9	49,0	Gema <i>et al.</i> , 2002

Από την άλλη μεριά, η παραγωγή μικροβιακών ελαίων σε μεγάλη κλίμακα φαίνεται να είναι αρκετά δαπανηρή σε σχέση με τα φυτικής προέλευσης έλαια (Kumar *et al.*, 2019; Koutinas *et al.*, 2014). Αυτό συμβαίνει κυρίως λόγω της χαμηλής παραγωγικότητας των ελαιογόνων μικροοργανισμών, το υψηλό κόστος των ζυμώσεων και των ακριβών πρώτων υλών που χρησιμοποιούνται όπως είναι η γλυκόζη (Ratlidge & Lippmeier, 2017). Ωστόσο, η δυνατότητα παραγωγής μονοκυτταρικών ελαίων σε μεγάλη κλίμακα εξακολουθεί να υπάρχει, καθώς η τιμή των ελαίων κυμαίνεται ανάλογα με τα λιπαρά οξέα από τα οποία αποτελούνται (Paranikolaou & Aggelis, 2019).

Η αξιοποίηση μελλοντικά διαφόρων τύπων αποβλήτων ή βιομηχανικών υπολειμμάτων ως πρώτες ύλες για την παραγωγή λιπιδίων τα οποία παρουσιάζουν ενδιαφέρουσα δομή και σύνθεση, με την ταυτόχρονη παραγωγή μικροβιακών ενώσεων που παράγονται μέσω μη ανταγωνιστικών οδών θα μπορούσαν να αυξήσουν τη βιωσιμότητα της διαδικασίας. Ταυτόχρονα, η παραγωγή προϊόντων μέσω ζύμωσης αποτελεί μία οικολογική και φιλική προς το περιβάλλον διαδικασία (Paranikolaou & Aggelis, 2011, 2019).

1.6 ΔΟΜΗ ΤΩΝ ΜΥΚΗΤΩΝ

Οι μύκητες αποτελούν μια πολυάριθμη ομάδα ευκαρυωτικών οργανισμών, το δεύτερο σε πλήθος ειδών στον πλανήτη μετά τα έντομα και συγκροτούν ένα από τα πέντε βασίλεια. Ένα χαρακτηριστικό που διαχωρίζει τους μύκητες από τα φυτά τα βακτήρια και μερικά πρώτιστα είναι η δομή του κυτταρικού τους τοιχώματος που αποτελείται κυρίως από χιτίνη. Ένας γραμμικός πολυσακχαρίτης αποτελούμενος από μόρια N-ακέτυλο-γλυκοζαμίνης ενωμένα με β-1,4 δεσμούς. Ένα συστατικό που αποτελεί και το κύριο συστατικό του εξωσκελετού των αρθροπόδων καθώς και του κελύφους των καρκινοειδών. Το κυτταρικό τοίχωμα αποτελείται επίσης από β-γλυκάνη (πολυσακχαρίτη της D-γλυκόζης με β-1,3 και β-1,6 δεσμούς), μαννάνη και κυτταρίνη (Ruiz-Herrera, 1991).

Η κυτταροπλασματική μεμβράνη ομοιάζει με αυτή των ανώτερων οργανισμών. Αποτελείται από την εργοστερόλη αντί της χοληστερόλης που υπάρχει στα ζωικά κύτταρα, η οποία αποτελεί μάλιστα το πεδίο δράσης των αντιμυκητιακών φαρμάκων (π.χ. αμφοτερυσίνη Β). Το μυκητιακό κύτταρο περιλαμβάνει όλα τα κυτταροπλασματικά οργανίδια που διαθέτει και ένα φυτικό κύτταρο (αυτό οδήγησε αρχικά τους βιολόγους να κατατάξουν εσφαλμένα τους μύκητες στο βασίλειο των φυτών) πλην των χλωροπλαστών (McLaughlin *et al.*, 2009). Ως εκ τούτου οι μύκητες δεν φωτοσυνθέτουν. Είναι χημειοετερότροφοι οργανισμοί: απορροφούν τα απλά διαλυτά θρεπτικά συστατικά από το περιβάλλον μέσω του κυτταρικού τους

τοιχώματος και μεμβράνης ενώ μπορούν να διασπάσουν σύνθετα οργανικά πολυμερή, με τη βοήθεια έξω-ενζύμων. Αποικίζουν τα περισσότερα ενδιαιτήματα στη γη, προτιμώντας σκοτεινές, υγρές συνθήκες. Μπορούν να ευδοκιμήσουν σε φαινομενικά εχθρικά περιβάλλοντα, όπως η τούνδρα. Ωστόσο, τα περισσότερα μέλη των μυκήτων αναπτύσσονται στο έδαφος όπου το σκοτεινό και υγρό περιβάλλον είναι πλούσιο σε αποσυντεθειμένα υπολείμματα από φυτά και ζώα. Σε αυτά τα περιβάλλοντα, οι μύκητες διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο για την ισορροπία του οικοσυστήματος ως αποσυνθέτες και ανακυκλωτές (Hawksorth, 1991; Naranjo-Ortiz & Gabaldón, 2019). Έχουν την ικανότητα να διασπούν σύνθετες οργανικές ενώσεις, καθιστώντας δυνατό στα μέλη των άλλων βασιλείων να τροφοδοτούνται με βασικά θρεπτικά συστατικά όπως ο άνθρακας, το άζωτο και ο φωσφόρος. Εκτός από την αναπλήρωση του περιβάλλοντος με θρεπτικά συστατικά και τη διατήρηση ενός βιώσιμου οικοσυστήματος, οι μύκητες αλληλοεπιδρούν άμεσα με άλλους οργανισμούς. Προκειμένου να αναπτυχθούν συμμετέχουν σε συμβιωτικές σχέσεις με άλλους οργανισμούς, κυρίως φυτά, με ευεργετικούς, αλλά μερικές φορές με επιβλαβείς τρόπους. Είτε παρουσιάζεται το φαινόμενο του μούτουαλισμού, όπου επωφελούνται και ο ξενιστής και ο μύκητας, είτε έχουμε φαινόμενα παρασιτισμού, επωφελείται δηλαδή μόνο ο μύκητας εις βάρος του ξενιστή.

Η ταξινόμηση των μυκήτων έχει διαφοροποιηθεί σημαντικά τα τελευταία χρόνια. Αρχικά είχε προταθεί ο διαχωρισμός τους, βάσει των μορφολογικών τους χαρακτηριστικών κυρίως, σε 5 φύλλα, που αποτελούσαν τους επονομαζόμενους πραγματικούς μύκητες. Η χρήση γονιδιακών τεχνικών επιτάχυνε σε μεγάλο βαθμό την έρευνα σχετικά με τη μυκητιακή φυλογενετική. Το νέο σύστημα ταξινόμησης έχει ολοκληρωθεί και βασίζεται σε κάθε διαθέσιμη πληροφορία των προηγούμενων ετών, αλλά κυρίως σε μοριακά δεδομένα. και συνοψίζεται στο άρθρο που δημοσιεύτηκε στο περιοδικό *Mycologia* το 2007, έπειτα από τη συνεργασία 66 επιστημόνων, με τίτλο «A higher - level phylogenetic classification of the Fungi» (Hibbett *et al.*, 2007). Τα 7 φύλλα στα οποία ταξινομούνται οι μύκητες είναι τα εξής:

1. Ascomycota
2. Basidiomycota
3. Chytridiomycota
4. Blastocladiomycota
5. Glomeromycota
6. Microsporidia
7. Neocallimastigomycota

Οι Ascomycota και οι Basidiomycota κατατάσσονται στο υποβασίλειο Dikarya, αντανακλώντας την πιθανή συναπομορφία των δικαρυωτικών υφών.

1.7 ΖΥΓΟΜΥΚΗΤΕΣ

Παραδοσιακά οι ζυγομύκητες ανήκαν στο φύλλο Zygomycota και διαχωρίζονταν σε δύο κλάσεις, τους Zygomycetes και τους Trichomycetes. Το φύλλο Zygomycota είναι το λιγότερο καλά καθορισμένο, καθώς πολλές από τις ομάδες που τοποθετούνταν σε αυτό είναι τώρα αβέβαιης κατάταξης. Οι ζυγομύκητες πλέον κατατάσσονται στο φύλλο των Glomeromycota και διαχωρίζονται σε 5 υποφύλλα (Mucoromycotina, Mortierellomycotina, Entomophthoromycotina, Zoopagomycotina, Kickxellomycotina) και 9 τάξεις: Asellariales, Dimargaritales, Endogonales, Entomophthorales, Harpellales, Kickxellales, Mortierellales, Mucorales, and Zoopagales (Voigt *et al.*, 2014).

Phylum: Glomeromycota

Subphylum: Mucoromycotina

Orders:

1. Mucorales
2. Endogonales

Subphylum: Mortierellomycotina

1. Mortierellales

Subphylum: Entomophthoromycotina

Orders:

1. Entomophthorales

Subphylum: Zoopagomycotina

Orders:

1. Zoopagales

Subphylum: Kickxellomycotina

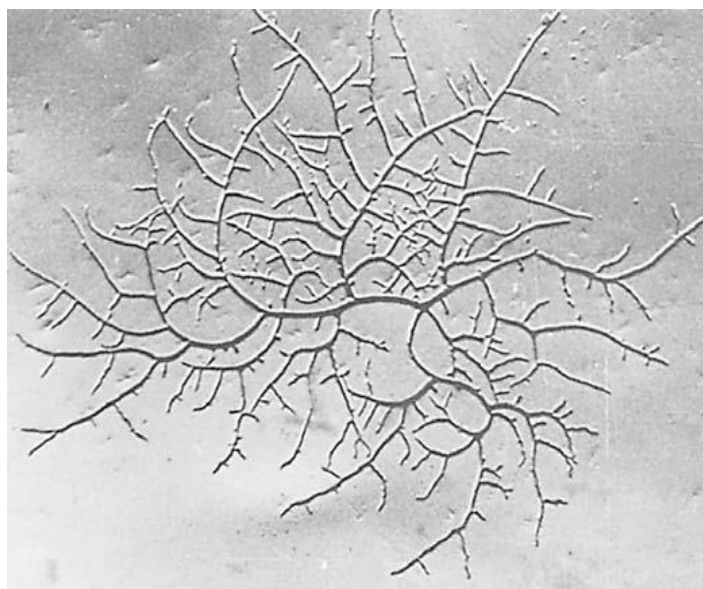
Orders:

1. Dimargaritales
2. Harpellales
3. Asellariales
4. Kickxellales

Οι ζυγομύκητες κατατάσσονται στους κατώτερους και μυκηλιακούς μύκητες. Αναπτύσσουν έναν τύπο θαλλού ,γνωστό ως μυκήλιο, αποτελούμενο από λεπτούς, διακλαδισμένους σωλήνες που ονομάζονται υφές. Οι μύκητες αναπτύσσουν τις υφές προκειμένου να εξερευνήσουν και να επεκταθούν, να δημιουργήσουν αναπαραγωγικές δομές και φυσικά να τραφούν μεταφέροντας γρήγορα θρεπτικά συστατικά.

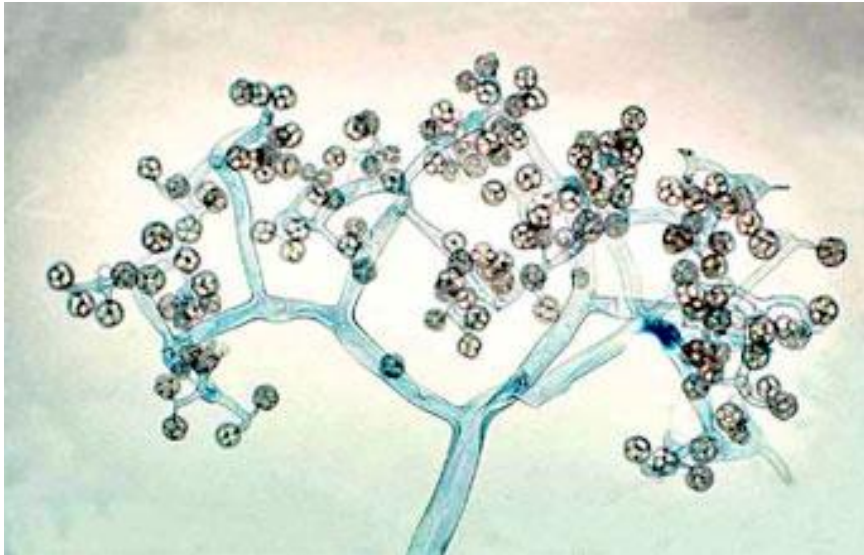
Οι υφές στους ζυγομύκητες είναι συνεχείς χωρίς σέπτα σε αντίθεση με τους ανώτερους μύκητες και χαρακτηριστικό τους γνώρισμα είναι ο σχηματισμός ζυγοσπορίων εγγενούς αναπαραγωγής. Η δομή τους είναι αρκετά απλή σε σχέση με άλλους μύκητες προσδίδοντάς τους την ικανότητα να αναπτύσσονται ταχέως σε πληθώρα οργανικών υποστρωμάτων και κάτω από διάφορες περιβαλλοντικές συνθήκες (Ferreira *et al.*, 2013; Lennartsson, 2012).

Μπορούν να αντέξουν σε υψηλές συγκεντρώσεις αλάτων και σε ένα μεγάλο εύρος θερμοκρασιών, ακόμα και πάνω από τους 50°C (*Rhizomucor pusillus*) ή και κάτω από τους 0°C (*Mucor hiemalis*). Κάποια είδη ζυγομυκήτων είναι σε θέση να αναπτυχθούν σε αναερόβιες συνθήκες όπου παρατηρείται το φαινόμενο του διμορφισμού. Το φαινόμενο αυτό περιλαμβάνει μια μετάβαση από τη συνήθη νηματώδη ανάπτυξη (σχηματισμός υφών) στην ανάπτυξη μεμονωμένων κυττάρων με σχηματισμό οφθαλμών (*Mucor rouxii*, *M. racemosus*) όπως στους ζυμομύκητες (Dijksterhuis & Samson, 2006).



Εικόνα 1-2: Υφές του ζυγομύκητα *Phycomyces blakesleeana*, μεγέθυνση x400 (www-plb.ucdavis.edu).

Η αξία αυτών των μυκήτων ως πηγών μονοκύτταρων πρωτεϊνών με υψηλή θρεπτική αξία είναι αναγνωρισμένη εδώ και αιώνες λόγω της χρήσης τους για την παραγωγή τροφίμων που έχουν υποστεί ζύμωση. Ακόμα στις μέρες μας χρησιμοποιούνται για την παραγωγή αρκετών τροφίμων, κυρίως στην Κίνα και τη Νοτιοανατολική Ασία, όπως το τέμπε και το τόφου (Lennartsson *et al.*, 2012). Επιπλέον, η βιομάζα των ζυγομυκήτων προβλέπεται για την παραγωγή ζωοτροφών και για κατανάλωση από τον άνθρωπο (όπου οι μικροοργανισμοί έχουν χαρακτηριστεί ως GRAS) καθώς περιέχει ευεργετικές ποσότητες πρωτεϊνών, λιπιδίων, αμινοξέων, χιτοζάνης και χιτίνης (Ferreira *et al.*, 2013).



Εικόνα 1-3: Σποριαγγιοφόροι του μύκητα *Thamnidium elegans*, τα σποριαγγιοσπόρια παράγονται εντός των σποριάγγιων στις άκρες των σποριαγγιοφόρων (© G. L. Barron 2004).

Οι ζυγομύκητες παρουσιάζουν ιδιαίτερο βιοτεχνολογικό ενδιαφέρον έχοντας από καιρό αναγνωριστεί ως πολύτιμες πηγές λιπιδίων. Έχουν την ικανότητα να καλλιεργούνται σε διάφορα βιομηχανικά και γεωργό-βιομηχανικά υποστρώματα χαμηλού ή/και μηδενικού κόστους και να παράγουν λιπίδια (Chatzifragkou *et al.*, 2011a; Papanikolaou *et al.*, 2017; Higashiyama *et al.*, 2002), τα οποία είτε είναι κατάλληλα να διοχετευτούν στη βιομηχανία παραγωγής βιοντίζελ ή είναι πλούσια σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα, προσδίδοντάς τους διατροφική και φαρμακευτική αξία (Bellou *et al.*, 2012; Chatzifragkou *et al.*, 2010; Fakas *et al.*, 2009a). Ο μύκητας *Mortierella alpina* χρησιμοποιείται για την βιομηχανική παραγωγή αραχιδονικού οξέος ως διατροφικό συμπλήρωμα από την DSM (Beligon *et al.*, 2016) Τα τελευταία χρόνια οι ζυγομύκητες έχουν ερευνηθεί και χρησιμοποιηθεί εκτεταμένα για την παραγωγή ενός ευρέος φάσματος μεταβολικών προϊόντων όπως για παράδειγμα ένζυμα, οργανικά οξέα και βιοκαύσιμα όπως η βιοαιθανόλη και το μικροβιακό λίπος το οποίο δύναται να μετατραπεί σε βιοντίζελ (Papanikolaou & Aggelis, 2019; Gao *et al.*, 2014; Ferreira *et al.*, 2013; Koutinas & Papanikolaou, 2011).

Οι μύκητες που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη είναι οι εξής:

- Ο μύκητας *Mortierella isabellina*, ανήκει στην τάξη Mortierellales
- Ο μύκητας *Mortierella ramanniana*, ανήκει στην τάξη Mortierellales
- Ο μύκητας *Thamnidium elegans*, ανήκει στην τάξη Mucorales
- Ο μύκητας *Cunninghamella echinulata*, ανήκει στην τάξη Mucorales

Τα συγκεκριμένα είδη μυκήτων που χρησιμοποιήθηκαν παρουσιάζουν επιπρόσθετο βιοτεχνολογικό ενδιαφέρον λόγω της ικανότητας τους να παράγουν λιπίδια πλούσια σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα και κυρίως γ-λινολενικό οξύ (GLA) το οποίο παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον κυρίως για τις φαρμακευτικές του ιδιότητες που του προσδίδουν (Beligon *et al.*, 2016; Horobin, 1992; Ratledge, 2013; Chen & Chang 1996; Chatzifragkou, 2010; Papanikolaou *et al.*, 2010; Shaw, 1966).

1.8 Η ΓΛΥΚΕΡΟΛΗ ΩΣ ΠΗΓΗ ΑΝΘΡΑΚΑ

Η γλυκερόλη ή αλλιώς γλυκερίνη είναι μια οργανική ένωση αποτελούμενη από τρία άτομα άνθρακα με τον καθένα να ενώνεται με ένα υδροξύλιο. Η κοινή ονομασία κατά IUPAC είναι 1,2,3-πρόπανο-τριόλη και περιγράφεται με τον συντακτικό τύπο: HOCH₂-CHOH-CH₂OH. Η γλυκερόλη μπορεί να παραχθεί είτε με μικροβιακή ζύμωση είτε να συντεθεί χημικά από πετροχημικές πρώτες ύλες, ενώ μπορεί επίσης να ανακτηθεί ως το κύριο υποπροϊόν από τις μονάδες παραγωγής σαπουνιού (Wang *et al.*, 2001).

Η ακατέργαστη γλυκερόλη είναι το κύριο παραπροϊόν της βιομηχανίας παραγωγής βιοντίζελ. Για κάθε 10 τόνους παραγόμενου βιοντίζελ, παράγεται παράλληλα περίπου 1 τόνος ακατέργαστης γλυκερόλης (καθαρότητας περίπου 85-90% κ.β. – Papanikolaou & Aggelis, 2009). Σύμφωνα με τα στοιχεία του Oil World of Germany Hamburg η παγκόσμια παραγωγικότητα του βιοντίζελ ήταν πάνω από 30 εκατομμύρια τόνους το 2017. Η αυξανόμενη ζήτηση καθώς και η σταδιακή υποχρεωτική εφαρμογή του έχει οδηγήσει στη συσσώρευση στην αγορά υψηλών ποσοτήτων «απόβλητου» νερού, με υψηλή περιεκτικότητα σε γλυκερόλη. Έτσι η γλυκερόλη, συμπεριλαμβανομένης της πολύ χαμηλής τιμής αγοράς, έχει αποκτήσει σημαντική προσοχή ως μια ελκυστική πρώτη ύλη και αξίζει διερεύνησης πιθανών τρόπων επαναχρησιμοποίησής της και την παραγωγή προϊόντων προστιθέμενης αξίας (Wang *et al.*, 2015; Ma & Liu, 2019) με οικονομικά καθώς και περιβαλλοντικά οφέλη.

Υπάρχουν αρκετές μελέτες που υποδεικνύουν ότι η ακατέργαστη γλυκερόλη μπορεί να μετατραπεί, μέσω υδρογονόλυσης, σε διάφορα χημικά προστιθέμενης αξίας όπως για παράδειγμα η 1,2-προπανοδιόλη και η 1,3-προπανοδιόλη. Η 1,3-προπανοδιόλη είναι ένας πολύ υποσχόμενος στόχος λόγω του υψηλού κόστους των συμβατικών διεργασιών παραγωγής και της μεγάλης κλίμακας παραγωγής ρητίνης πολυεστέρα και πολυουρεθάνης από 1,3 προπανοδιόλη (Yuan *et al.*, 2010; Balaraju *et al.*, 2008; Nakagawa *et al.*, 2010).

Επιπλέον, η ακατέργαστη γλυκερόλη αποτελεί μια εξόχως ευαφομοίωτη για πληθώρα μικροοργανισμών πηγή άνθρακα με πολλές πιθανές εφαρμογές στις βιομηχανικές ζυμώσεις. Σε σύγκριση με τις χημικές και θερμικές διεργασίες της γλυκερόλης, η μικροβιακή ζύμωση παρέχει μια φιλική προς το περιβάλλον προσέγγιση για τη μετατροπή της γλυκερόλης σε προϊόντα προστιθέμενης αξίας (Wang *et al.*, 2015). Υπάρχουν αρκετές αναφορές όσον αφορά στην εκμετάλλευση της ακάθαρτης γλυκερόλης για την παραγωγή προϊόντων μέσω μικροβιακών ζυμώσεων, όπως για παράδειγμα: κιτρικό οξύ (Paranikolaou & Aggelis, 2009), οξικό οξύ (Chatzifragkou *et al.*, 2011a), ηλεκτρικό οξύ (Gao *et al.*, 2016), γαλακτικό οξύ (Choubisa *et al.*, 2012), 1,3-προπανοδιόλη (Johnson & Rehmann, 2016; Chatzifragkou *et al.*, 2011b), διάφορα βιο-πολυμερή όπως το PHB (poly-b-hydroxybutyrate) (Teeka *et al.*, 2012) και μυκηλιακή βιομάζα (André *et al.*, 2010).

Η χρήση επίσης ακάθαρτης γλυκερόλης ως πηγή άνθρακα για την παραγωγή μονοκυτταρικού λίπους με μεγάλη περιεκτικότητα σε πολυακόρεστα λιπαρά έχει προσελκύσει αρκετά το ερευνητικό ενδιαφέρον τα τελευταία χρόνια (Munch *et al.*, 2015; Chatzifragkou *et al.*, 2011a; Ethier *et al.*, 2011; Paranikolaou & Aggelis, 2009; 2019) με αναφορές για πολύ ικανοποιητικά αποτελέσματα συγκριτικά με καθαρή γλυκερόλη και άλλα οργανικά υποστρώματα (Vivek *et al.*, 2016; Mucnh *et al.*, 2015; Fakas *et al.*, 2009b).

Τέτοια λιπίδια προερχόμενα από μικροβιακές ζυμώσεις έχει δειχθεί ότι είχαν σύνθεση παρόμοια με τα φυτικά έλαια (κραμβέλαιο, φοινικέλαιο, σογιέλαιο που παραδοσιακά χρησιμοποιούνται), υποδηλώνοντας ότι θα μπορούσαν να επαναχρησιμοποιηθούν ως πρώτη ύλη για την παραγωγή βιοντίζελ υψηλής ποιότητας (Ma *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2015). Διαφορετικά αυτή η παραγωγή θα μπορούσε να οδηγήσει στη σύνθεση συγκεκριμένων λιπιδίων υψηλής προστιθέμενης αξίας, όπως έλαια που περιέχουν σπάνια πολυακόρεστα λιπαρά οξέα ιατρικού ενδιαφέροντος, όπως το γ-λινολενικό οξύ (Chatzifragkou *et al.*, 2011a) ή λιπίδια που εμφανίζουν σύνθεση παρόμοια με το βούτυρο του κακάο ή άλλα εξωτικά λίπη.

1.9 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον για τη βιοτεχνολογική παραγωγή μικροβιακών ελαίων (μονοκύτταρα έλαια, single cell oils - SCOs) έχει επικεντρωθεί τα τελευταία χρόνια στην ικανότητα των διαφόρων ελαιογόνων μικροοργανισμών να μετατρέπουν διάφορα οργανικά αγρό-βιομηχανικά πλεονάσματα σε λιπίδια «ειδικού τύπου» που σπάνια συναντώνται στο φυτικό ή ζωικό βασίλειο. Οι ελαιογόνοι μύκητες, και ειδικότερα μερικά είδη ζυγομυκήτων θεωρούνται εξαιρετικοί υποψήφιοι για την παραγωγή λιπιδίων τα οποία είτε μπορούν να

χρησιμοποιηθούν για την παραγωγή δεύτερης γενιάς βιοκαύσιμα είτε είναι πλούσια σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFAs) προσδίδοντάς τους διατροφική και φαρμακευτική αξία. Τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα έχουν αξιοσημείωτες διατροφικές ιδιότητες. Το γ-λινολενικό οξύ είναι ένα λιπαρό οξύ της ομάδας ω-6 υψηλής διατροφικής αξίας λόγω των πολλών θεραπευτικών ιδιοτήτων που του προσδίδουν.

Παρόλες τις προσπάθειες που γίνονται η παραγωγή μικροβιακού λίπους σε μεγάλη κλίμακα φαίνεται να είναι αρκετά δαπανηρή σε σχέση με τις συμβατικές μεθόδους. Για αυτό είναι σημαντικό η αξιοποίηση οργανικών παράπλευρων προϊόντων ευτελούς αξίας, κάτι που θα είχε τόσο οικονομικό όσο και περιβαλλοντικό όφελος.

Σκοπός της συγκεκριμένης μελέτης ήταν η διερεύνηση της ανάπτυξης των στελεχών *Mortierella isabellina*, *Mortierella ramanniana*, *Thamnidium elegans* και *Cunninghamella echinulata* σε υπόστρωμα με βάση την απόβλητη ληγμένη γλυκερόλη και της βιοσύνθεσης ενδοκυτταρικού λίπους πλούσιο σε γ-λινολενικού οξέος.

2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 ΣΤΕΛΕΧΗ ΜΥΚΗΤΩΝ

Στην παρούσα διπλωματική εργασία χρησιμοποιήθηκαν τέσσερα στελέχη ζυγομυκήτων. Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκαν τα στελέχη: *Mortierella isabellina* ATHUM 2935 (τμήμα Βιολογίας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών), *Mortierella ramanniana* MUCL 9235 (εργαστήριο Μυκητολογίας, Καθολικό Πανεπιστήμιο Λουβένης, Βέλγιο), *Thamnidium elegans* CCF 1465 (Πανεπιστήμιο Πράγας) και *Cunninghamella echinulata* ATHUM 4411 (τμήμα Βιολογίας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών). Όλα τα στελέχη διατηρούνταν σε σωληνάρια slants καθώς και σε τρυβλία Petri με στερεό θρεπτικό υλικό, Potato Dextrose Agar 40%, σε θερμοκρασία 4 °C και ανανεωνόντουσαν σε τακτά χρονικά διαστήματα ανάλογα με τις ανάγκες των πειραμάτων.

2.2 ΘΡΕΠΤΙΚΟ ΜΕΣΟ

Σε όλες τις υγρές καλλιέργειες των μυκήτων χρησιμοποιήθηκε ως μοναδική πηγή άνθρακα και ενέργειας απόβλητη ληγμένη γλυκερόλη αρχικής καθαρότητας 98% με αρχική συγκέντρωση 60 gL⁻¹. Ως πηγή αζώτου χρησιμοποιήθηκε εκχύλισμα ζύμης (yeast extract, Pronadisa) και θειικό αμμώνιο [(NH₄)₂SO₄, Acros Organics] αρχικά σε συγκεντρώσεις 0,4 gL⁻¹ το καθένα ώστε να δημιουργηθούν περιοριστικές συνθήκες ανάπτυξης ως προς το άζωτο με αναλογία C/N 212=mol/mol προκειμένου να ευνοηθεί η συσσώρευση λιπιδίων σύμφωνα με την βιβλιογραφία. Στη συνέχεια τα πειράματα επαναλήφθηκαν σε συνθήκες περίσσειας αζώτου με συγκεντρώσεις 4 gL⁻¹ από το καθένα και αναλογία C/N=21 mol/mol, διατηρώντας τις υπόλοιπες συνθήκες των ζυμώσεων ίδιες. Επιπρόσθετα σε όλες τις περιπτώσεις το θρεπτικό υλικό εμπλουτίστηκε με θειικά και φωσφορικά άλατα και διάφορα μικροστοιχεία. Τα άλατα που χρησιμοποιήθηκαν φαίνονται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 2-1: Συγκεντρώσεις αλάτων που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή του θρεπτικού υποστρώματος.

Άλατα	Συγκέντρωση (gL ⁻¹)
KH ₂ PO ₄	7
Na ₂ HPO ₄	2,5
MgSO ₄ (H ₂ O) ₇	1,5
CaCl ₂	0,15
FeCl ₃ (H ₂ O) ₆	0,15
ZnSO ₄ (H ₂ O) ₇	0,02
MnSO ₄ H ₂ O	0,06

Όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε κωνικές φιάλες Erlenmeyer των 250 mL με 50 mL θρεπτικού μέσου. Αρχικά οι φιάλες αποστειρώθηκαν μαζί με το θρεπτικό μέσο στους 121 °C για 20 λεπτά. Το αρχικό pH του μέσου καλλιέργειας ήταν $6,05 \pm 0,1$.

Πριν τον εμβολιασμό όλες οι προς εμβολιασμό φιάλες τοποθετήθηκαν σε θάλαμο νηματικής ροής (laminar flow) μαζί με το αποστειρωμένο νερό, την πιπέτα που θα χρησιμοποιούταν και τα tips και εκτέθηκαν σε ακτινοβολία UV για 20 λεπτά ώστε να δημιουργηθούν πλήρως ασηπτικές συνθήκες. Οι φιάλες κατόπιν εμβολιάστηκαν με 1 mL εναιωρήματος σπορίων του μύκητα. Ο μύκητας προηγουμένως είχε αναπτυχθεί επαρκώς, σε σωλήνα slant με θρεπτικό υλικό PDA σε επωαστικό θάλαμο στους 30°C για 4-7 ημέρες. Αρχικά, 10 mL αποστειρωμένου απιονισμένου νερού μεταφέρθηκαν στα σωληνάρια slants με την στερεή καλλιέργεια του μύκητα και ξύνοντας ελαφρά με έναν σιδερένιο κρίκο προκειμένου να απελευθερωθούν τα σπόρια του μύκητα στο εναιώρημα. Το εναιώρημα μεταφέρθηκε σε μια αποστειρωμένη, μικρή κωνική φιάλη των 50 ml και η διαδικασία επαναλήφθηκε 2-3 φορές. Στόχος μας ήταν τα 10^4 - 10^5 σπόρια/mL. Στη συνέχεια, για τον εμβολιασμό μεταφέρθηκε με πιπέτα 1 ml από το εναιώρημα σε κάθε κωνική φιάλη.

Οι καλλιέργειες τοποθετήθηκαν σε ανακινούμενο επωαστικό θάλαμο σε σταθερή θερμοκρασία 28°C και υπό συνεχή ανάδευση στις 180 στροφές/λεπτό.

2.3 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΔΙΑΛΥΤΟΥ ΟΞΥΓΟΝΟΥ

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης του διαλυτού οξυγόνου (DO) έγινε με τη χρήση επιλεκτικού ηλεκτροδίου (Hanna instruments, HI 9146). Πριν από τη συγκομιδή της βιομάζας ο αναδευτήρας σταμάτησε και τοποθετήθηκε το ηλεκτρόδιο στη φιάλη κλείνοντας την είσοδο με βαμβάκι. Μετά την επανεκκίνηση του αναδευτήρα ήταν απαραίτητη η αναμονή,

συνήθως 5 με 10 λεπτά, ώστε ένα επέλθει και πάλι ισορροπία και να σταθεροποιηθεί η ένδειξη η οποία και σημειώθηκε ως το ποσοστό διαλυτού οξυγόνου τη χρονική στιγμή $t=0$. Στη συνέχεια ο αναδευτήρας σταμάτησε και πάλι και σημειώθηκαν οι ενδείξεις για τη συγκέντρωση του οξυγόνου κάθε 5 δευτερόλεπτα προκειμένου να προσδιοριστεί ο ειδικός ρυθμός κατανάλωσης οξυγόνου.

2.4 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ pH

Σε όλη τη διάρκεια των ζυμώσεων πραγματοποιούνταν ο έλεγχος του pH με επιλεκτικό ηλεκτρόδιο (Hanna instruments, SensoDirect type 330). Όπου ήταν αναγκαίο έγιναν οι απαραίτητες διορθώσεις με την προσθήκη κατάλληλης ποσότητας καυστικού νατρίου (NaOH) 5M στις εναπομείνουσες φιάλες υπό ασηπτικές συνθήκες, ώστε το pH να διατηρηθεί κοντά στα αρχικά επίπεδα μεταξύ 5 και 6.

2.5 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΒΙΟΜΑΖΑΣ

Ο προσδιορισμός της παραγόμενης βιομάζας έγινε σταθμικά αφού είχε προηγηθεί ξήρανση ώστε να είναι ελεύθερη υγρασίας. Αρχικά έγινε διαχωρισμός της βιομάζας από το υγρό υπόστρωμα της καλλιέργειας με την χρήση μεταλλικής σίτας διαμέτρου 0,09 mm όπου το διηθημένο υγρό αποθηκεύτηκε σε φιαλίδια τύπου Falcon των 15 ml για περαιτέρω αναλύσεις. Αφού ξεπλύθηκε καλά με απιονισμένο νερό η βιομάζα μεταφέρθηκε σε προζυγισμένο φιαλίδιο τύπου McCartney και στη συνέχεια σε φούρνο στους 80°C για 1-3 μέρες, μέχρι να εξατμιστεί τελείως η υγρασία και να σταθεροποιηθεί το βάρος του. Η διαφορά βάρους πριν και μετά την ξήρανση αντιστοιχούσε στην παραχθείσα βιομάζα η οποία εκφράστηκε σε g ξηρής βιομάζας ανά 1 L καλλιέργειας.

2.6 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΝΔΟΠΟΛΥΣΑΚΧΑΡΙΤΩΝ

Για την μέτρηση των παραχθέντων ενδοπολυσακχαριτών χρησιμοποιήθηκε αρχικά ένα τροποποιημένο πρωτόκολλο βασισμένο σε μια μέθοδο που εκδόθηκε από τους Liang *et al* (2010). Αρχικά έπρεπε να διασπαστούν τα κύτταρα για να απελευθερωθούν τα σάκχαρα στο εναιώρημα. Από την ξηρή βιομάζα μεταφέρθηκαν 0.05 g σε μεγάλους δοκιμαστικούς σωλήνες, προστέθηκε υδροχλωρικό οξύ (HCl) συγκέντρωσης 2M και τοποθετήθηκε στο υδατόλουτρο στους 80°C για 30 λεπτά. Στη συνέχεια προστέθηκε καυστικό νάτριο (NaOH)

συγκέντρωσης 2M ώστε να εξουδετερωθεί το οξύ και πραγματοποιήθηκε διήθηση με διπλό διηθητικό χαρτί για να απομακρυνθεί η βιομάζα.

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό των ενδοπολυσακχαριτών εφαρμόστηκε η φωτομετρική μέθοδο του 3,5 δινιτροσαλικυλικού οξέος (3,5- dinitrosalicylic acid- DNS) όπως περιέγραψε ο Miller (1959). Η μέθοδος αυτή ελέγχει την παρουσία ελεύθερης καρβονυλομάδας (C=O), των λεγόμενων αναγωγικών σακχάρων. Περιλαμβάνει την οξείδωση της λειτουργικής ομάδας αλδεΐδης που υπάρχει, για παράδειγμα, στη γλυκόζη και στη λειτουργική ομάδα κετόνης στη φρουκτόζη. Ταυτόχρονα, το 3,5-δινιτροσαλικυλικό οξύ (DNS) ανάγεται σε 3-αμινο, 5-νιτροσαλικυλικό οξύ υπό αλκαλικές συνθήκες.

Μεταφέρθηκαν 0,5 ml από το διήθημα σε δοκιμαστικούς σωλήνες και προστέθηκε 0,5 ml από το αντιδραστήριο DNS και έγινε ανάδευση σε αναδευτήρα vortex ώστε να ομογενοποιηθούν το διαλύματα. Τα διαλύματα τοποθετήθηκαν για βρασμό στους 100°C για 5 min. Κατόπιν, αφού πρώτα επανήλθαν σε θερμοκρασία δωματίου, προστέθηκαν 5 ml απιονισμένου νερού. Ακολούθησε ανάδευση σε αναδευτήρα vortex ώστε να ομογενοποιηθούν τα διαλύματα και φωτομέτρηση σε μήκος κύματος $\lambda=540$ nm. Η διαδικασία της φωτομέτρησης πραγματοποιήθηκε σε διπλή επανάληψη. Για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης των αναγόντων σακχάρων χρησιμοποιήθηκε πρότυπη καμπύλη αναφοράς.

2.7 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΓΛΥΚΕΡΟΛΗΣ

Για να υπολογίσουμε την κατανάλωση του υποστρώματος προσδιορίστηκε ποσοτικά η συγκέντρωσή της γλυκερόλης με τη χρήση υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography – HPLC) η οποία φέρει στήλη Phenomenex Rezex, ROA-Organic Acid H⁺ 8% (διαστάσεων 300 x 7,8 mm) και είναι εξοπλισμένη με ανιχνευτή UV και RI. Ο όγκος των προς αναλύσεως δειγμάτων ήταν 10 μl, αφού πρώτα έγινε η κατάλληλη αραιώση και φιλτράρισμα μέσω μεμβρανών Whatman με διάμετρο πόρων 0,22 μm. Η κινητή φάση αποτελούταν από υδατικό διάλυμα θειικού οξέος (H₂SO₄) 0,01M και η ροή της ήταν 0,5 ml/min σε θερμοκρασία στήλης 60°C. Για την ποσοτικοποίηση των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε πρότυπη καμπύλη αναφοράς.

2.8 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΝΟΡΓΑΝΩΝ ΑΜΜΩΝΙΑΚΩΝ ΙΟΝΤΩΝ

Ο προσδιορισμός των ανόργανων αμμωνιακών ιόντων έγινε με τη χρήση εκλεκτικού ηλεκτροδίου της Hach, (ammonia electrode) και τα αντίστοιχα αντιδραστήρια με τη μορφή kit της εταιρείας.

2.9 ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΝΔΟΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΛΙΠΟΥΣ

Η εξαγωγή των παραγόμενων ενδοκυτταρικών λιπιδίων έγινε σταθμικά σύμφωνα με την τροποποιημένη μέθοδο των Folch, Lees και Stanley (Folch *et al.*, 1957). Στα φιαλίδια τα τύπου McCartney τα οποία περιείχαν την ξηρή βιομάζα προστέθηκε μίγμα διαλυτών χλωροφορμίου-μεθανόλης σε αναλογία 2:1. Η ξηρή βιομάζα λειοτριβήθηκε για καλύτερη διάσπαση των κυττάρων και μυκηλίων και έπειτα τα φιαλίδια σφραγιζόταν ερμητικά και τοποθετούνταν υπό σκιά για 4-5 μέρες ώστε να πραγματοποιηθεί η εκχύλιση και να αποτρέψουμε την οξείδωση των ενδοκυτταρικών λιπιδίων. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε διήθηση του μίγματος με διπλό διηθητικό χαρτί σε προζυγισμένες σφαιρικές φιάλες ώστε να απομακρυνθεί η βιομάζα. Το διήθημα περιείχε το διάλυμα Folch (χλωροφόρμιο-μεθανόλη) μαζί με τα λιπίδια. Κατόπιν ακολούθησε εξάτμιση των διαλυτών υπό κενό σε περιστροφικό εξάτμιστήρα (Rotavapor R-210, Buchi) σε θερμοκρασία μικρότερη των 50°C ώστε να μην πραγματοποιηθεί οξείδωση των λιπαρών οξέων και αφού αφέθηκαν οι φιάλες να κρυώσουν σε θερμοκρασία δωματίου, προσδιορίστηκε το μικτό βάρος σε ζυγό ακριβείας. Η διαφορά βάρους αντιστοιχούσε στα ολικά ενδοκυτταρικά λιπίδια που είχε συνθέσει ο μικροοργανισμός. Ανάγοντας το βάρος των λιπιδίων στο αντίστοιχο βάρος της βιομάζας έγινε ο υπολογισμός του ποσοστού λίπους ανά ξηρής βιομάζας και βάσει του όγκου ζύμωσης η συγκέντρωση των λιπιδίων σε gL^{-1} .

2.10 ΜΕΘΥΛΕΣΤΕΡΟΠΟΙΗΣΗ ΛΙΠΑΡΩΝ ΟΞΕΩΝ

Ο προσδιορισμός της σύστασης των λιπιδίων σε λιπαρά οξέα έγινε μετά από μεθανόλυση των λιπιδίων και μετατροπή των λιπαρών οξέων στους αντίστοιχους μεθυλεστέρες. Η μεθυλεστεροποίηση των παραχθέντων λιπαρών οξέων πραγματοποιήθηκε σε επιλεγμένο αριθμό δειγμάτων ώστε να μελετηθεί η σύσταση των λιπιδίων κατά τη διάρκεια των ζυμώσεων.

Ο διαχωρισμός των λιπαρών οξέων στους αντίστοιχους μεθυλεστέρες έγινε σύμφωνα με την AFNOR (AFNOR, 1984). Η αντίδραση της μεθυλεστεροποίησης πραγματοποιείται σε δύο

στάδια (για την αποφυγή trans-ισομερισμού). Κατά το πρώτο στάδιο λαμβάνει χώρα πυρηνόφιλη αντικατάσταση στο μόριο της τριάκυλο-γλυκερόλης προς σχηματισμό των αντίστοιχων μεθυλεστέρων των λιπαρών οξέων. Ταυτόχρονα, τα ήδη υπάρχοντα ελεύθερα λιπαρά οξέα μετατρέπονται στους αντίστοιχους σάπωνες αντιδρώντας με το διάλυμα του μεθοξειδίου του νατρίου. Στο δεύτερο στάδιο της αντίδρασης οι σάπωνες μετατρέπονται και αυτοί στους αντίστοιχους μεθυλεστέρες.

Εφαρμογή της μεθόδου:

Σε μία σφαιρική φιάλη εξάτμισης όπου μεταφέρθηκαν τα λιπίδια, τα οποία προηγουμένως είχαν προσδιοριστεί βαρυμετρικά, προστέθηκαν 10 ml μεθοξειδίου του νατρίου ($\text{CH}_3\text{O}^-\text{Na}^+$), το οποίο περιέχει φαινολοφθαλεΐνη ως δείκτη pH, και μερικές πέτρες βρασμού. Η φιάλη τοποθετήθηκε σε έναν θερμαντικό μανδύα και συνδέθηκε με έναν κάθετο ψυκτήρα όπου το μίγμα υπέστη βρασμό για 20 min. Στη συνέχεια προστέθηκε ποσότητα υδροχλωρικής μεθανόλης ($\text{CH}_3\text{OH}/\text{HCl}$) μέχρις ότου το pH του διαλύματος έγινε όξινο (το μίγμα αποχρωματίζεται από ροζ σε άσπρο) και συνέχισε ο βρασμός του μίγματος για άλλα 20 min. Με το πέρας των 20 min προστέθηκε επαρκής ποσότητα απιονισμένου νερού ώστε να τερματιστεί η αντίδραση και το διάλυμα να πάρει ένα γαλακτώδες χρώμα. Τέλος, το διάλυμα μεταφέρθηκε σε διαχωριστική χοάνη όπου και προστέθηκαν 6 ml εξανίου. Μετά από καλή ανακίνηση και απελευθέρωση του περισσίου αέρα το μίγμα αφέθηκε σε ηρεμία μέχρις ότου να γίνει ο διαχωρισμός σε δύο φάσεις. Αφού απορρίφθηκε η υδατική φάση, μεταφέρθηκε ποσότητα από το διάλυμα του εξανίου, το οποίο περιείχε και τους μεθυλεστέρες, σε φιαλίδιο τύπου bijou (bijou bottle) και προστέθηκε άνυδρο θειικό νάτριο (Na_2SO_4) ώστε να απομακρυνθεί οποιαδήποτε περίσσια υγρασίας. Τα φιαλίδια διατηρήθηκαν στην κατάψυξη (-25°C) μέχρις ότου να πραγματοποιηθεί ανάλυση των λιπαρών οξέων με αέρια χρωματογραφία.

2.11 ΑΕΡΙΑ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ

Τα δείγματα που είχαν υποστεί μεθυλεστεροποίηση αναλύθηκαν στα επιμέρους λιπαρά οξέα με την χρήση αέριου χρωματογράφου (GC), εξοπλισμένου με στήλη διαστάσεων 30m x 0,25mm και ανιχνευτή FID. Η θερμοκρασία του συστήματος εξαέρωσης ήταν 250°C και του ανιχνευτή 270°C . Ως φέρον αέριο χρησιμοποιήθηκε ήλιο (He) στα 90kPa, H_2 στα 60kPa και μίγμα αέρα (80% N_2 και 20% O_2) στα 120kPa. Η διάρκεια της ανάλυσης ήταν 25 min. Με τη χρήση πρότυπων δειγμάτων μεθυλεστέρων ταυτοποιήθηκαν οι αντίστοιχοι χρόνοι κατακράτησης για τους μεθυλεστέρες και υπολογίστηκε το ποσοστό του κάθε λιπαρού οξέος

επί των συνολικών λιπιδίων με βάση το εμβαδόν της κάθε κορυφής του αντίστοιχου χρωματογραφήματος.

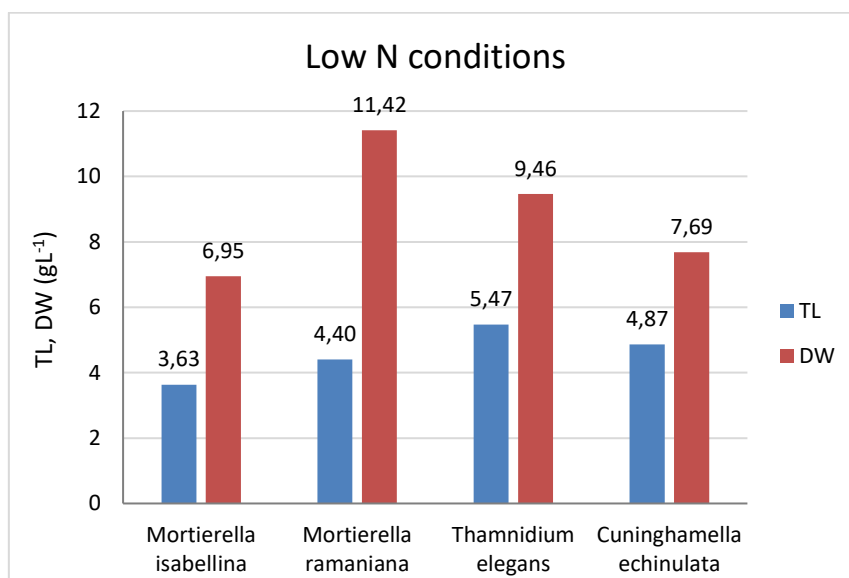
3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Τα στελέχη των ζυγομυκήτων που επιλέχθηκαν για τις πειραματικές διαδικασίες ήταν τα εξής: *Mortierella isabellina* ATHUM 2935, *Mortierella ramanniana* MUCL 9235 *Thamnidium elegans* CCF 1465, *Cunninghamella echinulata* ATHUM 4411. Καλλιεργήθηκαν σε κωνικές φιάλες Erlenmeyer των 250 ml σε θρεπτικό υλικό με πηγή άνθρακα απόβλητη ληγμένη γλυκερόλη με αρχική συγκέντρωση 60 gL^{-1} ενώ πραγματοποιήθηκαν δύο σετ πειραμάτων διαμορφώνοντας τις συγκεντρώσεις του θειικού αμμωνίου και του εκχυλίσματος ζύμης. Τα δύο αυτά αντιδραστήρια αποτελούσαν τις μοναδικές πηγές αζώτου στο διάλυμα. Στο πρώτο σετ, οι μύκητες αναπτύχθηκαν σε συνθήκες περιορισμού αζώτου με $0,4 \text{ gL}^{-1}$ θειικού αμμωνίου και $0,4 \text{ gL}^{-1}$ εκχυλίσματος ζύμης και την αναλογία άνθρακα/αζώτου 212 mol/mol. Στο δεύτερο σετ, οι μύκητες αναπτύχθηκαν σε συνθήκες περίσσειας αζώτου με 4 gL^{-1} θειικού αμμωνίου και 4 gL^{-1} εκχυλίσματος ζύμης διαμορφώνοντας την αναλογία άνθρακα/αζώτου στα 21 mol/mol, διατηρώντας τις υπόλοιπες συνθήκες σταθερές, προκειμένου να μελετηθεί η επίδραση στη συσσώρευση αποθεματικών λιπιδίων, τη σύσταση των λιπαρών οξέων και πως διαμορφώνονται αυτά κατά τη διάρκεια της ζύμωσης.

Σε συνθήκες περιορισμού αζώτου όλοι οι μύκητες παρουσίασαν περιορισμένη κυτταρική ανάπτυξη. Ο μύκητας *Mortierella ramanniana* ήταν αυτός με την υψηλότερη τιμή παραχθείσας βιομάζας φτάνοντάς τα $11,42 \text{ gL}^{-1}$ μετά από 432 ώρες από τον αρχικό εμβολιασμό. Οι μύκητες *Thamnidium elegans* και *Cunninghamella echinulata* έφτασαν τα $9,46 \text{ gL}^{-1}$ μετά από 504 ώρες και $7,69 \text{ gL}^{-1}$ παραχθείσας βιομάζας, 408 ώρες από τον αρχικό εμβολιασμό, αντίστοιχα, ενώ ο *Mortierella isabellina* τα $6,95 \text{ gL}^{-1}$ μετά από 430 ώρες. Σε όλες τις περιπτώσεις το θειικό αμμώνιο εξαντλήθηκε γρήγορα από τις πρώτες κιάλας ημέρες της ζύμωσης, και συμβάδιζε με την έναρξη του φαινομένου συσσώρευσης ενδοκυτταρικών λιπιδίων. Αντίθετα, σε όλες τις περιπτώσεις ποσότητα γλυκερόλης έμεινε χωρίς να καταναλωθεί φτάνοντας περίπου τα 23 gL^{-1} καταναλωθέντος υποστρώματος.

Ο μύκητας *Thamnidium elegans* παρουσίασε τη μεγαλύτερη συγκέντρωση παραχθέντων συνολικών λιπιδίων επί της ξηρής βιομάζας φτάνοντας τα $5,47 \text{ gL}^{-1}$, 504 ώρες μετά τον αρχικό εμβολιασμό με ποσοστό επί της ξηρής του βιομάζας σχεδόν 60%. Οι μύκητες *Cunninghamella echinulata* και *Mortierella ramanniana* παρήγαγαν $4,87 \text{ gL}^{-1}$ μετά από 408 ώρες και $4,4 \text{ gL}^{-1}$ συνολικών λιπιδίων μετά από 432 ώρες από τον αρχικό εμβολιασμό αντίστοιχα, ενώ ο μύκητας *Mortierella isabellina* έφτασε τα $3,63 \text{ gL}^{-1}$ μετά από 430 ώρες. Η περιεκτικότητα των λιπιδίων σε γ -λινολενικό οξύ ήταν σχετικά χαμηλή. Τα ποσοστά του παραχθέντος GLA επί των συνολικών λιπιδίων κυμάνθηκαν από το 1,5 έως και 5,2% ενώ δεν παρουσίασαν ιδιαίτερη

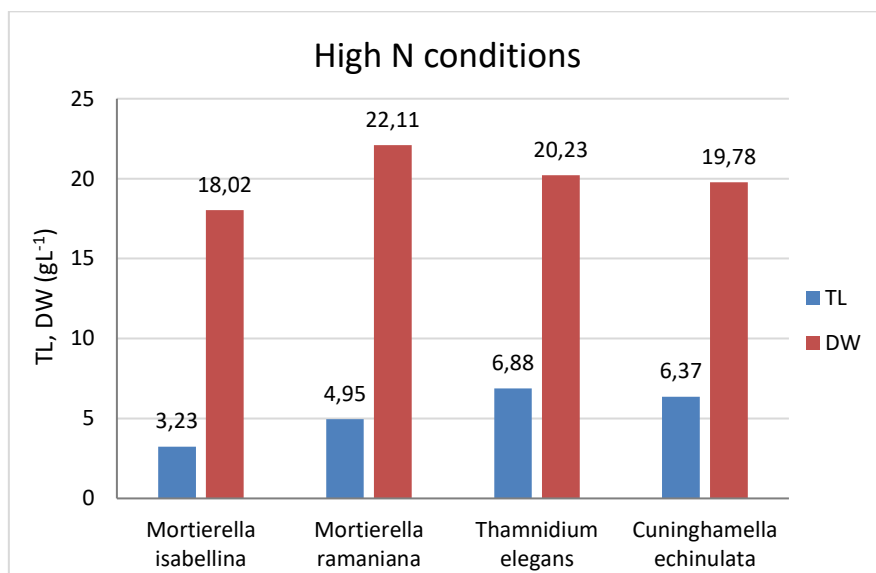
μεταβολή κατά τη διάρκεια των ζυμώσεων. Το ελαϊκό οξύ ήταν σε όλες τις περιπτώσεις το επικρατέστερο λιπαρό οξύ με ποσοστά 33-52% και το παλμιτικό το δεύτερο επικρατέστερο με ποσοστά 18-40%.



Διάγραμμα 3-1: Απεικόνιση της μέγιστης παραχθείσας βιομάζας (DW, gL⁻¹) και της μέγιστης παραγωγής λιπιδίων (TL, gL⁻¹) σε συνθήκες περιορισμού αζώτου.

Σε συνθήκες περίσσειας αζώτου όλοι οι μύκητες παρουσίασαν πολύ μεγαλύτερη κυτταρική ανάπτυξη, συγκριτικά με το πρώτο σετ πειραμάτων, καταναλώνοντας πάνω από το 65% της αρχικής συγκέντρωσης γλυκερόλης. Ο μύκητας *Mortierella ramaniana* παρουσίασε την υψηλότερη συγκέντρωση όσον αφορά στη παραγωγή βιομάζας με 22,11 gL⁻¹ 432 μετά τον αρχικό εμβολιασμό. Ο μύκητας *Thamnidium elegans* έφτασε τα 20,23 gL⁻¹ παραχθείσας βιομάζας μετά από 456 ώρες, ενώ οι μύκητες *Cunninghamella echinulata* και ο *Mortierella isabellina* τα 18 και 19,78 gL⁻¹ αντίστοιχα. Αυξημένες ήταν και οι τιμές όσον αφορά στις συγκεντρώσεις λιπιδίων, παρόλο που το ποσοστό ενδοκυτταρικών λιπιδίων επί της ξηρής βιομάζας ήταν σημαντικά μειωμένο σε σχέση με το πρώτο σετ πειραμάτων. Αυτό ίσως δικαιολογείται από την αυξημένη παραγωγή βιομάζας. Οι μύκητες *Thamnidium elegans* και *Cunninghamella echinulata* σημείωσαν τα υψηλότερα ποσοστά ενδοκυτταρικού λίπους φτάνοντας τα 6,88 gL⁻¹ με ποσοστό 34% w/w και 6,37 gL⁻¹ με ποσοστό 32% w/w επί της ξηρής βιομάζας αντίστοιχα. Ο μύκητας *Mortierella ramaniana* παρήγαγε 4,95 gL⁻¹ ενδοκυτταρικού λίπους, ενώ η παραγωγή λιπιδίων από τον *Mortierella isabellina* ήταν χαμηλότερη σε σχέση με το πρώτο σετ πειραμάτων φτάνοντας μόλις τα 3,23 gL⁻¹. Στις καλλιέργειες των *Mortierella isabellina* και *Thamnidium elegans* τα ποσοστά γ-λινολενικού οξέος ήταν σημαντικά

αυξημένα σε σχέση με το πρώτο σετ πειραμάτων φτάνοντας το 6,4 και 8,5% επί των συνολικών λιπιδίων αντίστοιχα. Και σε αυτή την περίπτωση το ελαϊκό οξύ ήταν το επικρατέστερο λιπαρό οξύ με ποσοστά 38-52% και το παλμιτικό το δεύτερο επικρατέστερο με ποσοστά 22-38%.



Διάγραμμα 3-2: Απεικόνιση της μέγιστης παραχθείσας βιομάζας (DW, gL⁻¹) και της μέγιστης παραγωγής λιπιδίων (TL, gL⁻¹) σε συνθήκες περίσσειας αζώτου.

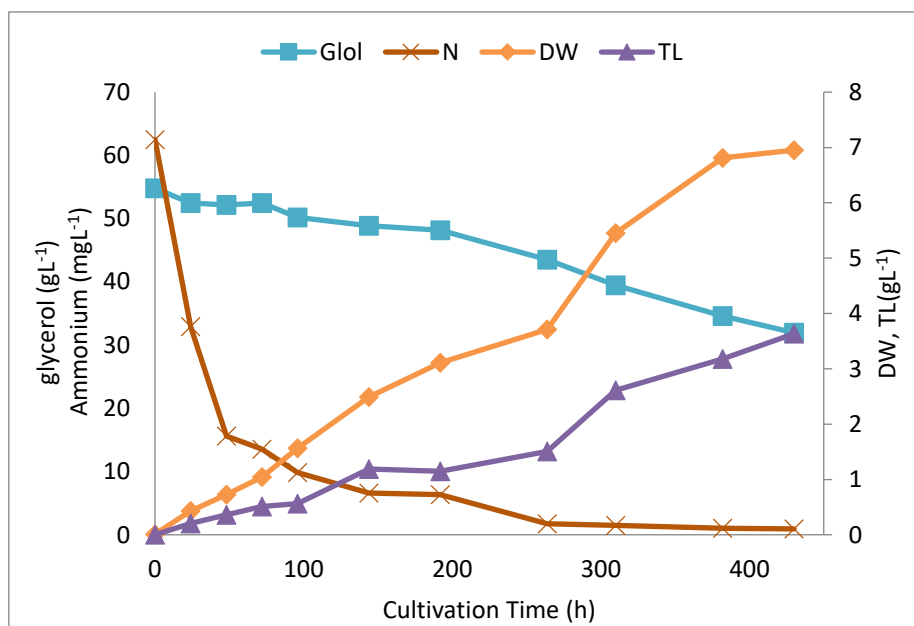
Σε όλες τις ζυμώσεις η συγκέντρωσή του διαλυτού οξυγόνου (DO) παρέμεινε πάνω από το 75% σε όλα τα στάδια ανάπτυξης των μυκήτων.

Ποσοτικά αποτελέσματα των σημείων της κινητικής της κατανάλωσης του υποστρώματος, αύξησης της βιομάζας, της συσσώρευσης των συνολικών λιπιδίων συναρτήσει του χρόνου, καθώς και της ανάλυσης στα αντίστοιχα λιπαρά οξέα, παρουσιάζονται στους παρακάτω πίνακες καθώς και οπτικοποίηση αυτών σε διαγράμματα για κάθε μία από τις ζυμώσεις που πραγματοποιήθηκαν.

3.1 Καλλιέργεια του μύκητα *Mortierella isabellina*

3.1.1 Σε χαμηλές συγκεντρώσεις αζώτου

Η κινητική της αύξησης της βιομάζας, της κατανάλωσης του υποστρώματος και της παραγωγής ενδοκυτταρικού λίπους από τον μύκητα *Mortierella isabellina* κατά την καλλιέργεια του σε μέσο αύξησης με μόνη πηγή άνθρακα απόβλητη γλυκερόλη και με περιοριστικό παράγοντα αύξησης το άζωτο, απεικονίζεται αναλυτικά τόσο στον Πίνακα 3-1 όσο και στο Διάγραμμα 3-3. Αναφέρονται επίσης το ποσοστό των λιπιδίων επί της ξηρής βιομάζας καθώς και η κατανάλωση των ανόργανων αμμωνιακών ιόντων.



Διάγραμμα 3-3: Κινητική της αύξησης της ολικής βιομάζας (DW, gL⁻¹), της συσσώρευσης ολικών λιπιδίων (TL, gL⁻¹), της κατανάλωσης γλυκερόλης (GloI, gL⁻¹) και της κατανάλωσης του θειικού αμμωνίου (N, mgL⁻¹) κατά τη διάρκεια αύξησης του *Mortierella isabellina* σε γλυκερόλη (54,8 gL⁻¹) και με περιοριστικό παράγοντα αύξησης το άζωτο (62,5 mgL⁻¹).

Παρατηρούμε ότι δεν καταναλώθηκε ολόκληρη η ποσότητα της γλυκερόλης, μόλις 23 gL⁻¹ μετά από 430 ώρες από τον αρχικό εμβολιασμό. Ωστόσο σημειώθηκε αξιόλογη κυτταρική ανάπτυξη φτάνοντας σχεδόν τα 7 gL⁻¹ με ποσοστό λίπους 52 % w/w επί της ξηρής βιομάζας. Το θειικό αμμώνιο έχει καταναλωθεί σχεδόν εξολοκλήρου από την τρίτη κιόλας ημέρα συμβαδίζοντας με την ενδοκυτταρική συσσώρευση των λιπιδίων.

Πίνακας 3-1: Αύξηση του *Mortierella isabellina* σε γλυκερόλη με περιοριστικό παράγοντα αύξησης το άζωτο. Αναλυτικά: Η καταναλωθείσα γλυκερόλη (S_{con} , gL^{-1}), η εναπομείνασα γλυκερόλη (S_r , gL^{-1}), η παραχθείσα ξηρή βιομάζα (DW , gL^{-1}), η αναλογία παραχθείσας βιομάζας προς το καταναλωθέν υπόστρωμα ($Y_{DW/s}$, gg^{-1}) τα συνολικά παραχθέντα λιπίδια (TL , gL^{-1}), αναλογία των συνολικών παραχθέντων λιπιδίων προς την παραχθείσα ξηρή βιομάζα ($Y_{TL/DW}$, gg^{-1}), το εναπομείνον θειικό ιόν (NH_4^+ , mgL^{-1}) συναρτήσει του χρόνου καλλιέργειας (*Cultivation time*, *h*).

Cultivation time (h)	S_{con} (gL^{-1})	S_r (gL^{-1})	DW (gL^{-1})	$Y_{DW/s}$ (gg^{-1})	TL (gL^{-1})	$Y_{TL/DW}$ (gg^{-1})	NH_4^+ (mgL^{-1})
0	-	54,79	0,01	-	-	-	62,50
24	2,30	52,48	0,43	0,19	0,20	0,48	32,90
48	2,63	52,16	0,72	0,27	0,36	0,50	15,63
72	2,31	52,48	1,04	0,45	0,51	0,49	13,54
96	4,59	50,20	1,57	0,34	0,57	0,36	9,84
144	5,90	48,89	2,49	0,42	1,19	0,48	6,62
192	6,61	48,18	3,11	0,47	1,15	0,37	6,35
264	11,28	43,51	3,71	0,33	1,50	0,41	1,72
312	15,34	39,45	5,45	0,36	2,61	0,48	1,47
384	20,17	34,62	6,81	0,34	3,18	0,47	1,02
432	22,83	31,96	6,95	0,30	3,63	0,52	0,93

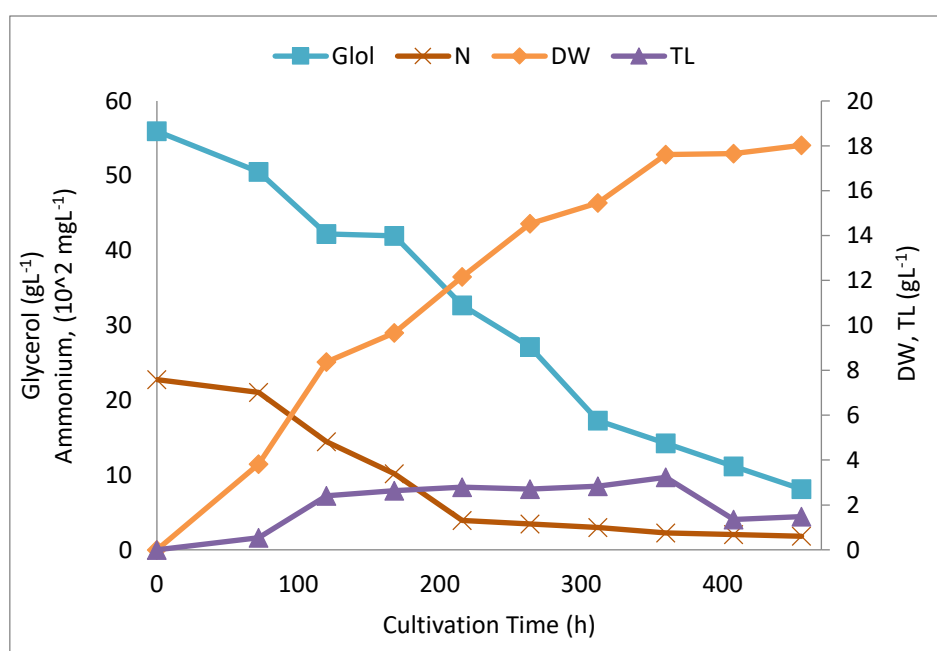
Η ανάλυση της σύστασης του ενδοκυτταρικού λίπους στα επιμέρους λιπαρά οξέα πραγματοποιήθηκε επιλεκτικά σε δείγματα από την εκθετική και τη στάσιμη φάση ανάπτυξης του μύκητα. Δεν παρατηρήσαμε κάποια αξιοσημείωτη αλλαγή στη σύσταση των λιπαρών οξέων από τη μετέπειτα εκθετική φάση και την στάσιμη φάση ανάπτυξης. Το επικρατέστερο λιπαρό οξύ ήταν το ελαϊκό (C18:0) με ποσοστό κοντά στο 50%, ενώ το γ-λινολενικό (C18:3) ήταν σε χαμηλά ποσοστά μεταξύ 1,5 και 2,4% επί των συνολικών λιπιδίων.

Πίνακας 3-2: Σύσταση των παραχθέντων λιπιδίων του μύκητα *Mortierella isabellina* κατά την ανάπτυξη σε γλυκερόλη με περιοριστικό παράγοντα αύξησης το άζωτο, 144 και 384 ώρες μετά τον αρχικό εμβολισμό. Ποσοστό παλμιτικού (C16:0), παλμιτελαϊκού (C16:1), στεατικού (C18:0), ελαϊκού (C18:1), λινελαϊκού (C18:2) και λινολενικού οξέος (C18:3) επί των συνολικών λιπιδίων.

Λιπαρά οξέα (%)						
Χρόνος	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3
144	30,3	3,0	1,7	45,6	14,7	1,5
384	23,1	3,0	3,5	49,6	11,7	2,4

3.1.2 Σε υψηλές συγκεντρώσεις αζώτου

Η κινητική της αύξησης της βιομάζας, της κατανάλωσης του υποστρώματος και της παραγωγής ενδοκυτταρικού λίπους από τον μύκητα *Mortierella isabellina* κατά την καλλιέργεια του σε μέσο αύξησης με μόνη πηγή άνθρακα απόβλητη γλυκερόλη και περίσσεια αζώτου, απεικονίζεται αναλυτικά τόσο στον Πίνακα 3-3 όσο και στο Διάγραμμα 3-4. Αναφέρονται επίσης το ποσοστό των λιπιδίων επί της ξηρής βιομάζας καθώς και η κατανάλωση του θειικού αμμωνίου.



Διάγραμμα 3-4: Κινητική της αύξησης της ολικής βιομάζας (DW, gL^{-1}), της συσσώρευσης ολικών λιπιδίων (TL, gL^{-1}), της κατανάλωσης γλυκερόλης (GloI, gL^{-1}) και της κατανάλωσης του θειικού αμμωνίου (N, 10^{-2} mgL^{-1}) κατά τη διάρκεια αύξησης του *Mortierella isabellina* σε γλυκερόλη (56 gL^{-1}) και περίσσεια αζώτου (2275 mgL^{-1}).

Σημειώθηκε πολύ καλή κυτταρική ανάπτυξη φτάνοντας τα 18 gL^{-1} 456 ώρες από τον αρχικό εμβολιασμό. Η γλυκερόλη καταναλώθηκε σχεδόν εξολοκλήρου, από τα αρχικά 56 gL^{-1} έμειναν μόλις 8 gL^{-1} . Το ποσοστό των ενδοκυτταρικών λιπιδίων παρέμεινε σε χαμηλά επίπεδα πέφτοντας μόλις στο 8% επί της ξηρής βιομάζας στο τέλος της ζύμωσης. Επίσης αρκετή ποσότητα θειικού αμμωνίου έμεινε ακατανάλωτη στο μέσο της καλλιέργειας ακόμα και μετά από 456 ώρες από τον αρχικό εμβολιασμό.

Πίνακας 3-3: Αύξηση του *Mortierella isabellina* σε γλυκερόλη και περίσσεια αζώτου. Αναλυτικά: Η καταναλωθείσα γλυκερόλη (S_{con} , gL^{-1}), η εναπομείνασα γλυκερόλη (S_r , gL^{-1}), η παραχθείσα ξηρή βιομάζα (DW , gL^{-1}), η αναλογία παραχθείσας βιομάζας προς το καταναλωθέν υπόστρωμα ($Y_{DW/S}$, gg^{-1}), τα συνολικά παραχθέντα λιπίδια (TL , gL^{-1}), αναλογία των συνολικών παραχθέντων λιπιδίων ανά την παραχθείσα ξηρή βιομάζα ($Y_{TL/DW}$, gg^{-1}), το εναπομείναν θεϊκό ιόν (NH_4^+ , $10^2 mgL^{-1}$) συναρτήσει του χρόνου καλλιέργειας (*Cultivation time*, *h*).

Cultivation time (h)	S_{con} (gL^{-1})	S_r (gL^{-1})	DW (gL^{-1})	$Y_{DW/S}$ (gg^{-1})	TL (gL^{-1})	$Y_{TL/DW}$ (gg^{-1})	NH_4^+ ($10^2 mgL^{-1}$)
0	-	55,96	0,01	-	-	-	22,75
72	5,43	50,53	3,81	0,70	0,53	0,14	21,04
120	13,71	42,24	8,37	0,61	2,41	0,29	14,45
168	13,99	41,96	9,67	0,69	2,64	0,27	10,19
216	23,29	32,67	12,16	0,52	2,79	0,23	3,94
264	28,83	27,13	14,53	0,50	2,71	0,19	3,44
312	38,68	17,28	15,46	0,40	2,84	0,18	2,98
360	41,72	14,23	17,61	0,42	3,23	0,18	2,27
408	44,79	11,17	17,65	0,39	1,35	0,08	2,03
456	47,84	8,11	18,02	0,38	1,48	0,08	1,81

Από την ανάλυση των λιπαρών οξέων διαπιστώσαμε αύξηση του ποσοστού του γ -λινολενικού οξέος (C18:3) από την εκθετική φάση μέχρι την αρχή της στάσιμης φάσης φτάνοντας το 6.4% και προς το τέλος της ζύμωσης σημειώθηκε μείωση του ποσοστού αυτού στο 5%. Ταυτόχρονα με την αύξηση του γ -λινολενικού είδαμε μείωση του ελαϊκού οξέος και αντίστροφα.

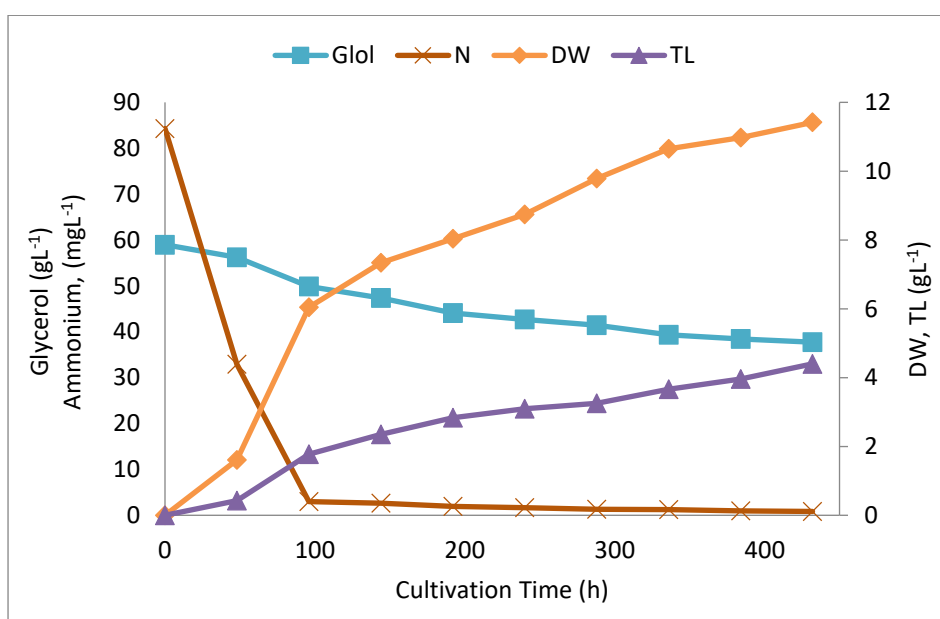
Πίνακας 3-4: Σύσταση των παραχθέντων λιπιδίων του μύκητα *Mortierella isabellina* κατά την ανάπτυξη σε γλυκερόλη και περίσσεια αζώτου, 72, 312 και 456 ώρες μετά τον αρχικό εμβολισμό. Ποσοστό παλμιτικού (C16:0), παλμιτελαϊκού (C16:1), στεατικού (C18:0), ελαϊκού (C18:1), λινελαϊκού (C18:2) και γ λινολενικού οξέος (C18:3) επί των συνολικών λιπιδίων.

Λιπαρά οξέα (%)						
Χρόνος	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3
72	22,9	0	2,9	51,7	12,8	1,6
312	30,3	4	2,0	39,8	10,5	6,4
456	28,5	3,1	2,6	40,6	6,7	5,1

3.2 ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΤΟΥ ΜΥΚΗΤΑ *MORTIERELLA RAMANNIANA*

3.2.1 Σε χαμηλές συγκεντρώσεις αζώτου

Η κινητική της αύξησης της βιομάζας, της κατανάλωσης του υποστρώματος και της παραγωγής ενδοκυτταρικού λίπους από τον μύκητα *Mortierella ramanniana* κατά την καλλιέργεια του σε μέσο αύξησης με μόνη πηγή άνθρακα απόβλητη γλυκερόλη και με περιοριστικό παράγοντα αύξησης το άζωτο, απεικονίζεται αναλυτικά τόσο στον Πίνακα 3-5 όσο και στο Διάγραμμα 3-5. Αναφέρονται επίσης το ποσοστό των λιπιδίων επί της ξηρής βιομάζας καθώς και η κατανάλωση των ανόργανων αμμωνιακών ιόντων.



Διάγραμμα 3-5: Κινητική της αύξησης της ολικής βιομάζας (DW, gL⁻¹), της συσσώρευσης ολικών λιπιδίων (TL, gL⁻¹), της κατανάλωσης γλυκερόλης (GloI, gL⁻¹) και της κατανάλωσης του θειικού αμμωνίου (N, mgL⁻¹) κατά τη διάρκεια αύξησης του *Mortierella ramanniana* σε γλυκερόλη (59 gL⁻¹) και με περιοριστικό παράγοντα αύξησης το άζωτο (84,3 mgL⁻¹).

Το συγκεκριμένο στέλεχος σημείωσε την μεγαλύτερη συγκέντρωση όσον αφορά στην παραγωγή βιομάζας (στο πρώτο σετ πειραμάτων) φτάνοντας τα 11,4 gL⁻¹ αλλά όχι και την μεγαλύτερη συγκέντρωση παραχθέντων λιπιδίων τα οποία έφτασαν το 39% w/w επί της ξηρής βιομάζας και αντιστοιχούν σε 4,4 gL⁻¹. Το θειικό αμμώνιο είχε καταναλωθεί σχεδόν εξολοκλήρου από την δεύτερη κιάλας ημέρα συμβαδίζοντας με την ενδοκυτταρική συσσώρευση των λιπιδίων σε αντίθεση με την κατανάλωση της γλυκερόλης όπου καταναλώθηκαν τα 21 από τα αρχικά 59 gL⁻¹ 432 ώρες μετά από τον αρχικό εμβολιασμό.

Πίνακας 3-5: Αύξηση του *Mortierella ramanniana* σε γλυκερόλη με περιοριστικό παράγοντα αύξησης το άζωτο. Αναλυτικά: Η καταναλωθείσα γλυκερόλη (S_{con} , gL^{-1}), η εναπομείνασα γλυκερόλη (S_r , gL^{-1}), η παραχθείσα ξηρή βιομάζα (DW , gL^{-1}), η αναλογία παραχθείσας βιομάζας προς το καταναλωθέν υπόστρωμα ($Y_{DW/S}$, gg^{-1}), τα συνολικά παραχθέντα λιπίδια (TL , gL^{-1}), αναλογία των συνολικών παραχθέντων λιπιδίων ανά την παραχθείσα ξηρή βιομάζα ($Y_{TL/DW}$, gg^{-1}), το εναπομείνον θειικό ιόν (NH_4^+ , mgL^{-1}) συναρτήσει του χρόνου καλλιέργειας (*Cultivation time*, h).

Cultivation time (h)	S_{con} (gL^{-1})	S_r (gL^{-1})	DW (gL^{-1})	$Y_{DW/S}$ (gg^{-1})	TL (gL^{-1})	$Y_{TL/DW}$ (gg^{-1})	NH_4^+ (mgL^{-1})
0	-	58,97	0,01	-	-	-	84,3
48	2,74	56,22	1,61	0,59	0,43	0,26	32,9
96	9,06	49,90	6,05	0,67	1,78	0,29	2,97
144	11,62	47,35	7,33	0,63	2,35	0,32	2,61
192	14,87	44,09	8,04	0,54	2,83	0,35	1,94
240	16,30	42,66	8,74	0,54	3,10	0,35	1,63
288	17,52	41,45	9,79	0,56	3,25	0,33	1,33
336	19,65	39,31	10,65	0,54	3,66	0,34	1,24
384	20,57	38,39	10,98	0,53	3,96	0,36	0,96
432	21,24	37,73	11,42	0,54	4,40	0,39	0,84

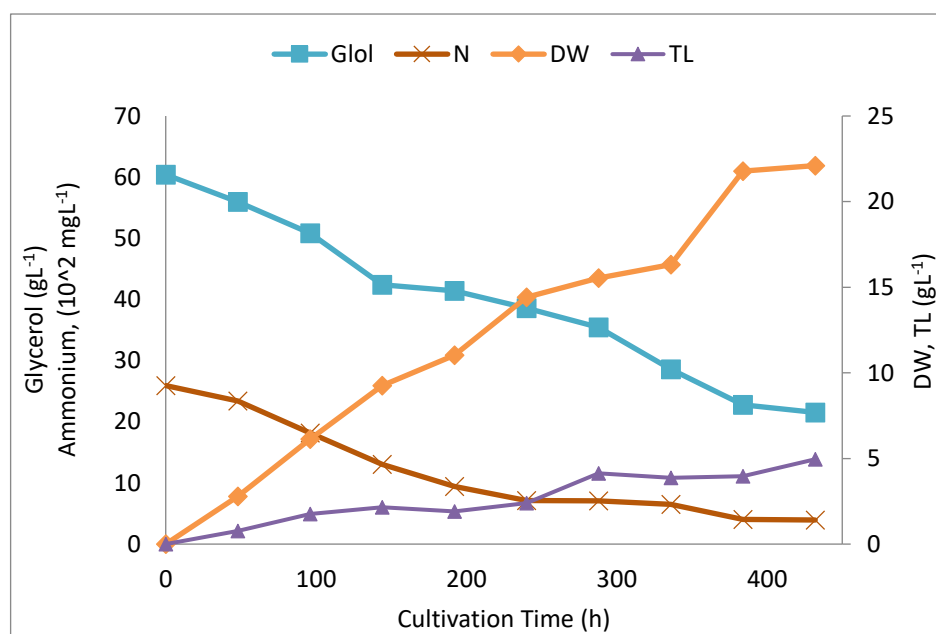
Ανάλυση των λιπαρών οξέων έδειξε ότι επικρατέστερο λιπαρό οξύ ήταν το ελαϊκό (C18:1) χωρίς να παρουσιάσει ιδιαίτερη διακύμανση κατά την εξέλιξη της ζύμωσης. Δεύτερο επικρατέστερο ήταν το παλμιτικό οξύ (C16:0) με ποσοστό 26-39% επί των συνολικών λιπιδίων. Σημειώθηκαν επίσης σημαντικές ποσότητες γ-λινολενικού οξέος με ποσοστό που έφτασε σχεδόν το 5% επί των συνολικών λιπιδίων.

Πίνακας 3-6: Σύσταση των παραχθέντων λιπιδίων του μύκητα *Mortierella ramanniana* κατά την ανάπτυξη σε γλυκερόλη με περιοριστικό παράγοντα αύξησης το άζωτο 144, 288 και 432 ώρες μετά τον αρχικό εμβολισμό. Ποσοστό παλμιτικού (C16:0), παλμιτελαϊκού (C16:1), στεατικού (C18:0), ελαϊκού (C18:1), λιγελαϊκού (C18:2) και γ-λινολενικού οξέος (C18:3) επί των συνολικών λιπιδίων.

Λιπαρά οξέα (%)						
Χρόνος	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3
144	39,2	0,3	1,9	48,9	2,4	2,2
288	26,8	0,9	1,6	48,0	14,0	4,8
432	31,1	0,3	1,8	48,4	11,2	1,9

3.2.2 Σε υψηλές συγκεντρώσεις αζώτου

Η κινητική της αύξησης της βιομάζας, της κατανάλωσης του υποστρώματος και της παραγωγής ενδοκυτταρικού λίπους από τον μύκητα *Mortierella ramanniana* κατά την καλλιέργεια του σε μέσο αύξησης με μόνη πηγή άνθρακα απόβλητη γλυκερόλη και περίσσεια αζώτου, απεικονίζεται αναλυτικά τόσο στον Πίνακα 3-7 όσο και στο Διάγραμμα 3-6. Αναφέρονται επίσης το ποσοστό των λιπιδίων επί της ξηρής βιομάζας καθώς και η κατανάλωση των ανόργανων αμμωνιακών ιόντων.



Διάγραμμα 3-6: Κινητική της αύξησης της ολικής βιομάζας (DW, gL^{-1}), της συσσώρευσης ολικών λιπιδίων (TL, gL^{-1}), της κατανάλωσης γλυκερόλης (GloI, gL^{-1}) και της κατανάλωσης του θειικού αμμωνίου (N, 10^2 mgL^{-1}) κατά τη διάρκεια αύξησης του *Mortierella ramanniana* σε γλυκερόλη ($60,4 \text{ gL}^{-1}$) και περίσσεια αζώτου (2592 mgL^{-1}).

Στη συγκεκριμένη ζύμωση σημειώθηκε η μεγαλύτερη συγκέντρωση παραχθείσας βιομάζας με 22 gL^{-1} και ποσοστό ενδοκυτταρικού λίπους 22% w/w στις 432 ώρες από τον αρχικό εμβολιασμό. Η κατανάλωση της γλυκερόλης ήταν περίπου 39 από τα αρχικά 60 gL^{-1} . Αρκετή ποσότητα θειικού αμμωνίου έμεινε στο μέσο χωρίς να καταναλωθεί.

Πίνακας 3-7: Αύξηση του *Mortierella ramanniana* σε γλυκερόλη και περίσσεια αζώτου. Αναλυτικά: Η καταναλωθείσα γλυκερόλη (S_{con} , gL^{-1}), η εναπομείνασα γλυκερόλη (S_r , gL^{-1}), η παραχθείσα ξηρή βιομάζα (DW , gL^{-1}), η αναλογία παραχθείσας βιομάζας προς το καταναλωθέν υπόστρωμα ($Y_{DW/S}$, gg^{-1}), τα συνολικά παραχθέντα λιπίδια (TL , gL^{-1}), αναλογία των συνολικών παραχθέντων λιπιδίων ανά την παραχθείσα ξηρή βιομάζα ($Y_{TL/DW}$, gg^{-1}), το εναπομείνον θειικό ιόν (NH_4^+ , 10^2mgL^{-1}) συναρτήσει του χρόνου καλλιέργειας (Cultivation time, h).

Cultivation time (h)	S_{con} (gL^{-1})	S_r (gL^{-1})	DW (gL^{-1})	$Y_{DW/S}$ (gg^{-1})	TL (gL^{-1})	$Y_{TL/DW}$ (gg^{-1})	NH_4^+ (10^2mgL^{-1})
0	-	60,42	0,01	-	-		25,92
48	4,47	55,95	2,78	0,62	0,77	0,28	23,39
96	9,60	50,82	6,13	0,64	1,75	0,29	18,16
144	18,00	42,42	9,26	0,51	2,15	0,23	13,06
192	18,99	41,42	11,03	0,58	1,91	0,17	9,42
240	21,85	38,56	14,42	0,66	2,40	0,17	7,13
288	24,98	35,43	15,54	0,62	4,14	0,27	7,06
336	31,82	28,60	16,32	0,51	3,87	0,24	6,52
384	37,66	22,76	21,79	0,58	3,96	0,18	4,02
432	38,89	21,53	22,11	0,57	4,95	0,22	3,94

Τα επικρατέστερα λιπαρά οξέα και σε αυτήν την περίπτωση ήταν το ελαϊκό (C18:0) και το παλμιτικό (C16:0). Στην αρχή της εκθετικής φάσης ανάπτυξης το ποσοστό του γ-λινολενικού οξέος (C18:3) ήταν κάτω από 1% επί των συνολικών λιπιδίων ενώ αυξήθηκε κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας και έφτασε το 4,6% στο σημείο που σημειώθηκε η μέγιστη συγκέντρωση ενδοκυτταρικών λιπιδίων. Το παλμιτελαϊκό (C16:1) και το στεατικό (C18:0) ήταν σε μικρότερες ποσότητες σε όλα τα στάδια της ζύμωσης.

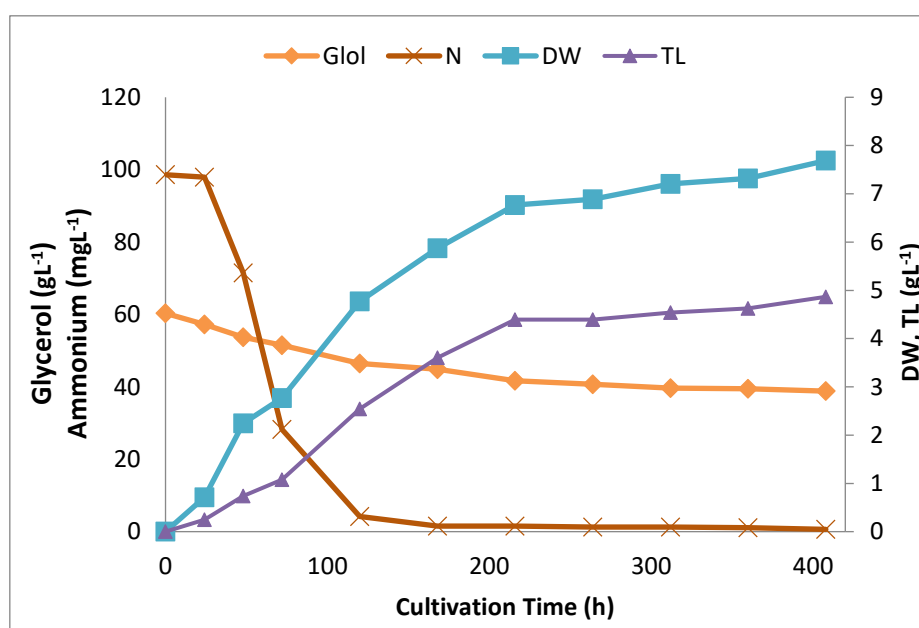
Πίνακας 3-8: Σύσταση των παραχθέντων λιπιδίων του μύκητα *Mortierella ramanniana* κατά την ανάπτυξη σε γλυκερόλη και περίσσεια αζώτου 96, 240 και 432 ώρες μετά τον αρχικό εμβολισμό. Ποσοστό παλμιτικού (C16:0), παλμιτελαϊκού (C16:1), στεατικού (C18:0), ελαϊκού (C18:1), λιγνελικού (C18:2) και γ-λινολενικού οξέος (C18:3) επί των συνολικών λιπιδίων.

Λιπαρά οξέα (%)						
Χρόνος	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3
96	36,4	1,7	2,4	46,9	7,2	0,4
240	30,7	0,4	2,1	44,3	12,6	1,7
432	35,6	1,5	2,6	40,8	7,9	4,6

3.3 ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΤΟΥ ΜΥΚΗΤΑ *THAMNIDIUM ELEGANS*

3.3.1 Σε χαμηλές συγκεντρώσεις αζώτου

Η κινητική της αύξησης της βιομάζας, της κατανάλωσης του υποστρώματος και της παραγωγής ενδοκυτταρικού λίπους από τον μύκητα *Thamnidium elegans* κατά την καλλιέργεια του σε μέσο αύξησης με μόνη πηγή άνθρακα απόβλητη γλυκερόλη και με περιοριστικό παράγοντα αύξησης το άζωτο, απεικονίζεται αναλυτικά τόσο στον Πίνακα 3-9 όσο και στο Διάγραμμα 3-7. Αναφέρονται επίσης το ποσοστό των λιπιδίων επί της ξηρής βιομάζας καθώς και η κατανάλωση των ανόργανων αμμωνιακών ιόντων.



Διάγραμμα 3-7: Κινητική της αύξησης της ολικής βιομάζας (DW , gL^{-1}), της συσσώρευσης ολικών λιπιδίων (TL , gL^{-1}), της κατανάλωσης γλυκερόλης ($GloI$, gL^{-1}) και της κατανάλωσης του θειικού αμμωνίου (N , mgL^{-1}) κατά τη διάρκεια αύξησης του *Thamnidium elegans* σε γλυκερόλη ($60,8 gL^{-1}$) και με περιοριστικό παράγοντα αύξησης το άζωτο ($86,5 mgL^{-1}$).

Στη συγκεκριμένη ζύμωση σημειώθηκε η μεγαλύτερη συγκέντρωση ενδοκυτταρικού λίπους φτάνοντας τα $5,47 gL^{-1}$ με ποσοστό επί της ξηρής βιομάζας σχεδόν 60% w/w. Και σε αυτήν την περίπτωση το θειικό αμμώνιο φαίνεται να εξαντλήθηκε σχεδόν αμέσως από το μέσο της καλλιέργειας ενώ η κατανάλωση της γλυκερόλης ήταν $25 gL^{-1}$ μετά από 504 ώρες από τον αρχικό εμβολιασμό.

Πίνακας 3-9: Αύξηση του *Thamnidium elegans* σε γλυκερόλη με περιοριστικό παράγοντα αύξησης το άζωτο. Αναλυτικά: Η καταναλωθείσα γλυκερόλη (S_{con} , gL^{-1}), η εναπομείνασα γλυκερόλη (S_r , gL^{-1}), η παραχθείσα ξηρή βιομάζα (DW , gL^{-1}), η αναλογία παραχθείσας βιομάζας προς το καταναλωθέν υπόστρωμα ($Y_{DW/S}$, gg^{-1}), τα συνολικά παραχθέντα λιπίδια (TL , gL^{-1}), αναλογία των συνολικών παραχθέντων λιπιδίων προς την παραχθείσα ξηρή βιομάζα ($Y_{TL/DW}$, gg^{-1}), το εναπομείνον θειικό ιόν (NH_4^+ , mgL^{-1}) συναρτήσει του χρόνου καλλιέργειας (Cultivation time, h).

Cultivation time (h)	S_{con} (gL^{-1})	S_r (gL^{-1})	DW (gL^{-1})	$Y_{DW/S}$ (gg^{-1})	TL (gL^{-1})	$Y_{TL/DW}$ (gg^{-1})	NH_4^+ (mgL^{-1})
0	-	60,80	0,01	-	-	-	86,5
72	10,10	50,70	2,56	0,25	0,82	0,32	29,6
120	14,68	46,12	2,81	0,19	0,97	0,34	12,4
168	14,80	46,00	5,98	0,40	2,57	0,43	9,89
216	16,87	43,93	6,39	0,38	2,76	0,43	9,71
264	20,86	39,94	7,09	0,34	3,40	0,48	6,49
312	22,52	38,28	7,91	0,35	3,92	0,50	5,51
360	23,39	37,41	8,39	0,36	4,29	0,51	5,31
408	23,34	37,45	8,76	0,38	4,85	0,55	2,95
456	23,43	37,37	9,05	0,39	5,13	0,57	2,79
504	25,29	35,50	9,46	0,37	5,47	0,58	2,65

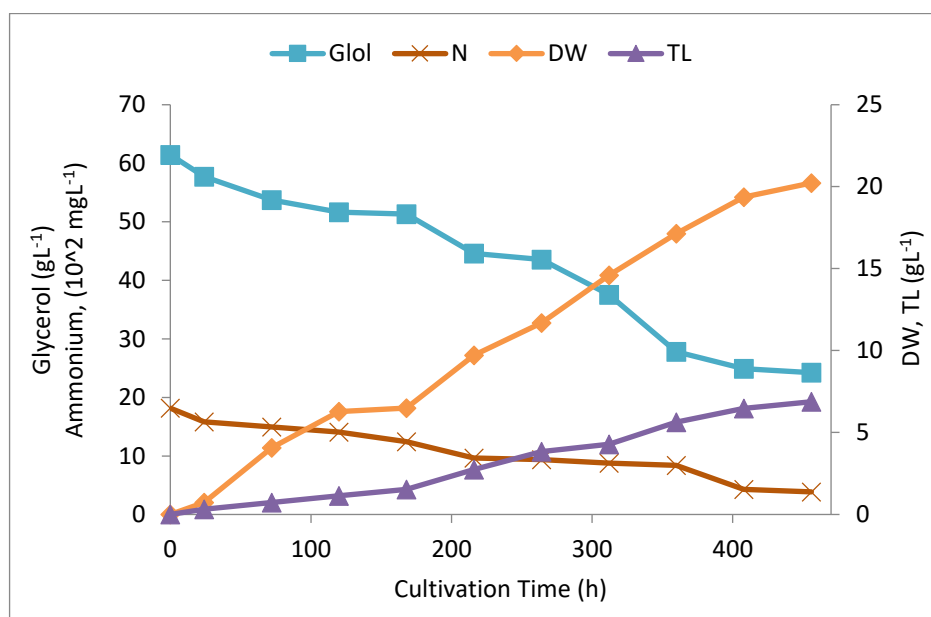
Κατά την καλλιέργεια του μύκητα σε συνθήκες περιορισμού αζώτου η σύσταση των λιπιδίων δεν παρουσίασε κάποια αξιόλογη μεταβολή κατά την διάρκεια της ζύμωσης. Το μεγαλύτερο ποσοστό κατείχε το ελαϊκό (C18:0) κοντά στο 50% και το παλμιτικό (C16:0) το δεύτερο μεγαλύτερο με ποσοστό 25-31%. Σημειώθηκαν επίσης σημαντικές ποσότητες λινελαϊκού οξέος (C18:2) με το ποσοστό να κυμαίνεται από το 6 μέχρι 10,6%. Το γ-λινολενικό οξύ κυμάνθηκε σε χαμηλά σχετικά ποσοστά, κοντά στο 3%.

Πίνακας 3-10: Σύσταση των παραχθέντων λιπιδίων του μύκητα *Thamnidium elegans* κατά την ανάπτυξη σε γλυκερόλη με περιοριστικό παράγοντα αύξησης το άζωτο 72, 312 και 504 ώρες μετά τον αρχικό εμβολισμό. Ποσοστό παλμιτικού (C16:0), παλμιτελαϊκού (C16:1), στεατικού (C18:0), ελαϊκού (C18:1), λινελαϊκού (C18:2) και γ-λινολενικού οξέος (C18:3) επί των συνολικών λιπιδίων.

Λιπαρά οξέα (%)						
Χρόνος	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3
72	31,5	1,1	2,5	50	6,2	2,9
312	25,5	1,4	1,2	52,1	10,3	3,5
504	26,1	1,2	1,2	49,8	10,6	2,9

3.3.2 Σε υψηλές συγκεντρώσεις αζώτου

Η κινητική της αύξησης της βιομάζας, της κατανάλωσης του υποστρώματος και της παραγωγής ενδοκυτταρικού λίπους από τον μύκητα *Thamnidium elegans* κατά την καλλιέργεια του σε μέσο αύξησης με μόνη πηγή άνθρακα απόβλητη γλυκερόλη και περίσσεια αζώτου, απεικονίζεται αναλυτικά τόσο στον Πίνακα 3-11 όσο και στο Διάγραμμα 3-8. Αναφέρονται επίσης το ποσοστό των λιπιδίων επί της ξηρής βιομάζας καθώς και η κατανάλωση των ανόργανων αμμωνιακών ιόντων.



Διάγραμμα 3-8: Κινητική της αύξησης της ολικής βιομάζας (DW, gL^{-1}), της συσσώρευσης ολικών λιπιδίων (TL, gL^{-1}), της κατανάλωσης γλυκερόλης (GloI, gL^{-1}) και της κατανάλωσης του θειικού αμμωνίου (N, 10^2 mgL^{-1}) κατά τη διάρκεια αύξησης του *Thamnidium elegans* σε γλυκερόλη ($61,5 \text{ gL}^{-1}$) και περίσσεια αζώτου (1816 mgL^{-1}).

Παρατηρήθηκε πολύ καλή κυτταρική ανάπτυξη ξεπερνώντας τα 20 gL^{-1} μετά από 456 ώρες από τον αρχικό εμβολιασμό ενώ σημειώθηκε η μεγαλύτερη συγκέντρωση ενδοκυτταρικού λίπους φτάνοντας τα $6,9 \text{ gL}^{-1}$. Αυτό δικαιολογείται από το μεγάλο ποσοστό επί της ξηρής βιομάζας, σε σχέση με τους άλλους μύκητες στο δεύτερο σετ πειραμάτων, που ξεπέρασε το 34% w/w.

Πίνακας 3-11: Αύξηση του *Thamnidium elegans* σε γλυκερόλη και περίσσεια αζώτου. Αναλυτικά: Η καναλωθείσα γλυκερόλη (S_{con} , gL^{-1}), η εναπομείνουσα γλυκερόλη (S_r , gL^{-1}), η παραχθείσα ξηρή βιομάζα (DW , gL^{-1}), η αναλογία παραχθείσας βιομάζας προς το καταναλωθέν υπόστρωμα ($Y_{DW/s}$, gg^{-1}), τα συνολικά παραχθέντα λιπίδια (TL , gL^{-1}), αναλογία των συνολικών παραχθέντων λιπιδίων ανά την παραχθείσα ξηρή βιομάζα ($Y_{TL/DW}$, gg^{-1}), το εναπομείνον θειικό ιόν (NH_4^+ , $10^2 mgL^{-1}$) συναρτήσει του χρόνου καλλιέργειας (Cultivation time, h).

Cultivation time (h)	S_{con} (gL^{-1})	S_r (gL^{-1})	DW (gL^{-1})	$Y_{DW/s}$ (gg^{-1})	TL (gL^{-1})	$Y_{TL/DW}$ (gg^{-1})	NH_4^+ ($10^2 mgL^{-1}$)
0	-	61,45	0,01		-	-	18,16
24	3,73	57,72	0,73	0,20	0,32	0,44	15,81
72	7,70	53,76	4,06	0,53	0,72	0,18	14,96
120	9,81	51,64	6,28	0,64	1,15	0,18	14,07
168	10,10	51,35	6,50	0,64	1,54	0,24	12,42
216	16,84	44,61	9,71	0,58	2,74	0,28	9,62
264	17,88	43,58	11,70	0,65	3,84	0,33	9,35
312	23,91	37,54	14,60	0,61	4,28	0,29	8,77
360	33,65	27,80	17,15	0,51	5,63	0,33	8,41
408	36,52	24,93	19,37	0,53	6,48	0,33	4,29
456	37,23	24,23	20,23	0,54	6,88	0,34	3,86

Η ανάλυση των λιπαρών οξέων έδειξε σημαντική ποσότητα παραχθέντος γ -λινολενικού οξέος (C18:3) φτάνοντας το 8,5% επί των συνολικών λιπιδίων. Κατά τη εξέλιξη της ζύμωσης το ποσοστό αυτό έπεσε φτάνοντας στο 3,7% κατά τη στάσιμη φάση. Ταυτόχρονα σημειώθηκε αύξηση του ελαϊκού οξέος (C18:1) και του στεατικού (C16:0) ενώ μειώθηκε σημαντικά το ποσοστό του λιγνελικού (C18:2).

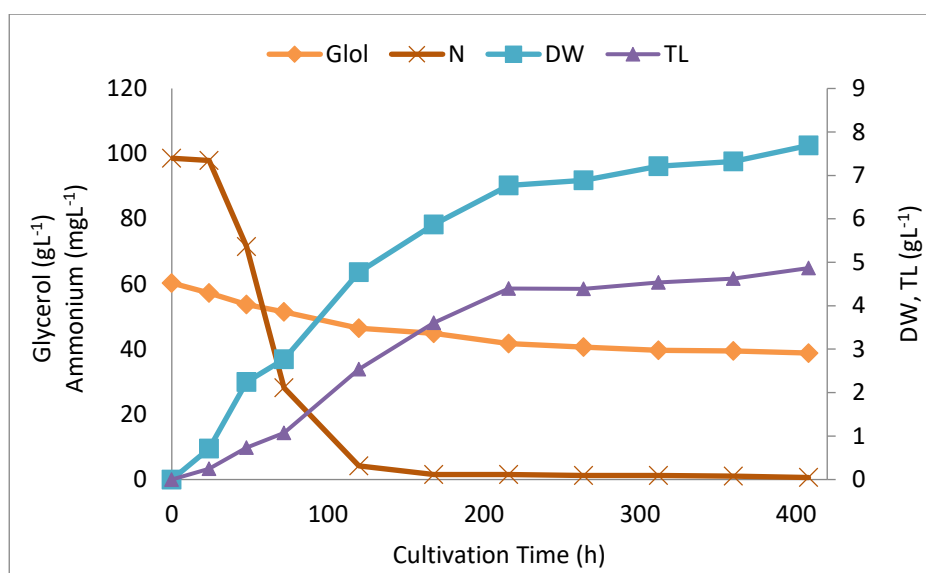
Πίνακας 3-12: Σύσταση των λιπιδίων σε λιπαρά οξέα του μύκητα *Thamnidium elegans* κατά την ανάπτυξη σε γλυκερόλη και περίσσεια αζώτου 216, 360 και 456 ώρες μετά τον αρχικό εμβολισμό. Ποσοστό παλμιτικού (C16:0), παλμιτελαϊκού (C16:1), στεατικού (C18:0), ελαϊκού (C18:1), λιγνελικού (C18:2) και γ λινολενικού οξέος (C18:3) επί των συνολικών λιπιδίων.

Λιπαρά οξέα (%)						
Χρόνος	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3
216	24,6	1,1	3,5	39,7	17,0	8,5
360	32,1	0,5	3,6	38,0	16,5	6,6
456	30,1	2,5	3,2	51,8	5,3	3,7

3.4 ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΤΟΥ ΜΥΚΗΤΑ *CUNNINGHAMELLA ECHINULATA*

3.4.1 Σε χαμηλές συγκεντρώσεις αζώτου

Η κινητική της αύξησης της βιομάζας, της κατανάλωσης του υποστρώματος και της παραγωγής ενδοκυτταρικού λίπους από τον μύκητα *Cunninghamella echinulata* κατά την καλλιέργεια του σε μέσο αύξησης με μόνη πηγή άνθρακα απόβλητη γλυκερόλη και με περιοριστικό παράγοντα αύξησης το άζωτο, απεικονίζεται αναλυτικά τόσο στον Πίνακα 3-13 όσο και στο Διάγραμμα 3-9. Αναφέρονται επίσης το ποσοστό των λιπιδίων επί της ξηρής βιομάζας καθώς και η κατανάλωση του θειικού αμμωνίου.



Διάγραμμα 3-9: Κινητική της αύξησης της ολικής βιομάζας (DW, gL⁻¹), της συσσώρευσης ολικών λιπιδίων (TL, gL⁻¹), της κατανάλωσης γλυκερόλης (GloI, gL⁻¹) και της κατανάλωσης του θειικού αμμωνίου (N, mgL⁻¹) κατά τη διάρκεια αύξησης του *Cunninghamella echinulata* σε γλυκερόλη (61,8 gL⁻¹) και με περιοριστικό παράγοντα αύξησης το άζωτο (98,6 mgL⁻¹).

Παρατηρήθηκε αξιόλογη κυτταρική ανάπτυξη φτάνοντας τα 7,7 gL⁻¹ ενώ η συγκέντρωση του ενδοκυτταρικού λίπους τα 4,8 gL⁻¹ που αντιστοιχεί σε 63% επί της ξηρής βιομάζας, 408 ώρες μετά τον αρχικό εμβολιασμό. Η κατανάλωση της γλυκερόλης έφτασε τα 23 από τα αρχικά 60 gL⁻¹. Και σε αυτήν την περίπτωση η κατανάλωση του θειικού αμμωνίου ήταν ταχύτερη, φτάνοντας σε μηδενικά σχεδόν επίπεδα μετά από την τρίτη ημέρα της καλλιέργειας.

Πίνακας 3-13: Αύξηση του *Cunninghamella echinulata* σε γλυκερόλη με περιοριστικό παράγοντα αύξησης το άζωτο. Αναλυτικά: Η καταναλωθείσα γλυκερόλη (S_{con} , gL^{-1}), η εναπομείνασα γλυκερόλη (S_r , gL^{-1}), η παραχθείσα ξηρή βιομάζα (DW , gL^{-1}), η αναλογία παραχθείσας βιομάζας προς το καταναλωθέν υπόστρωμα ($Y_{DW/S}$, gg^{-1}), τα συνολικά παραχθέντα λιπίδια (TL , gL^{-1}), αναλογία των συνολικών παραχθέντων λιπιδίων ανά την παραχθείσα ξηρή βιομάζα ($Y_{TL/DW}$, gg^{-1}), το εναπομείνον θειικό ιόν (NH_4^+ , mgL^{-1}) συναρτήσει του χρόνου καλλιέργειας (*Cultivation time*, *h*).

Cultivation time (h)	S_{con} (gL^{-1})	S_r (gL^{-1})	DW (gL^{-1})	$Y_{DW/S}$ (gg^{-1})	TL (gL^{-1})	$Y_{TL/DW}$ (gg^{-1})	NH_4^+ (mgL^{-1})
0	-	60,31	0,01	-	-	-	98,6
24	4,62	57,21	0,71	0,15	0,25	0,35	97,9
48	8,13	53,70	2,24	0,28	0,74	0,33	71,5
72	10,35	51,47	2,77	0,27	1,08	0,39	28,2
120	15,38	46,44	4,77	0,31	2,54	0,53	4,19
168	16,97	44,86	5,87	0,35	3,61	0,61	1,57
216	20,11	41,71	6,77	0,34	4,39	0,65	1,49
264	21,15	40,67	6,89	0,33	4,39	0,64	1,28
312	22,19	39,63	7,21	0,32	4,54	0,63	1,26
360	22,36	39,47	7,32	0,33	4,63	0,63	1,09
408	23,01	38,81	7,69	0,33	4,87	0,63	0,62

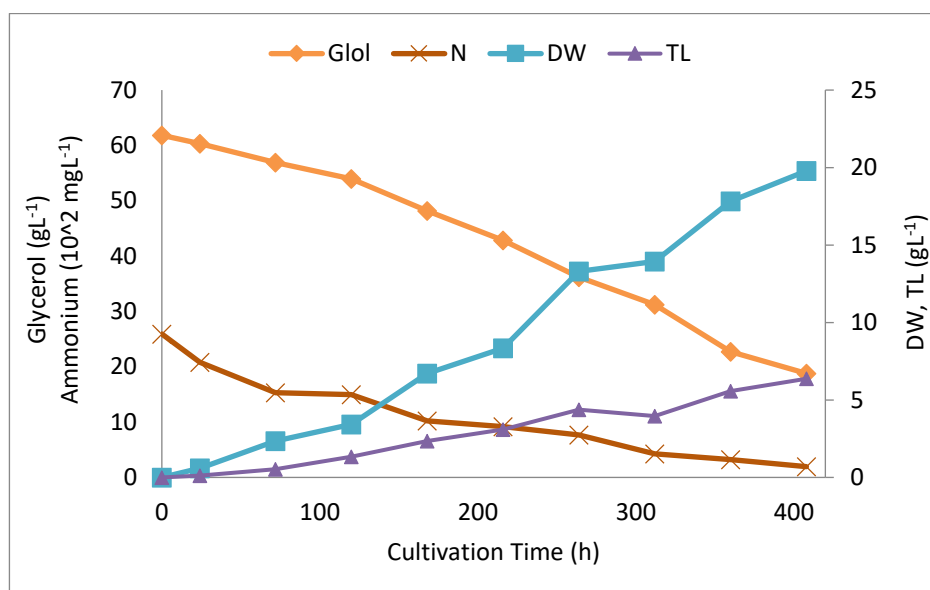
Η ανάλυση των παραχθέντων λιπιδίων έδειξε μια αυξομείωση στα λιπαρά οξέα. Κατά τη διάρκεια της ζύμωσης τα ποσοστά του γ -λινολενικού οξέος μειώθηκαν από το 5% που ήταν στην εκθετική φάση ανάπτυξης στο 2% κατά τη στάσιμη φάση. Παρόμοια κινήθηκαν και τα ποσοστά του ελαϊκού ενώ αύξηση παρατηρήθηκε στο ποσοστό του παλμιτικού οξέος (C16:0). Σημαντικά ήταν και τα ποσοστά του λινελαϊκού οξέος (C18:2) που κυμάνθηκε μεταξύ 13 και 18% επί των συνολικών λιπιδίων.

Πίνακας 3-14: Σύσταση των λιπιδίων σε λιπαρά οξέα του μύκητα *Cunninghamella echinulata* κατά την ανάπτυξη σε γλυκερόλη με περιοριστικό παράγοντα αύξησης το άζωτο 72, 216 και 408 ώρες μετά τον αρχικό εμβολισμό. Ποσοστό παλμιτικού (C16:0), παλμιτελαϊκού (C16:1), στεατικού (C18:0), ελαϊκού (C18:1), λινελαϊκού (C18:2) και γ λινολενικού οξέος (C18:3) επί των συνολικών λιπιδίων.

Λιπαρά οξέα (%)						
Χρόνος	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3
72	18,3	0,9	4,9	48,2	13,1	5,2
216	24,5	0,6	4,4	40,0	18,3	3,2
408	25,1	0,9	1,9	33,4	17,4	2,1

3.4.2 Σε υψηλές συγκεντρώσεις αζώτου

Η κινητική της αύξησης της βιομάζας, της κατανάλωσης του υποστρώματος και της παραγωγής ενδοκυτταρικού λίπους από τον μύκητα *Cunninghamella echinulata* κατά την καλλιέργεια του σε μέσο αύξησης με μόνη πηγή άνθρακα απόβλητη γλυκερόλη και περίσσεια αζώτου, απεικονίζεται αναλυτικά τόσο στον Πίνακα 3-15 όσο και στο Διάγραμμα 3-10. Αναφέρονται επίσης το ποσοστό των λιπιδίων επί της ξηρής βιομάζας καθώς και η κατανάλωση των ανόργανων αμμωνιακών ιόντων.



Διάγραμμα 3-10: Κινητική της αύξησης της ολικής βιομάζας (DW, gL⁻¹), της συσσώρευσης ολικών λιπιδίων (TL, gL⁻¹), της κατανάλωσης γλυκερόλης (GloI, gL⁻¹) και της κατανάλωσης του θειικού αμμωνίου (N, 10⁻²mgL⁻¹) κατά τη διάρκεια αύξησης του *Cunninghamella echinulata* σε γλυκερόλη (61,8 gL⁻¹) και περίσσεια αζώτου (2592 mgL⁻¹).

Και σε αυτή την περίπτωση σημειώθηκε πολύ ικανοποιητική κυτταρική ανάπτυξη. Το στέλεχος του *Cunninghamella echinulata* παρήγαγε σχεδόν 20 gL⁻¹ βιομάζας με ποσοστό ενδοκυτταρικού λίπους 32% w/w επί της ξηρής βιομάζας ενώ καταναλώθηκαν 43 gL⁻¹ γλυκερόλης 408 ώρες μετά τον αρχικό εμβολιασμό, ενώ ποσότητα θειικού αμμωνίου έμεινε στο μέσο της καλλιέργειας χωρίς να καταναλωθεί.

Πίνακας 3-15: Αύξηση του *Cunninghamella echinulata* σε γλυκερόλη και περίσσεια αζώτου. Αναλυτικά: Η καταναλωθείσα γλυκερόλη (S_{con} , gL^{-1}), η εναπομείνασα γλυκερόλη (S_r , gL^{-1}), η παραχθείσα ξηρή βιομάζα (DW , gL^{-1}), η αναλογία παραχθείσας βιομάζας προς το καταναλωθέν υπόστρωμα ($Y_{DW/S}$, gg^{-1}), τα συνολικά παραχθέντα λιπίδια (TL , gL^{-1}), αναλογία των συνολικών παραχθέντων λιπιδίων ανά την παραχθείσα ξηρή βιομάζα ($Y_{TL/DW}$, gg^{-1}), το εναπομείνον θειικό ιόν (NH_4^+ , 10^2mgL^{-1}) συναρτήσει του χρόνου καλλιέργειας (Cultivation time, h).

Cultivation time (h)	S_{con} (gL^{-1})	S_r (gL^{-1})	DW (gL^{-1})	$Y_{DW/S}$ (gg^{-1})	TL (gL^{-1})	$Y_{TL/DW}$ (gg^{-1})	NH_4^+ (10^2mgL^{-1})
0	-	61,82	0,01		-	-	25,92
24	1,51	60,31	0,60	0,40	0,12	0,20	20,80
72	4,92	56,91	2,35	0,48	0,54	0,23	15,32
120	7,90	53,93	3,42	0,43	1,34	0,39	14,96
168	13,67	48,16	6,71	0,49	2,36	0,35	10,24
216	18,97	42,85	8,33	0,44	3,08	0,37	9,17
264	25,61	36,22	13,31	0,52	4,37	0,33	7,68
312	30,61	31,22	13,94	0,46	3,95	0,28	4,26
360	39,12	22,71	17,82	0,46	5,57	0,31	3,21
408	43,03	18,79	19,78	0,46	6,37	0,32	1,95

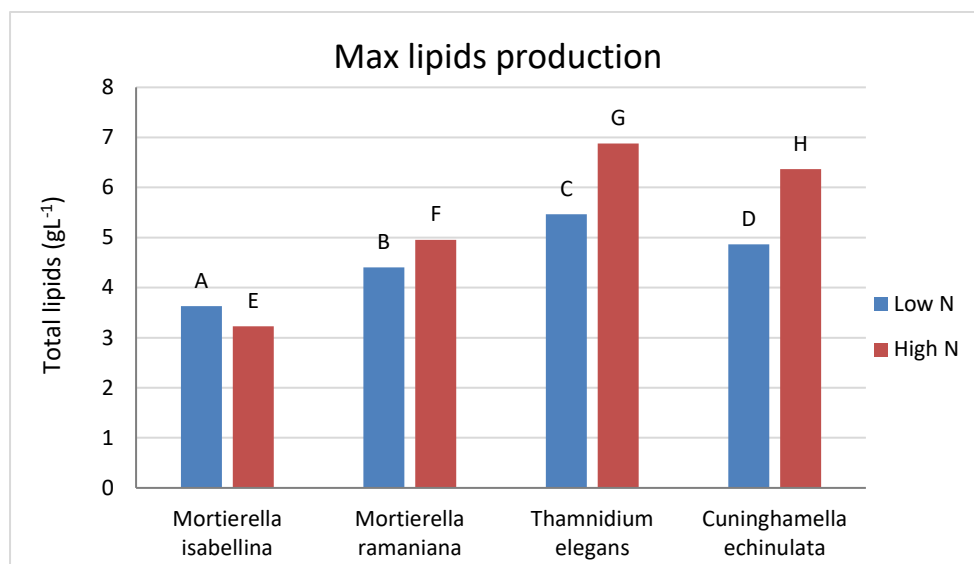
Κατά την ανάπτυξη του μύκητα σε συνθήκες περίσσειας αζώτου παρατηρήσαμε μια αύξηση του γ-λινολενικού οξέος κατά τη διάρκεια της ζύμωσης με ταυτόχρονη μείωση του παλμιτικού (C16:0) και του στεατικού οξέος (C18:0). Το ελαϊκό (C18:1) και σε αυτήν την περίπτωση ήταν το επικρατέστερο λιπαρό οξύ ήταν μεταξύ 40 και 50% ενώ σημαντικές ποσότητες λινελαϊκού οξέος (C18:2) παράχθηκαν κατά τη στάσιμη φάση ανάπτυξης.

Πίνακας 3-16: Σύσταση των λιπιδίων σε λιπαρά οξέα του μύκητα *Cunninghamella echinulata* κατά την ανάπτυξη σε γλυκερόλη και περίσσεια αζώτου 216, 312 και 408 ώρες μετά τον αρχικό εμβολισμό. Ποσοστό παλμιτικού (C16:0), παλμιτελαϊκού (C16:1), στεατικού (C18:0), ελαϊκού (C18:1), λινελαϊκού (C18:2) και γ λινολενικού οξέος (C18:3) επί των συνολικών λιπιδίων.

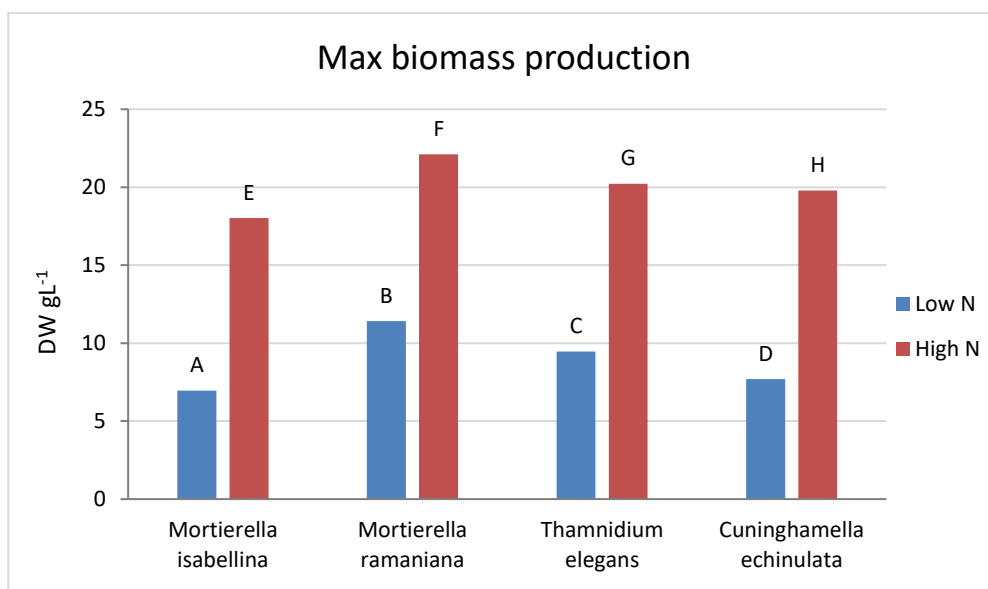
Λιπαρά οξέα (%)						
Χρόνος	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3
216	37,4	9,9	3,7	45,9	1,6	0,2
312	27,1	2,5	2,1	49,8	10,2	4,4
408	30,5	0,3	3,1	41,7	10,1	5,2

3.5 ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΑ

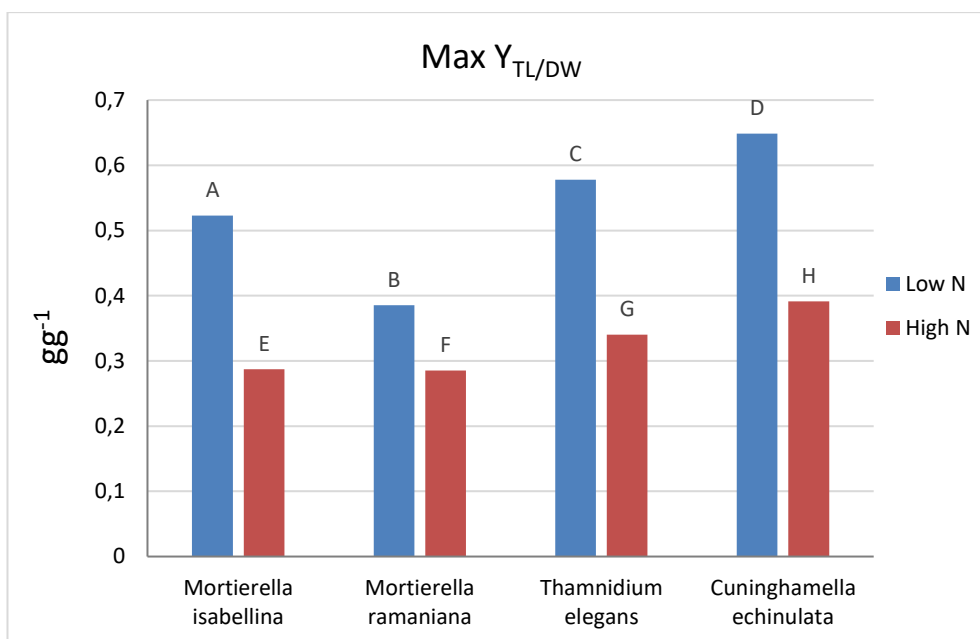
Συγκριτικά αποτελέσματα για την μέγιστη συγκέντρωση παραχθέντων λιπιδίων (Διάγραμμα 3-11), την μέγιστη παραχθείσα βιομάζα (Διάγραμμα 3-12) και την μέγιστη αναλογία συνολικών παραχθέντων λιπιδίων προς την ξηρή βιομάζα (Διάγραμμα 3-13) στις διαφορετικές αρχικές συγκεντρώσεις αζώτου (Low N: πρώτο σετ πειραμάτων, High N: δεύτερο σετ πειραμάτων).



Διάγραμμα 3-11: Μέγιστη παραγωγή συνολικών λιπιδίων (TL, gL^{-1}) σε συνθήκες περιορισμού αζώτου (A,B,C,D) και σε συνθήκες περίσσειας αζώτου (E,F,G,H), (1) *Mortierella isabellina*, A=3,63 gL^{-1} στις 430 h, E=3,23 gL^{-1} στις 360 h, (2) *Mortierella ramanniana*, B=4,40 gL^{-1} στις 432 h και F=4,95 gL^{-1} στις 432 h, (3) *Thamnidium elegans*, C=5,47 gL^{-1} στις 504 h και G=6,88 gL^{-1} στις 456 h, (4) *Cunninghamella echinulata*, D=4,87 gL^{-1} στις 408 h και H=6,37 gL^{-1} στις 408 h.



Διάγραμμα 3-12: Μέγιστη παραγωγή βιομάζας (DW, g/L^{-1}) σε συνθήκες περιορισμού αζώτου (A,B,C,D) και σε συνθήκες περίσσειας αζώτου (E,F,G,H), (1) *Mortierella isabellina*, A=6,95 g/L^{-1} στις 430 h, E=18,02 g/L^{-1} στις 456 h, (2) *Mortierella ramanniana*, B=11,42 g/L^{-1} στις 432 h και F=22,11 g/L^{-1} στις 432 h, (3) *Thamnidium elegans*, C=9,46 g/L^{-1} στις 504 h και G=20,23 g/L^{-1} στις 456 h, (4) *Cunninghamella echinulata*, D=7,69 g/L^{-1} στις 408 h και H=19,78 g/L^{-1} στις 408 h.



Διάγραμμα 3-13: Μέγιστη αναλογία συνολικών παραχθέντων λιπιδίων ανά την παραχθείσα ξηρή βιομάζα σε συνθήκες περιορισμού αζώτου (A,B,C,D) και σε συνθήκες περίσσειας αζώτου (E,F,G,H), (1) *Mortierella isabellina*, 0,52 gg⁻¹ στις 430 h, E=0,29 gg⁻¹ στις 120 h, (2) *Mortierella ramanniana*, B=0,39 gg⁻¹ στις 432 h και F=0,29 gg⁻¹ στις 96 h, (3) *Thamnidium elegans*, C=0,58 gg⁻¹ στις 504 h και G=0,34 gg⁻¹ στις 456 h, (4) *Cunninghamella echinulata*, D=0,65 gg⁻¹ στις 408 h και H=0,39 gg⁻¹ στις 120 h.

4 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Εδώ και αιώνες ο άνθρωπος χρησιμοποιεί (εμπειρικά και χωρίς να ξέρει την παρουσία και σημασία τους, τουλάχιστον μέχρι την εποχή του Pasteur, και φυσικά κατά τρόπο οργανωμένο και επιστημονικό τα τελευταία τουλάχιστον 100 έτη) μικροοργανισμούς είτε για την παραγωγή τροφίμων είτε μεταγενέστερα για την παραγωγή μεταβολικών προϊόντων, όπως αντιβιοτικά, ένζυμα και διάφορες χημικές ενώσεις.

Η ιδέα για την χρήση μικροοργανισμών ως εναλλακτικές πηγές ελαίων ξεκίνησε ήδη από τα τέλη του 19^{ου} αιώνα. Μέχρι την εποχή του Β' Παγκοσμίου Πολέμου (1939-45), επιστήμονες στη Γερμανία, οι οποίοι είχαν πρωτοπορήσει σε πολλές από τις προηγούμενες μελέτες, θεώρησαν ότι τα μικροβιακά έλαια θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για ανθρώπινη κατανάλωση, ωστόσο, στην πράξη, αυτό δεν συνέβη. Το πρώτο μικροβιακό έλαιο παράχθηκε σε βιομηχανική κλίμακα το 1985 με τη χρήση του μύκητα, *Mucor circinelloides (javanicus)*, ένα έλαιο σχετικά πλούσιο στο μεγάλη διατροφική και φαρμακολογική σπουδαιότητας γ-λινολενικό οξύ (Ratledge, 2010).

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

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

Η δυνατότητα παραγωγής μονοκυτταρικών ελαίων σε μεγάλη κλίμακα εξακολουθεί να υπάρχει, καθώς η τιμή των ελαίων κυμαίνεται ανάλογα με τα λιπαρά οξέα από τα οποία

αποτελούνται (Paranikolaou & Aggelis, 2019). Ορισμένοι μικροοργανισμοί, κυρίως μύκητες και μικροφύκη, έχουν την ιδιότητα να παράγουν λιπίδια τα οποία αποτελούνται σε υψηλό ποσοστό από πολυακόρεστα λιπαρά οξέα προσδίδοντάς τους μεγάλη διατροφική και φαρμακευτική αξία (Bellou *et al.*, 2012; Chatzifragkou *et al.*, 2010; Fakas *et al.*, 2009a, 2009c). Πολυακόρεστα λιπαρά οξέα, κυρίως αυτά που ανήκουν στην ω-3 και ω-6 κατηγορία είναι γνωστά για τα πολλαπλά οφέλη στην υγεία και είναι απαραίτητο να συμπεριλαμβάνονται στη διατροφή μας, καθώς δεν μπορούν να παραχθούν *de-novo* από το ανθρώπινο σώμα (Ratlidge & Lippmeier, 2017; Gogus & Smith, 2010; Serhan, 2005). Εκτός από την πώλησή τους ως φαρμακευτικά προϊόντα διατροφής και βρεφικά παρασκευάσματα, τα μικροβιακά έλαια είναι επίσης κατάλληλα προϊόντα για vegans και διάφορες θρησκευτικές ομάδες που δεν επιθυμούν να καταναλώνουν ψάρια ή προϊόντα που προέρχονται από ψάρια (Ratlidge, 2013). Άλλα λιπίδια εμφανίζονται να έχουν παρόμοια σύσταση με τα διάφορα τυπικά (και σχετικά φτηνά) φυτικά έλαια που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή βιοντίζελ, γεγονός που συνεπάγεται ότι θα μπορούσαν να τα αντικαταστήσουν (Ma *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2015).

Ορισμένα είδη μυκήτων, κυρίως μυκηλιακοί μύκητες που ανήκουν στις τάξεις *Mortierellales* και *Mucorales* δύνανται να συσσωρεύουν ενδοκυτταρικά λιπίδια με μεγάλη ακορεστότητα, συγκριτικά με άλλους ελαιογόνους μικροοργανισμούς. Τα λιπίδια αυτά αποτελούνται κυρίως από παλμτικό οξύ (C16:0), στεατικό οξύ (C18:0), ελαϊκό οξύ (C18:1 n-9) και λινελαϊκό οξύ (C18:2 n-6). Περιέχουν, όμως, και σημαντικές ποσότητες γ-λινολενικού οξέος (C18:3 n-6), κάτι που, όπως φαίνεται, αποτελεί ταξινομικό χαρακτηριστικό για το γένος των ζυγομυκήτων (Paranikolaou & Aggelis, 2019; Paranikolaou *et al.*, 2017, 2010; Chatzifragkou *et al.*, 2011a). Το γ-λινολενικό οξύ (GLA) είναι ένα λιπαρό οξύ της ομάδας ω-6 των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων με σημαντική διατροφική και φαρμακευτική σημασία. Αποτελεί πρόδρομη ουσία της προσταγλανδίνης 1 (PGE1) που το σώμα μας χρησιμοποιεί για την αντιμετώπιση των φλεγμονών (Fan & Charpin, 1998). Υπάρχουν, επίσης, πολλές αναφορές στις οποίες η κατανάλωσή του συνδέεται με την αντιμετώπιση ασθενειών, όπως το άσθμα, η αρθρίτιδα, καρδιοπάθειες, καθώς και μερικοί τύποι καρκίνου (Karoor & Nair, 2005; Wanasundara & Wanasundara, 2006; Belch & Muir, 1998). Σε καλλιέργεια του μύκητα *Mortierella isabellina* σε υπόστρωμα με βάση τη γλυκόζη, παρήχθησαν μέχρι και 801 mgL⁻¹ γ-λινολενικού οξέος (Paranikolaou *et al.*, 2004a). Σε παρόμοια μελέτη ο μύκητας *Cunninghamella echinulata* παρήγαγε 4,4 gL⁻¹ συνολικών λιπιδίων, αλλά με μεγάλο ποσοστό σε GLA που αντιστοιχεί σε 720 mgL⁻¹ (Gema *et al.*, 2002). Η γλυκόζη αποτελεί την συνηθέστερη επιλογή όσον αφορά στην πηγή άνθρακα και ενέργειας του μέσου καλλιέργειας (Yang *et al.*, 2019). Ωστόσο, μερικά

είδη ζυγομυκήτων έχουν την ικανότητα να αφομοιώνουν και πιο σύνθετα υποστρώματα που έχουν ως βάση την σουκρόζη, τη λακτόζη και το άμυλο (Ferreira *et al.*, 2013). Η μετατροπή φτηνών «απόβλητων» πρώτων υλών, όπως είναι η ακάθαρτη γλυκερόλη, σε προϊόντα προστιθέμενης αξίας, συμπεριλαμβανομένων των λιπιδίων, αποτελεί έναν εναλλακτικό τρόπο αξιοποίησης αυτού του παραπροϊόντος και προσφέρει επίσης λύση για την αντικατάσταση της ακριβής γλυκόζης ως πηγή άνθρακα στο μέσο της καλλιέργειας. Οι ζυγομύκητες, παρουσιάζουν ένα ακόμα πλεονέκτημα. Λόγω της μορφολογίας τους, όταν αναπτύσσονται σε υγρές καλλιέργειες σχηματίζουν μυκήλια και η ανάκτηση της βιομάζας είναι ευκολότερη συγκριτικά με τις ζύμες και τα μικροφύκη (Yang *et al.*, 2019). Σε ορισμένες περιπτώσεις λόγω των σχηματισμών αυτών δύναται να παράγουν μεγαλύτερα ποσοστά ενδοκυτταρικών λιπιδίων (Hiruta *et al.*, 1997).

Στις μέρες μας, ωστόσο, το ενδιαφέρον για τα μικροβιακά έλαια είναι στραμμένο στην παραγωγή πολυακόρεστων λιπαρών οξέων μεγαλύτερης αλυσίδας όπως είναι το DHA και το AA (Paranikolaou & Aggelis, 2019; Sabikhi & Kumar, 2012) και λιπιδίων με σύσταση παρόμοια με τα φυτικά έλαια που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή βιοκαυσίμων (Kumar *et al.*, 2019).

Η παρούσα μεταπτυχιακή μελέτη είχε ως κύριο σκοπό τη διερεύνηση της ανάπτυξης των στελεχών *Mortierella isabellina*, *Mortierella ramanniana*, *Thamnidium elegans* και *Cunninghamella echinulata* σε υπόστρωμα με βάση την απόβλητη ληγμένη γλυκερόλη και της βιοσύνθεσης ενδοκυτταρικού λίπους πλούσιο σε γ-λινολενικού οξέος. Τα συγκεκριμένα στελέχη και από προηγούμενες μελέτες εμφανίζονται ως εξαιρετικοί υποψήφιοι για την παραγωγή λιπιδίων ιδιαίζουσας σύστασης μέσω βιοτεχνολογικών διεργασιών.

Στη συγκεκριμένη μελέτη πραγματοποιήθηκαν δύο σετ πειραμάτων. Στο πρώτο όλοι οι μύκητες αναπτύχθηκαν κάτω από συνθήκες περιορισμού αζώτου με σκοπό να κατευθύνουμε τους μικροοργανισμούς στην συσσώρευση ενδοκυτταρικών λιπιδίων ενώ στο δεύτερο σετ οι μύκητες αναπτύχθηκαν σε συνθήκες με υψηλές συγκεντρώσεις αζώτου ώστε να ενισχύσουμε την κυτταρική ανάπτυξη.

4.1 ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΥΚΗΤΩΝ ΣΕ ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΥ ΑΖΩΤΟΥ

- Σε αυτό το πρώτο σετ πειραμάτων ο μύκητας *Mortierella ramanniana* ήταν αυτός με τα πιο ικανοποιητικά αποτελέσματα όσον αφορά στην παραγωγή βιομάζας. Ξεπέρασε τα 11 gL⁻¹ και με ποσοστό λίπους επί της ξηρής βιομάζας σχεδόν 39% w/w, που αντιστοιχεί σε 4,4 gL⁻¹. Τις πρώτες μέρες το θειικό αμμώνιο καταναλώθηκε ταχύτατα και έπειτα παρατηρήθηκε σταδιακή αύξηση της βιομάζας, κυρίως όμως λόγω της συσσώρευσης λιπιδίων. Μετά την εξάντληση του αζώτου στο μέσο είναι εμφανώς μειωμένη και ο ρυθμός κατανάλωσης της γλυκερόλης. Είναι χαρακτηριστικό ότι τις πρώτες 96 ώρες από τον αρχικό εμβολιασμό είχαν καταναλωθεί σχεδόν 9 gL⁻¹ από, ενώ από τις 96 μέχρι και τις 432 ώρες μόλις 12 gL⁻¹. Ο *M. ramanniana* φαίνεται να ανταποκρίνεται ικανοποιητικά στη γλυκερόλη καθώς σε παρόμοια μελέτη, μετά από μόλις 144 ώρες από τον αρχικό εμβολιασμό η παραχθείσα βιομάζα ήταν 7,2 gL⁻¹ με ποσοστό 44% ενδοκυτταρικού λίπους (Bellou *et al.*, 2012). Τα ποσοστά του GLA παρουσίασαν μία αυξομείωση κατά την εξέλιξη της ζύμωσης. Προς το τέλος της εκθετικής φάσης ανάπτυξης το ποσοστό του GLA ήταν λίγο πάνω από το 2% επί των συνολικών λιπιδίων, στην αρχή της στάσιμης φάσης αυξήθηκε στο 4.8% ενώ έπεσε κάτω από το 2% προς το τέλος τη στάσιμης φάσης. Παρόμοια αποτελέσματα εμφανίζονται όταν ο μύκητας καλλιεργήθηκε σε υπόστρωμα με βάση την απόβλητη γλυκερόλη ενώ εμφάνισε τα διπλάσια ποσοστά GLA όταν αναπτύχθηκε σε γλυκόζη (Paranikolaou *et al.*, 2017).

- Η μέγιστη συγκέντρωση ενδοκυτταρικού λίπους σημειώθηκε ωστόσο στην καλλιέργεια του μύκητα *Thamnidium elegans* φτάνοντας τα 5,47 gL⁻¹. Αυτό οφείλεται στο μεγάλο ποσοστό επί της ξηρής του βιομάζας που έφτασε σχεδόν το 60% w/w. Τις πρώτες μέρες παρατηρήσαμε ταχύτερη κυτταρική ανάπτυξη, μέχρι την εξάντληση του θειικού αμμωνίου όπου ξεκίνησε η συσσώρευση μεγάλων ποσοτήτων ενδοκυτταρικών λιπιδίων. Η ανάπτυξη του μύκητα φάνηκε ωστόσο να σταματάει μετά τις 300 ώρες όπου και η συγκέντρωση της υπολειπόμενης γλυκερόλης στο μέσο ανάπτυξης παρέμεινε σε σταθερά μπορούμε να πούμε επίπεδα. Στις 312 ώρες από τον αρχικό εμβολιασμό είχαν καταναλωθεί 22,5 gL⁻¹ γλυκερόλης. Το συγκεκριμένο είδος μύκητα είναι γνωστό και από άλλες αναφορές για την ικανότητα συσσώρευσης ενδοκυτταρικών λιπιδίων που μπορεί να ξεπεράσει το 70% επί της ξηρής του βιομάζας καλλιεργούμενος σε υπόστρωμα με βάση τη γλυκερόλη (Chatzifragkou *et al.*, 2011a), αλλά και άλλα σακχαρούχα υποστρώματα όπως είναι η γλυκόζη, η φρουκτόζη και η σουκρόζη (Paranikolaou *et al.*, 2010). Τα ποσοστά του GLA κυμάνθηκαν σε σχετικά σταθερά επίπεδα κατά τη διάρκεια της ζύμωσης φτάνοντας το 3,5% επί των συνολικών λιπιδίων στις 312 ώρες στην αρχή της στάσιμης φάσης ανάπτυξης.

- Ο μύκητας *Cunninghamella echinulata* παρουσίασε παρόμοια αποτελέσματα με τον *Thamnidium elegans*. Η παραγωγή βιομάζας έφτασε τα $7,69 \text{ gL}^{-1}$ ενώ η συγκέντρωση του ενδοκυτταρικού λίπους τα $4,87 \text{ gL}^{-1}$ που αντιστοιχεί στο 63% w/w επί της ξηρής βιομάζας. Μετά το πέρας περίπου 100 ωρών από τον αρχικό εμβολιασμό το θειικό αμμώνιο είχε εξαντληθεί από το μέσο καλλιέργειας και η κατανάλωση της γλυκερόλης ήταν περίπου στα 11 gL^{-1} . Από τις 120 ώρες και μετά παρατηρήθηκε μικρή κατανάλωση του υποστρώματος, γεγονός που πιθανώς συνδέεται με την συσσώρευση ενδοκυτταρικού λίπους. Το ποσοστό του παραγόμενου ενδοκυτταρικού λίπους στην παρούσα μελέτη ήταν μεγαλύτερο συγκριτικά με άλλα πειράματα όπου ο μύκητας αναπτύχθηκε σε υπόστρωμα με βάση τη γλυκόζη (40 gL^{-1} , C/N=133) όπου το αντίστοιχο ποσοστό ήταν 47% επί της ξηρής βιομάζας ($9,4 \text{ gL}^{-1}$) (Papanikolaou *et al.*, 2004b). Καλλιεργούμενος ο μύκητας σε υπόστρωμα ξυλόζης και με μεγαλύτερη αναλογία άνθρακα αζώτου (C/N=285), το ποσοστό ενδοκυτταρικού λίπους επί της ξηρής βιομάζας έφτασε το 55,7% (Fakas *et al.*, 2009b). Τα ποσοστά του γ-λινολενικού οξέος στην αρχή της εκθετική φάσης ήταν λίγο πάνω από το 5% επί των συνολικών λιπιδίων ενώ σημειώνεται σταδιακή μείωση του ποσοστού αυτού κατά τη διάρκεια της συσσώρευσης των ενδοκυτταρικών λιπιδίων. Σε μελέτη που ο μύκητας αναπτύχθηκε με ζύμωση στερεής κατάστασης το ποσοστό του γ-λινολενικού οξέος έφτασε το 16% επί των συνολικών λιπιδίων (Gema *et al.*, 2002), κάτι που αποδεικνύει τις δυνατότητες του μύκητα για παραγωγή λιπιδίων υψηλής διατροφικής και φαρμακευτικής αξίας.

- Ο μύκητας *Mortierella isabellina* παρόλο που αναπτύχθηκε ικανοποιητικά, σε σχέση και με τους άλλους μύκητες, ήταν αυτός που εμφάνισε την μικρότερη παραγωγή ενδοκυτταρικών λιπιδίων. Με ποσοστό σχεδόν 52% w/w η συγκέντρωση ενδοκυτταρικών λιπιδίων έφτασε τα $3,6 \text{ gL}^{-1}$. Μετά από 430 ώρες, είχαν καταναλωθεί $22,3 \text{ gL}^{-1}$ γλυκερόλης ενώ το θειικό αμμώνιο εξαντλήθηκε από το μέσο από την τρίτη κιόλας ημέρα μετά τον εμβολιασμό. Η εξάντληση του θειικού αμμωνίου συμβαδίζει με την έναρξη του φαινομένου συσσώρευσης ενδοκυτταρικών λιπιδίων. Σε αντίστοιχη μελέτη (Fakas *et al.*, 2009b) ο μύκητας καλλιεργούμενος σε ακάθαρτη γλυκερόλη 80% παρήγαγε $2,7 \text{ gL}^{-1}$ βιομάζα με ποσοστό ενδοκυτταρικού λίπους 35% w/w. Ο μύκητας φαίνεται να αναπτύσσεται καλύτερα σε υπόστρωμα με βάση τη γλυκόζη καθώς στην ίδια μελέτη και με αναλογία C/N=285, μετά από 360 ώρες περίπου από τον αρχικό εμβολιασμό έφτασε τα 27 gL^{-1} παραχθείσας βιομάζας και τα 14 gL^{-1} ενδοκυτταρικού λίπους. Τα ποσοστά του GLA κυμάνθηκαν σε χαμηλά επίπεδα φτάνοντας το 2,4% επί των συνολικών λιπιδίων, κάτι που ίσως σημαίνει μειωμένη δραστηριότητα της Δ6 αποκορεσμάσης κατά τη διαδικασία συσσώρευσης των λιπιδίων.

4.2 ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΥΚΗΤΩΝ ΣΕ ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΠΕΡΙΣΣΕΙΑΣ ΑΖΩΤΟΥ

Στο δεύτερο σετ πειραμάτων που διεξήχθησαν αυξήσαμε την αρχική συγκέντρωση του θειικού αμμωνίου και του εκχυλίσματος ζύμης κατά 10 φορές σε σχέση με το πρώτο σετ ενώ διατηρήσαμε όλες τις υπόλοιπες συνθήκες της ζύμωσης ίδιες. Οι μύκητες σε συνθήκες περίσσειας αζώτου παρουσίασαν πολύ μεγαλύτερη κυτταρική ανάπτυξη (ακόμα και υπερδιπλάσια συγκριτικά με το πρώτο σετ πειραμάτων) καταναλώνοντας μεγαλύτερα ποσά γλυκερόλης, αλλά με μειωμένα τα ποσοστά ενδοκυτταρικού λίπους. Η συγκέντρωση ωστόσο των λιπιδίων ήταν μεγαλύτερη συγκριτικά με τα αποτελέσματα του πρώτου σετ, με εξαίρεση την καλλιέργεια του *Mortierella isabellina*.

- Και σε αυτή την περίπτωση ο μύκητας *Mortierella ramanniana* παρουσίασε τη μεγαλύτερη συγκέντρωση όσον αφορά στην παραγωγή βιομάζας με 22 gL⁻¹. Το ποσοστό του ενδοκυτταρικού λίπους ήταν στο 22% w/w επί της ξηρής βιομάζας που αντιστοιχεί σε 4,95 gL⁻¹. Λίγο περισσότερο σε σχέση με το πρώτο σετ πειραμάτων. Ο μύκητας φάνηκε να αναπτύσσεται με έναν σταθερό ρυθμό παράγοντας ταυτόχρονα σημαντικές ποσότητες λιπιδίων καταναλώνοντας σχεδόν 39 gL⁻¹ από την αρχική συγκέντρωση γλυκερόλης (60 gL⁻¹) ενώ το θειικό αμμώνιο καταναλώθηκε σε ποσοστό 75% της αρχικής συγκέντρωσης (2,5 gL⁻¹) μετά από 432 ώρες από τον αρχικό εμβολιασμό. Ο συγκεκριμένος μύκητας έχει επιλεγεί και παλαιότερα για την μελέτη παραγωγής γ-λινολενικού οξέος τόσο σε βιοαντιδραστήρα (Hiruta *et al.*, 1997) όσο και σε φιάλες (Dyal *et al.*, 2005; Hansson & Dostalek, 1988) λόγω της μορφολογίας του και της ικανότητάς του να παράγει λιπίδια πλούσια σε γ-λινολενικό φτάνοντας μέχρι και το 20% w/w. Στην αρχή της εκθετικής φάσης ανάπτυξης το ποσοστό του GLA ήταν κάτω από 1% επί των συνολικών λιπιδίων ενώ αυξήθηκε κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας φτάνοντας το 4,6% στο σημείο που σημειώθηκε η μέγιστη συγκέντρωση ενδοκυτταρικών λιπιδίων.

- Η καλλιέργεια του μύκητα *Thamnidium elegans* ήταν αυτή με την μεγαλύτερη συγκέντρωση ενδοκυτταρικού λίπους φτάνοντας σχεδόν τα 7 gL⁻¹ σε ποσοστό 34% w/w επί της ξηρής βιομάζας. Η αντίστοιχη βιομάζα που παρήγαγε ήταν λίγο πάνω από τα 20 gL⁻¹. Η καταναλωθείσα γλυκερόλη ήταν 37 gL⁻¹ μετά από 456 ώρες από την αρχικό εμβολιασμό ενώ το θειικό αμμώνιο καταναλώθηκε σε ποσοστό 80%. Αντίστοιχα αποτελέσματα είχε η καλλιέργεια του μύκητα σε υπόστρωμα με βάση γλυκερόλη 80% και σε συνθήκες περίσσειας αζώτου, η παραχθείσα βιομάζα ήταν 20,9 gL⁻¹ ενώ το ποσοστό ενδοκυτταρικού λίπους 38,3% w/w (Fakas *et al.*, 2009a), καθώς επίσης και σε υπόστρωμα με βάση τη γλυκόζη παρήγαγε 32 gL⁻¹ βιομάζα αλλά με ποσοστό ενδοκυτταρικού λίπους μόλις 15% w/w (Zίκου *et al.*, 2013). Τα ποσοστά του GLA ήταν αρκετά υψηλά φτάνοντας σχεδόν το 8,5% στις 216 ώρες και μειώθηκε

κατά τη διάρκεια της ζύμωσης στο 5%. Σε συνδυασμό όμως με την υψηλή παραγωγικότητα σε ενδοκυτταρικό λίπος συνεπάγεται σημαντική ποσότητα γ -λινολενικού οξέος.

- Ο μύκητας *Cunninghamella echinulata* παρουσίασε παρόμοια αποτελέσματα. Η κυτταρική αύξηση ήταν και σε αυτή την περίπτωση πολύ ικανοποιητική. Η παραχθείσα βιομάζα μετά από 408 ώρες από την αρχή της ζύμωσης ήταν $19,78 \text{ gL}^{-1}$ με ποσοστό ενδοκυτταρικού λίπους 32% w/w επί της ξηρής βιομάζας, που αντιστοιχεί σε $6,37 \text{ gL}^{-1}$. Η εναπομένουσα γλυκερόλη στο μέσο της καλλιέργειας ήταν στο 29% της αρχικής συγκέντρωσης (61 gL^{-1}) ενώ το θειικό αμμώνιο (αρχικής συγκέντρωσης $2,5 \text{ gL}^{-1}$) καταναλώθηκε κατά 93%. Στην αρχή της στάσιμης φάσης ανάπτυξης το ποσοστό του GLA ήταν κάτω από 0,5% επί των συνολικών λιπιδίων φτάνοντας όμως σχεδόν το 4,5% στο σημείο που επιτεύχθηκε η μέγιστη παραγωγή ενδοκυτταρικών λιπιδίων.

- Η καλλιέργεια του μύκητα *Mortierella isabellina* ήταν αρκετά ικανοποιητική όσον αφορά στην παραγωγή βιομάζας φτάνοντας τα 18 gL^{-1} αλλά με μικρό ποσοστό ενδοκυτταρικών λιπιδίων το οποίο κυμάνθηκε από το 29 έως 18% κατά τη εκθετική φάση, ενώ έπεσε στο 8% w/w κατά την στάσιμη φάση του αυξητικού κύκλου. Σε αντίστοιχη μελέτη ο μύκητας καλλιεργούμενος σε ακάθαρτη γλυκερόλη 80% αρχικής συγκέντρωσης 100 gL^{-1} , θειικό αμμώνιο 2 gL^{-1} και εκχύλισμα ζύμης 4 gL^{-1} παρήγαγε $6,2 \text{ gL}^{-1}$ βιομάζα 120 ώρες μετά τον εμβολιασμό και με ποσοστό λίπους που έφτασε το 53% w/w (Fakas *et al.*, 2009a). Στην παρούσα μελέτη η παραχθείσα βιομάζα στις ίδιες ώρες ήταν $8,3 \text{ gL}^{-1}$. Τα ποσοστά του GLA στην αρχή της εκθετικής φάσης ανάπτυξης ήταν σε χαμηλά επίπεδα στο 1,5% επί των συνολικών λιπιδίων φτάνοντας το 6,5% στην αρχή της στάσιμης φάσης και πέφτοντας μετά πάλι στο 5% στο τέλος της ζύμωσης.

Σε όλες τις περιπτώσεις το ελαϊκό οξύ (C18:1) ήταν αυτό με το επικρατέστερο ποσοστό, 38-52% επί των συνολικών λιπιδίων και το δεύτερο πιο άφθονο λιπαρό οξύ ήταν το παλμιτικό (C16:0) με ποσοστό 20 έως και 40%. Το λινελαϊκό οξύ (C18: 2 n-6) ήταν σε σημαντικές επίσης ποσότητες (1,6 - 17%) σε όλα σχεδόν τα στάδια των ζυμώσεων ενώ το παλμιτελαϊκό οξύ (C16:1 n-7) και το στεατικό (C18:0) ανιχνεύθηκαν σε χαμηλές ποσότητες.

Στον Πίνακα 4-1 που ακολουθεί εμφανίζονται αποτελέσματα παραγωγής μικροβιακών λιπιδίων και ποσοστά γ -λινολενικού οξέος επί των συνολικών λιπιδίων από τους μύκητες που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα ερευνητική εργασία συγκριτικά με αντίστοιχες μελέτες που χρησιμοποιήθηκαν τα ίδια είδη ζυγομυκήτων.

Πίνακας 4-1: Παραγωγή μικροβιακού λίπους (TL, $g L^{-1}$), το ποσοστό του μικροβιακού λίπους προς την παραχθείσα βιομάζα ($Y_{TL/X}$ %) και το ποσοστό γ -λινολενικού οξέος (GLA %) επί των συνολικών λιπιδίων από ελαιογόνους μύκητες κατά την καλλιέργεια σε διάφορα υποστρώματα, (a): αναφέρεται στο πρώτο σετ πειραμάτων, (b): αναφέρεται στο δεύτερο σετ πειραμάτων, SSF=ζύμωση στερεάς κατάστασης.

Μύκητας	Υπόστρωμα	TL ($g L^{-1}$)	$Y_{TL/X}$ % w/w	GLA %	Αναφορά
<i>Mortierella isabellina</i> (a)	Γλυκερόλη	3,6	52,3	2,4	Παρούσα μελέτη
<i>Mortierella isabellina</i> (b)	Γλυκερόλη	3,2	18,3	6,4	Παρούσα μελέτη
<i>Mortierella isabellina</i>	Γλυκόζη	18,1	50	4,4	Paranikolaou et al., 2004a
<i>Mortierella isabellina</i>	Γλυκερόλη 80%	1,6	41	3,8	Fakas et al., 2009b
<i>Mortierella ramanniana</i> (a)	Γλυκερόλη	4,4	38,5	4,8	Παρούσα μελέτη
<i>Mortierella ramanniana</i> (b)	Γλυκερόλη	4,9	22,4	4,6	Παρούσα μελέτη
<i>Mortierella ramanniana</i>	Γλυκόζη	3,6	24,4	12	Hansson & Dostalek, 1988
<i>Mortierella ramanniana</i>	Γλυκερόλη 81%	3,3	43,4	5,4	Paranikolaou et al., 2017
<i>Thamnidium elegans</i> (a)	Γλυκερόλη	5,47	57,8	3,5	Παρούσα μελέτη
<i>Thamnidium elegans</i> (b)	Γλυκερόλη	6,9	34	6,6	Παρούσα μελέτη
<i>Thamnidium elegans</i>	Σουκρόζη	9,3	70	5,5	Paranikolaou et al., 2010
<i>Thamnidium elegans</i>	Γλυκερόλη	11,6	71,1	3,2	Chatzifragkou et al., 2011a
<i>Cunninghamella echinulata</i>	Γλυκερόλη	4,9	63,3	3,2	Παρούσα μελέτη
<i>Cunninghamella echinulata</i> (b)	Γλυκερόλη	6,37	32,2	4,4	Παρούσα μελέτη
<i>Cunninghamella echinulata</i>	Γλυκόζη (SSF)	4,4	49	16,4	Gema et al., 2002
<i>Cunninghamella echinulata</i>	Γλυκερόλη 81%	1,6	55,6	7,5	Paranikolaou et al., 2017

5 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Έχει παρατηρηθεί ότι αρκετοί ζυγομύκητες που δύνανται να συσσωρεύουν μεγάλες ποσότητες ενδοκυτταρικού λίπους εμφανίζουν την τάση να παράγουν μικρές ποσότητες γ-λινολενικού οξέος και αντίστροφα (Kavadia *et al.*, 2001). Αυτό ίσως οφείλεται στο γεγονός ότι η παραγωγή του GLA ευνοείται κατά την εκθετική φάση του αυξητικού κύκλου, ενώ η συσσώρευση του ενδοκυτταρικού λίπους λαμβάνει χώρα κατά κανόνα κατά τη διάρκεια της στάσιμης φάσης ως μία δευτερογενής λειτουργία. Ενδεικτικό είναι ότι το ποσοστό του GLA μειώνεται κατά τη διαδικασία της συσσώρευσης λιπιδίων (Gema *et al.*, 2002). Πιθανότατα οι μικροοργανισμοί αυτοί παράγουν μεγάλες ποσότητες ενδοκυτταρικού λίπους, προκειμένου να παρέχουν την αναγκαία ποσότητα γ-λινολενικού οξέος για την ομαλή λειτουργία της κυτταρικής μεμβράνης (Kavadia *et al.*, 2001). Σε συνθήκες ωστόσο με υψηλές συγκεντρώσεις αζώτου οι μύκητες φαίνονται να συμπεριφέρονται διαφορετικά όσον αφορά στην ανάπτυξη και σύνθεση ενδοκυτταρικών λιπιδίων.

Διαπιστώνουμε επίσης ότι ο περιορισμός του αζώτου στο μέσο καλλιέργειας δεν αποτελεί προϋπόθεση για τη συσσώρευση αποθησαυριστικών λιπιδίων κατά την ανάπτυξη ελαιογόνων μικροοργανισμών. Σε παρόμοιες μελέτες έχει αποδειχθεί ότι η ελαιογόνος ζύμη *Rhodosporidium toruloides* μπορεί να παρουσιάσει υψηλή παραγωγή βιομάζας με ταυτόχρονη συσσώρευση ενδοκυτταρικών λιπιδίων σε μέσα πλούσια σε άζωτο, υπό την προϋπόθεση ότι ο φωσφόρος ή το θειικό άλας είναι ο περιοριστικός παράγοντας της κυτταρικής ανάπτυξης (Wu *et al.*, 2010; Wu *et al.*, 2011). Τα τελευταία χρόνια έχουν γίνει πολλές αξιολογικές προσπάθειες ώστε να αποκωδικοποιήσουμε τους μηχανισμούς τους οποίους χρησιμοποιούν οι μικροοργανισμοί για την βιοσύνθεση των λιπαρών οξέων με σκοπό να αυξήσουμε την παραγωγή αυτή προς όφελός μας. Σε κάθε περίπτωση, η ιδιότητα των μικροοργανισμών για την αποθήκευση σημαντικών ποσοτήτων μονοκυτταρικού λίπους σε υποστρώματα πλούσια σε άζωτο και περιορισμένα σε φωσφορικά ή θειικά, μπορεί να αξιοποιηθεί σε βιομηχανικό επίπεδο για την αξιοποίηση πλούσιων σε σάκχαρα και πλούσιων σε άζωτο αγρό-βιομηχανικών υπολειμμάτων (Papanikolaou & Aggelis, 2011).

Σε όλες τις ζυμώσεις το ποσοστό των παραχθέντων ενδοπολυσακχαριτών ήταν ιδιαίτερα χαμηλό σε όλα τα στάδια της καλλιέργειας, μεταξύ 0,5 και 3,5 % επί της ξηρής βιομάζας. Αυτό δικαιολογείται ίσως από το γεγονός ότι οι ελαιογόνοι μικροοργανισμοί κατευθύνουν την περίσσεια του άνθρακα που υπάρχει στο μέσο στην παραγωγή λιπιδίων ως αποθησαυριστικές ουσίες ενέργειας (Ratledge, 1984). Εξάιρεση αποτελεί η καλλιέργεια του

μύκητα *Mortierella isabellina* όπου το ποσοστό των ενδοπολυσακχαριτών κυμάνθηκε μεταξύ 10 και 16% επί της ξηρής μάζας κατά την αύξηση σε συνθήκες περιορισμού αζώτου.

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης δεικνύουν ότι ορισμένα είδη ζυγομυκήτων κατά την καλλιέργεια σε ανανεώσιμα υποστρώματα, όπως είναι η απόβλητη ληγμένη γλυκερόλη, μπορούν να αναπτυχθούν ικανοποιητικά και να παράγουν σημαντικές ποσότητες ενδοκυτταρικού λίπους πλούσιο σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα. Το γ-λινολενικό οξύ αποτελεί το πιο σημαντικό από αυτά λόγω της υψηλής διατροφικής και φαρμακευτικής αξίας που παρουσιάζει. Σε όλες τις περιπτώσεις υπήρχε παραγωγή γ-λινολενικού οξέος με μεγάλη όμως διακύμανση κατά τη διάρκεια των ζυμώσεων και ειδικότερα στα ίδια τα στελέχη όταν αναπτύχθηκαν σε διαφορετικές συνθήκες. Ειδικότερα οι μύκητες *Mortierella isabellina* και ο *Thamnidium elegans* σημείωσαν υψηλά επίπεδα γ-λινολενικού οξέος φτάνοντας το 6,4% και 6,6% αντίστοιχα όταν αναπτύχθηκαν σε συνθήκες με υψηλές συγκεντρώσεις αζώτου. Καλλιεργούμενοι σε συνθήκες περιορισμού αζώτου τα αντίστοιχα ποσοστά ήταν 2,4% και 3,5%.

Η βελτιστοποίηση των συνθηκών καλλιέργειας θα μπορούσε να αυξήσει σημαντικά την απόδοση παραγωγής GLA. Η βιοσύνθεση και η συσσώρευση ενδοκυτταρικών λιπιδίων είναι μια πολύπλοκη διαδικασία και είναι αρκετοί οι παράγοντες, όπως, το pH, η πηγή άνθρακα, η πηγή αζώτου, οι αρχικές συγκεντρώσεις τους, ο αερισμός, η θερμοκρασία, που μπορούν να επηρεάσουν τις αποδόσεις παραγωγής της βιομάζας, των λιπιδίων καθώς και τη σύσταση αυτών. Οι παράγοντες αυτοί μπορούν να ρυθμιστούν ανάλογα το επιθυμητό τελικό προϊόν.

Η ικανότητα των ζυγομυκήτων να αφομοιώνουν πληθώρα υποστρωμάτων χαμηλού κόστους, όπως, λιγνοκυτταρινούχα υλικά, σακχαρούχα υπολείμματα, μελάσες, διάφορα υδρολύματα, απόβλητη γλυκερόλη, για την παραγωγή προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας, καθώς και η ευελιξία που παρουσιάζουν στον σχεδιασμό των ζυμώσεων, αυξάνει τις πιθανότητες να χρησιμοποιηθούν σε βιοδιυλιστήρια. Η ικανότητα επίσης, ταυτόχρονης παραγωγής περισσότερων του ενός τελικών προϊόντων, π.χ., ενζύμων, βασικών χημικών ουσιών, βιομάζας για διατροφικούς σκοπούς καθώς και λιπιδίων μπορεί να έχει σημαντικό αντίκτυπο τόσο στη βιομηχανία των βιοδιεργασιών ως σύνολο όσο και στο περιβάλλον (Ferreira *et al.*, 2013).

Η παραγωγή πολυακόρεστων λιπαρών οξέων από μικροβιακά στελέχη είναι πλέον μια βιομηχανική πραγματικότητα. Αποτελούν μια πρόταση στις αυξανόμενες διατροφικές απαιτήσεις με αρκετά πλεονεκτήματα (Christophe *et al.*, 2019) και ταυτόχρονα μία εναλλακτική της επεξεργασίας απόβλητων προϊόντων. Σημαντικό σταθμό στο εγχείρημα

αύξησης των κερδών και την βιωσιμότητα της διαδικασίας μπορεί να αποτελέσει η πραγματοποίηση υψηλής κυτταρικής πυκνότητας που επιτυγχάνεται σε σύντομο χρονικό διάστημα με βελτιστοποίηση των συνθηκών καλλιέργειας, η καθαρότητα του προϊόντος, δηλαδή η παραγωγή λιπιδίων με μεγάλα ποσοστά των επιθυμητών λιπαρών οξέων που μπορεί να επιτευχθεί με μεταβολική μηχανική και η ανάπτυξη μιας καθολικής και οικονομικά αποδοτικής μεθόδου ανάκτησης του μονοκυτταρικού ελαίου (Beligon *et al.*, 2016; Ochsenreither *et al.*, 2016).

Συμπερασματικά, η ποικιλία των υπάρχοντων μικροοργανισμών, η γνώση της μεταβολικής οδού, η δυνατότητα χρήσης υποστρωμάτων χαμηλού κόστους για την παραγωγή προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας και τα περιβαλλοντικά οφέλη που προκύπτουν μπορούν να αποτελέσουν τους πυλώνες μιας οικονομικά βιώσιμης αειφόρου διεργασίας.

6 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- AFNOR. (1984). Recueil des normes françaises des corps gras, grains oléagineux et produits dérivés. *Association Française pour Normalisation*, 95.
- Alakhras, R., Bellou, S., Fotaki, G., Stephanou, G., Demopoulos, N. A., Papanikolaou, S., & Aggelis, G. (2015). Fatty acid lithium salts from *Cunninghamella echinulata* have cytotoxic and genotoxic effects on HL-60 human leukemia cells. *Engineering in Life Sciences*, 15(2), 243-253.
- André, A., Diamantopoulou, P., Philippoussis, A., Sarris, D., Komaitis, M., & Papanikolaou, S. (2010). Biotechnological conversions of bio-diesel derived waste glycerol into added-value compounds by higher fungi: production of biomass, single cell oil and oxalic acid. *Industrial Crops and Products*, 31(2), 407-416.
- Anthea, M., Hopkins, J., McLaughlin, C. W., Johnson, S., Warner, M. Q., LaHart, D., et al. (1993). Human biology and health. Englewood Cliffs, NJ: Prentice Hall.
- Appel, L., Miller, E. R., Seidler, A. J., & Whelton, P. K. (1994). Diet supplementation with fish oils and blood pressure reduction: a meta-analysis. *Annals of Internal Medicine*, 120(2 SUPPL. 1), 9.
- Armenta, R. E., & Valentine, M. C. (2013). Single-cell oils as a source of omega-3 fatty acids: an overview of recent advances. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 90(2), 167-182.
- Bailey, A. E., & Shahidi, F. (2005). *Bailey's industrial oil & fats products*. John Wiley & Sons.
- Balaraju, M., Rekha, V., Prasad, P. S., Prasad, R. B. N., & Lingaiah, N. (2008). Selective hydrogenolysis of glycerol to 1, 2 propanediol over Cu–ZnO catalysts. *Catalysis Letters*, 126(1-2), 119-124.
- BARRON, G. L. (2004). Fungal parasites and predators of rotifers, nematodes, and other invertebrates. In *Biodiversity of Fungi* (pp. 435-450). Academic Press.
- Belch, J. J. F., & Muir, A. (1998). n-6 and n-3 essential fatty acids in rheumatoid arthritis and other rheumatic conditions. *Proceedings of the Nutrition Society*, 57(4), 563-569.
- Bell, M. V., & Tocher, D. R. (2009). Biosynthesis of polyunsaturated fatty acids in aquatic ecosystems: general pathways and new directions. In *Lipids in aquatic ecosystems* (pp. 211-236). Springer, New York, NY.

Beligon, V., Christophe, G., Fontanille, P., & Larroche, C. (2016). Microbial lipids as potential source to food supplements. *Current Opinion in Food Science*, 7, 35-42.

Bellou, S., Moustogianni, A., Makri, A., & Aggelis, G. (2012). Lipids containing polyunsaturated fatty acids synthesized by Zygomycetes grown on glycerol. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 166(1), 146-158.

Brenna, J. T. (2016). Arachidonic acid needed in infant formula when docosahexaenoic acid is present. *Nutrition reviews*, 74(5), 329-336.

Calder, P. C. (2006). n-3 polyunsaturated fatty acids, inflammation, and inflammatory diseases. *The American journal of clinical nutrition*, 83(6), 1505S-1519S.

Calder, P. C. (2013). Omega-3 polyunsaturated fatty acids and inflammatory processes: nutrition or pharmacology?. *British journal of clinical pharmacology*, 75(3), 645-662.

Cescut J (2009) Accumulation d'acylglycérols par des espèces levuriennes à usage carburant aéronautique: physiologie et performances de procédés. Thèse de doctorat de l'Université de Toulouse

Chajès, V., Thiébaud, A. C., Rotival, M., Gauthier, E., Maillard, V., Boutron-Ruault, M. C., ... & Clavel-Chapelon, F. (2008). Association between serum trans-monounsaturated fatty acids and breast cancer risk in the E3N-EPIC Study. *American journal of epidemiology*, 167(11), 1312-1320.

Chatzifragkou, A., Fakas, S., Galiotou-Panayotou, M., Komaitis, M., Aggelis, G., & Papanikolaou, S. (2010). Commercial sugars as substrates for lipid accumulation in *Cunninghamella echinulata* and *Mortierella isabellina* fungi. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 112(9), 1048-1057.

Chatzifragkou, A., Makri, A., Belka, A., Bellou, S., Mavrou, M., Mastoridou, M., ... & Papanikolaou, S. (2011a). Biotechnological conversions of biodiesel derived waste glycerol by yeast and fungal species. *Energy*, 36(2), 1097-1108.

Chatzifragkou, A., Papanikolaou, S., Dietz, D., Doulgeraki, A. I., Nychas, G. J. E., & Zeng, A. P. (2011b). Production of 1, 3-propanediol by *Clostridium butyricum* growing on biodiesel-derived crude glycerol through a non-sterilized fermentation process. *Applied microbiology and biotechnology*, 91(1), 101-112.

Chen, H. C., & Chang, C. C. (1996). Production of γ -linolenic acid by the fungus *Cunninghamella echinulata* CCRC 31840. *Biotechnology Progress*, 12(3), 338-341.

- Choubisa, B., Patel, H., Patel, M., & Dholakiya, B. (2012). Microbial production of lactic acid by using crude glycerol from biodiesel. *J Microb Biotechnol Res*, 2(1), 90-93.
- Christophe, G., Fontanille, P., & Larroche, C. (2019). Research and Production of Microbial Polyunsaturated Fatty Acids. *Bioprocessing for Biomolecules Production*, 167-194.
- Connor, W. E., DeFRANCESCO, C. A., & Connor, S. L. (1993). N-3 fatty acids from fish oil. *Ann. NY Acad. Sci*, 683, 16-34.
- Cottin, S. C., Sanders, T. A., & Hall, W. L. (2011). The differential effects of EPA and DHA on cardiovascular risk factors. *Proceedings of the Nutrition Society*, 70(2), 215-231.
- De Caterina, R., Kristensen, S., & Schmidt, E. (1993). n-3 Fatty Acids: and Vascular Disease.
- De Lorgeril, M., Salen, P., Martin, J. L., Monjaud, I., Delaye, J., & Mamelle, N. (1999). Mediterranean diet, traditional risk factors, and the rate of cardiovascular complications after myocardial infarction: final report of the Lyon Diet Heart Study. *Circulation*, 99(6), 779-785.
- Dijksterhuis, J., & Samson, R. A. (2006). Zygomycetes. In *Food spoilage microorganisms* (pp. 415-436). Woodhead Publishing.
- Donadio Jr, J. V., Bergstralh, E. J., Offord, K. P., Spencer, D. C., & Holley, K. E. (1994). A controlled trial of fish oil in IgA nephropathy. *New England Journal of Medicine*, 331(18), 1194-1199.
- Dyal, S. D., Bouzidi, L., & Narine, S. S. (2005). Maximizing the production of γ -linolenic acid in *Mortierella ramanniana* var. *ramanniana* as a function of pH, temperature and carbon source, nitrogen source, metal ions and oil supplementation. *Food Research International*, 38(7), 815-829.
- Ethier, S., Woisard, K., Vaughan, D., & Wen, Z. (2011). Continuous culture of the microalgae *Schizochytrium limacinum* on biodiesel-derived crude glycerol for producing docosahexaenoic acid. *Bioresource technology*, 102(1), 88-93.
- Fakas, S., Bellou, S., Makri, A., & Aggelis, G. (2009a). Single cell oil and gamma-linolenic acid production by *Thamnidium elegans* grown on raw glycerol. *Microbial conversions of raw glycerol*, 85-99.
- Fakas, S., Makri, A., Mavromati, M., Tselepi, M., & Aggelis, G. (2009c). Fatty acid composition in lipid fractions lengthwise the mycelium of *Mortierella isabellina* and lipid production by solid state fermentation. *Bioresource technology*, 100(23), 6118-6120.

- Fakas, S., Papanikolaou, S., Batsos, A., Galiotou-Panayotou, M., Mallouchos, A., & Aggelis, G. (2009b). Evaluating renewable carbon sources as substrates for single cell oil production by *Cunninghamella echinulata* and *Mortierella isabellina*. *Biomass and Bioenergy*, *33*(4), 573-580.
- Fakas, S., Papanikolaou, S., Galiotou-Panayotou, M., Komaitis, M., & Aggelis, G. (2006). Lipids of *Cunninghamella echinulata* with emphasis to γ -linolenic acid distribution among lipid classes. *Applied microbiology and biotechnology*, *73*(3), 676-683.
- Fakas, S., Papanikolaou, S., Galiotou-Panayotou, M., Komaitis, M., & Aggelis, G. (2008). Biochemistry and biotechnology of single cell oil. *University of Patras*, 38-60.
- Fan, Y. Y., & Chapkin, R. S. (1998). Importance of dietary γ -linolenic acid in human health and nutrition. *The Journal of nutrition*, *128*(9), 1411-1414.
- Ferreira, J. A., Lennartsson, P. R., Edebo, L., & Taherzadeh, M. J. (2013). Zygomycetes-based biorefinery: Present status and future prospects. *Bioresource technology*, *135*, 523-532.
- Ficinus, O. (1873). Ueber den Fettgehalt des Mutterkorn. *Archiv der Pharmazie*, *203*(3), 219-219.
- Folch, J., Lees, M., & Stanley, G. S. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *Journal of biological chemistry*, *226*(1), 497-509.
- Gao, C., Yang, X., Wang, H., Rivero, C. P., Li, C., Cui, Z., ... & Lin, C. S. K. (2016). Robust succinic acid production from crude glycerol using engineered *Yarrowia lipolytica*. *Biotechnology for biofuels*, *9*(1), 179.
- Gao, D., Zeng, J., Yu, X., Dong, T., & Chen, S. (2014). Improved lipid accumulation by morphology engineering of oleaginous fungus *Mortierella isabellina*. *Biotechnology and bioengineering*, *111*(9), 1758-1766.
- Gardeli, C., Athenaki, M., Xenopoulos, E., Mallouchos, A., Koutinas, A. A., Aggelis, G., & Papanikolaou, S. (2017). Lipid production and characterization by *Mortierella* (*Umbelopsis*) *isabellina* cultivated on lignocellulosic sugars. *Journal of applied microbiology*, *123*(6), 1461-1477.
- Gema, H., Kavadia, A., Dimou, D., Tsagou, V., Komaitis, M., & Aggelis, G. (2002). Production of γ -linolenic acid by *Cunninghamella echinulata* cultivated on glucose and orange peel. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *58*(3), 303-307.

- Gogus, U., & Smith, C. (2010). n-3 Omega fatty acids: a review of current knowledge. *International Journal of Food Science & Technology*, *45*(3), 417-436.
- Hadley, K. B., Ryan, A. S., Forsyth, S., Gautier, S., & Salem, N. (2016). The essentiality of arachidonic acid in infant development. *Nutrients*, *8*(4), 216.
- Hawksworth, D. L. (1991). The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance, and conservation. *Mycological research*, *95*(6), 641-655.
- Hansson, L., & Dostálek, M. (1988). Effect of culture conditions on mycelial growth and production of γ -linolenic acid by the fungus *Mortierella ramanniana*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *28*(3), 240-246.
- Heydari, B., Abdullah, S., Pottala, J. V., Shah, R., Abbasi, S., Mandry, D., ... & Appelbaum, E. (2016). Effect of omega-3 acid ethyl esters on left ventricular remodeling after acute myocardial infarction: the OMEGA-REMODEL randomized clinical trial. *Circulation*, *134*(5), 378-391.
- Hibbett, D. S., Binder, M., Bischoff, J. F., Blackwell, M., Cannon, P. F., Eriksson, O. E., ... & Lumbsch, H. T. (2007). A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycological research*, *111*(5), 509-547.
- Hiruta, O., Yamamura, K., Takebe, H., Futamura, T., Inuma, K., & Tanaka, H. (1997). Application of Maxblend Fermentor® for microbial processes. *Journal of fermentation and bioengineering*, *83*(1), 79-86.
- Horrobin, D. F. (1992). Nutritional and medical importance of gamma-linolenic acid. *Progress in lipid research*, *31*(2), 163-194.
- Jensen, R. G., & Lammi-Keefe, C. J. (1998). *Current status of research on the composition of bovine and human milk lipids* (pp. 168-191). AOCS Press, Champaign, IL, USA.
- Johnson, E. E., & Rehmann, L. (2016). The role of 1, 3-propanediol production in fermentation of glycerol by *Clostridium pasteurianum*. *Bioresource technology*, *209*, 1-7.
- Kapoor, R., & Nair, H. (2005). Gamma linolenic acid oils. *Bailey's industrial oil and fat products*.
- Kavadia, A., Komaitis, M., Chevalot, I., Blanchard, F., Marc, I., & Aggelis, G. (2001). Lipid and γ -linolenic acid accumulation in strains of Zygomycetes growing on glucose. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, *78*(4), 341-346.
- Kendrick, B. (2017). *The fifth kingdom*. Hackett Publishing.

Kirk, P. M., Cannon, P. F., David, J. C., & Stalpers, J. A. (2001). *Ainsworth and Bisby's Dictionary of the Fungi* (No. Ed. 9). CABI publishing.

Koutinas, A. A., & Papanikolaou, S. (2011). Biodiesel production from microbial oil. In *Handbook of biofuels production* (pp. 177-198). Woodhead Publishing.

Koutinas, A. A., Chatzifragkou, A., Kopsahelis, N., Papanikolaou, S., & Kookos, I. K. (2014). Design and techno-economic evaluation of microbial oil production as a renewable resource for biodiesel and oleochemical production. *Fuel*, *116*, 566-577.

Kraus, W. E., & Pruitt, J. D. (2015). Preventive Cardiology: Counseling Older At-Risk Adults on Nutrition. In *Handbook of Clinical Nutrition and Aging* (pp. 203-214). Humana Press, New York, NY.

Kremer, J. M. (1996). Effects of modulation of inflammatory and immune parameters in patients with rheumatic and inflammatory disease receiving dietary supplementation of n-3 and n-6 fatty acids. *Lipids*, *31*(1Part2), S243-S247.

Kumar, L. R., Kaur, R., Yellapu, S. K., Zhang, X., & Tyagi, R. D. (2019). Biodiesel Production from Oleaginous Microorganisms with Wastes as Raw Materials. In *Biofuels: Alternative Feedstocks and Conversion Processes for the Production of Liquid and Gaseous Biofuels* (pp. 661-690). Academic Press.

Lands, B. (2014). Historical perspectives on the impact of n-3 and n-6 nutrients on health. *Progress in Lipid Research*, *55*, 17-29.

Lennartsson, P. (2012). *Zygomycetes and cellulose residuals: hydrolysis, cultivation and applications* (Doctoral dissertation, University of Borås: School of Engineering; Chalmers University of Technology: Department of Chemical and Biological Engineering).

Liang, M. H., & Jiang, J. G. (2013). Advancing oleaginous microorganisms to produce lipid via metabolic engineering technology. *Progress in lipid research*, *52*(4), 395-408.

Liang, Y., Sarkany, N., Cui, Y., & Blackburn, J. W. (2010). Batch stage study of lipid production from crude glycerol derived from yellow grease or animal fats through microalgal fermentation. *Bioresource technology*, *101*(17), 6745-6750.

Lindner, P. Das Problem der Biologischen Fettbildung und Fettgewinnung. *Z. Angew. Chem.* 1922, *35*, 110–114.

- Liu, X., Schumacher, F. R., Plummer, S. J., Jorgenson, E., Casey, G., & Witte, J. S. (2007). Trans-fatty acid intake and increased risk of advanced prostate cancer: modification by RNASEL R462Q variant. *Carcinogenesis*, *28*(6), 1232-1236.
- Ma, Y., Gao, Z., Wang, Q., & Liu, Y. (2018). Biodiesels from microbial oils: Opportunity and challenges. *Bioresource technology*, *263*, 631-641.
- Ma, Y., & Liu, Y. (2019). Biodiesel Production: Status and Perspectives. In *Biofuels: Alternative Feedstocks and Conversion Processes for the Production of Liquid and Gaseous Biofuels* (pp. 503-522). Academic Press.
- Maton, A., Hopkins, J., McLaughlin, C. W., Johnson, S., Warner, M. Q., LaHart, D., & Wright, J. D. Human biology and health. 1993. *Englewood Cliffs, New Jersey, US: Prentice Hall*.
- McLaughlin, D. J., Hibbett, D. S., Lutzoni, F., Spatafora, J. W., & Vilgalys, R. (2009). The search for the fungal tree of life. *Trends in microbiology*, *17*(11), 488-497.
- Miller, G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical chemistry*, *31*(3), 426-428.
- Morris, M. C., Sacks, F., & Rosner, B. (1994). Fish oil to reduce blood pressure a meta-analysis. *Annals of Internal Medicine*, *120*(Suppl.), 10.
- Morrison, W. R., & Smith, L. M. (1964). Preparation of fatty acid methyl esters and dimethylacetals from lipids with boron fluoride-methanol. *Journal of lipid research*, *5*(4), 600-608.
- Munch, G., Sestric, R., Sparling, R., Levin, D. B., & Cicek, N. (2015). Lipid production in the under-characterized oleaginous yeasts, *Rhodospiridium babjevae* and *Rhodospiridium diobovatum*, from biodiesel-derived waste glycerol. *Bioresource technology*, *185*, 49-55.
- Nägeli, C. V., & Loew, O. (1880). Ueber die Fettbildung bei den niederen Pilzen. *Journal für Praktische Chemie*, *21*(1), 97-114.
- Nägeli, C., & Loew, O. (1878). Über die chemische Zusammensetzung der Hefe. *Justus Liebigs Annalen der Chemie*, *193*(2), 322-348.
- Nakagawa, Y., Shinmi, Y., Koso, S., & Tomishige, K. (2010). Direct hydrogenolysis of glycerol into 1, 3-propanediol over rhenium-modified iridium catalyst. *Journal of Catalysis*, *272*(2), 191-194.

- Naranjo-Ortiz, M. A., & Gabaldón, T. (2019). Fungal evolution: diversity, taxonomy and phylogeny of the Fungi. *Biological Reviews*, 94(6), 2101-2137.
- Ochsenreither, K., Glück, C., Stressler, T., Fischer, L., & Syldatk, C. (2016). Production strategies and applications of microbial single cell oils. *Frontiers in microbiology*, 7, 1539.
- Oil World Annual, Data available at: <https://www.oilworld.biz/t/publications/annual>, 2018.
- Papanikolaou, S., & Aggelis, G. (2002). Lipid production by *Yarrowia lipolytica* growing on industrial glycerol in a single-stage continuous culture. *Bioresource technology*, 82(1), 43-49.
- Papanikolaou, S., Rontou, M., Belka, A., Athenaki, M., Gardeli, C., Mallouchos, A., ... & Aggelis, G. (2017). Conversion of biodiesel-derived glycerol into biotechnological products of industrial significance by yeast and fungal strains. *Engineering in Life Sciences*, 17(3), 262-281.
- Papanikolaou, S., & Aggelis, G. (2009). Biotechnological valorization of biodiesel derived glycerol waste through production of single cell oil and citric acid by *Yarrowia lipolytica*. *Lipid technology*, 21(4), 83-87.
- Papanikolaou, S., & Aggelis, G. (2011). Lipids of oleaginous yeasts. Part I: Biochemistry of single cell oil production. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 113(8), 1031-1051.
- Papanikolaou, S., & Aggelis, G. (2019). Sources of microbial oils with emphasis to *Mortierella (Umbelopsis) isabellina* fungus. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 35(4), 63.
- Papanikolaou, S., Diamantopoulou, P., Chatzifragkou, A., Philippoussis, A., & Aggelis, G. (2010). Suitability of low-cost sugars as substrates for lipid production by the fungus *Thamnidium elegans*. *Energy & fuels*, 24(7), 4078-4086.
- Papanikolaou, S., Dimou, A., Fakas, S., Diamantopoulou, P., Philippoussis, A., Galiotou-Panayotou, M., & Aggelis, G. (2011). Biotechnological conversion of waste cooking olive oil into lipid-rich biomass using *Aspergillus* and *Penicillium* strains. *Journal of applied microbiology*, 110(5), 1138-1150.
- Papanikolaou, S., Komaitis, M., & Aggelis, G. (2004a). Single cell oil (SCO) production by *Mortierella isabellina* grown on high-sugar content media. *Bioresource Technology*, 95(3), 287-291.
- Papanikolaou, S., Sarantou, S., Komaitis, M., & Aggelis, G. (2004b). Repression of reserve lipid turnover in *Cunninghamella echinulata* and *Mortierella isabellina* cultivated in multiple-limited media. *Journal of Applied Microbiology*, 97(4), 867-875.

- Raheja, B. S., Sadikot, S. M., Phatak, R. B., & Rao, M. B. (1993). Significance of the n-6/n-3 ratio for insulin action in diabetes. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 683(1), 258-271.
- Ratledge, C. (1968a). Growth of Moulds on a Fraction of n-Alkanes Predominant in Tridecane. *Journal of Applied Bacteriology*, 31(2), 232-240.
- Ratledge, C. (1968b). Production of fatty acids and lipid by a *Candida* sp. growing on a fraction of n-alkanes predominating in tridecane. *Biotechnology and Bioengineering*, 10(4), 511-533.
- Ratledge, C., & Wynn, J. P. (1976). Microbial production of oils and fats. *Food from waste. Applied Science, London*, 98-113.
- Ratledge, C. (1978). In "Economic Microbiology" (A. H. Rose, ed.), vol. 2, pp. 263-302. Academic Press, London.
- Ratledge, C. (1982). Single cell oil. *Enzyme Microb Technol*, 4, 58-60.
- Ratledge, C. (1984). Biotechnology as applied to the oils and fats industry. *Fette, Seifen, Anstrichmittel*, 86(10), 379-389.
- Ratledge, C. (1993). Single cell oils—have they a biotechnological future?. *Trends in biotechnology*, 11(7), 278-284.
- Ratledge, C. (1997). Microbial lipids. *Biotechnology: products of secondary metabolism*, 7, 133-197.
- Ratledge, C., & Wynn, J. P. (2002). The biochemistry and molecular biology of lipid accumulation in oleaginous microorganisms. *Advances in applied microbiology*, 51, 1-52.
- Ratledge, C. (2004). Fatty acid biosynthesis in microorganisms being used for single cell oil production. *Biochimie*, 86(11), 807-815.
- Ratledge, C. (2005). Microbial production of γ -linolenic acid. In *Handbook of functional lipids* (pp. 30-56). CRC press.
- Ratledge, C. (2010). Single cell oils for the 21st century. In *Single cell oils* (pp. 3-26). AOCS Press.
- Ratledge, C. (2013). Microbial production of polyunsaturated fatty acids as nutraceuticals. In *Microbial production of food ingredients, enzymes and nutraceuticals* (pp. 531-558). Woodhead Publishing.

- Ratledge, C. (2014). The role of malic enzyme as the provider of NADPH in oleaginous microorganisms: a reappraisal and unsolved problems. *Biotechnology letters*, *36*(8), 1557-1568.
- Ratledge, C., & Lippmeier, C. (2017). Microbial production of fatty acids. In *Fatty Acids* (pp. 237-278). AOCS Press.
- Ratray, J. B. (1984). Biotechnology and the fats and oils industry—an overview. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, *61*(11), 1701-1712.
- Ruiz-Herrera, J. (1991). *Fungal cell wall: structure, synthesis, and assembly*. CRC press.
- Sabikhi, L., & Kumar, M. S. (2012). Fatty acid profile of unconventional oilseeds. In *Advances in food and nutrition research* (Vol. 67, pp. 141-184). Academic Press.
- Sakuradani, E., Ando, A., Ogawa, J., & Shimizu, S. (2009). Improved production of various polyunsaturated fatty acids through filamentous fungus *Mortierella alpina* breeding. *Applied microbiology and biotechnology*, *84*(1), 1-10.
- SanGiovanni, J. P., Agrón, E., Clemons, T. E., & Chew, E. Y. (2009). ω -3 Long-chain polyunsaturated fatty acid intake inversely associated with 12-year progression to advanced age-related macular degeneration. *Archives of ophthalmology*, *127*(1), 109-116.
- Sayegh, F., Elazzazy, A., Bellou, S., Moustogianni, A., Elkady, A. I., Baeshen, M. N., & Aggelis, G. (2016). Production of polyunsaturated single cell oils possessing antimicrobial and anticancer properties. *Annals of Microbiology*, *66*(3), 937-948.
- Serhan, C. N. (2005). Novel eicosanoid and docosanoid mediators: resolvins, docosatrienes, and neuroprotectins. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care*, *8*(2), 115-121.
- Shahar, E., Folsom, A. R., Melnick, S. L., Tockman, M. S., Comstock, G. W., Gennaro, V., ... & Szklo, M. (1994). Dietary n-3 polyunsaturated fatty acids and smoking-related chronic obstructive pulmonary disease. *New England Journal of Medicine*, *331*(4), 228-233.
- Shaw, R. (1965). The occurrence of γ -linolenic acid in fungi. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism*, *98*(2), 230-237.
- Shaw, R. (1966). The fatty acids of phycomycete fungi, and the significance of the γ -linolenic acid component. *Comparative biochemistry and physiology*, *18*(2), 325-331.
- Shaw, R. (1966). The polyunsaturated fatty acids of microorganisms. In *Advances in lipid research* (Vol. 4, pp. 107-174). Elsevier.

- Shuib, S., Ibrahim, I., Mackeen, M. M., Ratledge, C., & Hamid, A. A. (2018). First evidence for a multienzyme complex of lipid biosynthesis pathway enzymes in *Cunninghamella bainieri*. *Scientific reports*, *8*(1), 1-10.
- Stenson, W. F., Cort, D., Rodgers, J., Burakoff, R., DeSchryver-Kecskemeti, K., Gramlich, T. L., & Beeken, W. (1992). Dietary supplementation with fish oil in ulcerative colitis. *Annals of internal medicine*, *116*(8), 609-614.
- Stredansky, M., Conti, E., Stredanska, S., & Zanetti, F. (2000). γ -Linolenic acid production with *Thamnidium elegans* by solid-state fermentation on apple pomace. *Bioresource Technology*, *73*(1), 41-45.
- Teeka, J., Imai, T., Reungsang, A., Cheng, X., Yuliani, E., Thiantanankul, J., ... & Yamamoto, K. (2012). Characterization of polyhydroxyalkanoates (PHAs) biosynthesis by isolated *Novosphingobium* sp. THA_AIK7 using crude glycerol. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, *39*(5), 749-758.
- Thorpe, R. F., & Ratledge, C. (1972). Fatty acid distribution in triglycerides of yeasts grown on glucose or n-alkanes. *Microbiology*, *72*(1), 151-163.
- Vamvakaki, A. N., Kandarakis, I., Kaminarides, S., Komaitis, M., & Papanikolaou, S. (2010). Cheese whey as a renewable substrate for microbial lipid and biomass production by *Zygomycetes*. *Engineering in Life Sciences*, *10*(4), 348-360.
- Voigt, K., & Kirk, P. M. (2014). FUNGI | Classification of *Zygomycetes*: Reappraisal as Coherent Class Based on a Comparison between Traditional versus Molecular Systematics.
- Vivek, N., Pandey, A., & Binod, P. (2016). Biological valorization of pure and crude glycerol into 1, 3-propanediol using a novel isolate *Lactobacillus brevis* N1E9. 3.3. *Bioresource technology*, *213*, 222-230.
- Wang, X., Lin, H., & Gu, Y. (2012). Multiple roles of dihomogamma-linolenic acid against proliferation diseases. *Lipids in health and disease*, *11*(1), 25.
- Wang, X., Ruan, Z., Guan, W., Kraemer, R., Zhong, Y., & Liu, Y. (2015). Evaluation of fungal lactic acid accumulation using glycerol as the sole carbon source. *Biotechnology and bioprocess engineering*, *20*(3), 389-395.
- Wang, Z., Zhuge, J., Fang, H., & Prior, B. A. (2001). Glycerol production by microbial fermentation: a review. *Biotechnology advances*, *19*(3), 201-223.

- Wanasundara, U.N., Wanasundara, J.P.D., 2006. Gamma-linolenic acid: purification and functionality. In: Akoh, C.C. (Ed.), Handbook of Functional Lipids. Taylor and Francis, Boca Raton, FL, pp. 4775
- Woodbine, M., Gregory, M. E., & Walker, T. K. (1951). Microbiological synthesis of fat: Preliminary survey of the fat-producing moulds. *Journal of Experimental Botany*, 204-211.
- Wu, S., Hu, C., Jin, G., Zhao, X., & Zhao, Z. K. (2010). Phosphate-limitation mediated lipid production by *Rhodosporidium toruloides*. *Bioresource technology*, 101(15), 6124-6129.
- Wu, S., Zhao, X., Shen, H., Wang, Q., & Zhao, Z. K. (2011). Microbial lipid production by *Rhodosporidium toruloides* under sulfate-limited conditions. *Bioresource technology*, 102(2), 1803-1807.
- Yang, Y., Heidari, F., & Hu, B. (2019). Fungi (Mold)-Based Lipid Production. In *Microbial Lipid Production* (pp. 51-89). Humana, New York, NY.
- Yuan, Z., Wang, J., Wang, L., Xie, W., Chen, P., Hou, Z., & Zheng, X. (2010). Biodiesel derived glycerol hydrogenolysis to 1, 2-propanediol on Cu/MgO catalysts. *Bioresource technology*, 101(18), 7088-7092.
- Zhang, H., Zhang, L., Chen, H., Chen, Y. Q., Ratledge, C., Song, Y., & Chen, W. (2013). Regulatory properties of malic enzyme in the oleaginous yeast, *Yarrowia lipolytica*, and its non-involvement in lipid accumulation. *Biotechnology letters*, 35(12), 2091-2098.
- Zheng, H., Tang, H., Liu, M., He, M., Lai, P., Dong, H., ... & Bai, X. (2014). Inhibition of endometrial cancer by n-3 polyunsaturated fatty acids in preclinical models. *Cancer Prevention Research*, 7(8), 824-834.
- Zikou, E., Chatzifragkou, A., Koutinas, A. A., & Papanikolaou, S. (2013). Evaluating glucose and xylose as cosubstrates for lipid accumulation and γ -linolenic acid biosynthesis of *T. hamnidium elegans*. *Journal of Applied Microbiology*, 114(4), 1020-1032.