



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

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΕΠΙΣΤΗΜΗ & ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ**

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

Μελέτη αλκοολικής ζύμωσης κατά την αύξηση επιλεγμένων ζυμών
σε σακχαρούχα υποστρώματα

Μαρία Ελένη Ι. Δαμιανάκη

Επιβλέπων Καθηγητής:
Παπανικολάου Σεραφείμ, Καθηγητής ΓΠΑ

**Αθήνα
2023**

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

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

Μελέτη αλκοολικής ζύμωσης κατά την αύξηση επιλεγμένων ζυμών
σε σακχαρούχα υποστρώματα

“Study of the alcoholic fermentation of selected yeast strains
when growing on sugar-based substrates”

Μαρία Ελένη Ι. Δαμιανάκη

Εξεταστική επιτροπή:

Παπανικολάου Σεραφείμ, Καθηγητής ΓΠΑ (Επιβλέπων)

Δροσινός Ελευθέριος, Καθηγητής ΓΠΑ

Καλλίθρακα Σταματίνα, Καθηγήτρια ΓΠΑ

Μελέτη αλκοολικής ζύμωσης κατά την αύξηση επιλεγμένων ζυμών σε σακχαρούχα υποστρώματα

ΠΜΣ Επιστήμη & Τεχνολογία Τροφίμων
Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων & Διατροφής του Ανθρώπου
Εργαστήριο Μικροβιολογίας & Βιοτεχνολογίας Τροφίμων

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η αλκοολική ζύμωση σακχαρούχων υποστρωμάτων με τη χρήση ζυμών, αποτελεί μία από τις πιο παλιές τεχνολογίες, που ακόμη και σήμερα διαδραματίζει βασικό ρόλο σε διάφορες βιοτεχνολογικές διεργασίες, όπως ζυμώσεις της μύρας, του κρασιού, καθώς και ζυμώσεις παραγωγής βιοκαυσίμων. Η γρήγορη κατανάλωση σακχαρούχων υποστρωμάτων, η παραγωγή αιθανόλης και η αλκοολοανθεκτικότητα, καθώς και η δυνατότητα ανάπτυξης τους χωρίς οξυγόνο, είναι μερικά από τα πλεονεκτικά χαρακτηριστικά των ζυμών. Η αιθανόλη ως προϊόν υψηλής προστιθέμενης αξίας μπορεί να αξιοποιηθεί ως υγρό βιοκαύσιμο, αποτελώντας εναλλακτική πηγή ενέργειας. Στην παρούσα μελέτη στόχος ήταν η αξιολόγηση νέων, πρόσφατα απομονωμένων στελεχών ζυμών (*Saccharomyces cerevisiae* XS, *Pichia fermentans* 5265, *Pichia anomala*, *Pichia kluyveri*, *Pichia guilliermondi*, *Kluyveromyces marxianus* LPBH6) ως προς την ικανότητά τους να αυξάνονται σε συνυποστρώματα γλυκόζης και φρουκτόζης, υπό αερόβιες και αναερόβιες συνθήκες και να παράγουν μεταβολίτες, όπως αιθανόλη, καθώς και μικροβιακά λιπίδια και ενδοπολυσακχαρίτες.

Αρχικά πραγματοποιήθηκαν μικροβιακές ζυμώσεις σε αερόβιες και αναερόβιες συνθήκες, με αρχική συγκέντρωση σακχάρων ίση με 120 g/L, οι οποίες οδήγησαν σε πλήρη αφομοίωση των σακχάρων από όλα τα στελέχη των μικροοργανισμών. Στις αερόβιες ζυμώσεις, τα στελέχη *P. fermentans* 5265 και *P. anomala* επέδειξαν την υψηλότερη παραγωγή και παραγωγικότητα αιθανόλης (55 g/L και 1,2 g/L/h), ενώ στις αναερόβιες ζυμώσεις η μέγιστη παραγωγή και παραγωγικότητα αιθανόλης επιτεύχθηκε με τη ζύμη *Kluyveromyces marxianus* LPBH6 (51 g/L και 1,1 g/L/h). Γενικά, το υπόστρωμα γλυκόζης καταναλώθηκε πιο γρήγορα και εύκολα από τους μικροοργανισμούς συγκριτικά με την φρουκτόζη, ενώ παράλληλα όλες οι ζύμες ήταν θετικές στο φαινόμενο Crabtree. Επιπλέον, η παραγωγή μικροβιακών λιπιδίων κινήθηκε σε χαμηλά ποσοστά, μικρότερα του 5%, ενώ στις αερόβιες σημειώθηκε μεγαλύτερη παραγωγή λιπιδίων απ' ότι στις αναερόβιες καλλιέργειες, τα οποία ήταν πλούσια σε ακόρεστα λιπαρά οξέα, με κυρίαρχο το ελαϊκό οξύ. Τέλος,

πραγματοποιήθηκαν αναερόβιες ζυμώσεις με τις ζύμες *K. marxianus* LPHB6 και *S.cerevisiae* XS σε αρχική συγκέντρωση σακχάρων περί τα 200 g/L, οι οποίες σημείωσαν αρκετά υψηλές συγκεντρώσεις αιθανόλης, πάνω από 9% (v/v), καθώς και πολύ υψηλές παραγωγικότητες, περί το 2 g/L/h.

Επιστημονική περιοχή: Αλκοολική ζύμωση

Λέξεις κλειδιά: Βιοαιθανόλη, Αλκοολική ζύμωση, *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia* sp., *Kluyveromyces* sp., Φαινόμενο Crabtree, Λιπίδια, Ενδοπολυσακχαρίτες

Study of the alcoholic fermentation of selected yeast strains when growing on sugar-based substrates

*MSc Food Science & Technology
Department of Food Science & Human Nutrition
Laboratory of Food Microbiology & Biotechnology*

ABSTRACT

The alcoholic fermentation of sugar-based substrates using yeasts, is one of the most diachronic human technologies, which even nowadays plays a key role in various biotechnological processes, such as beer and wine fermentations, as well as biofuel production fermentations. The rapid consumption of sugar-based substrates, the ethanol production and ethanol resistance, as well as the ability of anaerobic growth, are some of the advantages of yeast fermentation. Ethanol, as a value-added product, can be valorized as a biofuel, constituting an alternative energy resource. The aim of the present study was to evaluate the ability of new, recently isolated yeast strains (*Saccharomyces cerevisiae* XS, *Pichia fermentans* 5265, *Pichia anomala*, *Pichia kluyveri*, *Pichia guillermondi*, *Kluyveromyces marxianus* LPBH6) to grow on glucose and fructose substrates, under aerobic and anaerobic conditions, as well as the ability to produce ethanol, microbial lipids and intra-cellular polysaccharides.

Firstly, aerobic, and anaerobic fermentations were carried out with an initial sugar concentration (glucose and fructose) equal to 120 g/L, which led to total accumulation of the substrate by all the yeast strains. As for the aerobic fermentations, the strains *P. fermentans* 5265 and *P. anomala* reached the highest ethanol production and productivity (55 g/L και 1,2 g/L/h), while in the anaerobic fermentations the highest ethanol production and productivity was achieved by the yeast *Kluyveromyces marxianus* LPBH6 (51 g/L και 1,1 g/L/h). In general, the microbial strains consumed the glucose substrate easier and faster compared to the fructose substrate, while all the strains were positive to the Crabtree effect. Moreover, the microbial lipids production reached a percentage less than 5%, while in the aerobic fermentations the microbial lipids production was higher than the one in anaerobic fermentations. Furthermore, the microbial lipids were rich in unsaturated fatty acids, especially oleic acid. Finally, anaerobic fermentations were conducted by using the yeasts *K. marxianus* LPBH6 and *S. cerevisiae* XS, with an initial sugar concentration of 200 g/L, which reached high

concentrations of ethanol production, more than 9%(v/v), as well as very high ethanol productivities, approximately 2 g/L/h.

Scientific area: Alcoholic fermentation

Key words: Ethanol, Alcoholic fermentation, *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia sp.*, *Kluyveromyces sp.*, Crabtree Effect, Lipids, Endopolysaccharides

Ευχαριστίες

Η παρούσα μεταπτυχιακή μελέτη πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, στο πλαίσιο του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών «Επιστήμη και Τεχνολογία Τροφίμων».

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα καθηγητή μου κ. Σεραφείμ Παπανικολάου, για την εμπιστοσύνη του και την ανάθεση του θέματος της μεταπτυχιακής μου μελέτης, όπως επίσης και τα υπόλοιπα μέλη της τριμελούς μου επιτροπής, κ. Δροσινό Ελευθέριο και κα Καλλίθρακα Σταματίνα.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου για την βοήθεια, τη στήριξη και τις συμβουλές που μου παρείχαν καθ' όλη τη διάρκεια της διεξαγωγής των πειραμάτων μου.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου και τους φίλους μου για την κατανόηση και τη συμπαράσταση που έδειξαν κατά τη διάρκεια των σπουδών μου.

Συντομογραφίες

ACL: ATP-citrate lyase

AGAT: 1-acyl-G-3-Pacyltransferase

ALA: α-linolenic acid

AMP: Adenosinemonophosphate

CoA: CoenzymeA

DAG: Diacylglycerol

FAMES: Fatty Acid Methyl Esters

FID: Flame Ionization Detector

G-3-P: Glycerol-3-phosphate

GAT: G-3-Pacyltransferase

GC: Gas Chromatography

HMG-CoA: 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA

HPLC: High-performance liquid chromatography

IMP: Inosine monophosphate

LA: Linoleic acid

LED: Light emitting diode

LPA: Lysophosphatidic acid

NAD⁺: Nicotinamideadeninedinucleotide

NADP⁺: Nicotinamideadeninedinucleotidephosphate

PA: Phosphatidic acid

PAP: Phosphatidic acid phosphohydrolase

SEs: Sterylesters

TAGs: Triacylglycerols

TDW: Total Dry Weight

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Ευχαριστίες	7
Συντομογραφίες	8
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	14
1.1. Βιοαιθανόλη.....	15
1.1.1. Χαρακτηριστικά βιοαιθανόλης.....	15
1.1.2. Παγκόσμια παραγωγή βιοαιθανόλης.....	16
1.2. Ζύμες.....	18
1.2.1. Φαινόμενο Pasteur και φαινόμενο Crabtree	18
1.2.2. Χαρακτηριστικά ζυμών	20
1.2.3. Παραγωγή βιοαιθανόλης από ζύμες.....	23
1.2.4. Παράγοντες που επηρεάζουν την παραγωγή βιοαιθανόλης.....	24
1.3. Βιοχημικά μονοπάτια παραγωγής βιοαιθανόλης	27
1.3.1. Γλυκόλυση.....	28
1.3.2. Αλκοολική ζύμωση.....	30
1.3.3. Γλυκεροπυροσταφυλική ζύμωση	31
1.3.4. Αναπνοή	32
1.4. Βιοχημεία της συσσώρευσης λιπιδίων στους μικροοργανισμούς.....	33
1.4.1. Μονοπάτι βιοσύνθεσης λιπιδίων	33
1.4.2. Σύνθεση τριακυλογλυκερόλης.....	35
1.5. Ενδοπολυσακχαρίτες.....	36
2. ΣΚΟΠΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ.....	38
3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	39
3.1. Μικροοργανισμοί, ανανέωση, συντήρηση και προκαλλιέργεια	39
3.2. Ζυμώσεις προς παραγωγή βιοαιθανόλης και μικροβιακού λίπους.....	39
3.3. Αναλυτικές μέθοδοι	40
3.3.1. Προσδιορισμός πηγών άνθρακα και αιθανόλης.....	40
3.3.2. Προσδιορισμός βιομάζας και μικροβιακού λίπους	40
3.3.3. Προσδιορισμός σύστασης σε λιπαρά οξέα.....	41
3.3.4. Προσδιορισμός ενδοπολυσακχαριτών (IPS)	41
3.3.5. Συντελεστές	41
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	43
4.1. Καλλιέργειες υπό αερόβιες συνθήκες	43
4.2. Καλλιέργειες υπό αναερόβιες συνθήκες	47

4.3. Αναερόβιες ζυμώσεις σε υψηλότερο S_0	53
4.4. Προφίλ μεθυλεστέρων λιπαρών οξέων του λίπους.....	55
4.5. Ανάλυση κλασμάτων ενδοκυτταρικού λίπους.....	56
4.6. Συγκριτική αξιολόγηση αποτελεσμάτων	57
5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	60
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	62

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

- Εικόνα 1.** Εμπορικά μίγματα αιθανόλης – βενζίνης χρησιμοποιούμενα σε κινητήρες εσωτερικής καύσης (<https://www.hisour.com/common-ethanol-fuel-mixtures-40963/amp/>).....17
- Εικόνα 2.** Γλυκολυτικό μονοπάτι EMP και μονοπάτι αλκοολικής ζύμωσης (Faria-Oliveira et al., 2013).....30
- Εικόνα 3.** Μεταβολικά μονοπάτια βιοσύνθεσης λιπαρών οξέων σε ελαιογόνους ευκαρυωτικούς μικροοργανισμούς (Ochsenreither et al. 2016).....35
- Εικόνα 4** Διαγραμματική απεικόνιση της κινητικής κατανάλωσης γλυκόζης (●) και φρουκτόζης (◆), της παραγωγής βιομάζας (■) και αιθανόλης (▲) κατά την αερόβια ασυνεχή ζύμωση του *K. marxianus* LPHB6 σε κωνικές φιάλες.....41
- Εικόνα 5** Διαγραμματική απεικόνιση της κινητικής κατανάλωσης γλυκόζης (●) και φρουκτόζης (◆), της παραγωγής βιομάζας (■) και αιθανόλης (▲) κατά την αερόβια ασυνεχή ζύμωση του *S. cerevisiae* XS σε κωνικές φιάλες.....42
- Εικόνα 6** Διαγραμματική απεικόνιση της κινητικής κατανάλωσης γλυκόζης (●) και φρουκτόζης (◆), της παραγωγής βιομάζας (■) και αιθανόλης (▲) κατά την αερόβια ασυνεχή ζύμωση του *P. fermentans* 5265 σε κωνικές φιάλες.....43
- Εικόνα 7** Διαγραμματική απεικόνιση της κινητικής κατανάλωσης γλυκόζης (●) και φρουκτόζης (◆), της παραγωγής βιομάζας (■) και αιθανόλης (▲) κατά την αερόβια ασυνεχή ζύμωση του *P. anomala* σε κωνικές φιάλες.....43
- Εικόνα 8** Διαγραμματική απεικόνιση της κινητικής κατανάλωσης γλυκόζης (●) και φρουκτόζης (◆), της παραγωγής βιομάζας (■) και αιθανόλης (▲) κατά την αερόβια ασυνεχή ζύμωση του *P. anomala* σε κωνικές φιάλες.....44
- Εικόνα 9** Διαγραμματική απεικόνιση της κινητικής κατανάλωσης γλυκόζης (●) και φρουκτόζης (◆), της παραγωγής βιομάζας (■) και αιθανόλης (▲) κατά την αερόβια ασυνεχή ζύμωση του *P. anomala* σε κωνικές φιάλες.....44
- Εικόνα 10** Διαγραμματική απεικόνιση της κινητικής κατανάλωσης γλυκόζης (●) και φρουκτόζης (◆), της παραγωγής βιομάζας (■) και αιθανόλης (▲) κατά την αναερόβια ασυνεχή ζύμωση του *K. marxianus* LPBH6 σε κωνικές φιάλες.....46
- Εικόνα 11** Διαγραμματική απεικόνιση της κινητικής κατανάλωσης γλυκόζης (●) και φρουκτόζης (◆), της παραγωγής βιομάζας (■) και αιθανόλης (▲) κατά την αναερόβια ασυνεχή ζύμωση του *S. cerevisiae* XS σε κωνικές φιάλες.....46
- Εικόνα 12** Διαγραμματική απεικόνιση της κινητικής κατανάλωσης γλυκόζης (●) και φρουκτόζης (◆), της παραγωγής βιομάζας (■) και αιθανόλης (▲) κατά την αναερόβια ασυνεχή ζύμωση του *P. fermentans* 5265 σε κωνικές φιάλες.....47
- Εικόνα 13** Διαγραμματική απεικόνιση της κινητικής κατανάλωσης γλυκόζης (●) και φρουκτόζης (◆), της παραγωγής βιομάζας (■) και αιθανόλης (▲) κατά την αναερόβια ασυνεχή ζύμωση του *P. anomala* σε κωνικές φιάλες.....47

Εικόνα 14 Διαγραμματική απεικόνιση της κινητικής κατανάλωσης γλυκόζης (●) και φρουκτόζης (◆), της παραγωγής βιομάζας (■) και αιθανόλης (▲) κατά την αναερόβια ασυνεχή ζύμωση του *P. kluyverii* σε κωνικές φιάλες.....48

Εικόνα 15 Διαγραμματική απεικόνιση της κινητικής κατανάλωσης γλυκόζης (●) και φρουκτόζης (◆), της παραγωγής βιομάζας (■) και αιθανόλης (▲) κατά την αναερόβια ασυνεχή ζύμωση του *P. guillermondi* σε κωνικές φιάλες.....49

Εικόνα 16 Διαγραμματική απεικόνιση της κινητικής κατανάλωσης γλυκόζης (●) και φρουκτόζης (◆), της παραγωγής βιομάζας (■) και αιθανόλης (▲) κατά την αναερόβια ασυνεχή ζύμωση του *K. marxianus* LPHB6 σε κωνικές φιάλες.....51

Εικόνα 17 Διαγραμματική απεικόνιση της κινητικής κατανάλωσης γλυκόζης (●) και φρουκτόζης (◆), της παραγωγής βιομάζας (■) και αιθανόλης (▲) κατά την αναερόβια ασυνεχή ζύμωση του *S. cerevisiae* XS σε κωνικές φιάλες.....52

Εικόνα 18 Ανάλυση κλασμάτων των μικροβιακών λιπιδίων του *K. marxianus* LPBH6, *S. cerevisiae* XS και *P. fermentans* 5265 μέσω χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας.....54

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

- Πίνακας 1.** Συγκεντρωτικά ποσοτικά δεδομένα προερχόμενα από την κινητική ανάπτυξης ζυμών, έπειτα από καλλιέργεια σε ημι-καθορισμένα θρεπτικά συνυποστρώματα γλυκόζης-φρουκτόζης (60 g/L έκαστο), υπό αερόβιες συνθήκες.....40
- Πίνακας 2.** Συγκεντρωτικά ποσοτικά δεδομένα προερχόμενα από την κινητική ανάπτυξης ζυμών, έπειτα από καλλιέργεια σε ημι-καθορισμένα θρεπτικά συνυποστρώματα γλυκόζης-φρουκτόζης (60 g/L έκαστο), υπό αναερόβιες συνθήκες.....45
- Πίνακας 3** Συγκεντρωτικός συγκριτικός πίνακας από τα αποτελέσματα των κινητικών, που παρουσίασαν τα συγκεκριμένα στελέχη, καθώς αναπτύχθηκαν υπό αερόβιες και αναερόβιες συνθήκες.....49
- Πίνακας 4.** Συγκεντρωτικά ποσοτικά δεδομένα προερχόμενα από την κινητική ανάπτυξης επιλεγμένων ζυμών, έπειτα από καλλιέργεια σε ημι-καθορισμένα θρεπτικά συνυποστρώματα γλυκόζης-φρουκτόζης (≈ 100 g/L έκαστο), υπό αναερόβιες συνθήκες.....50
- Πίνακας 5.** Συγκεντρωτικός συγκριτικός πίνακας από τα αποτελέσματα των κινητικών, που παρουσίασαν τα συγκεκριμένα στελέχη, καθώς αναπτύχθηκαν υπό αερόβιες και αναερόβιες συνθήκες.....52
- Πίνακας 6.** Προφίλ μεθυλεστέρων των λιπαρών οξέων του μικροβιακού λίπους, κατά την καλλιέργεια των ζυμών υπό αερόβιες συνθήκες.....53
- Πίνακας 7:** Συγκεντρωτικά αποτελέσματα περί της παραγωγής βιοαιθανόλης από διάφορα στελέχη ζυμών σύμφωνα με τη διεθνή βιβλιογραφία.....56

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η αλκοολική ζύμωση υδατανθράκων διαφόρων φυτικών πηγών από ζύμες αποτελεί μία από τις παλαιότερες εφαρμογές, με προέλευση από τη Νεολιθική περίοδο. Ακόμη και στις μέρες μας, οι ζύμες διαδραματίζουν βασικό ρόλο σε διάφορες βιοτεχνολογικές διεργασίες, όπως ζυμώσεις της μύρας, του κρασιού, καθώς και ζυμώσεις παραγωγής βιοκαυσίμων, όπως η βιοαιθανόλη. Οι μικροοργανισμοί, και ιδιαίτερα ο *Saccharomyces cerevisiae* και οι συγγενικές του ζύμες, συχνά γίνονται ο κυρίαρχος μικροοργανισμός σε περιβάλλον με μονο- και ολιγοσακχαρίτες. Η ταχεία αφομοίωση των σακχάρων, η παραγωγή αιθανόλης, η ανθεκτικότητα σε υψηλές συγκεντρώσεις του προϊόντος, καθώς και η δυνατότητα ανάπτυξης απουσία οξυγόνου, είναι μερικά από τα πλεονεκτήματα στα οποία οφείλονται τα επιτυχημένα αποτελέσματα (Dashko et al., 2014).

Η ζύμωση οποιουδήποτε υποστρώματος περιέχει υδατάνθρακες, ιδιαίτερα μονομερή όπως η γλυκόζη, ξυλόζη, φρουκτόζη κ.α., από τα κατάλληλα μικροβιακά στελέχη μπορεί να οδηγήσει στην παραγωγή αιθανόλης. Οι πρώτες ύλες κατηγοριοποιούνται ως εξής: 1) απλές πεντόζες/εξόζες και δισακχαρίτες (π.χ. φρουκτόζη), 2) το άμυλο, 3) τα λιγνοκυτταρινούχα υλικά και 4) τα αστικά – βιομηχανικά απόβλητα. Η γλυκερόλη, το κύριο παραπροϊόν της βιομηχανίας βιολογικού πετρελαίου μπορεί, επίσης, να βιομετατραπεί σε αιθανόλη. Η λιγνοκυτταρινούχα βιομάζα και το άμυλο, αν και φθηνότερα υλικά (άφθονη φυτική βιομάζα μηδενικής αξίας) συγκριτικά με τα μονομερή σάκχαρα, απαιτούν σαφώς περισσότερη ενέργεια λόγω την προεπεξεργασίας, που απαιτείται, για την μετατροπή τους σε ζυμώσιμα σάκχαρα και αποτελεί μειονέκτημα για τη χρήση αυτών των υποστρωμάτων (Sarris & Papanikolaou, 2016).

Παράλληλα, η ανάγκη για ανανεώσιμες πηγές ενέργειας και κάλυψης των ενεργειακών αναγκών του πλανήτη, έχει στρέψει τη βιομηχανία προς τα υγρά καύσιμα, όπως η βιοαιθανόλη, που καλύπτουν το 40% της συνολικής κατανάλωσης ενέργειας του κόσμου. Η χρήση υγρών καυσίμων, συμβάλλει στην μείωση των εκπομπών του φαινομένου του θερμοκηπίου και στην τοπική ανάπτυξη (Azhar et al., 2017).

1.1. Βιοαιθανόλη

1.1.1. Χαρακτηριστικά βιοαιθανόλης

Η βιοαιθανόλη, γνωστή και ως αιθυλική αλκοόλη ή οινόπνευμα, είναι μία αλκοόλη με χημικό τύπο C_2H_5OH (CH_3-CH_2-OH) και αποτελεί υγρό καύσιμο, που παράγεται από διάφορες πρώτες ύλες βιομάζας και τεχνολογίες μετατροπής. Η βιοαιθανόλη έχει υψηλό αριθμό οκτανίων, ίσο με 108, επιτρέποντας την αύξηση του ρυθμού συμπίεσης και την μείωση των εκπομπών (Balat, 2011). Η αιθανόλη είναι ένα οξυγονωμένο καύσιμο, που περιέχει 35% οξυγόνο, το οποίο μειώνει τις εκπομπές σωματιδίων και NO_x , που παράγονται από την καύση (Balat et al., 2008). Είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθεί άμεσα ως καθαρή αιθανόλη ή αναμειγμένη με βενζίνη και μπορεί να λειτουργήσει ως βελτιωτής της βενζίνης ή ενισχυτής οκτανίων, ενώ σε μείγματα βιοαιθανόλης-ντίζελ μπορεί να μειώσει τις εκπομπές αερίων (Azhar et al., 2017).

Πλεονεκτήματα

Η αιθανόλη παρουσιάζει πλήθος πλεονεκτημάτων συγκριτικά με τη βενζίνη, αποτελώντας μία πιο ποιοτική εναλλακτική λύση. Συγκεκριμένα, έχει μεγαλύτερο αριθμό οκτανίων, ευρύτερα όρια ανάφλεξης, υψηλότερες ταχύτητες φλόγας και αυξημένες θερμοκρασίες εξάτμισης, ενώ είναι λιγότερο τοξική, βιοδιασπώμενη και παράγει λιγότερους ρυπαντές του αέρα που είναι βλαβεροί για την υγεία (CO). Επιπλέον, ως εναλλακτική και ανανεώσιμη πηγή καυσίμου δεν έχει συμπληρωματικές εκπομπές CO_2 , είναι φιλική προς το περιβάλλον και μπορεί να παραχθεί στο σπίτι με χαμηλό κόστος. Η χαρακτηριστική ομάδα $-OH$ που κυριαρχεί στο μόριό της, βοηθά σε αντιδράσεις, όπως η αφυδρογόνωση, η αλογόνωση, ο σχηματισμός εστέρων και η οξείδωση. Τέλος, η βιοαιθανόλη στην καθαρή της μορφή είναι διαλυτή στο νερό, τη βενζίνη, τον αιθέρα, την ακετόνη και άλλους οργανικούς διαλύτες (Azhar et al., 2017; Sutjahjo, 2018).

Μειονεκτήματα

Στα μειονεκτήματα της βιοαιθανόλης περιλαμβάνεται η χαμηλή ενεργειακή πυκνότητα συγκριτικά με την βενζίνη, καθώς η βιοαιθανόλη έχει 66% της ενέργειας της βενζίνης. Επίσης, η βιοαιθανόλη είναι διαβρωτική, έχει χαμηλή φωτεινότητα φλόγας, χαμηλή τάση ατμών (κάνοντας δύσκολη την εκκίνηση σε χαμηλές θερμοκρασίες), ενώ είναι τοξική για τα οικοσυστήματα (Balat et al., 2008).

Το πιο ευρέως γνωστό μείγμα αιθανόλης είναι το E85, το οποίο περιλαμβάνει 85% βιοαιθανόλη και 15% βενζίνη (Balat et al., 2008). Για την παραγωγή βιοαιθανόλης έχει χρησιμοποιηθεί πλήθος πρώτων υλών καθιστώντας την παραγόμενη αιθανόλη πρώτης, δεύτερης και τρίτης γενιάς. Η βιοαιθανόλη πρώτης γενιάς περιλαμβάνει πρώτες ύλες πλούσιες σε σουκρόζη (σακχαρότευτλο, φρούτα, ζαχαροκάλαμο) και άμυλο (καλαμπόκι, σιτάρι, ρύζι, πατάτα), οι οποίες αυτές ύλες είναι στην πραγματικότητα τρόφιμα. Η βιοαιθανόλη δεύτερης γενιάς προέρχεται από λιγνοκυτταρινούχα βιομάζα, όπως ξύλο, άχυρο και χόρτα ή από άλλα αγροτο-βιομηχανικά υποπροϊόντα και απόβλητα. Η βιοαιθανόλη τρίτης γενιάς προέρχεται από βιομάζα άλγης (μικρο- και μακροφύκη) (Sarris & Paranikolaou, 2016; Azhar et al., 2017).

1.1.2. Παγκόσμια παραγωγή βιοαιθανόλης

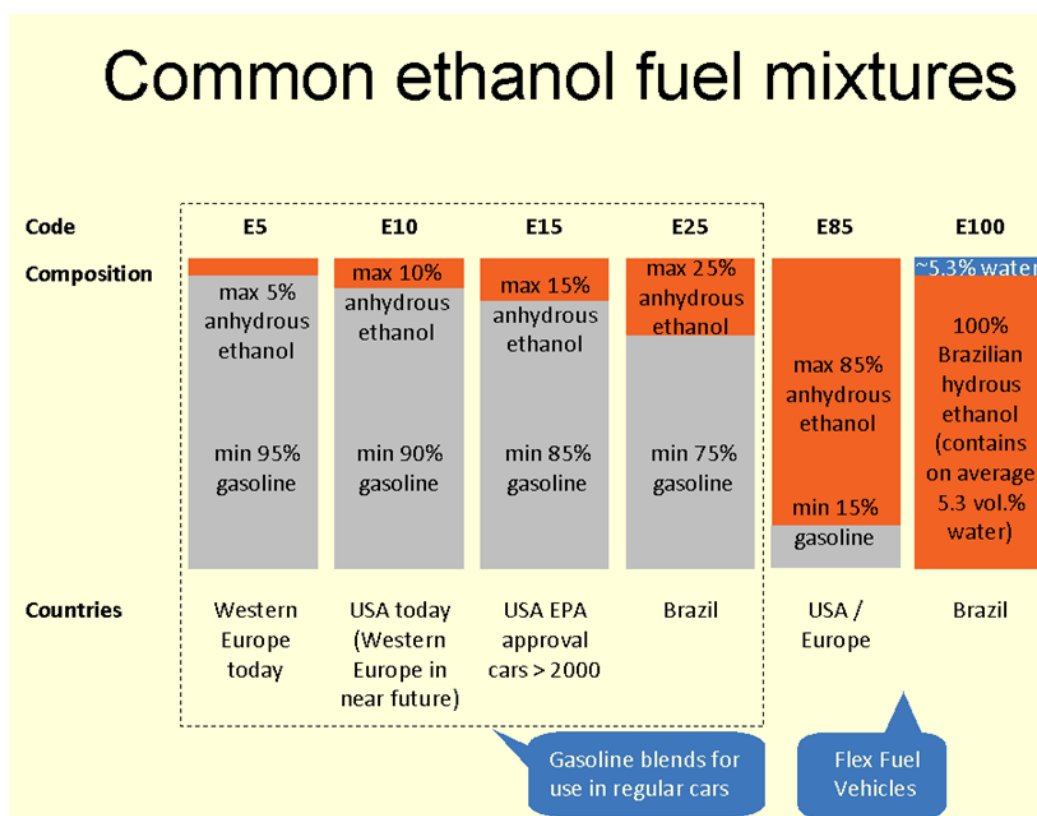
Η αιθανόλη χρησιμοποιείται σαν πρώτη ύλη για μεγάλο εύρος εφαρμογών, όπως τα χημικά, τα καύσιμα (βιοαιθανόλη), τα ποτά, τα φάρμακα και τα καλλυντικά. Η πλειοψηφία (90-95%) της αιθανόλης που παράγεται παγκόσμια προέρχεται από την τεχνολογία των ζυμώσεων (βιοαιθανόλη), ενώ η υπόλοιπη είναι συνθετική και παράγεται από το αιθύνιο, με τη χρήση ατμού και φωσφορικού οξέος ως καταλύτη. Η αντίδραση παραγωγής της συνθετικής αιθανόλης οδηγεί στην παραγωγή τοξικών παραπροϊόντων, γι' αυτό δεν χρησιμοποιείται για ανθρώπινη κατανάλωση. Μετά το τέλος του Β' Παγκοσμίου Πολέμου και οδεύοντας προς τα τέλη της δεκαετίας 1990 – 2000, οι συνθήκες άλλαξαν την οικονομία και έθεσαν νέες προτεραιότητες, οδηγώντας στην κατασκευή εργοστασίων παραγωγής αιθανόλης από κυτταρίνη (ethanol-from-cellulose - EFC) σε χώρες, όπως η Γερμανία, η Ρωσία, η Κίνα και οι Η.Π.Α., λόγω της ανάγκης για εναλλακτικές πηγές καυσίμων (Sarris & Paranikolaou, 2016). Επί του παρόντος, και λαμβάνοντας υπόψη την πολύ μεγάλη αύξηση στην τιμή των διαφόρων εδώδιμων προϊόντων που οφείλεται στην πανδημία, την οικονομική κρίση και τον πόλεμο στην Ανατολική Ευρώπη, η χρήση «νέων» και «εναλλακτικών» υποστρωμάτων (π.χ. αποβλήτων) για την παραγωγή βιοκαυσίμων και άλλων χημικών υλικών είναι πρώτη προτεραιότητα (Vasilakis et al., 2022; Karayannis et al., 2023).

Παγκοσμίως, η αιθανόλη αποτελεί το βιοκαύσιμο με την ευρύτερη χρήση στον τομέα των μετακινήσεων, όπου η αιθανόλη προερχόμενη από καλαμπόκι επικρατεί κυρίως στις Η.Π.Α., ενώ η αιθανόλη από ζαχαροκάλαμο επικρατεί κυρίως στη Βραζιλία. Η αιθανόλη πρώτης γενιάς (προέρχεται κυρίως από τη ζύμωση υδρολυμένων εδώδιμων αμυλούχων υλικών ή εδώδιμων απλών σακχάρων), αλλά κυρίως η βιοαιθανόλη

δεύτερης γενιάς (προέρχεται μέσω της αξιοποίησης ρευμάτων αποβλήτων), αποτελεί μια από τις πλέον υποσχόμενες ανανεώσιμες πηγές ενέργειας, παγκοσμίως (Sarris & Papanikolaou, 2016).

Από την άλλη, παρά την πρόσφατη μεγάλη διάδοσή της, η χρήση της αιθανόλης σαν πηγή ενέργειας είναι γνωστή από το 19^ο αιώνα. Το 1826 χρησιμοποιήθηκε για την πρώτη εσωτερική ανάφλεξη μηχανής στην Αμερική, ενώ τη δεκαετία του 1860 στις Η.Π.Α., χιλιάδες οινοπνευματοποιεία παρήγαγαν τουλάχιστον 90 εκατομμύρια γαλόνια αιθανόλης το χρόνο, τα οποία χρησιμοποιούνταν ως πηγή φωτισής. Παράλληλα, το 1860, η αιθανόλη χρησιμοποιήθηκε στη Γερμανία ως καύσιμο από τον Nikolaus Otto, ενώ τα πρώτα αυτοκίνητα που παράχθηκαν από την εταιρία Ford ήταν δυνατόν να λειτουργούν χρησιμοποιώντας αποκλειστικά αιθανόλη. Ωστόσο, το χαμηλό κόστος της βενζίνης και η ποτοαπαγόρευση στις Η.Π.Α. οδήγησαν στη χρήση εναλλακτικών πηγών καυσίμων, όπως η βενζίνη και η κηροζίνη (Sarris & Papanikolaou, 2016).

Σήμερα, περίπου 820 εκατομμύρια αυτοκίνητα και φορτηγά λειτουργούν με αιθανόλη. Η αιθανόλη μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε προσμίξεις με βενζίνη σε ποσοστό αιθανόλης στο μείγμα από 5 (E5) έως 100% (E100) (Εικόνα 1).



Εικόνα 1. Εμπορικά μίγματα αιθανόλης – βενζίνης χρησιμοποιούμενα σε κινητήρες εσωτερικής καύσης (<https://www.hisour.com/common-ethanol-fuel-mixtures-40963/amp/>).

1.2. Ζύμες

Οι ζύμες, ως μονοκύτταροι μύκητες, είναι ετερότροφοι οργανισμοί, καθώς προσλαμβάνουν άνθρακα ως πηγή ενέργειας μέσω της κατανάλωσης διαφόρων οργανικών υποστρωμάτων. Η αύξηση των ζυμών εξαρτάται κυρίως από τις συνθήκες που επικρατούν στο περιβάλλον ανάπτυξής τους. Πιο συγκεκριμένα, ανάλογα με τις συνθήκες του περιβάλλοντος μέσου, οι συμβατικές ζύμες ως προαιρετικά αναερόβιοι μικροοργανισμοί μπορούν να ακολουθήσουν δύο διαφορετικά μεταβολικά μονοπάτια, της αναπνοής και της αλκοολικής ζύμωσης. Καθοριστικός παράγοντας για το μεταβολικό μονοπάτι που θα ακολουθήσει ο μικροοργανισμός είναι η παρουσία ή μη οξυγόνου στο θρεπτικό μέσο ζύμωσης. Υπό την παρουσία οξυγόνου (αερόβιες συνθήκες), οι ζύμες εκτελούν το φαινόμενο της αναπνοής, το οποίο εκκινεί με τη γλυκόλυση (αναφερόμενοι σε υποστρώματα πλούσια σε γλυκόζη/φρουκτόζη) και καταλήγει στην οξειδωτική φωσφορυλίωση, αποδίδοντας υψηλές συγκεντρώσεις ενέργειας (υπό μορφή ATP) και κατ' επέκταση μικροβιακής βιομάζας. Κάτω από αναερόβιες συνθήκες, οι ζύμες, που δύνανται να εκτελέσουν αλκοολική ζύμωση καταβολίζουν τις διαθέσιμες πηγές άνθρακα, στρέφοντας όμως το μεταβολισμό τους προς τη σύνθεση αιθανόλη (Σουφλερός, 2009).

Συνεπώς, υπό αερόβιες συνθήκες, όπου ο μικροοργανισμός ακολουθεί το μεταβολικό μονοπάτι της αναπνοής, οι ζύμες μπορούν να χρησιμοποιήσουν ως πηγή ενέργειας και άνθρακα διάφορες ενώσεις, όπως σάκχαρα, γλυκερόλη, αμινοξέα κ.α. Όταν απουσιάζει το οξυγόνο και οι ζύμες εκτελούν το μονοπάτι της αλκοολικής ζύμωσης, μπορούν να χρησιμοποιήσουν μόνο συγκεκριμένες εξόζες όπως η D-γλυκόζη, D-μαννόζη, D-φρουκτόζη και ορισμένες τη D-γαλακτόζη. Επιπλέον μπορούν να χρησιμοποιήσουν και δισακχαρίτες, οι οποίοι μετατρέπονται σε μονοσακχαρίτες. Ένας ακόμη σημαντικός παράγοντας για την ανάπτυξη των ζυμών είναι η παρουσία αζώτου στο θρεπτικό μέσο, ώστε οι ζύμες να συνθέσουν αμινοξέα και πρωτεΐνες, βασικά συστατικά της μικροβιακής βιομάζας. Το άζωτο βρίσκεται συνήθως στο υγρό της ζύμωσης με τη μορφή ιόντων αμμωνίου, ενώ οργανικό άζωτο μπορούν να προσλάβουν και από τα διαθέσιμα αμινοξέα και πεπτίδια (Σουφλερός, 2009).

1.2.1. Φαινόμενο Pasteur και φαινόμενο Crabtree

Φαινόμενο Pasteur: Όταν εφαρμόζονται χαμηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης στο μέσο καλλιέργειας, η ζύμη *S. cerevisiae* ή άλλες ζύμες που καταναλώνουν γλυκόζη, χρησιμοποιούν τη γλυκόζη μέσω της αναπνοής ή της ζύμωσης. Η παρουσία οξυγόνου

επάγει την αναπνευστική αλυσίδα και την παραγωγή βιομάζας, ενώ ταυτόχρονα παρεμποδίζει την αλκοολική ζύμωση των σακχάρων και την παραγωγή αιθανόλης. Βιομηχανικώς, αυτές οι συνθήκες χρησιμοποιούνται για την παραγωγή επιλεγμένης ξηρής ζύμης (μαγιά). Στον αντίποδα, οι χαμηλές συγκεντρώσεις οξυγόνου, οδηγούν στην καταβολική καταστολή των πρώτων ενζύμων του κύκλου του Krebs με ταυτόχρονη αύξηση των ενζύμων – κλειδιών της γλυκόλυσης EMP (π.χ. φωσφοφρουκτοκινάση), συντελώντας στην κατεύθυνση του κυτταρικού μεταβολισμού προς την παραγωγή αιθανόλης. Το φαινόμενο αυτό ονομάζεται φαινόμενο Pasteur, ενώ οι ζύμες χαρακτηρίζονται ως θετικές ή αρνητικές στο φαινόμενο Pasteur. Συνεπώς, σύμφωνα με το φαινόμενο αυτό, σε πολλά στελέχη ζυμών, υπάρχει μία καταστολή της αλκοολικής ζύμωσης λόγω της παρουσίας οξυγόνου στο μέσο καλλιέργειας. Όταν ο μικροοργανισμός ξεκινήσει να καταναλώνει σάκχαρα υπό αερόβιες συνθήκες, σε διάφορα στάδια του καταβολισμού εκλύεται διοξείδιο του άνθρακα, το οποίο αν συσσωρευτεί, περιορίζει το διαθέσιμο οξυγόνο, δημιουργώντας μερικώς αναερόβιες συνθήκες, που ευνοούν τις ζυμωτικές διεργασίες (Sarris & Papanikolaou, 2016).

Φαινόμενο Crabtree: Υπό αερόβιες συνθήκες, το οξυγόνο είναι ο τελικός αποδέκτης ηλεκτρονίων κατά την οξειδωτική φωσφορυλίωση, ωστόσο ο μικροοργανισμός *S. cerevisiae* δύναται να εκτελέσει αλκοολική ζύμωση ακόμη και υπό την παρουσία οξυγόνου, όταν στο μέσο ανάπτυξη η συγκέντρωση σακχάρων είναι υψηλή (>5 g/L) και έως ότου να κατέλθει σε χαμηλά επίπεδα. Πιο συγκεκριμένα, σε συνθήκες υψηλής συγκέντρωσης σακχάρων στο μέσο ζύμωσης, τα μιτοχόνδρια εκφυλίζονται, η αναλογία των κυτταρικών στερολών και λιπαρών οξέων μειώνεται και τόσο τα ένζυμα, που συμμετέχουν στο οξειδωτικό μέρος του μεταβολισμού όσο και τα συστατικά της αναπνευστικής αλυσίδας υποβάλλονται σε καταβολική καταστολή. Το μεταβολικό μονοπάτι κατευθύνεται στη σύνθεση της αιθανόλης μέσω της ζυμωτικής μετατροπής, παρά την παρουσία οξυγόνου. Το φαινόμενο ονομάζεται Crabtree με τις ζύμες να χαρακτηρίζονται ως θετικές ή αρνητικές στο φαινόμενο Crabtree. Οι αρνητικές στο φαινόμενο ζύμες δεν παράγουν αιθανόλη, παρά μόνο βιομάζα παρουσία οξυγόνου (Sarris & Papanikolaou, 2016). Παράλληλα, έχει παρατηρηθεί κατανάλωση γλυκόζης μέσω αναπνοής από τον *S. cerevisiae* κάτω από αναερόβιες συνθήκες, αν η συγκέντρωση της γλυκόζης διατηρηθεί σε χαμηλές τιμές π.χ. σε συνθήκες περιορισμού γλυκόζης σε συνεχή καλλιέργεια ή ημισυνεχή καλλιέργεια. Τα κύτταρα του *S. cerevisiae* χρειάζονται οξυγόνο (ειδικά τις πρώτες ώρες μετά τον εμβολιασμό για τη

βιοσύνθεση στερολών, ακόρεστων λιπαρών οξέων και φωσφολιπιδίων, που χρειάζονται για το σχηματισμό κυτταρικών μεμβρανών και συνεπώς την ανάπτυξη και πολλαπλασιασμό του κυττάρου. Ο *S. cerevisiae* μπορεί συνεπώς να χρησιμοποιήσει την αναπνοή όταν η συγκέντρωση των σακχάρων είναι πολύ χαμηλή παρά την απουσία οξυγόνου στο θρεπτικό μέσο (Dashko et al., 2014).

1.2.2. Χαρακτηριστικά ζυμών

- *Saccharomyces cerevisiae*

. Ο *S. Cerevisiae* είναι μονοκύτταρος μύκητας, που αναπαράγεται με πολυμερή εκβλάστηση και σεξουαλικά μέσω ασκοσπορίων. Πρόκειται για το πλέον αξιοποιήσιμο βιοτεχνολογικά, καθώς χρησιμοποιείται εδώ και πολλά χρόνια στην ζυθοποιία, την οινοποίηση, την παραγωγή αποσταγμάτων ή βιοκαυσμίων, και την παρασκευή ψωμιού, καθώς και ως εκχύλισμα ζύμης για τρόφιμα, ως ενισχυτής γεύσης, αλλά και για θεραπευτικούς σκοπούς (Stewart, 2014). Ο μικροοργανισμός μπορεί να αφομοιώσει σάκχαρα, που ανήκουν στην κατηγορία των εξοζών, όπως D-γλυκόζη, D-φρουκτόζη και D-μαννόζη. Ο υψηλότερος ρυθμός ζύμωσης έχει παρατηρηθεί σε υποστρώματα με κύρια πηγή άνθρακα τη D-γλυκόζη. Εναλλακτικά, έχει αξιοποιηθεί σουκρόζη, μαλτόζη, μαλτοτριόζη και D-γαλακτόζη, ενώ οι δεξτρίνες και το άμυλο μπορούν να καταναλωθούν μόνο από εξειδικευμένες ποικιλίες του *S. cerevisiae*. Το συγκεκριμένο είδος αυτό δεν μπορεί να καταναλώσει λακτόζη, L-σάκχαρα και πεντόζες, εκτός από την ξυλουλόζη, που είναι αφομοιώσιμη. Παράλληλα, τα στελέχη του *S. cerevisiae* διαφέρουν σχετικά με την ικανότητα χρήσης των πηγών αζώτου. Πολλά άλατα ανόργανου αζώτου φαίνεται ότι προωθούν την ανάπτυξη, ενώ τα στελέχη παρουσιάζουν διαφορετικές δυνατότητες αξιοποίησης των ελεύθερων αμινοξέων. Τα νιτρικά και τα L-αμινοξέα (π.χ. L-προλίνη) συνήθως δεν αφομοιώνονται. Αντίθετα, κάποια συγκεκριμένα στελέχη της ζύμης μπορούν να χρησιμοποιήσουν την ουρία ως πηγή αζώτου.

Λόγω της παρουσίας και επιβίωσής τους στα τρόφιμα και τα ποτά, το πιο ιδιαίτερο χαρακτηριστικό του γένους *Saccharomyces* α είναι η ανθεκτικότητα σε υψηλές συγκεντρώσεις αιθανόλης. Η ανθεκτικότητα στην αιθανόλη μπορεί να ποικίλει μεταξύ των στελεχών, αλλά γενικά τα περισσότερα στελέχη μπορούν να αναπτυχθούν σε υποστρώματα, που περιέχουν 8 – 12% v/v αιθανόλη ($\approx 80-120$ g/L), ενώ επιβιώνουν ακόμη και σε περιεκτικότητα 15% σε αιθανόλη. Οι φυσιολογικές ζυμώσεις με υπόστρωμα γλυκόζης μπορεί να αποδώσουν συγκεντρώσεις γλυκόζης περίπου στο

12% με βέλτιστη θερμοκρασία μεταξύ 25 και 35 °C. Κατά τη διάρκεια ζυμώσεων για παραγωγή αιθανόλης, η εφαρμογή θερμοκρασιών 5-10 °C πέραν των βέλτιστων, οδηγούν σε μείωση της βιομάζας και αύξηση της παραγωγικότητας της αιθανόλης. Η αλκοολική ζύμωση ενισχύεται περαιτέρω από την ικανότητα της θεαματικά γρήγορης ανάπτυξης της ζύμης κάτω από αναερόβιες συνθήκες, οδηγώντας σε υψηλούς ρυθμούς αλκοολικής ζύμωσης. Ωστόσο, το οξυγόνο είναι πολύ σημαντικό συστατικό για όλες τις ζύμες και παρά την ικανότητα του *Saccharomyces cerevisiae* να αναπτύσσεται σε μικροαερόφιλες συνθήκες, το οξυγόνο είναι σημαντικό για την διατήρηση και την ανάπτυξη των κυττάρων. Τέλος, το βέλτιστο pH για τον *Saccharomyces cerevisiae* βρίσκεται μεταξύ των τιμών 4,5 και 6,5 με τα στελέχη να παρουσιάζουν αξιοσημείωτη ανθεκτικότητα στο pH και να μπορούν να αναπτυχθούν ακόμη και σε πολύ όξινες συνθήκες (Stewart, 2014).

- *Kluyveromyces marxianus*

Το είδος *K. marxianus* υπάγεται στις μη συμβατικές ζύμες και περιγράφεται ως ένας ομοθαλλικός, ημιασκομυκητώδης μικροοργανισμός, ο οποίος συνδέεται φυλογενετικά με τον *S. cerevisiae* και με το είδος *Kluyveromyces lactis*. Το μεγαλύτερο κοινό στοιχείο μεταξύ του *K. lactis* και του *K. marxianus* είναι η ικανότητά τους να αφομοιώνουν τη λακτόζη και να τη χρησιμοποιούν ως πηγή άνθρακα. Αυτό το χαρακτηριστικό, το οποίο απουσιάζει από το μικροοργανισμό *S. cerevisiae*, οδηγεί στη συχνή απομόνωση των στελεχών του *Kluyveromyces* από γαλακτοκομικά προϊόντα, όπως κεφίρ, αριάνι, γιαούρτι ή τυρί. Ο μικροοργανισμός θεωρείται GRAS (Generally Regarded As Safe) και QPS (Qualified Presumption of Safety και χρησιμοποιείται ευρέως στη βιομηχανία, κυρίως λόγω των χαρακτηριστικών του που είναι επιθυμητά στις βιοτεχνολογικές εφαρμογές και περιλαμβάνουν την ικανότητα αφομοίωσης σακχάρων, κυρίως λακτόζης και ινουλίνης, τον εξαιρετικά ταχύ ρυθμό ανάπτυξης, την θερμοανθεκτικότητα, με ικανότητα ανάπτυξης μέχρι και σε θερμοκρασία ίση με 52 °C, καθώς και την υψηλή παραγωγικότητα (Lane & Morrissey, 2010). Ο *K. marxianus* είναι προαιρετικά αναερόβιος, οπότε προτιμά να αναπτύσσεται μέσω ζυμωτικών διεργασιών, αλλά δύναται να αναπτυχθεί και υπό οξειδωτικές συνθήκες. Στην περίπτωση ανοξικού περιβάλλοντος, διαθέτει το γενετικό υπόβαθρο για την παραγωγή αιθανόλης μέσω αλκοολικής ζύμωσης. Στην περίπτωση αερόβιων καλλιέργειών, υπάρχει σύγχυση στην ερευνητική κοινότητα, σχετικά με το αν το είδος αυτό είναι θετικό ή αρνητικό στο φαινόμενο Crabtree. Γενικά, θα μπορούσε να ειπωθεί ότι οι

ζύμες *Kluyveromyces* sp. είναι Crabtree αρνητικές και μπορούν να οδηγήσουν το μεταβολισμό τους προς τον κύκλο του Krebs με στόχο την βέλτιστη παραγωγή ενέργειας. Έτσι, ο μικροοργανισμός μπορεί να εκτελέσει τόσο αναπνοή, όσο και ζύμωση ισορροπώντας μεταξύ των δύο μονοπατιών (Lane & Morrissey, 2010).

- *Pichia* sp.

Οι ζύμες, που ανήκουν στο γένος της *Pichia* sp., έχουν σφαιρικό ή ωοειδές σχήμα, ενώ περιστασιακά μπορεί να εμφανίζονται υπό μορφή ψευδοφών. Τα είδη του γένους αυτού εμφανίζουν πολυμερείς οφθαλμούς για αγενή αναπαραγωγή, ενώ η εγγενής χαρακτηρίζεται από μη συζευγμένο ασκό. Η σύνδεση γίνεται μεταξύ του γονικού κυττάρου και του οφθαλμού του ή μεταξύ ανεξάρτητων κυττάρων. Η *Pichia* μπορεί να εκτελέσει ζύμωση με υπόστρωμα γλυκόζης αλλά δυσκολεύεται στη ζύμωση άλλων σακχάρων. Επιπλέον, δεν μπορεί να αφομοιώσει νιτρικά άλατα ως πηγή αζώτου. Ορισμένα είδη *Pichia* που χρησιμοποιούνται ευρέως τον τομέα της βιοτεχνολογίας και των τροφίμων είναι η *Pichia kluyveri*, *Pichia fermentans*, *Pichia guilliermondi* και *Pichia anomala* (Vicente et al., 2021).

Όσον αφορά τη ζύμη *P. kluyveri*, τα κύτταρα είναι ελαφρώς ωοειδή και είναι πολύ δύσκολο να ξεχωρίσει η μορφή τους σε σχέση με τη μορφή των κυττάρων του *S. cerevisiae* ή του *S. ellipsoideus*. Ωστόσο, η ιδιότητα της ζύμης να σχηματίζει ένα φιλμ κατά την ανάπτυξή της στο υγρό ζύμωσης είναι πολύ χαρακτηριστική και επιτρέπει στην εύκολη διάκριση του είδους μεταξύ άλλων ζυμών. Η ζύμη *P. kluyveri* καταναλώνει μόνο γλυκόζη και αναπτύσσεται σε υγρό μέσο που περιέχει γλυκόζη, αιθανόλη ή γλυκερόλη. Όπως και άλλα είδη *Pichia*, η ζύμη είναι ανθεκτική στην υψηλή οσμωτική πίεση, εμφανίζοντας βέλτιστη ανάπτυξη σε 10% NaCl ή 5% γλυκόζη. Έχει απομονωθεί από φρούτα και πράσινα μέρη φυτών και έχει εξαπλωθεί σε όλα τα είδη οικοσυστημάτων. Η ζύμη μπορεί να παράγει έως 4-5% v/v αιθανόλη, καταναλώνοντας μόνο γλυκόζη και απορρίπτοντας τη φρουκτόζη. Η απόδοση της αιθανόλης της *P. kluyveri* είναι 22% χαμηλότερη από αυτή του *S. cerevisiae*, παράγοντας 0,36 g αιθανόλης ανά γραμμάριο σακχάρου (Vicente et al., 2021).

Το στέλεχος *Pichia fermentans* έχει περιγραφεί ως ένας μέτριος παραγωγός αιθανόλης, φτάνοντας συγκεντρώσεις περί το 5% v/v, παράγοντας μεγάλες ποσότητες πολυσακχαριτών (άνω των 278 g/L) και οξικού αιθυλεστέρα (Vicente et al., 2021). Όσον αφορά το είδος *Pichia anomala*, αυτό έχει απομονωθεί από διάφορα περιβάλλοντα, τόσο ανθρωπογενή, όσο και φυσικά. Συνήθως απαντάται σε ζυμούμενα

ποτά και τρόφιμα και μπορεί να αναπτυχθεί κάτω από ακραίες περιβαλλοντικές συνθήκες στρες, όπως χαμηλό και υψηλό pH, χαμηλή ενεργότητα νερού, υψηλή ωσμωτική πίεση και αναερόβιες συνθήκες. Παρά την ανθεκτικότητά της σε μεγάλο εύρος pH και σε υψηλή ωσμωτική πίεση, η *P. anomala* δεν είναι τόσο ανθεκτική στην αιθανόλη και στο οξικό. Η ζύμη είναι Crabtree-αρνητική και η ανάπτυξή της παρεμποδίζεται από την απουσία οξυγόνου, ενώ κάτω από αερόβιες συνθήκες, παράγονται μικρές ποσότητες αιθανόλης ή γλυκερόλης (Passoth et al., 2006).

1.2.3. Παραγωγή βιοαιθανόλης από ζύμες

Μικροοργανισμοί, όπως οι ζύμες, θεωρούνται από τους πλέον σημαντικούς παραγωγούς βιοαιθανόλης μέσω της αξιοποίησης διαφόρων σακχάρων. Οι ζύμες χρησιμοποιούνται σε βιομηχανική κλίμακα λόγω των πολύ υψηλών αποδόσεων αιθανόλης, που παράγεται κατά τη ζύμωση (>90% της θεωρητικής απόδοσης), λόγω της ανθεκτικότητάς τους στην αιθανόλη (>40 g/L), λόγω της υψηλής παραγωγικότητας (>1,0 g/L/h), καθώς και λόγω της ανάπτυξής τους σε απλά, φθηνά υποστρώματα με ανθεκτικότητα σε αναστολείς και σε επιβραδυντικές μολύνσεις κατά τη φάση ανάπτυξης (Dien et al., 2003).

Εδώ και χιλιάδες χρόνια, οι ζύμες και ιδίως ο *S. cerevisiae* χρησιμοποιούνται για την παραγωγή αιθανόλης και πιο συγκεκριμένα στην ζυθοποιία και τη βιομηχανία της οινοποίησης. Η χρήση ζυμών διατηρεί τα κόστη της απόσταξης χαμηλά, καθώς αποδίδει υψηλές αποδόσεις αιθανόλης, υψηλή παραγωγικότητα, ενώ μπορούν να αναπτυχθούν ακόμη και υπό πολύ υψηλές συγκεντρώσεις αιθανόλης στο υγρό ζύμωσης (Kasavi et al., 2012). Σήμερα, οι ζύμες χρησιμοποιούνται για την παραγωγή καύσιμης αιθανόλης ως ανανεώσιμη πηγή ενέργειας από αειφόρες πρώτες ύλες. Συγκεκριμένα στελέχη ζύμης, που θεωρούνται ιδανικά για την παραγωγή αιθανόλης από διάφορα σάκχαρα, είναι η *Pichia stipitis* NRRL-Y-7124, ο *S. cerevisiae* RL-11, ο *Kluyveromyces fragilis* Kf1, ο *S. cerevisiae* LMBF Y-54, ο *S. cerevisiae* DBVPG 1014, ο *S. cerevisiae* Passion Fruit κ.α. (Azhar et al., 2017; Basa et al 2022). Οι κροκιδώδεις ζύμες, οι οποίες ανήκουν στην κατηγορία των ζυμών ζυθοποίησης (π.χ. *Saccharomyces cerevisiae* και *Saccharomyces Carlsbergensis*), χρησιμοποιούνται, επίσης, για παραγωγή αιθανόλης, καθώς διευκολύνουν τη διαδικασία επιτρέποντας τη ζύμωση με υψηλή συγκέντρωση κυττάρων και αποδίνοντας γενικότερα υψηλότερη παραγωγικότητα. Επιπλέον, μειώνεται το κόστος ανάκτησης των κυττάρων, καθώς

διαχωρίζονται εύκολα από το μέσο της ζύμωσης χωρίς φυγοκέντρηση (Jin & Speers, 1998).

1.2.4. Παράγοντες που επηρεάζουν την παραγωγή βιοαιθανόλης

Υπάρχουν διάφοροι παράγοντες, που επηρεάζουν την παραγωγή βιοαιθανόλης, συμπεριλαμβανομένης της θερμοκρασίας, της συγκέντρωσης των σακχάρων και του ίδιου του μεταβολίτη, του pH, του χρόνου ζύμωσης, του ρυθμού ανάδευσης και της συγκέντρωσης του εμβολίου. Ο ρυθμός ανάπτυξης των μικροοργανισμών επηρεάζεται άμεσα από τη θερμοκρασία. Έτσι, η υψηλή θερμοκρασία, η οποία είναι μη ευνοϊκή για την κυτταρική ανάπτυξη, γίνεται στρεσογόνος παράγοντας για τους μικροοργανισμούς. Το ιδανικό εύρος θερμοκρασίας για την ζύμωση κυμαίνεται μεταξύ 20 και 35 °C. Τα ελεύθερα κύτταρα του *S. cerevisiae* έχουν βέλτιστη θερμοκρασία κοντά στους 30 °C, ενώ τα ακινητοποιημένα κύτταρα έχουν ελαφρώς υψηλότερη βέλτιστη θερμοκρασία λόγω της ικανότητάς τους να μεταφέρουν θερμότητα από την επιφάνεια των σωματιδίων στο εσωτερικό του κυττάρου. Επιπλέον, τα ένζυμα που ρυθμίζουν τη λειτουργία των μικροοργανισμών και την διαδικασία της ζύμωσης είναι ευαίσθητα σε υψηλές θερμοκρασίες, γεγονός που μπορεί να καταστρέψει την τεταρτοταγή δομή τους και κατά συνέπεια να τα απενεργοποιήσει. Συνεπώς, η θερμοκρασία θα πρέπει να ρυθμίζεται προσεκτικά κατά τη διάρκεια τις διαδικασίας της ζύμωσης (Zabed et al., 2014).

Η αύξηση της συγκέντρωσης των σακχάρων σε ένα συγκεκριμένο επίπεδο μπορεί να προκαλέσει την αύξηση του ρυθμού της ζύμωσης, με την αρχική συγκέντρωση να θεωρείται κρίσιμος παράγοντας στην παραγωγή αιθανόλης. Η υψηλή παραγωγικότητα και απόδοση αιθανόλης σε ζύμωση κλειστού τύπου μπορεί να επιτευχθεί με τη χρήση υψηλότερων αρχικών συγκεντρώσεων σακχάρων, αυξάνοντας όμως το χρόνο ζύμωσης και το κόστος ανάκτησης (Zabed et al., 2014).

Η ανάπτυξη του μικροοργανισμού και κατ' επέκταση η παραγωγή του μεταβολίτη επηρεάζεται, επίσης, από το pH της ζύμωσης, καθώς περιορίζει πιθανές βακτηριακές επιμολύνσεις, ελέγχει την κυτταρική ανάπτυξη, το ρυθμό ζύμωσης και τον σχηματισμό παραπροϊόντων (Zabed et al., 2014). Η επιβίωση και ανάπτυξη των ζυμών επιβραδύνεται μερικώς σε χαμηλές τιμές pH (2,75–4,25). Για τη ζύμωση προς παραγωγή αιθανόλης, το βέλτιστο εύρος pH για τον *S. cerevisiae* είναι μεταξύ των τιμών 4–5. Όταν το pH είναι κάτω από 4 απαιτείται μεγαλύτερος χρόνος επώασης των

μικροοργανισμών χωρίς να μειώνεται η τελική συγκέντρωση της αιθανόλης. Ωστόσο, όταν το pH της ζύμωσης διατηρείται σε τιμές άνω του 5, η συγκέντρωση της αιθανόλης μειώθηκε αισθητά (Staniszewski et al., 2007).

Ένας ακόμη παράγοντας που επηρεάζει την ανάπτυξη των μικροοργανισμών είναι η διάρκεια της ζύμωσης. Όταν η διάρκεια είναι μικρή, έχουμε ανεπαρκή ανάπτυξη των μικροοργανισμών, ενώ παρατεταμένες ζυμώσεις μπορεί να έχουν τοξικές συνέπειες για τους μικροοργανισμούς, ειδικά στην περίπτωση κλειστού τύπου καλλιέργειών, όπου υπάρχει υψηλή συγκέντρωση αιθανόλης στο υγρό της καλλιέργειας. Μια ολοκληρωμένη ζύμωση μπορεί να επιτευχθεί ακόμη και σε χαμηλότερη της βέλτιστης θερμοκρασία για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα ζύμωσης, που θα οδηγήσει σε χαμηλότερη απόδοση αιθανόλης, χωρίς να κινδυνέψει ο μικροοργανισμός (Zabed et al., 2014).

Ο ρυθμός ανάδευσης καθορίζει την μεταφορά των θρεπτικών στοιχείων από το υγρό ζύμωσης στο εσωτερικό των κυττάρων και την απομάκρυνση της αιθανόλης από το μικροβιακό κύτταρο στο υγρό ζύμωσης. Όσο μεγαλύτερη είναι η ανάδευση, τόσο υψηλότερη είναι η ποσότητα αιθανόλης που παράγεται. Παράλληλα, αυξάνεται η αφομοίωση των σακχάρων και μειώνεται η παρεμπόδιση της αιθανόλης στα κύτταρα. Ο τυπικός ρυθμός ανάδευσης για τη ζύμωση με κύτταρα ζύμης είναι μεταξύ 150 – 200 rpm. Ο υπερβολικά υψηλός ρυθμός ανάδευσης δεν είναι κατάλληλος για ήπια παραγωγή αιθανόλης, καθώς προκαλεί περιορισμό στις μεταβολικές διεργασίες των κυττάρων (Zabed et al., 2014).

Η συγκέντρωση του εμβολίου δεν αποτελεί σημαντικό παράγοντα της ζύμωσης και δεν επηρεάζει την τελική συγκέντρωση της αιθανόλης, ωστόσο επηρεάζει το ρυθμό κατανάλωσης των σακχάρων και την παραγωγικότητα της αιθανόλης. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι η αύξηση της συγκέντρωσης των κυττάρων μειώνει το χρόνο ζύμωσης καθώς τα κύτταρα αυξάνονται γρήγορα και καταναλώνουν άμεσα σάκχαρα μετατρέποντάς τα σε αιθανόλη. Πράγματι, η παραγωγή αιθανόλης αυξήθηκε με την αύξηση του αριθμού των κυττάρων από 1×10^4 σε 1×10^7 κύτταρα ανά mL, όμως δεν παρατηρήθηκε σημαντική παραγωγή αιθανόλης, όταν ο πληθυσμός ανήλθε από 10^7 σε 10^8 κύτταρα/mL (Zabed et al., 2014).

Μεταξύ των προαναφερθέντων, οι πιο κοινοί παράγοντες που μπορεί να επηρεάσουν την ανάπτυξη των ζυμών είναι η αύξηση της θερμοκρασίας (σε τιμές άνω των 38 °C

συγκεκριμένα για τον *S. cerevisiae*) και η αύξηση της συγκέντρωσης της αιθανόλης (πάνω από 15%). Ο ρυθμός ανάπτυξης των ζυμών και ο μεταβολισμός τους αυξάνεται καθώς αυξάνεται η θερμοκρασία μέχρι εκείνη να φτάσει μια βέλτιστη τιμή. Από την άλλη, η αύξηση της συγκέντρωσης αιθανόλης κατά τη διάρκεια της ζύμωσης εξυπηρετεί στην αποφυγή επιμολύνσεων, όμως μπορεί να προκαλέσει παρεμπόδιση στην ανάπτυξη της ίδιας της ζύμης και στη βιωσιμότητά της (Attfield, 1997). Μία ακόμη πρόκληση κατά την ζύμωση, είναι η ικανότητα της ζύμης να αφομοιώσει τις πεντόζες, κύρια μονομερή της ημι-κυτταρίνης. Ο *S. cerevisiae* μπορεί να ζυμώσει μόνο εξόζες και όχι πεντόζες. Μερικές μόνο ζύμες, που ανήκουν στα γένη *Pichia*, *Candida* και *Schizosaccharomyces* είναι ικανές να βιομετατρέπουν πεντόζες σε αιθανόλη (Kumar et al., 2009).

Γενικά η αποδοτικότητα της παραγωγής αιθανόλης σε βιομηχανική κλίμακα δύναται να αυξηθεί με τη χρήση στελεχών, που ξεπερνούν τις προαναφερθείσες παρεμποδίσεις. Στελέχη, που αντέχουν το στρες θερμοκρασίας μπορούν να απομονωθούν από περιβάλλοντα υψηλών θερμοκρασιών, ενώ η ανθεκτικότητα στις υψηλές συγκεντρώσεις αιθανόλης μπορεί να βελτιωθεί μέσω πρωτοκόλλων προσαρμοστικής εργαστηριακή εξέλιξης (Mavrommati et al., 2021). Η ζύμη *K. marxianus* είναι μια θερμοανθεκτική ζύμη, η οποία μπορεί να αφομοιώσει εξόζες και πεντόζες, ενώ αναπτύσσεται ακόμη και σε θερμοκρασίες 42-45 °C (Azhar et al., 2017).

Συνοψίζοντας, η ζύμωση για παραγωγή αιθανόλης μέσω ζυμών εξαρτάται από διάφορους παράγοντες, οι οποίοι ποικίλουν ανάλογα με το στέλεχος της ζύμης. Οι περισσότερες ζυμώσεις με το στέλεχος *S. cerevisiae* γίνονται στους 30 °C, ενώ οι ζυμώσεις με τον *K. marxianus* γίνονται στους 42 °C. Η ιδανική θερμοκρασία για την παραγωγή αιθανόλης εξαρτάται από την ιδανική θερμοκρασία ανάπτυξης των μικροοργανισμών. Ανάλογα το μικροβιακό στέλεχος, θα καθοριστούν και οι κύριες πηγές άνθρακα (εξόζες ή/και πεντόζες). Όσον αφορά το pH, στην πλειονότητα των αλκοολικών ζυμώσεων έχει τιμή μεταξύ 4,5-5,5. Η διαδικασία της ζύμωσης συνήθως πραγματοποιείται σε ρυθμούς ανάδευσης περί τις 120-150 rpm, με την ποσότητα εμβολίου για παραγωγή αιθανόλης είναι 5-10% του όγκου ζύμωσης (Azhar et al., 2017). Οι Zhang et al. (2011) σημείωσαν την υψηλότερη συγκέντρωση αιθανόλης στη βιβλιογραφία (128,5 g/L) με παραγωγικότητα ίση με 4,76 g/L/h.

1.3. Βιοχημικά μονοπάτια παραγωγής βιοαιθανόλης

Η αλκοολική ζύμωση, αποτελεί την αναερόβια μετατροπή των σακχάρων, κυρίως της γλυκόζης και της φρουκτόζης, σε αιθανόλη και διοξείδιο του άνθρακα. Αυτή η διαδικασία που πραγματοποιείται από ζύμες, καθώς και από κάποια βακτήρια, όπως το είδος *Zymomonas mobilis*, μπορεί να συνοψιστεί στην παρακάτω αντίδραση.



Ωστόσο, η αλκοολική ζύμωση είναι μία πολύ πιο σύνθετη διαδικασία, καθώς παράλληλα με την παραπάνω αντίδραση, λαμβάνουν χώρα αρκετές βιοχημικές, χημικές και φυσικοχημικές διαδικασίες που οδηγούν στην μετατροπή των σακχάρων σε αιθανόλη. Εκτός από την αιθανόλη, παράγονται και άλλες ενώσεις κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης, όπως ανώτερες αλκοόλες (1-προπανόλη, ισοπροπυλική αλκοόλη, 1-εξανόλη, ισοβουτανόλη), εστέρες, γλυκερόλη, ηλεκτρικό οξύ, διακετύλιο, ακετοΐνη και 2,3- βουτανεδιόλη. Ο *Saccharomyces cerevisiae* είναι η επικρατέστερη ζύμη όσον αφορά την αλκοολική ζύμωση, κυρίως λόγω της μεγάλης ανθεκτικότητάς της σε υψηλές συγκεντρώσεις αιθανόλης. Άλλες ζύμες όπως οι ανήκοντες στα γένη *Torulaspora* sp., *Kluyveromyces* sp., *Schizosaccharomyces* sp., *Zygosaccharomyces* sp. και *Brettanomyces* sp. μπορεί να είναι, επίσης, παρούσες κατά την αλκοολική ζύμωση (Zamora, 2009).

Η βιοχημεία της αλκοολικής ζύμωσης περιλαμβάνει μονοπάτια αποικοδόμησης του υποστρώματος, όπως γλυκόλυση, αλκοολική ζύμωση, γλυκεροπυροσταφυλική ζύμωση και αναπνοή στην περίπτωση χρήσης των εξοζών, καταβολικά μονοπάτια ξυλόζης στην περίπτωση της χρήσης των πεντοζών και αφομοίωση της γλυκερόλης και γλυκόλυση για την περίπτωση μικροοργανισμών ικανών να μετατρέπουν τη γλυκερόλη. Επιπλέον, περιλαμβάνει τη ρύθμιση μεταξύ ζύμωσης και αναπνοής μέσω των φαινομένων Crabtree, Pasteur, Kluyver και Custers. Η γλυκόλυση Embden-Meyerhoff-Parnas (Εικόνα 2) πραγματοποιείται στην περίπτωση του *S. cerevisiae* και των μικροοργανισμών που καταναλώνουν γλυκερόλη, η γλυκόλυση των φωσφορικών πεντοζών πραγματοποιείται στην περίπτωση μικροοργανισμών που καταναλώνουν γλυκόζη και το μονοπάτι Entner-Dudoroff για τα βακτήρια *Zymomonas mobilis* (Sarris & Papanikolaou, 2016).

1.3.1. Γλυκόλυση

Η έννοια της γλυκόλυσης αποτελεί τη διαδικασία της ενδοκυτταρικής μετατροπής της γλυκόζης (και της φρουκτόζης) σε πυροσταφυλικό. Με αυτό το βιοχημικό μονοπάτι εκκινεί η διαδικασία καταβολισμού των υδατανθράκων των περισσότερων οργανισμών και πραγματοποιείται εξολοκλήρου στο κυτταρόπλασμα. Το πλήρες μονοπάτι περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1940 λόγω της μεγάλης συμβολής των Gustav Embden και Otto Meyerhof και γι' αυτό το λόγο ονομάζεται μονοπάτι Embden-Meyerhoff προς τιμήν τους. Ωστόσο, στην περιγραφή του μονοπατιού συνέβαλαν και άλλοι επιστήμονες όπως οι Gerti και Karl Cori, Carl Neuberg, Jacob Parnas, Hans von Euler και Otto Warburg (Kresge et al., 2005).

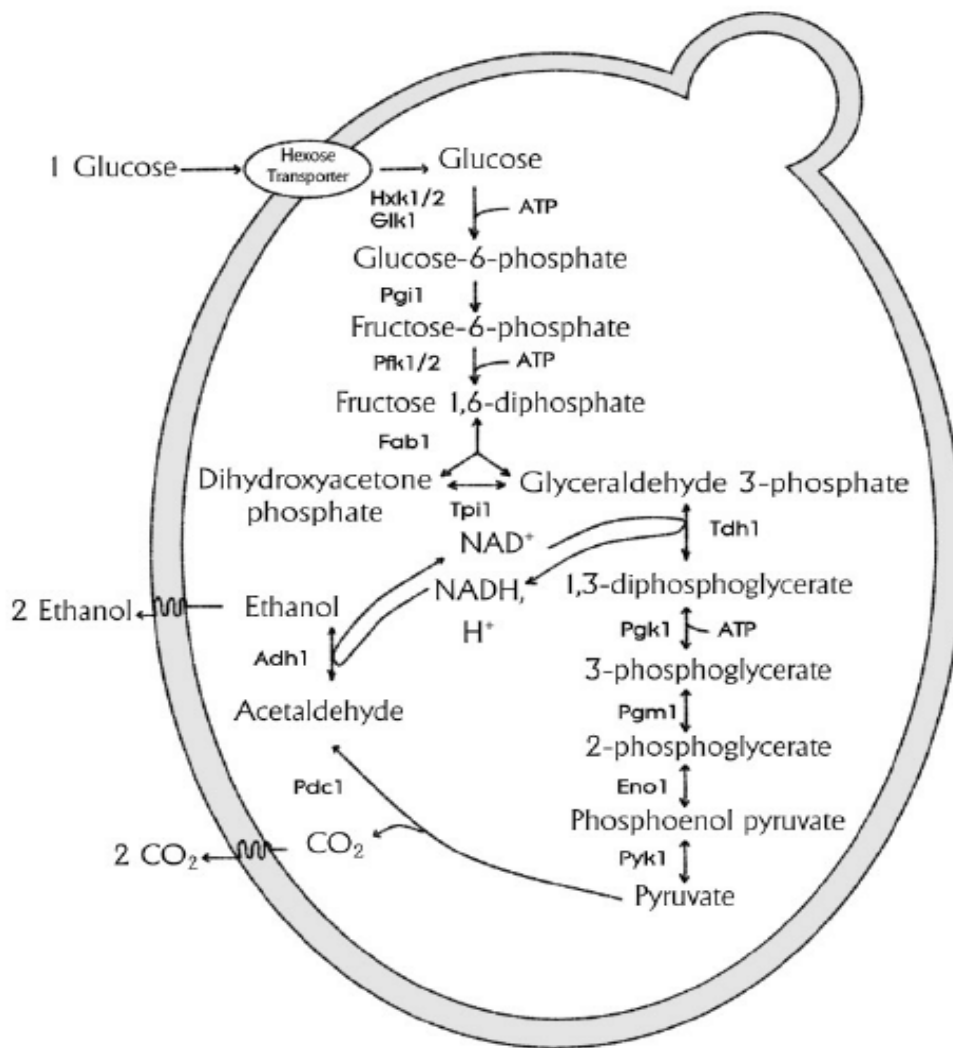
Οι ζύμες χρησιμοποιούν τη γλυκόλυση ως το κύριο μονοπάτι καταβολισμού της γλυκόζης, ενώ το μονοπάτι των φωσφορικών πεντοζών, που χρησιμοποιείται από κάποιους οργανισμούς, όπως τα οξικά βακτήρια, ως βασικό μονοπάτι καταβολισμού σακχάρων, χρησιμοποιείται από τις ζύμες μόνο ως πηγή ριβόζης και NADPH. Η ριβόζη είναι απαραίτητη για τη σύνθεση νουκλεοτιδίων, ενώ το NADPH είναι απαραίτητο ιδίως στη βιοσύνθεση λιπιδίων. Έτσι, οι ζύμες δεν χρησιμοποιούν το μονοπάτι των πεντοζών ως παροχή ενέργειας, αλλά για την παροχή ορισμένων πολύ σημαντικών ενώσεων για τον πολλαπλασιασμό του κυττάρου.

Η γλυκόλυση περιλαμβάνει μία αλληλουχία από 11 χημικές αντιδράσεις, κατά τις οποίες αποικοδομούνται εξόζες και παράγεται ενέργεια υπό τη μορφή του χημικού μορίου ATP. Αρχικά, οι εξόζες μεταφέρονται εντός του κυττάρου μέσω υποβοηθούμενης διάχυσης και καθώς η εσωτερική συγκέντρωση σακχάρων του κυττάρου είναι μικρότερη από την εξωτερική συγκέντρωση, δεν απαιτείται καθόλου ενέργεια για τη διαδικασία αυτή. Το πρώτο βήμα της γλυκόλυσης είναι η φωσφορυλίωση της γλυκόζης και της φρουκτόζης από μία ομάδα ενζύμων που ονομάζονται εξοκινάσες, δημιουργώντας την 6-φωσφορική γλυκόζη και 6-φωσφορική φρουκτόζη. Αυτή η αντίδραση καταναλώνει ένα ATP, αλλά διατηρεί την ενδοκυτταρική συγκέντρωση των σακχάρων χαμηλή, ώστε να ευνοήσει τη συνεχή μεταφορά σακχάρων στο κύτταρο. Στη συνέχεια η ισομεράση της φωσφογλυκόζης μετατρέπει την 6-φωσφορική γλυκόζη σε 6-φωσφορική φρουκτόζη. Οι δύο ενδιάμεσες ενώσεις, είναι σημαντικά υποστρώματα του δευτερογενούς μεταβολισμού και χρειάζονται για την σύνθεση πολυσακχαριτών για την δημιουργία του κυτταρικού τοιχώματος. Η επόμενη αντίδραση περιλαμβάνει τη φωσφορυλίωση της 6-φωσφορικής

φρουκτόζης από το ένζυμο φωσφοφρουκτοκινάση για την παραγωγή 1,6-διφωσφορικής φρουκτόζης. Αυτή η αντίδραση καταναλώνει ακόμη ένα μόριο ATP (Zamora, 2009; Sarris & Papanikolaou, 2016).

Ύστερα, το ένζυμο αλδολάση διασπά το μόριο της 1,6-διφωσφορικής φρουκτόζης με αποτέλεσμα τη σύνθεση δύο φωσφορικών τριοζών (3C), της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεΐδης και της διυδροξυακετόνης. Αυτή η αντίδραση οδηγεί σε πολύ μεγαλύτερο ποσοστό φωσφορικής διυδροξυακετόνης (96%), η οποία γρήγορα μετατρέπεται σε 3-φωσφορική γλυκεραλδεΐδη από την ισομεράση των φωσφορικών τριοζών. Στη συνέχεια, το ένζυμο αφυδρογονάση της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεΐδης καταλύει την αντίδραση μετατροπής της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεΐδης σε 1,3-διφωσφογλυκερικό. Η αντίδραση αυτή περιλαμβάνει την οξείδωση του μορίου που συνδέεται με την αναγωγή του NAD^+ σε NADH για την εξισορρόπηση του φορτίου. Ταυτόχρονα, πραγματοποιείται μία φωσφορυλίωση σε επίπεδο υποστρώματος, δημιουργώντας έναν υψηλής ενέργειας δεσμό μεταξύ της οξειδωμένης καρβοξυλομάδας και του ανόργανου φώσφορου. Το επόμενο βήμα είναι η μετατροπή του 1,3-διφωσφογλυκερικού σε 3-φωσφογλυκερικό, με καταλύτη την κινάση του φωσφογλυκερικού, η οποία απελευθερώνει την ενέργεια του δεσμού υψηλής ενέργειας, φωσφορυλιώνοντας ένα μόριο ADP σε ATP. Στη συνέχεια η μούταση του φωσφογλυκερικού μετατρέπει το 3-φωσφογλυκερικό σε 2-φωσφογλυκερικό, το οποίο αφυδατώνεται και οδηγεί στο σχηματισμό του φωσφο-ενολοπυροσταφυλικού από το ένζυμο ενολάση.

Το φωσφοενολοπυροσταφυλικό, περιλαμβάνει δεσμό υψηλής ενέργειας, ο οποίος χρησιμοποιείται από το ένζυμο κινάση του πυροσταφυλικού για την φωσφορυλίωση ενός μορίου ADP σε ATP. Αυτή η αντίδραση παράγει πυροσταφυλικό, το οποίο είναι το τελικό προϊόν της διαδικασίας της γλυκόλυσης. Ως αποτέλεσμα της γλυκόλυσης, κάθε μόριο εξόζης οδηγεί στην παραγωγή 2 μορίων πυροσταφυλικού, 4 μορίων ATP και 1 NADH . Λόγω της προηγούμενης κατανάλωσης 2 ATP για τη φωσφορυλίωση των εξοζών, το καθαρό κέρδος ενέργειας για το κύτταρο είναι 2 ATP ανά εξόζη. Το πυροσταφυλικό που παράγεται από τη γλυκόλυση μπορεί να χρησιμοποιηθεί από τις ζύμες για διάφορα μεταβολικά μονοπάτια, στοχεύοντας, παράλληλα, στην αναγέννηση NAD^+ από το NADH (Zamora, 2009; Sarris & Papanikolaou, 2016).



Εικόνα 2. Γλυκολυτικό μονοπάτι EMP και μονοπάτι αλκοολικής ζύμωσης (Faria-Oliveira et al., 2013)

1.3.2. Αλκοολική ζύμωση

Η αναγωγική ικανότητα του NADH, που παράγεται μέσω της γλυκόλυσης, πρέπει να μεταφερθεί σε έναν αποδέκτη ηλεκτρονίου για να αναγεννηθεί το NAD⁺ που καταναλώθηκε από τη γλυκόλυση. Στην περίπτωση του *S. cerevisiae* και άλλων ειδών ζύμης, η διαδικασία αυτή ονομάζεται αλκοολική ζύμωση, η οποία λαμβάνει χώρα εντός του κυτταροπλάσματος, όπου η ακεταλδεΐδη (το προϊόν αποκαρβοξυλίωσης του πυροσταφυλικού) αποτελεί τον τελικό αποδέκτη ηλεκτρονίου. Σε συνέχεια της γλυκόλυσης, η αλκοολική ζύμωση περιλαμβάνει δύο επιπλέον αντιδράσεις που καταλύονται από ένζυμα. Αρχικά, το πυροσταφυλικό αποκαρβοξυλιώνεται σε ακεταλδεΐδη από την αποκαρβοξυλάση του πυροσταφυλικού. Στην αντίδραση συμμετέχουν ως συμπαραγόντες η πυροφωσφορική θειαμίνη και το μαγνήσιο. Στη συνέχεια, η ακεταλδεΐδη ανάγεται σε αιθανόλη ανακυκλώνοντας το NADH σε NAD⁺. Η αντίδραση καταλύεται από την αφυδρογονάση της αιθανόλης χρησιμοποιώντας ως

συμπαράγοντα τον ψευδάργυρο. Τα δύο τελικά προϊόντα της αλκοολικής ζύμωσης, η αιθανόλη και το διοξείδιο του άνθρακα, μεταφέρονται έξω από το κύτταρο μέσω απλής διάχυσης (Sarris & Papanikolaou, 2016).

1.3.3. Γλυκεροπυροσταφυλική ζύμωση

Εκτός από την παραγωγή αιθανόλης ως μέσον αναγέννησης του NAD^+ , η γλυκεροπυροσταφυλική ζύμωση αποτελεί ένα εναλλακτικό μονοπάτι για αυτό το σκοπό, αποδίδοντας γλυκερόλη ως τελικό προϊόν. Η φωσφορική διυδροξυακετόνη, το κύριο προϊόν της αντίδρασης της αλδολάσης, οξειδώνεται σε 3-φωσφορική γλυκερόλη μέσω του ενζύμου αφυδρογονάση της 3-φωσφορικής γλυκερόλης, ενώ ταυτόχρονα ένα μόριο NADH οξειδώνεται σε NAD^+ . Στη συνέχεια, το ένζυμο φωσφατάση της 3-φωσφορικής γλυκερόλης καταλύει την παραγωγή της γλυκερόλης μέσω της αποφωσφορυλίωσης της 3-φωσφορικής γλυκερόλης. Η παραγωγή της γλυκερόλης καταναλώνει ATP , ωστόσο είναι απαραίτητη για την διατήρηση της οξειδοαναγωγικής ισορροπίας στο κύτταρο.

Γενικά, στα πρώτα στάδια της ζύμωσης, όταν οι ζύμες βρίσκονται σε πολύ υψηλούς ρυθμούς ανάπτυξης με ταυτόχρονη βιοσύνθεση πρωτεϊνών, λιπιδίων και νουκλεοτιδίων, η γλυκεροπυροσταφυλική ζύμωση ευνοείται. Τα περισσότερα από τα προαναφερθέντα βιομόρια συντίθενται μέσω του πυροσταφυλικού, έτσι κάθε φορά που ένα μόριο πυροσταφυλικού χρησιμοποιείται αναβολικά, προκαλείται ένα έλλειμμα NAD^+ που πρέπει να αποκατασταθεί μέσω του μονοπατιού της γλυκεροπυροσταφυλικής ζύμωσης. Γι' αυτό το λόγο η γλυκερόλη παράγεται κυρίως στα πρώτα στάδια της αλκοολικής ζύμωσης, όταν οι ζύμες αυξάνονται και χρειάζονται μεγάλο ποσοστό πυροσταφυλικού για την αύξηση της βιομάζας τους. Επιπλέον, οι ζύμες παράγουν γλυκερόλη ως προστασία ενάντια στις υψηλές ωσμωτικές πιέσεις.

Η γλυκεροπυροσταφυλική ζύμωση μπορεί να είναι μία εντελώς επιθυμητή διαδικασία στην περίπτωση που είναι επιθυμητή η μετατροπή της γλυκόζης σε γλυκερόλη, όπως έγινε σε μελέτες που πραγματοποιήθηκαν πριν από 10-15 χρόνια, πρότερα της μεγάλης εξάπλωσης της παραγωγής βιοντίζελ και της ραγδαίας αύξησης της γλυκερόλης στην αγορά, αλλά και μία μη επιθυμητή διαδικασία, στην περίπτωση που το επιθυμητό προϊόν είναι η αιθανόλη και συνεπώς η ζύμωση πρέπει να στραφεί στο μονοπάτι της αλκοολικής ζύμωσης. Στη βιβλιογραφία έχουν αναφερθεί δύο διαφορετικές στρατηγικές για την ρύθμιση (μεγιστοποίηση ή ελαχιστοποίηση) της γλυκερόλης στο

στέλεχος *S. cerevisiae*. Η πρώτη περιλαμβάνει την αλλαγή των λειτουργικών συνθηκών της ζύμωσης π.χ. τα επίπεδα αερισμού, την προσθήκη βιταμινών, την επιβολή συνθηκών στρες κ.λ.π., οι οποίες μπορούν να μεγιστοποιήσουν ή να ελαχιστοποιήσουν την παραγωγή γλυκερόλης κατά τη διάσπαση της γλυκόζης. Μία άλλη προσέγγιση σχετίζεται με τη χρήση γενετικά τροποποιημένων στελεχών, τα οποία υπερεκφράζουν ή καταστέλλουν τα γονίδια, που οδηγούν στο μονοπάτι της γλυκεροπυροσταφυλικής ζύμωσης, οδηγώντας σε αύξηση ή μείωση της παραγωγής γλυκερόλης (Sarris & Papanikolaou, 2016).

1.3.4. Αναπνοή

Οι ζύμες είναι προαιρετικά αναερόβιοι μικροοργανισμοί καθώς διαθέτουν το γενετικό υπόβαθρο για να μεταβολίσουν τα σάκχαρα τόσο αερόβια όσο και αναερόβια. Συνεπώς, μπορούν να καταβολίσουν εξίσου μέσω της αναπνοής, κατά την οποία όταν τα σάκχαρα (ή η γλυκερόλη) χρησιμοποιούνται από το αναπνευστικό μονοπάτι, το πυροσταφυλικό οξύ υφίσταται μία οξειδωτική αποκαρβοξυλίωση, η οποία καταλύεται από την αφυδρογονάση του πυροσταφυλικού στο εσωτερικό των μιτοχονδρίων. Η τριφωσφορική θειαμίνη, το λιποαμίδιο και το φλαβινο-αδενινο-δινουκλεοτίδιο (FAD) λειτουργούν ως καταλυτικοί συμπαραγόντες. Αυτή η αντίδραση ανάγει το NAD^+ σε NADH και πρέπει να συμπεριλαμβάνει το ακέτυλο συνένζυμο Α (ακέτυλο- CoA). Το ακέτυλο- CoA μπορεί στη συνέχεια να ενσωματωθεί στον κύκλο του κιτρικού οξέος (κύκλος του Krebs) και να οξειδωθεί πλήρως σε διοξείδιο του άνθρακα και να παράξει αναγωγική ισχύ (NADH και FADH_2). Οι αντιδράσεις αυτές επίσης εκτελούνται στο μιτοχόνδριο. Η αναπνοή ενός mol γλυκόζης αποδίδει ενέργεια ίση με 36-38 mol ATP. Συνεπώς, η αναπνοή της ίδιας ποσότητας σακχάρου παράγει 18 με 19 φορές περισσότερη βιολογικά διαθέσιμη ενέργεια στις ζύμες σε σχέση με τη ζύμωση, υποδεικνύοντας ότι αυτή η διαδικασία είναι πολύ πιο ευνοϊκή όσον αφορά το ενεργειακό κέρδος συγκριτικά με τη ζύμωση. Σε κάθε περίπτωση, η μετατροπή του πυροσταφυλικού σε ακεταλδεΐδη ή ακέτυλο- CoA αποτελούν σημείο κλειδί για τη ρύθμιση του μεταβολισμού των ζυμών (Sarris & Papanikolaou, 2016).

1.4. Βιοχημεία της συσσώρευσης λιπιδίων στους μικροοργανισμούς

Τα λιπίδια παράγονται από όλους τους έμβιους μακρο- και μικροοργανισμούς, έχοντας ουσιαστικούς δομικούς και λειτουργικούς ρόλους, όπως την σύνθεση εκλεκτικά διαπερατών κυτταρικών μεμβρανών και οργανιδίων σχηματίζοντας διπλοστοιβάδες (Bogdanov et al., 2014). Το μικροβιακό λίπος είναι ένας δευτερογενής αποθησαυριστικός μεταβολίτης και αντιστοιχεί κυρίως σε ενδοκυτταρικά λιπίδια, που αποθηκεύονται πρωτίστως υπό τη μορφή τριακυλογλυκερολών (TAGs). Άλλα συστατικά, παρόντα στο μικροβιακό έλαιο, είναι τα ελεύθερα λιπαρά οξέα, τα ουδέτερα λιπίδια, δηλαδή μονοακυλογλυκερόλες, διακυλογλυκερόλες και στερυλεστέρες, στερόλες και πολικά κλάσματα, όπως φωσφολιπίδια, σφιγγολιπίδια και γλυκολιπίδια (Papanikolaou & Aggelis, 2011).

Όταν χρησιμοποιούνται C₅ και C₆ πηγές άνθρακα για την παραγωγή μικροβιακού λίπους, η συσσώρευση των λιπιδίων στα μικροβιακά κύτταρα ή στα μικκύλια (γνωστή ως *de novo* συσσώρευση λιπιδίων), πυροδοτείται από την εξάντληση κάποιου, εκ των απαραίτητων για τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, συστατικού (συνήθως περιορισμός σε άζωτο ή φώσφορο στο μέσο), επάγοντας τη βιομετατροπή των σακχάρων σε λιπαρά οξέα και κατ' επέκταση λιπίδια (Papanikolaou & Aggelis, 2011). Αντίθετα, όταν η ανάπτυξη πραγματοποιείται σε υδρόφοβες πηγές άνθρακα (π.χ. λίπη, έλαια), η συσσώρευση των λιπιδίων (γνωστή ως *ex novo*) είναι μία κύρια αναβολική διαδικασία, που συμβαίνει ταυτόχρονα με την παραγωγή βιομάζας, ανεξάρτητα από την εξάντληση του αζώτου στο θρεπτικό μέσο (Fickers et al., 2005).

1.4.1. Μονοπάτι βιοσύνθεσης λιπιδίων

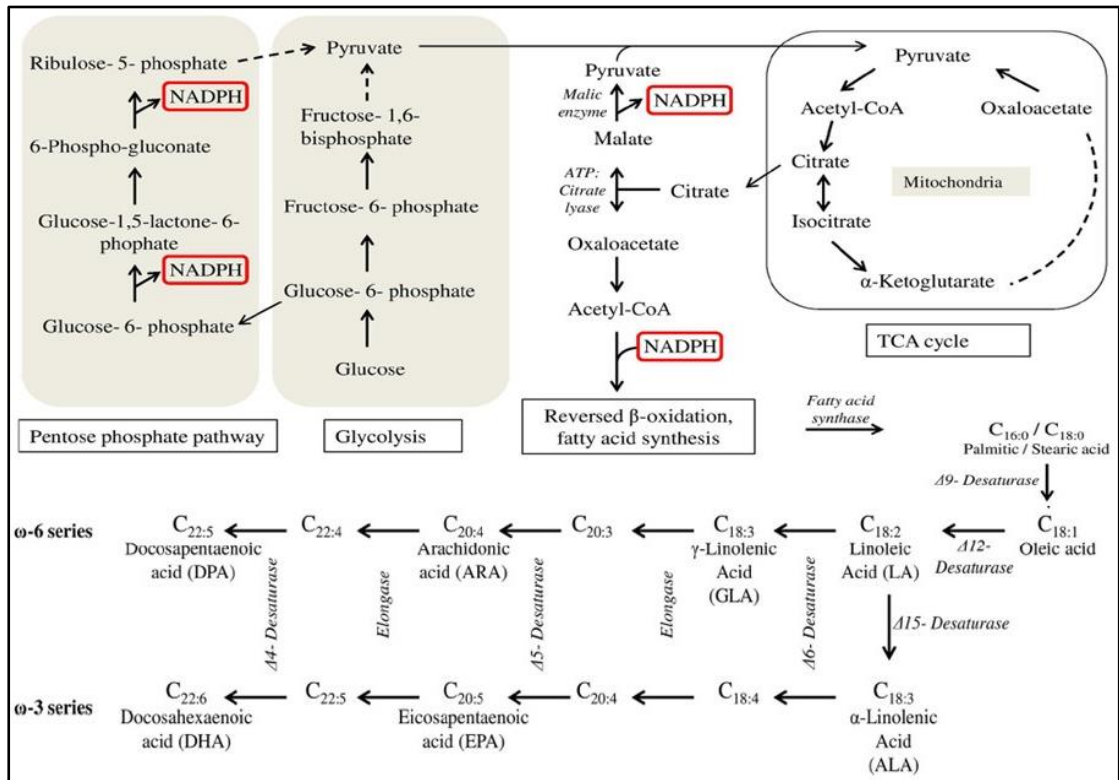
Η *de novo* συσσώρευση των κυτταρικών λιπιδίων είναι μία αναβολική βιοχημική διαδικασία κατά την οποία, χάρη σε μία σειρά αντεστραμμένων αντιδράσεων της β-οξειδωσης, το ακέτυλο συνένζυμο A, που παράγεται από τον ενδιάμεσο κυτταρικό μεταβολισμό, πυροδοτεί τη σύνθεση των ενδοκυτταρικών λιπαρών οξέων (Εικόνα 3). Τα λιπαρά οξέα στη συνέχεια θα εστεροποιηθούν για τη σύνθεση δομικών (φωσφολιπίδια, σφιγγολιπίδια κ.λ.π.) και αποθεματικών λιπιδίων (TAGs και SEs) (Ratledge & Wynn, 2002; Papanikolaou & Aggelis, 2009).

Το ακέτυλο-CoA είναι πρόδρομο μόριο για τη βιογένεση των ενδοκυτταρικών λιπαρών οξέων. Στα μικροφύκη και τους μη ελαιογόνους μικροοργανισμούς το ακέτυλο-CoA συντίθεται από το οξικό άλας μέσω του ενζύμου συνθάση του ακέτυλο-CoA. Στους

ελαιογόνους μικροοργανισμούς, ο δότης του ακέτυλο -CoA είναι το κιτρικό, το οποίο γίνεται διαθέσιμο στο κυτταρόπλασμα μετά από μία σειρά βιοχημικών γεγονότων, που προκαλούνται από περιοριστικές συνθήκες στο θρεπτικό μέσο (κυρίως εν τη απουσία αζώτου) (Ratledge & Wynn, 2002). Αυτός ο περιορισμός προκαλεί μία ταχεία μείωση της ενδοκυτταρικής μονοφωσφορικής αδενοσίνης (AMP), καθώς ο μικροοργανισμός διασπά την AMP σε μονοφωσφορική ινοσίνη (IMP) και ιόντα NH_4^+ μέσω της απαμινάσης της AMP, για χρήση αμμωνιακού ιόντος ως συμπληρωματική πηγή αζώτου, απαραίτητη για τη σύνθεση των συστατικών του κυττάρου (Evans & Ratledge, 1985).

Η απότομη μείωση της ενδοκυτταρικής AMP τροποποιεί την λειτουργία του κύκλου του Krebs. Η δράση των ισοκιτρικών αφυδρογονασών τόσο του NAD^+ , όσο και του NADP^+ (ένζυμα υπεύθυνα για την μετατροπή του ισοκιτρικού σε α-κετογλουταρικό οξύ) χάνεται, καθώς αυτά ενεργοποιούνται αλλοστερικά από την ενδοκυτταρική AMP, γεγονός που οδηγεί στην συσσώρευση κιτρικού μέσα στο μιτοχόνδριο (Botham & Ratledge, 1979; Evans & Ratledge, 1985). Το κιτρικό διασπάται από την ATP- κιτρική λυάση (ACL), ένζυμο κλειδί για την διαδικασία συσσώρευσης λιπιδίων, σε ακέτυλο-CoA και οξαλοξικό, με το ακέτυλο-CoA να μετατρέπεται, μέσω αντιστροφής της β-οξειδωσης σε λιπαρά οξέα. Η απουσία ή περιορισμένη δράση της ACL μπορεί να οδηγήσει σε αύξηση της συγκέντρωσης του κιτρικού, η οποία στη συνέχεια είτε απελευθερώνεται στο μέσο ανάπτυξης, είτε συσσωρεύεται στο κυτταρόπλασμα, προκαλώντας αναστολή του καταβολικού μονοπατιού της γλυκόλυσης (π.χ. στο επίπεδο της φωσφοφρουκτοκινάσης), που ευνοεί τη βιοσύνθεση ενδοκυτταρικών πολυσακχαριτών.

Γενικά, η παραγωγή του κιτρικού οξέος από στελέχη που παράγουν κιτρικό είναι μία διαδικασία, που πραγματοποιείται, όταν η ποσότητα αζώτου στο μιτοχόνδριο εξαντλείται (μεταβολικό φαινόμενο overflow), ενώ οι μελέτες για τις δράσεις των ενδοκυτταρικών ενζύμων και τις συγκεντρώσεις των συνενζύμων έχουν ταυτοποιήσει και διευκρινίσει εν μέρη τα βιοχημικά γεγονότα, που οδηγούν στην βιοσύνθεση του κιτρικού οξέος (Morgunov et al., 2004) και πράγματι έχει αποδειχθεί ότι η έκκριση του κιτρικού οξέος και η συσσώρευση ενδοκυτταρικού λίπους είναι διαδικασίες όμοιες στα πρώτα τους στάδια.



Εικόνα 3. Μεταβολικά μονοπάτια βιοσύνθεσης λιπαρών οξέων σε ελαιογόνους ευκαρυωτικούς μικροοργανισμούς (Ochsenreither et al. 2016)

1.4.2. Σύνθεση τριακυλογλυκερόλης

Τα λιπαρά οξέα μπορεί να απελευθερωθούν από φωσφολιπίδια και να χρησιμοποιηθούν σαν δομικά στοιχεία για διάφορα λιπίδια, συμπεριλαμβανομένων των αποθηκευτικών TAGs, μέσω της οδού Kennedy (ακυλίωση α- φωσφορικής γλυκερόλης) (Davies & Holdsworth, 1992; Müllner & Daum, 2004). Μετά τη βιοσύνθεση των λιπαρών-CoA εστέρων, τα ελεύθερα λιπαρά οξέα ενεργοποιούνται από το CoA και χρησιμοποιούνται στη συνέχεια για την ακυλίωση της αλυσίδας της γλυκερόλης για τη σύνθεση των TAGs. Σε πρώτο στάδιο, η 3-φωσφορική γλυκερόλη (G3P) ακυλιώνεται από την G3P ακυλοτρανσφεράση (GAT) στην θέση sn-1 για να δώσει 1-ακυλο G3P (λυσοφωσφατιδικό οξύ, LPA), το οποίο στη συνέχεια ακυλιώνεται από την ακυλοτρανσφεράση του λυσοφωσφατιδικού (που επίσης ονομάζεται 1-ακυλο-G3P ακυλοτρανσφεράση, AGAT) στην sn-2 για να δώσει φωσφατιδικό οξύ (PA). Ακολουθεί αποφωσφορυλίωση του PA από την φωσφοδρολάση του φωσφατιδικού οξέος (PAP) αποδίδοντας διακυλογλυκερόλη (DAG). Στο τελικό στάδιο, η DAG ακυλιώνεται από την ακυλοτρανσφεράση της διακυλογλυκερόλης προς παραγωγή των TAGs (Davies & Holdsworth, 1992; Müllner & Daum, 2004).

1.5. Ενδοπολυσακχαρίτες

Οι πολυσακχαρίτες είναι πολυμερείς ενώσεις, οι οποίες αποτελούνται από μονοσακχαρίτες με γενικό χημικό τύπο $(C_6H_{10}O_5)_n$, όπου $n > 100$ στις περισσότερες περιπτώσεις. Ο σχηματισμός του πολυμερούς γίνεται μετά την αφυδάτωση μίας αλδόζης ή κετόζης για τον σχηματισμό γλυκοσιδικών δεσμών, ενώ τα μονομερή συνδέονται μέσω γραμμικών ή διακλαδισμένων γλυκοσιδικών δεσμών. Ο αριθμός των μονάδων μονοσακχαριτών, που σχηματίζουν έναν πολυσακχαρίτη ονομάζεται βαθμός πολυμερισμού και οι περισσότεροι πολυσακχαρίτες έχουν μεταξύ 200-3000, ενώ σε λίγες περιπτώσεις συναντώνται πολυσακχαρίτες με βαθμό πολυμερισμού μικρότερο του 100. Οι πολυσακχαρίτες διακρίνονται σε διάφορες κατηγορίες ανάλογα με το είδος των σακχάρων από τα οποία αποτελούνται. Πολυσακχαρίτες, που αποτελούνται από ένα είδος σακχάρου ονομάζονται ομοπολυσακχαρίτες, όπως το άμυλο και η κυτταρίνη, ενώ ετεροπολυσακχαρίτες καλούνται οι ενώσεις που αποτελούνται από παραπάνω είδη σακχάρων, όπως οι πηκτίνες (Wang et al., 2020; Belitz et al., 2009).

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, η βιοσύνθεση των πολυσακχαριτών ευνοείται όταν χρησιμοποιείται θρεπτικό μέσο που περιέχει γλυκόζη ως κύρια πηγή άνθρακα, καθώς και οργανικές πηγές αζώτου, όπως το yeast extract και η πεπτόνη. Παράλληλα, η θερμοκρασία της ζύμωσης, το αρχικό pH του υγρού της ζύμωσης και ο αερισμός, αποτελούν σημαντικούς παράγοντες για τη βιοσύνθεση των πολυσακχαριτών. Ωστόσο, οι συνθήκες ζύμωσης που προάγουν την παραγωγή βιομάζας, μπορεί να λειτουργούν αρνητικά στην συσσώρευση πολυσακχαριτών (κυρίως εξωπολυσακχαριτών) και αντίστροφα (Diamantopoulou et al., 2012). Πολλές μελέτες υποστηρίζουν πως η εξάντληση του αζώτου στο θρεπτικό μέσο ζύμωσης, οδηγεί στη βιοσυσσώρευση ενδοπολυσακχαριτών λόγω αναστολής της 6-φωσφο-φρουκτοκινάσης, όπως περιγράφηκε σε προηγούμενη εδάφιο (Papanikolaou & Aggelis, 2011).

Οι πολυσακχαρίτες δεν αποτελούν μόνο δομικό υλικό στήριξης και αποθησαυριστική μονάδα ενέργειας του κυττάρου, αλλά αποτελούν και από τις σημαντικότερες ενώσεις, που συμμετέχουν στο μεταβολισμό των ζωντανών οργανισμών. Οι βιολογικές δράσεις των πολυσακχαριτών ποικίλουν και συμπεριλαμβάνουν την μεταφορά βιολογικής κυτταρικής πληροφορίας, την μεταφορά πρωτεϊνών και την ανοσολογική απόκριση. Η δραστηριότητα των πολυσακχαριτών δεν επηρεάζεται μόνο από την πηγή, αλλά συνδέεται και στενά με τη δομή του πολυμερούς (Wang et al., 2020). Όσον αφορά τους πολυσακχαρίτες, που προέρχονται από μικροοργανισμούς διαθέτουν σημαντική

βιολογική δράση και βιοσυμβατότητα, καθώς και ζελατινοποιητικές ιδιότητες, με την παραγωγή τους σε μεγάλη κλίμακα να έχει υψηλή προοπτική ανάπτυξης. Τέλος, σύμφωνα με μελέτες, οι β-D-γλυκάνες αποτελούν βιομόρια υψηλού διατροφικού αλλά και φαρμακευτικού ενδιαφέροντος (Wang et al., 2020).

2. ΣΚΟΠΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η διερεύνηση της ικανότητας νέων απομονωμένων στελεχών ζυμών (στελέχη κυρίως ανηκόντων στα γένη *Saccharomyces* sp., *Pichia* sp., *Kluyveromyces* sp.) να αυξάνονται σε συνυπόστρωμα με κύριες πηγές άνθρακα τη γλυκόζη και τη φρουκτόζη, υπό αερόβιες και αναερόβιες συνθήκες. Κατά τη διερεύνηση αυτή, κύριως στόχος είναι η παραγωγή αιθανόλης και δευτερευόντων η μελέτη της ικανότητας των στελεχών να παράγουν ή/και να συσσωρεύουν πολυσακχαρίτες και λιπίδια. Τέλος, τα στελέχη με την υψηλότερη προοπτική αξιολογήθηκαν σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις σακχάρων, αποσκοπώντας στη μεγοστοποίηση της παραγωγής των προς μελέτη μεταβολιτών.

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1. Μικροοργανισμοί, ανανέωση, συντήρηση και προκαλλιέργεια

Στην παρούσα μεταπτυχιακή μελέτη, τα μικροβιακά στελέχη *Kluyveromyces* LPBH6, *Saccharomyces cerevisiae* XS, *Pichia fermentans* 5265, *Pichia anomala*, *Pichia guilliermondii*, *Pichia kluyverii* και προμηθεύτηκαν από το Εργαστήριο Γαλακτοκομίας, καθώς και από το Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών και δεν έχουν μελετηθεί εκτενώς έως σήμερα σε σχέση με την ικανότητα παραγωγής αιθανόλης. Η ανανέωση των μικροοργανισμών πραγματοποιήθηκε σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα υπό κλίση σε γυάλινους σωλήνες (slants), το οποίο περιείχε (w/v): 1% εκχύλισμα ζύμης, 1% πεπτόνη, 1% γλυκόζη και 2% άγαρ. Οι καλλιέργειες συντηρούνταν στους 4 °C μέχρι περεταίρω χρήσεως.

Πριν από κάθε πείραμα, παρασκευάζονταν υγρή προκαλλιέργεια σε 250 mL Erlenmeyer κωνικές φιάλες, η οποία ήταν ίδιας σύστασης με τα slants, απουσία άγαρ και επωαζόταν στους 30 °C για 24 έως 48 ώρες, για να επιτευχθεί εκθετική φάση ανάπτυξης. Η προκαλλιέργεια με τα ανεπτυγμένα στελέχη ζύμης χρησιμοποιούταν στη συνέχεια ως εμβόλιο (10% v/v) για τις ζυμώσεις κλειστού τύπου, που ακολούθησαν. Όλα τα θρεπτικά μέσα και τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για τη ζύμωση αποστειρώνονταν στους 121 °C για 15 λεπτά σε αυτόκαυστο (Systec, VX-150).

3.2. Ζυμώσεις προς παραγωγή βιοαιθανόλης και μικροβιακού λίπους

Το θρεπτικό μέσο ζύμωσης σε όλες τις περιπτώσεις είχε την εξής σύσταση (g/L): 120-200 κύρια πηγή άνθρακα (50% γλυκόζη και 50% φρουκτόζη), 7,0 KH₂PO₄, 2,5 Na₂HPO₄, 1,5 MgSO₄·7H₂O, 0,15 CaCl₂·2H₂O, 0,15 FeCl₃·6H₂O, 0,06 MnSO₄·H₂O, 0,02 ZnSO₄·7H₂O, με 6,0 εκχύλισμα ζύμης και 6,0 θειικό αμμώνιο ως πηγές αζώτου. Το εμβόλιο (10% v/v), που χρησιμοποιήθηκε προήλθε από την προκαλλιέργεια, όπως περιγράφηκε. Το pH διατηρήθηκε σε τιμή 4 με χρήση χημικών διαλυμάτων HCl 1 M ή NaOH 1 M, όποτε ήταν απαραίτητο.

Οι μικροβιακές ζυμώσεις, που πραγματοποιήθηκαν ήταν ασυνεχούς καλλιέργειας σε αερόβιες και αναερόβιες συνθήκες, με τη χρήση μείγματος εμπορικής γλυκόζης και εμπορικής φρουκτόζης ως θρεπτικά υποστρώματα. Τα αερόβια πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε κωνικές φιάλες (250 mL) με ενεργό όγκο 50 mL και επωάστηκαν στους 28 °C, στα 180 rpm για 6 μέρες. Για τις αναερόβιες συνθήκες, τα

πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε φιάλες Duran (100 mL) με ενεργό όγκο 100 mL και επώαστηκαν στους 28 °C, στα 70 rpm για 5 μέρες. Τα δείγματα, που λαμβάνονταν καθημερινά αναλύονταν ως προς τον προσδιορισμό σακχάρων, της αιθανόλης, της ξηρής βιομάζας, του μικροβιακού λίπους και των ενδοπολυσακχαριτών.

3.3. Αναλυτικές μέθοδοι

3.3.1. Προσδιορισμός πηγών άνθρακα και αιθανόλης

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης των σακχάρων πραγματοποιήθηκε με χρήση υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC). Αρχικά, όλα τα δείγματα φυγοκεντρώνταν και στην συνέχεια φιλτράρονταν με την χρήση φίλτρων Whatman διαμέτρου οπών 0,22 μm. Το σύστημα HPLC, που χρησιμοποιήθηκε ήταν υγρός χρωματογράφος τύπου Waters Alliance 2695, εξοπλισμένο με ανιχνευτές UV και RI (2414 Waters Refractive Index Detector) και διαχωριστική στήλη τύπου Rezex ROA-Organic acid H+ (Phenomenex) (στατική φάση), με την κινητή φάση να είναι υδατικό διάλυμα θεικού οξέος H₂SO₄ 5 mM, με θερμοκρασία στήλης 60 °C και με ροή κινητής 0,5 mL/min. Η δειγματοληψία ορίστηκε στα 20 μL, με διάρκεια 30 min και η επεξεργασία του χρωματογραφήματος, που προέκυπτε, γινόταν με τη βοήθεια του λογισμικού Empower μέσω ολοκλήρωσης των κορυφών των πηγών άνθρακα. Με τη βοήθεια πρότυπων καμπυλών προσδιοριζόταν η συγκέντρωση των υπολειπόμενων στο υγρό της ζύμωσης σακχάρων (S_R, g/L), συνυπολογισθείσας της αραίωσης, με την καταναλωθείσα συγκέντρωση (S_{CON}, g/L) να προκύπτει ως η διαφορά της υπολειπόμενης από την αρχική συγκέντρωση (S₀, g/L). Με τον ίδιο τρόπο και αντίστοιχη πρότυπη καμπύλη προσδιοριζόταν και η συγκέντρωση (EtOH, g/L) της παραχθείσας αιθανόλης.

3.3.2. Προσδιορισμός βιομάζας και μικροβιακού λίπους

Για τον προσδιορισμό της συνολικής ξηρής βιομάζας (TDW) πραγματοποιήθηκε επαναλαμβανόμενη έκπλυση σε απιονισμένο νερό και φυγοκέντρωση σε 15,000 × g, T = 2 °C για 10 min (Hettich Universal Centrifuge, Model 320-R, Merck KGaA, Darmstadt, Germany) της παραχθείσας μικροβιακής βιομάζας, η οποία στη συνέχεια συλλέχθηκε και ξηράνθηκε στους 80 °C έως σταθερής μάζας. Για την εκχύλιση του λίπους, πραγματοποιήθηκε πρότερη μηχανική κονιορτοποίηση της ξηρής βιομάζας και στη συνέχεια προστέθηκε μίγμα διαλυτών χλωροφορμίου/μεθανόλης (2:1 v/v) για την εκχύλιση των λιπιδίων (Folch et al., 1957). Ακολούθησε εξάτμιση του διαλύτη υπό

κενό (Flash Evaporator/Rotavapor R-114, BÜCHI Labortechnik AG, St. Gallen, Switzerland) σε προζυγισμένες φιάλες και το λίπος (L, g/L) προσδιορίστηκε βαρομετρικά από τη διαφορά του μικτού βάρους μετά την εξάτμιση με το απόβαρο.

3.3.3 Προσδιορισμός σύστασης σε λιπαρά οξέα

Για την ανάλυση της σύστασης των λιπιδίων σε λιπαρά οξέα εφαρμόστηκε παραγωγοποίηση σε μεθυλεστέρες των λιπαρών οξέων (FAMES). Η διαδικασία δύο σταδίων περιλαμβάνει μεθυλεστεροποίηση με χρήση μεθοξειδίου του νατρίου (MeONa) και στη συνέχεια εστεροποίηση με τη χρήση μεθανόλης και καταλύτη το HCl. Ο προσδιορισμός των FAMES πραγματοποιήθηκε μέσω Αέριας Χρωματογραφίας (Gas Chromatography-GC) Fisons 8060, που ήταν εξοπλισμένη με στήλη Chrompack (60 m × 0.32 mm) και ανιχνευτή ιονισμού φλόγας (FID) με χρήση ηλίου ως φέρον αέριο (2 mL/min). Η ανάλυση εκκίνησε με αρχική θερμοκρασία 50 °C, στη συνέχεια ο φούρνος θερμαινόταν στους 200 °C με ρυθμό 25 °C/min, έπειτα στους 240 °C με ρυθμό 3 °C/min και τέλος στους 250 °C με ρυθμό 25 °C/min, όπου και παρέμενε για 3 min. Η θερμοκρασία του FID ρυθμίστηκε στους 250 °C. Τα FAMES ταυτοποιήθηκαν με τη χρήση προτύπων αναφοράς (Supelco® 37 Component FAME Mix, 47885-U, Merck) και εκφράστηκαν ως % w/w του συνόλου των FAMES.

3.3.4. Προσδιορισμός ενδοπολυσακχαριτών (IPS)

Ο ποσοτικός προσδιορισμός των ενδοπολυσακχαριτών της ξηρής βιομάζας των ζυμώσεων πραγματοποιήθηκε βασιζόμενος στο τροποποιημένο πρωτόκολλο, που προτάθηκε από τους Liang et al. (2009). Περί τα 50 mg ξηρής βιομάζας υδρολύονται παρουσία 10 mL HCl 2,5 M υπό θερμοκρασία 100 °C για 30 λεπτά. Ύστερα, το όλον εξουδετερώνεται με κατάλληλη ποσότητα διαλύματος NaOH 2,5 M και έπεται διήθηση (Whatman No1) για την απομάκρυνση των υπολειμμάτων της βιομάζας. Τέλος, για τον ποσοτικό προσδιορισμό των απελευθερωμένων αναγωγικών σακχάρων εφαρμόστηκε η μέθοδος του 3,5-δινιτροσαλικυλικού οξέος (DNS) με τα αποτελέσματα τα εκφράζονται ως ισοδύναμα γλυκόζης, με βάση πρότυπη καμπύλη του ίδιου σακχάρου (Miller, 1959).

3.3.5. Συντελεστές

X – συνολική βιομάζα (g L⁻¹), S – υπόστρωμα (g L⁻¹), L – κυτταρικά λιπίδια (g L⁻¹), S_{CONS} – καταναλωθέν υπόστρωμα (g L⁻¹), EtOH – αιθανόλη (g L⁻¹), Y_{X/S} – απόδοση, g συνολικής παραγόμενης βιομάζας ανά g καταναλωθέντος υποστρώματος (g/g), Y_{EtOH/S}

– απόδοση, g συνολικής παραγόμενης αιθανόλης ανά g καταναλωθέντος υποστρώματος (g/g), P_{ETOH} – παραγωγικότητα, συνολική συγκέντρωση παραγόμενης αιθανόλης ανά ώρα ($g L^{-1}h^{-1}$), $K_{L/X}$ - g κυτταρικών λιπιδίων ανά g συνολικής βιομάζας (g/g), IPS – ενδοπολυσακχαρίτες ($g L^{-1}$), TDW – συνολική ξηρή βιομάζα ($g L^{-1}$).

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

4.1. Καλλιέργειες υπό αερόβιες συνθήκες

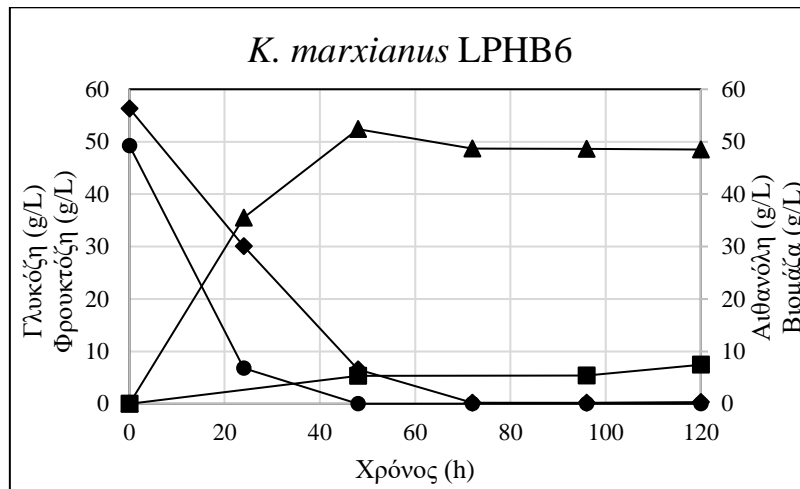
Τα στελέχη των ζυμών αξιολογήθηκαν ως προς την ικανότητά τους να αναπτυχθούν σε συνυποστρώματα γλυκόζης και φρουκτόζης και να παράγουν αιθανόλη υπό αερόβιες συνθήκες, με τα αποτελέσματα να παρουσιάζονται στον κάτωθι Πίνακα 1.

Πίνακας 1. Συγκεντρωτικά ποσοτικά δεδομένα προερχόμενα από την κινητική ανάπτυξης ζυμών, έπειτα από καλλιέργεια σε ημι-καθορισμένα θρεπτικά συνυποστρώματα γλυκόζης-φρουκτόζης (60 g/L έκαστο), υπό αερόβιες συνθήκες. Στον πίνακα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα κατά τη στιγμή μέγιστης παραγωγής αιθανόλης.

Στέλεχος	Time (h)	S _{CONS} (g/L)	TDW (g/L)	L (g/L)	E _{tOH} (g/L)	IPS (g/L)	Y _{X/S} (g/g)	Y _{E_{tOH}/S} (g/g)	P _{E_{tOH}} (g/L/h)	K _{L/X} (g/g)
<i>K. marxianus</i> LPHB6	48	114	7,5	0,1	49	2,4	0,07	0,43	1,0	0,015
<i>S. cerevisiae</i> XS	48	113	8,0	0,4	49	2,6	0,07	0,43	1,0	0,051
<i>P. fermentans</i> 5265	48	120	8,5	0,2	55	2,7	0,07	0,46	1,2	0,021
<i>P. anomala</i>	48	120	6,2	0,1	55	0,7	0,05	0,46	1,2	0,015
<i>P. kluyveri</i>	72	114	5,1	0,1	47	0,3	0,07	0,41	0,7	0,019
<i>P. guillermondi</i>	72	95	3,9	0,1	48	0,4	0,04	0,50	0,7	0,012

- *Kluyveromyces marxianus* LPBH6

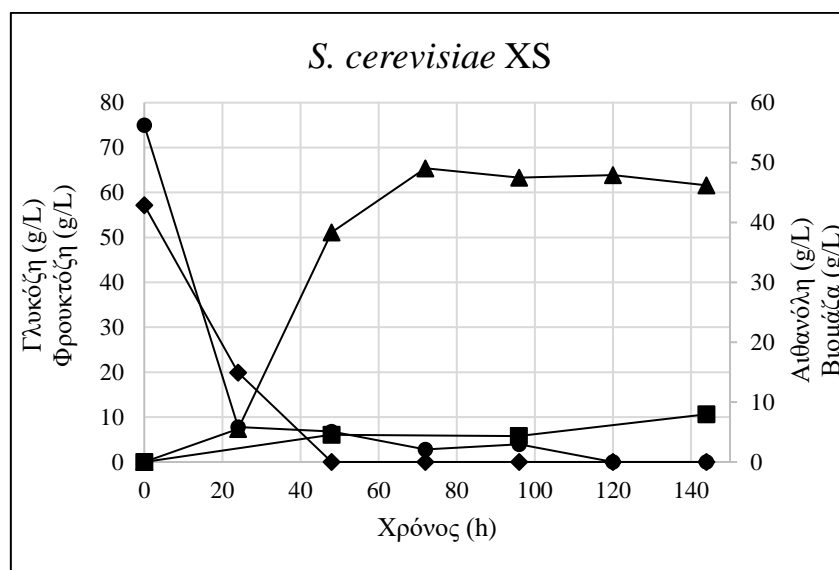
Το στέλεχος *Kluyveromyces marxianus* LPHB6 αξιολογήθηκε για την ικανότητά του να αναπτυχθεί σε συνυπόστρωμα γλυκόζης και φρουκτόζης και να παράγει βιοαιθανόλη. Αρχικά, πραγματοποιήθηκε ζύμωση υπό αερόβιες συνθήκες με αρχική συγκέντρωση σακχάρων ίση με περίπου 120 g/L, εκ των οποίων οι συγκεντρώσεις της γλυκόζης και της φρουκτόζης ήταν ίσες με 60 g/L. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 4, το υπόστρωμα καταναλώθηκε πλήρως από το μικροβιακό στέλεχος μετά τις 72 h. Η μέγιστη παραγωγή βιοαιθανόλης ανήλθε και διατηρήθηκε περί τα 50 g/L στις 48 h, με αντίστοιχη παραγωγή βιομάζας 7,5 g/L και ενδοκυτταρικά λιπίδια 0,1 g/L (1,5% επί ξηρής βιομάζας). Η απόδοση της ζύμωσης έφτασε τα 0,43 g αιθανόλης/g καταναλωθέντων σακχάρων, ενώ η παραγωγικότητα ήταν ίση με 1,0 g/L/h.



Εικόνα 4 Διαγραμματική απεικόνιση της κινητικής κατανάλωσης γλυκόζης (●) και φρουκτόζης (◆), της παραγωγής βιομάζας (■) και αιθανόλης (▲) κατά την αερόβια ασυνεχή ζύμωση του *K. marxianus* LPHB6 σε κωνικές φιάλες.

- *Saccharomyces cerevisiae* XS

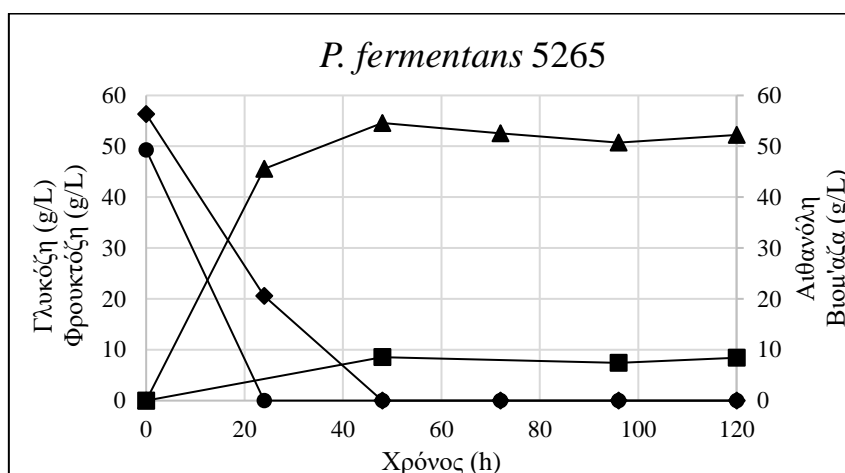
Το στέλεχος *S. cerevisiae* XS εξετάστηκε, επίσης, ως προς την ικανότητά του να αναπτυχθεί σε συνυπόστρωμα γλυκόζης και φρουκτόζης και να παράγει αιθανόλη. Η ζύμωση πραγματοποιήθηκε υπό αερόβιες συνθήκες με αρχική συγκέντρωση σακχάρων περίπου τα 120 g/L (50% γλυκόζη, 50% φρουκτόζη). Σύμφωνα με την Εικόνα 5, και σε αυτή την περίπτωση το υπόστρωμα καταναλώθηκε σχεδόν πλήρως ήδη από τις πρώτες 48 h (υπολειμματική φρουκτόζη ≈ 7 g/L). Η μέγιστη παραγωγή βιοαιθανόλης ανήλθε στα 49 g/L στις 72 h με αντίστοιχη παραγωγή βιομάζας 8 g/L και ενδοκυτταρικό περιεχόμενο λιπιδίων ίσο με 5,1%. Η απόδοση της ζύμωσης έφτασε τα 0,43 g αιθανόλης/g καταναλωθέντων σακχάρων, ενώ η παραγωγικότητα ήταν ίση με 1,0 g/L/h.



Εικόνα 5 Διαγραμματική απεικόνιση της κινητικής κατανάλωσης γλυκόζης (●) και φρουκτόζης (◆), της παραγωγής βιομάζας (■) και αιθανόλης (▲) κατά την αερόβια ασυνεχή ζύμωση του *S. cerevisiae* XS σε κωνικές φιάλες.

- *Pichia fermentans* 5265

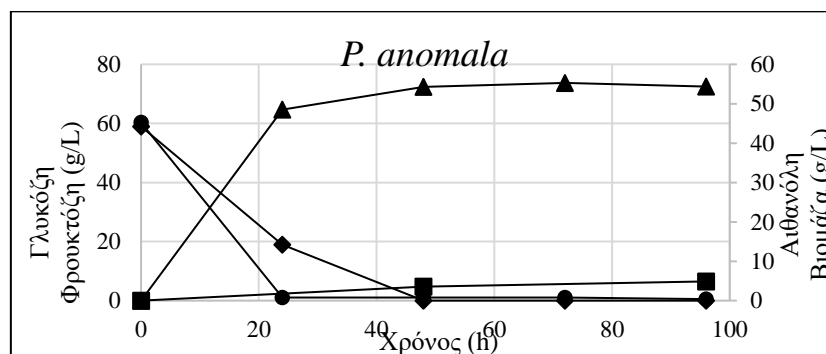
Η ζύμη *P. fermentans* 5265 αξιολογήθηκε ομοίως. Τόσο η γλυκόζη όσο και η φρουκτόζη καταναλώθηκαν ικανοποιητικά από το μικροοργανισμό, αφού είχαν καταναλωθεί πλήρως τις πρώτες 48 h ζύμωσης, όπως παρατηρείται στην Εικόνα 6 η παραχθείσα αιθανόλη έφτασε μέγιστη τιμή τα 55 g/L. Η παραχθείσα βιομάζα ανήλθε στα 8,5 g/L, ενώ το ενδοκυτταρικό περιεχόμενο λιπιδίων ήταν 2,1%. Η απόδοση της ζύμωσης ήταν 0,46 g αιθανόλης/g καταναλωθέντων σακχάρων και η παραγωγικότητα ίση με 1,2 g/L/h.



Εικόνα 6 Διαγραμματική απεικόνιση της κινητικής κατανάλωσης γλυκόζης (●) και φρουκτόζης (◆), της παραγωγής βιομάζας (■) και αιθανόλης (▲) κατά την αερόβια ασυνεχή ζύμωση του *P. fermentans* 5265 σε κωνικές φιάλες.

- *Pichia anomala*

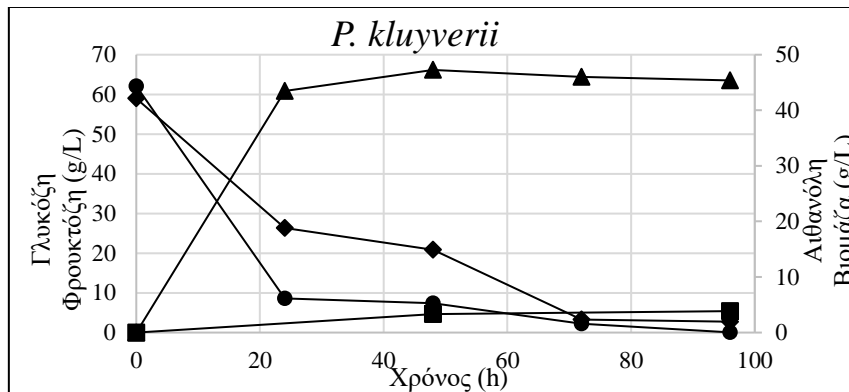
Στην περίπτωση της *P. anomala*, το υπόστρωμα είχε καταναλωθεί πλήρως στις 48 h, σύμφωνα με την Εικόνα 7, η μέγιστη παραγωγή βιοαιθανόλης έφτασε τα 55 g/L, η βιομάζα 6 g/L και ενδοκυτταρικό περιεχόμενο λιπιδίων ίσο με 2%. Η απόδοση της ζύμωσης έφτασε τα 0,46 g αιθανόλης/g καταναλωθέντων σακχάρων, ενώ η παραγωγικότητα ήταν ίση με 1,2 g/L/h.



Εικόνα 7 Διαγραμματική απεικόνιση της κινητικής κατανάλωσης γλυκόζης (●) και φρουκτόζης (◆), της παραγωγής βιομάζας (■) και αιθανόλης (▲) κατά την αερόβια ασυνεχή ζύμωση του *P. anomala* σε κωνικές φιάλες.

- *Pichia kluyveri*

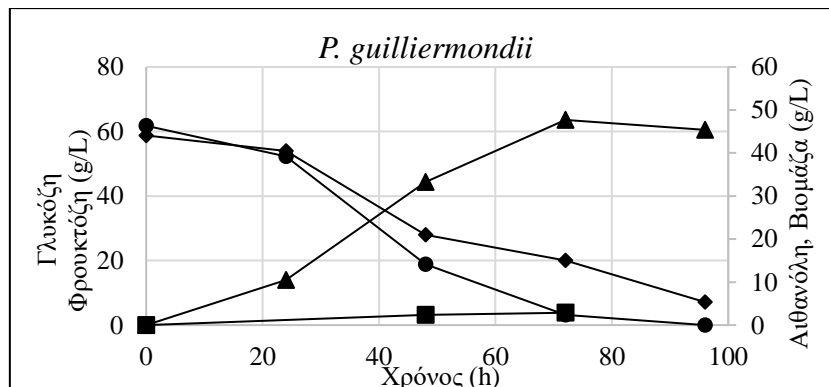
Στην περίπτωση του *P. kluyveri* και σύμφωνα με την Εικόνα 8, το υπόστρωμα καταναλώθηκε σχεδόν πλήρων έπειτα από 72 h (υπολειπόμενα σάκχαρα ≈ 6 g/L). Η μέγιστη παραγωγή βιοαιθανόλης έφτασε τα 47 g/L στις 48 h με αντίστοιχη παραγωγή βιομάζας 5 g/L και ενδοκυτταρικό περιεχόμενο λιπιδίων ίσο με 2%. Η απόδοση της ζύμωσης ήταν 0,41 g αιθανόλης/g καταναλωθέντων σακχάρων, ενώ η παραγωγικότητα έπειτα από 72 h ήταν ίση με 0,65 g/L/h.



Εικόνα 8 Διαγραμματική απεικόνιση της κινητικής κατανάλωσης γλυκόζης (●) και φρουκτόζης (◆), της παραγωγής βιομάζας (■) και αιθανόλης (▲) κατά την αερόβια ασυνεχή ζύμωση του *P. anomala* σε κωνικές φιάλες.

- *Pichia guilliermondii*

Η ζύμη *P. guilliermondii*, όπως παρατηρείται στο διάγραμμα της Εικόνας 9, χρειάστηκε περισσότερο χρόνο για να αφομοιώσει το υπόστρωμα (υπολειμματική φρουκτόζη ≈ 7 g/L έπειτα από 96 h), με τη μέγιστη παραγωγή αιθανόλης (EtOH = 48 g/L) να παρατηρείται στις 72 h. Την ίδια στιγμή, η βιομάζα ήταν περί τα 4 g/L, με περιεχόμενα λιπίδια 1%. Η απόδοση της ζύμωσης έφτασε τα 0,50 g αιθανόλης/g καταναλωθέντων σακχάρων, ενώ η παραγωγικότητα ήταν ίση με 0,66 g/L*h.



Εικόνα 9 Διαγραμματική απεικόνιση της κινητικής κατανάλωσης γλυκόζης (●) και φρουκτόζης (◆), της παραγωγής βιομάζας (■) και αιθανόλης (▲) κατά την αερόβια ασυνεχή ζύμωση του *P. anomala* σε κωνικές φιάλες.

4.2. Καλλιέργειες υπό αναερόβιες συνθήκες

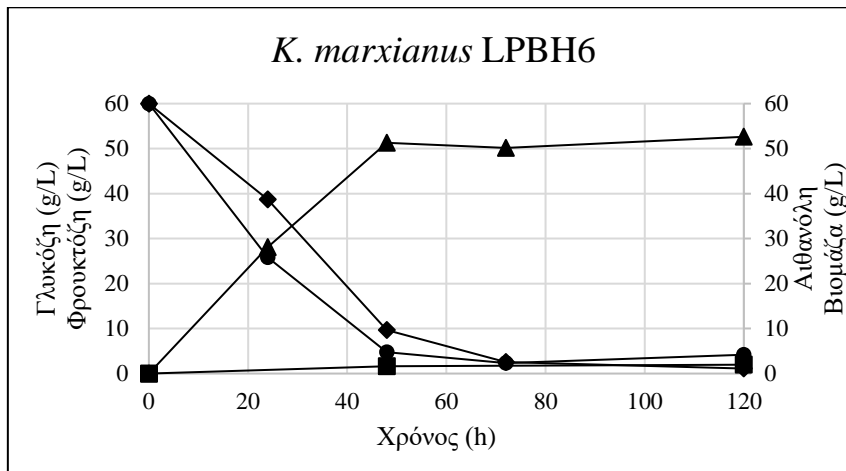
Τα στελέχη των ζυμών αξιολογήθηκαν ως προς την ικανότητά τους να αναπτυχθούν σε συνυποστρώματα γλυκόζης και φρουκτόζης και να παράγουν αιθανόλη υπό αναερόβιες συνθήκες, με τα αποτελέσματα να παρουσιάζονται στον κάτωθι Πίνακα 2.

Πίνακας 2. Συγκεντρωτικά ποσοτικά δεδομένα προερχόμενα από την κινητική ανάπτυξης ζυμών, έπειτα από καλλιέργεια σε ημι-καθορισμένα θρεπτικά συνυποστρώματα γλυκόζης-φρουκτόζης (60 g/L έκαστο), υπό αναερόβιες συνθήκες. Στον πίνακα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα κατά τη στιγμή μέγιστης παραγωγής αιθανόλης.

Στέλεχος	Time (h)	SCONS (g/L)	TDW (g/L)	L (g/L)	EtOH (g/L)	IPS (g/L)	Y _{X/S} (g/g)	Y _{EtOH/S} (g/g)	P _{EtOH} (g/L/h)	K _{L/X} (g/g)
<i>K. marxianus</i> LPHB6	48	105	2,1	0,04	51	0,7	0,02	0,49	1,1	0,019
<i>S. cerevisiae</i> XS	48	102	1,3	0,02	49	0,4	0,01	0,48	1,0	0,015
<i>P. fermentans</i> 5265	48	120	1,3	0,03	49	0,4	0,01	0,41	1,0	0,026
<i>P. anomala</i>	120	100	2,0	0,03	48	0,6	0,02	0,48	0,4	0,014
<i>P. kluyveri</i>	312	93	1,1	0,01	42	0,4	0,01	0,45	0,1	0,013
<i>P. guillermondi</i>	336	89	1,0	0,01	40	0,3	0,01	0,45	0,1	0,014

- *Kluyveromyces marxianus* LPBH6

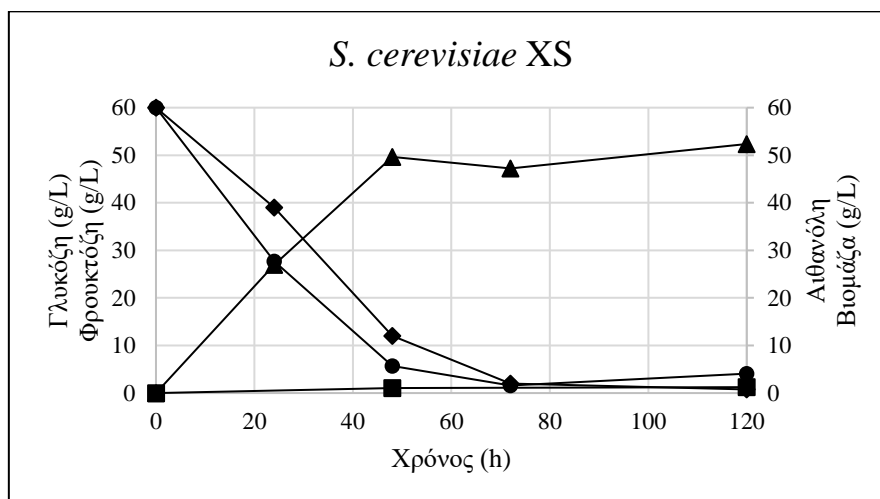
Το στέλεχος *K. marxianus* LPHB6 αξιολογήθηκε και υπό αναερόβιες συνθήκες για την ικανότητά του να αναπτυχθεί σε ημι-συνθετικό συνυπόστρωμα γλυκόζης και φρουκτόζης (60 g/L έκαστη) και να παράγει βιοαιθανόλη. Όπως παρουσιάζεται στο διάγραμμα της Εικόνας 10, το υπόστρωμα καταναλώθηκε σχεδόν πλήρων από το μικροβιακό στέλεχος εντός 72 h (υπολειμματικά σάκχαρα <5 g/L). Η μέγιστη παραγωγή βιοαιθανόλης έφτασε τα 51 g/L στις 48 h με αντίστοιχη παραγωγή βιομάζας 4 g/L και ενδοκυτταρικό περιεχόμενο λιπιδίων ίσο με 2%. Η απόδοση της ζύμωσης έφτασε τα 0,49 g αιθανόλης/g καταναλωθέντων σακχάρων, ενώ η παραγωγικότητα ήταν ίση με 1,1 g/L/h.



Εικόνα 10 Διαγραμματική απεικόνιση της κινητικής κατανάλωσης γλυκόζης (●) και φρουκτόζης (◆), της παραγωγής βιομάζας (■) και αιθανόλης (▲) κατά την αναερόβια ασυνεχή ζύμωση του *K. marxianus* LPBH6 σε κωνικές φιάλες.

- *Saccharomyces cerevisiae* XS

Το στέλεχος *S. cerevisiae* XS κατά την αναερόβια καλλιέργειά του στο συνυπόστρωμα, κατανάλωσε σχεδόν πλήρως τα σάκχαρα εντός 72 ωρών (υπολειμματικά σάκχαρα <4 g/L). Σύμφωνα με την Εικόνα 11, η παραγωγή βιοαιθανόλης ανήλθε στα 50 g/L στις 48 h με αντίστοιχη παραγωγή βιομάζας 1,3 g/L και περιεχόμενο λίπος 1,5%. Η απόδοση της ζύμωσης έφτασε τα 0,48 g αιθανόλης/g καταναλωθέντων σακχάρων με παραγωγικότητα ίση με 1,0 g/L/h.

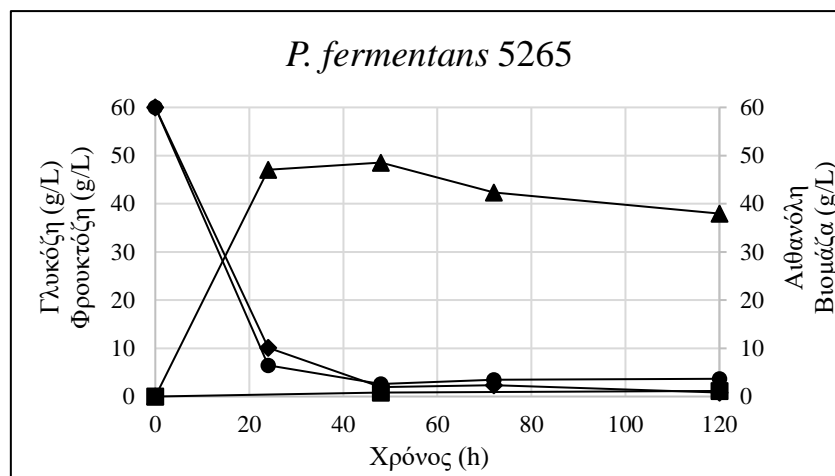


Εικόνα 11 Διαγραμματική απεικόνιση της κινητικής κατανάλωσης γλυκόζης (●) και φρουκτόζης (◆), της παραγωγής βιομάζας (■) και αιθανόλης (▲) κατά την αναερόβια ασυνεχή ζύμωση του *S. cerevisiae* XS σε κωνικές φιάλες.

- *Pichia fermentans* 5265

Σύμφωνα με την Εικόνα 12, ο μικροοργανισμός *P. fermentans* 5265 κατά την αναερόβια καλλιέργεια και περί τις 48 h είχε καταναλώσει σχεδόν πλήρως τις κύριες πηγές άνθρακα, αποδίδοντας 1,3 g/L TDW με περιεχόμενα λιπίδια της τάξης του 2,6%

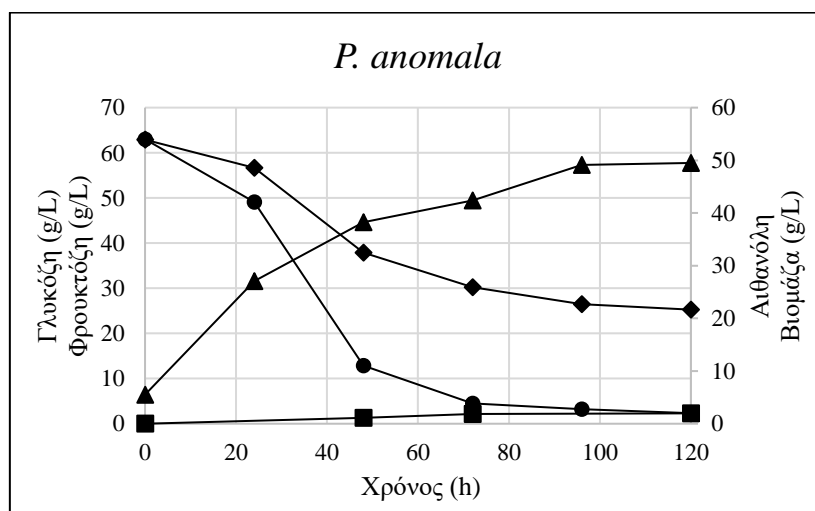
και περί τα 49 g/L βιοαιθανόλη. Η απόδοση της ζύμωσης έφτασε τα 0,41 g αιθανόλης/g καταναλωθέντων σακχάρων με παραγωγικότητα 1,0 g/L/h.



Εικόνα 12 Διαγραμματική απεικόνιση της κινητικής κατανάλωσης γλυκόζης (●) και φρουκτόζης (◆), της παραγωγής βιομάζας (■) και αιθανόλης (▲) κατά την αναερόβια ασυνεχή ζύμωση του *P. fermentans* 5265 σε κωνικές φιάλες.

-
- *Pichia anomala*

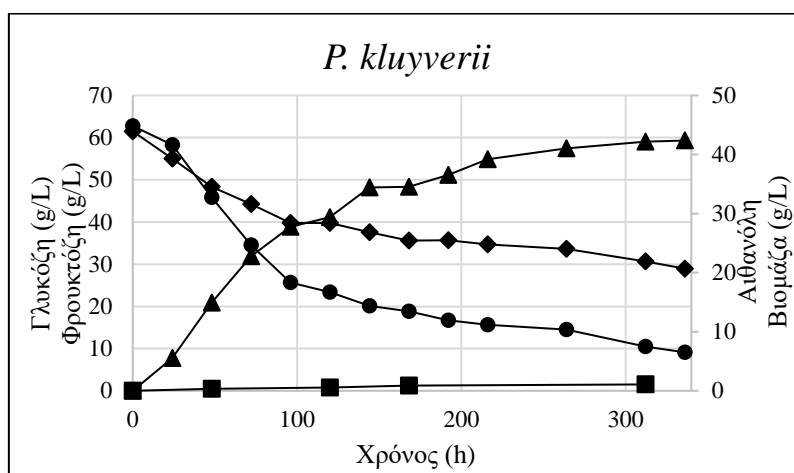
Το στέλεχος *P. anomala* υπό συνθήκες αναεροβίωσης και εν αντιθέσει με τις υπόλοιπες ζυμώσεις, μετά από 120 h ζύμωσης δεν κατάφερε να αφομοιώσει πλήρως τα σάκχαρα και με την υπολειπόμενη φρουκτόζη, συγκεκριμένα να ανέρχεται περί τα 20 g/L, σύμφωνα με το γράφημα της Εικόνας 13. Η μέγιστη παραγωγή βιοαιθανόλης ήταν 48 g/L τη χρονική αυτή στιγμή, προερχόμενη από 2,0 g/L βιομάζα, με περιεχόμενα 1,4% λιπίδια. Η απόδοση της ζύμωσης έφτασε τα 0,48 g αιθανόλης/g καταναλωθέντων σακχάρων, ενώ η παραγωγικότητα ήταν ίση με 0,4 g/L/h.



Εικόνα 13 Διαγραμματική απεικόνιση της κινητικής κατανάλωσης γλυκόζης (●) και φρουκτόζης (◆), της παραγωγής βιομάζας (■) και αιθανόλης (▲) κατά την αναερόβια ασυνεχή ζύμωση του *P. anomala* σε κωνικές φιάλες.

- *Pichia kluyveri*

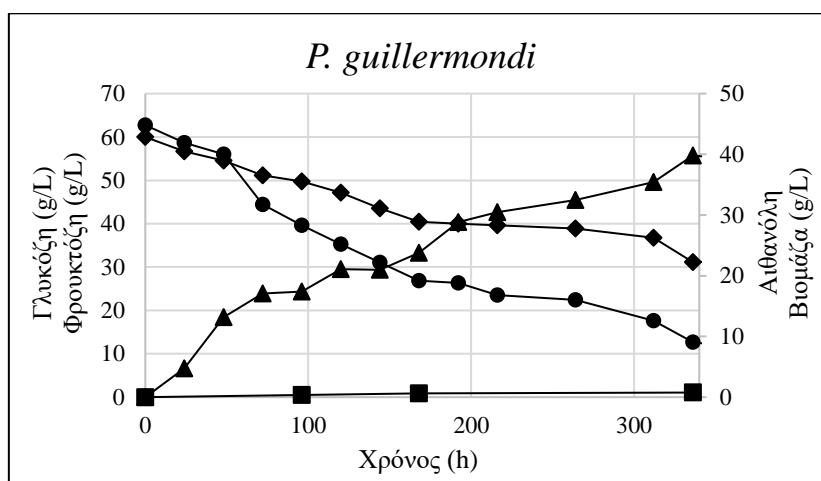
Σύμφωνα με την κινητική της αναερόβιας καλλιέργειας του *P. kluyveri* (Εικόνα 14), η αφομοίωση των 2 σακχάρων έγινε με πολύ αργό ρυθμό, με αποτέλεσμα τον τερματισμό της ζύμωσης στις 312 ώρες και υπόλοιπα γλυκόζης και φρουκτόζης 7 και 20 g/L, αντίστοιχα. Η παραγωγή αιθανόλης τη συγκεκριμένη χρονική στιγμή ήταν 42 g/L, η ξηρή βιομάζα 1,1 g/L, με ενδοκυτταρικό λίπος 1,3%. Η απόδοση της ζύμωσης έφτασε τα 0,45 g αιθανόλης/g καταναλωθέντων σακχάρων, ενώ η παραγωγικότητα ήταν ίση με 0,13 g/L/h.



Εικόνα 14 Διαγραμματική απεικόνιση της κινητικής κατανάλωσης γλυκόζης (●) και φρουκτόζης (◆), της παραγωγής βιομάζας (■) και αιθανόλης (▲) κατά την αναερόβια ασυνεχή ζύμωση του *P. kluyveri* σε κωνικές φιάλες.

- *Pichia guilliermondii*

Το στέλεχος *P. guilliermondii*, όπως και το προηγούμενο, όταν καλλιεργήθηκε σε αναερόβιο περιβάλλον, αδυνατούσε να αφομοιώσει τα σάκχαρα, με 9 και 22 g/L γλυκόζης και φρουκτόζης, αντίστοιχα, να παραμένουν στο υγρό της ζύμωσης, έπειτα από 336 h ζύμωσης (Εικόνα 15). Η μέγιστη παραγωγή βιοαιθανόλης έφτασε τα 40 g/L, με ολική ξηρή βιομάζα 1 g/L και ενδοκυτταρικό περιεχόμενο λιπιδίων ίσο με 1,4%. Η απόδοση της ζύμωσης έφτασε τα 0,45 g αιθανόλης/g καταναλωθέντων σακχάρων, ενώ η παραγωγικότητα το 0,1 g/L/h.



Εικόνα 15 Διαγραμματική απεικόνιση της κινητικής κατανάλωσης γλυκόζης (●) και φρουκτόζης (◆), της παραγωγής βιομάζας (■) και αιθανόλης (▲) κατά την αναερόβια ασυνεχή ζύμωση του *P. guillermondi* σε κωνικές φιάλες.

Πίνακας 3. Συγκενρωτικός συγκριτικός πίνακας από τα αποτελέσματα των κινητικών, που παρουσίασαν τα συγκεκριμένα στελέχη, καθώς αναπτύχθηκαν υπό αερόβιες και αναερόβιες συνθήκες.

Στέλεχος	Συνθήκες ζύμωσης	Time (h)	SCONS (g/L)	EtOH (g/L)	TDW (g/L)	Y _{EtOH/S} (g/g)	P _{EtOH} (g/L/h)
<i>K. marxianus</i> LPHB6	Αερόβια	48	114	49	7,5	0,43	1,0
	Αναερόβια	48	105	51	2,1	0,49	1,1
<i>S. cerevisiae</i> XS	Αερόβια	48	113	49	8,0	0,43	1,0
	Αναερόβια	48	102	49	1,3	0,48	1,0
<i>P. fermentans</i> 5265	Αερόβια	48	120	55	8,5	0,46	1,2
	Αναερόβια	48	120	49	1,3	0,41	1,0
<i>P. anomala</i>	Αερόβια	48	120	55	6,2	0,46	1,2
	Αναερόβια	120	100	48	2,0	0,48	0,4
<i>P. kluyveri</i>	Αερόβια	48	114	47	5,1	0,41	0,7
	Αναερόβια	312	93	42	1,1	0,45	0,1
<i>P. guillermondi</i>	Αερόβια	48	95	48	3,9	0,50	0,7
	Αναερόβια	336	89	40	1,0	0,45	0,1

Όπως παρατηρείται στο συγκενρωτικό συγκριτικό Πίνακα 3, όλα τα στελέχη δύνανται να αφομοιώσουν τις δύο κύριες πηγές άνθρακα, γλυκόζη – φρουκτόζη και να παράγουν αιθανόλη, με τους ρυθμούς αφομοίωσης να εξαρτώνται και από τις συνθήκες αερισμού της καλλιέργειας. Πιο συγκεκριμένα, η μέγιστη παραγωγή αιθανόλης επιτεύχθηκε, όσον αφορά τις αερόβιες ζυμώσεις, από τα στελέχη *Pichia anomala* και *P. fermentans* 5265, όπου η συγκέντρωση της αιθανόλης ανήλθε στα 55 g/L, ενώ υπό αναερόβιες ζυμώσεις απέδωσε μέγιστη συγκέντρωση αιθανόλης ίση με 51 g/L, εντός 48 ωρών ζύμωσης και στις τρεις περιπτώσεις. Οι συντελεστές μετατροπής των σακχάρων σε αιθανόλη ήταν ελαφρώς πιο υψηλοί στις καλλιέργειες υπό αναερόβιες συνθήκες (κατά

μέσο όρο 0,46 έναντι 0,44 g/g στις αερόβιες καλλιέργειες), καθώς ο άνθρακας όδευε κυρίως προς παραγωγή αιθανόλης, ενώ στις αερόβιες ζυμώσεις παρατηρήθηκαν σαφώς υψηλότερες τιμές ξηρής βιομάζας. Σε κάθε περίπτωση οι αποδόσεις κυμάνθηκαν σε υψηλά επίπεδα (περί το 88% του μέγιστου θεωρητικού συντελεστή απόδοσης =0,51 g/g), με τις υψηλότερες τιμές =0,50 g/g να παρατηρούνται από τον *P. guilliermondi* σε συνθήκες αερισμού, ενώ ο *K. marxianus* LPHB6 παρουσίασε τον υψηλότερο συντελεστή μετατροπής =0,49 g/g στις αναερόβιες ζυμώσεις. Το ίδιο στέλεχος στις ίδιες συνθήκες παρουσίασε και τη μέγιστη παραγωγικότητα ίση με 1,1 g/L/h τις πρώτες 48 h, ακολουθούμενο από τα *S. cerevisiae* XS και *P. fermentans* 5265 με 1,0 g/L/h, ενώ υπό συνθήκες αεροβίωσης, 1,2 g/L/h ήταν η παραγωγικότητα των στελεχών *Pichia anomala* και *P. fermentans* 5265, με τα *K. marxianus* LPHB6 και *S. cerevisiae* XS να ακολουθούν με 1,0 g/L/h. Η μέγιστη παραγωγή σε συνδυασμό με μέγιστη παραγωγικότητα αιθανόλης επιτεύχθηκε από τα στελέχη *P. anomala* και *P. fermentans* 5265 κατά τη ζύμωση υπό αερόβιες συνθήκες δεικνύοντας την υψηλή δυναμικότητα των ζυμών αυτών του γένους *Pichia* sp. να επιτελούν αλκοολική ζύμωση εξαιτίας της υψηλής συγκέντρωσης σακχάρων στο μέσο εν τη παρουσία οξυγόνου, ελέω του φαινομένου Crabtree. Μεταξύ του συνόλου των στελεχών, τα πλέον αδύναμα ιδίως όσον αφορά την παραγωγικότητα σε αιθανόλη ήταν τα *P. kluyveri* και *P. guilliermondi*, όπου ειδικά υπό αναερόβιες συνθήκες, η πλήρης αφομοίωση του υποστρώματος κατέστη αδύνατη. Αναφορικά με την παραγωγή και συσσώρευση των υπολοίπων μεταβολιτών, που αναλύθηκαν, η συσσώρευση λιπιδίων παρέμεινε σε πολύ χαμηλά επίπεδα (περί το 2% w/w), ενώ οι πολυσακχαρίτες κυμάνθηκαν σε ποσοστά 28-38% w/w επί της ξηρής βιομάζας.

4.3. Αναερόβιες ζυμώσεις σε υψηλότερο S_0

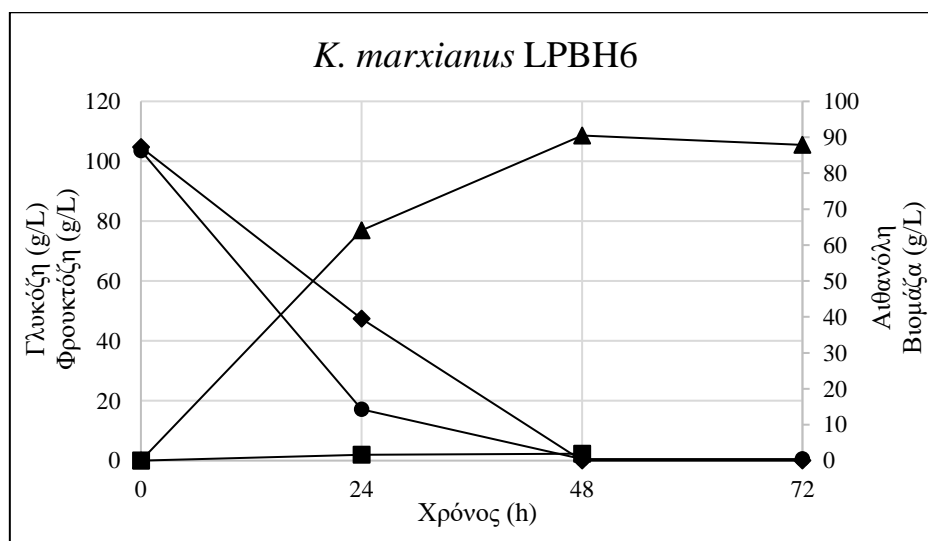
Οι ζύμες *K. marxianus* LPBH6 και *S. cerevisiae* XS καλλιιεργήθηκαν σε ακόμη υψηλότερη συγκέντρωση σακχάρων (≈ 200 g/L, ισόποσο συνυπόστρωμα γλυκόζης – φρουκτόζης) υπό αναερόβιες συνθήκες, λόγω των πολύ υψηλών συγκεντρώσεων αιθανόλης, της υψηλής απόδοσης και παραγωγικότητας αιθανόλης, που προέκυψε κατά την καλλιέργειά τους σε συνθήκες αναεροβίωσης, με τα αποτελέσματα να παρουσιάζονται στον Πίνακα 4.

Πίνακας 4. Συγκεντρωτικά ποσοτικά δεδομένα προερχόμενα από την κινητική ανάπτυξης επιλεγμένων ζυμών, έπειτα από καλλιέργεια σε ημι-καθορισμένα θρεπτικά συνυποστρώματα γλυκόζης-φρουκτόζης (≈ 100 g/L έκαστο), υπό αναερόβιες συνθήκες. Στον πίνακα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα κατά τη στιγμή μέγιστης παραγωγής αιθανόλης.

Στέλεχος	Time (h)	S_0 (g/L)	S_{CONS} (g/L)	TDW (g/L)	EtOH (g/L)	$Y_{EtOH/S}$ (g/g)	P_{EtOH} (g/L/h)
<i>K.marxianus</i> LPBH6	48	220	220	1,9	91	0,41	1,9
<i>S. cerevisiae</i> XS	48	190	190	3,3	95	0,50	2,0

- *Kluyveromyces marxianus* LPBH6

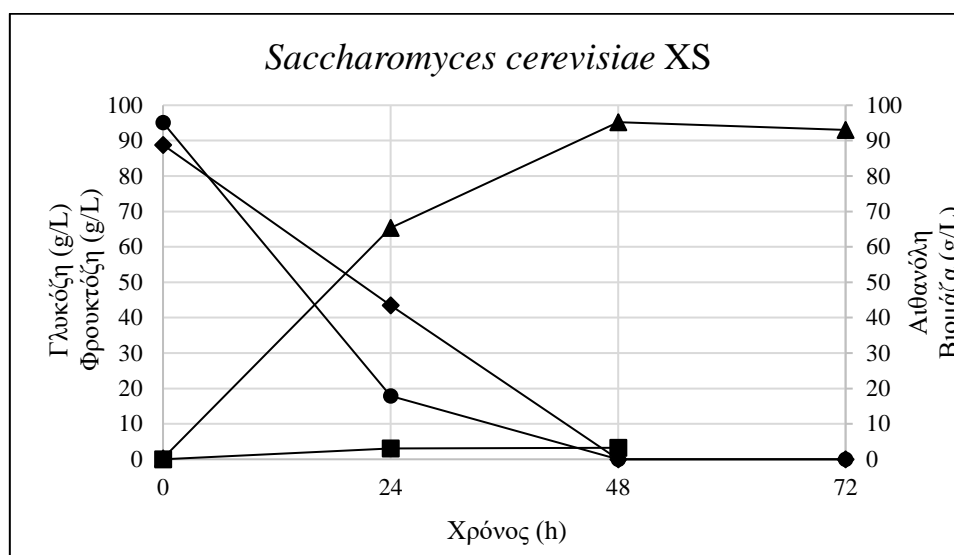
Το στέλεχος *K. marxianus* LPBH6, σύμφωνα με την Εικόνα 16, όταν καλλιιεργήθηκε σε υπόστρωμα αρχικής συγκέντρωσης περί τα 220 g/L, απέδωσε περί τα 91 g/L αιθανόλη, έπειτα από πλήρη αφομοίωση των σακχάρων εντός 48 h. Η ξηρή παραχθείσα βιομάζα ήταν 1,9 g/L, η απόδοση της ζύμωσης έφτασε τα 0,41 g αιθανόλης/g καταναλωθέντων σακχάρων, ενώ η παραγωγικότητα ήταν αρκετά υψηλή και ίση με 1,9 g/L/h.



Εικόνα 16 Διαγραμματική απεικόνιση της κινητικής κατανάλωσης γλυκόζης (●) και φρουκτόζης (◆), της παραγωγής βιομάζας (■) και αιθανόλης (▲) κατά την αναερόβια ασυνεχή ζύμωση του *K. marxianus* LPBH6 σε κωνικές φιάλες.

- *Saccharomyces cerevisiae* XS

Για τη ζύμη *S. cerevisiae* XS με βάση την κινητική στην Εικόνα 17, τόσο η γλυκόζη όσο και η φρουκτόζη (ολικά σάκχαρα ≈ 190 g/L) καταναλώθηκαν πλήρως εντός 48 h, αποδίδοντας 3,3 g/L βιομάζα, μέγιστη παραγωγή βιοαιθανόλης 95 g/L, με απόδοση 0,50 g αιθανόλης/g καταναλωθέντων σακχάρων, σχεδόν όση η μέγιστη θεωρητική, ενώ η παραγωγικότητα αιθανόλης ήταν περί τα 2,0 g/L/h.



Εικόνα 17 Διαγραμματική απεικόνιση της κινητικής κατανάλωσης γλυκόζης (●) και φρουκτόζης (◆), της παραγωγής βιομάζας (■) και αιθανόλης (▲) κατά την αναερόβια ασυνεχή ζύμωση του *S. cerevisiae* XS σε κωνικές φιάλες.

Πίνακας 5: Συγκενρωτικός συγκριτικός πίνακας από τα αποτελέσματα των κινητικών, που παρουσίασαν τα συγκεκριμένα στελέχη, καθώς αναπτύχθηκαν υπό αερόβιες και αναερόβιες συνθήκες.

Στέλεχος	Time (h)	S ₀ (g/L)	S _{CONS} (g/L)	TDW (g/L)	EtOH (g/L)	Y _{EtOH/S} (g/g)	P _{EtOH} (g/L/h)
<i>Kluyveromyces marxianus</i> LPHB6	48	120	105	2,1	51	0,49	1,1
	48	220	220	1,9	91	0,41	1,9
<i>Saccharomyces</i> XS	48	120	102	1,3	49	0,48	1,0
	48	190	190	3,3	95	0,50	2,0

Όπως φαίνεται από τον πίνακα, τόσο ο *K. marxianus* LPHB6, όσο και ο *S. cerevisiae* XS, σημείωσαν αρκετά υψηλές συγκεντρώσεις αιθανόλης, οι οποίες ανήλθαν σε αλκοολικούς τίτλους άνω του 9% (v/v), καθώς και πολύ υψηλές παραγωγικότητες (≈ 2 g/L/h), καταναλώνοντας πλήρως τα σάκχαρα σε 48 h. Στις ζυμώσεις αυτές ο *S. cerevisiae* XS κατάφερε να βιομετατρέψει το συνυπόστρωμα σε αιθανόλη με ακόμη υψηλότερα συντελεστή (Y_{EtOH/S} = 0,5 g/g, 98% του μέγιστου θεωρητικού συντελεστή).

4.4. Προφίλ μεθυλεστέρων λιπαρών οξέων του λίπους

Οι παραγωγοποιημένοι μεθυλεστέρες των λιπαρών οξέων, των λιπιδίων που εκχυλίστηκαν από τις ξηρές βιομάζας των ζυμών, όπως αυτές απομονώθηκαν μετά το πέρας των καλλιεργειών υπό αερόβιες συνθήκες, καθώς υπό αυτές τις συνθήκες παρήγαγαν υψηλότερες συγκεντρώσεις λιπιδίων, αναλύθηκαν μέσω αέριου χρωματογράφου και τα ποσοστιαία αποτελέσματα του προφίλ των λιπιδίων παρουσιάζονται στον Πίνακα 6.

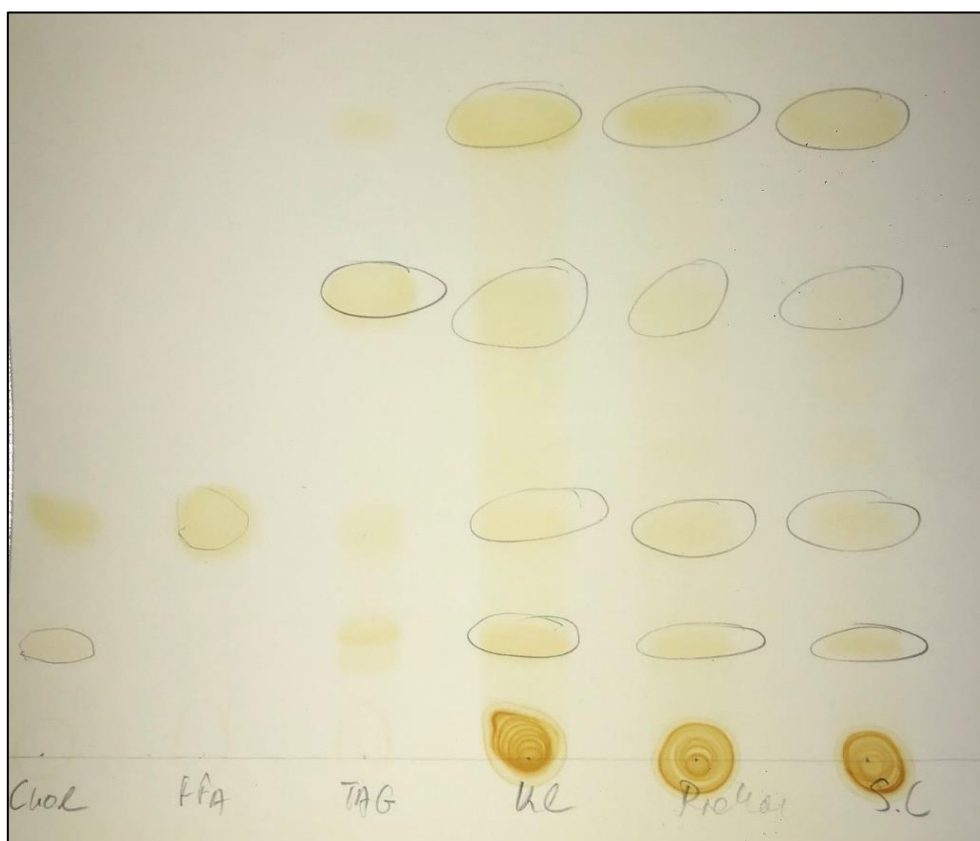
Πίνακας 6. Προφίλ μεθυλεστέρων των λιπαρών οξέων του μικροβιακού λίπους, κατά την καλλιέργεια των ζυμών υπό αερόβιες συνθήκες.

Στελέχος	Προφίλ μεθυλεστέρων λιπαρών οξέων (% w/w)								
	C14:0	C16:0	^{Δ9} C16:1	C18:0	^{Δ9} C18:1	^{Δ9,12} C18:2	SFA	UFA	PUFA
<i>P. fermentans</i> 5265	5,5	15,1	8,9	18,4	39,2	12,9	39,0	61,0	12,9
<i>S. cerevisiae</i> XS	5,8	21,6	6,9	12,3	45,5	13,4	39,7	65,8	13,4
<i>K. marxianus</i> LPBH6	3,1	15,3	6,1	16,2	41,8	16,0	34,6	63,9	16,0
<i>P. anomala</i>	5,9	12,8	7,5	17,0	37,9	18,7	35,7	64,1	18,7
<i>P. kluyveri</i>	1,9	20,2	7,2	9,3	47,7	13,7	31,4	68,6	13,7
<i>P. guilliermondii</i>	3,6	22,3	7,4	10,1	38,4	18,2	36,0	64,0	18,2

Με βάση τα αποτελέσματα, στην περίπτωση του στελέχους *P. fermentans* 5265, το κυριότερο λιπαρό οξύ ήταν το ελαϊκό οξύ με ποσοστό 39,2%, ενώ ακολούθησε το στεατικό με ποσοστό 18,4%. Τα λιπίδια της ζύμης *S. cerevisiae* XS αποτελούνταν κυρίως από ελαϊκό 45,5%, ακολουθούμενο από το παλμιτικό σε ποσοστό 21,6%. Η σύσταση του μικροβιακού λίπους του στελέχους *K. marxianus* LPBH6 είχε ως κυρίαρχο λιπαρό οξύ το ελαϊκό οξύ (41,8%), ακολουθούμενο από το στεατικό (16,2%). Από το προφίλ λιπαρών οξέων του λίπους του στελέχους *P. anomala* παρατηρείται ότι κυρίαρχο λιπαρό οξύ είναι το ελαϊκό (37,9%), ακολουθούμενο από το λινελαϊκό (18,7%), ενώ τα λιπίδια της *P. kluyveri* αποτελούνται από υψηλό ποσοστό ελαϊκού οξέος (47,7%), ενώ ακολούθησε το παλμιτικό οξύ με ποσοστό 20,2%. Τέλος, και στην περίπτωση των λιπιδίων της *P. guilliermondii*, κυρίαρχο ήταν το ελαϊκό οξύ (18:1) με ποσοστό 38,4%, ακολουθούμενο από το παλμιτικό οξύ (22,3%). Σε όλες τις περιπτώσεις τα λιπίδια ήταν πλούσια σε ακόρεστα λιπαρά οξέα (>60% w/w επί του συνόλου των λιπαρών οξέων).

4.5. Ανάλυση κλασμάτων ενδοκυτταρικού λίπους

Το μικροβιακό λίπος, που παράχθηκε από τις ζύμες *K. marxianus* LPBH6, *P. fermentans* 5265 και *S. cerevisiae* XS υπό αερόβιες συνθήκες, αναλύθηκε μέσω χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας (TLC) ως προς την ανίχνευση κλασμάτων στερολών, ελεύθερων λιπαρών οξέων και τριακυλογλυκερολών, έναντι προτύπων χοληστερόλης (Chol), ελεύθερων λιπαρών οξέων (FFAs) και τριακυλογλυκερολών (TGAs) με τα αποτελέσματα να παρουσιάζονται στην Εικόνα 18.



Εικόνα 18 Ανάλυση κλασμάτων των μικροβιακών λιπιδίων του *K. marxianus* LPBH6, *S. cerevisiae* XS και *P. fermentans* 5265 μέσω χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας.

Η ανάλυση των κλασμάτων του παραγόμενου λίπους έδειξε την παρουσία χοληστερόλης (εργοστερόλη στην περίπτωση του μικροβιακού λίπους ζυμών), ελεύθερων λιπαρών οξέων (FFAs) και τριγλυκεριδίων (TAG). Η κηλίδα που βρίσκεται πάνω από το ύψος της κηλίδας των TAG αφορά εστέρες χοληστερόλης, σύμφωνα με την ανάλυση λιπιδίων του Cyberlipid (<http://cyberlipid.gerli.com/>). Παράλληλα, γίνεται αντιληπτό το πολύ έντονο στίγμα των πολικών λιπιδίων στο σημείο ένεσης του δείγματος, δείγμα της υψηλής παρουσίας φωσφολιπιδίων, σφιγγολιπιδίων και λοιπών πολικών λιπόφιλων μορίων.

4.6. Συγκριτική αξιολόγηση αποτελεσμάτων

Σύμφωνα με τη διεθνή βιβλιογραφία (Πίνακας 7), μικροοργανισμοί όπως οι ζύμες παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στην παραγωγή βιοαιθανόλης, καθώς έχουν τη δυνατότητα να ζυμώσουν ένα μεγάλο εύρος σακχαρούχων υποστρωμάτων προς αιθανόλη. Οι ζύμες χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία λόγω των πολύ σημαντικών ιδιοτήτων μεταξύ των οποίων είναι η υψηλή απόδοση σε αιθανόλη (>90% της μέγιστης θεωρητικής τιμής θεωρητική απόδοση), η ανθεκτικότητά τους στην αιθανόλη και η υψηλή παραγωγικότητα (>1,0 g/L/h). Συγκεκριμένα στελέχη ζυμών, όπως του γένους *Pichia* sp., ο *S. cerevisiae*, ο *K. marxianus*, ο *K. fragilis* (Kf1) αποτελούν ικανοποιητικούς παραγωγούς αιθανόλης, μέσω ζύμωσης με διαφορετικά υποστρώματα σακχάρων, ακόμη και σε πιο αντίξοες συνθήκες ζύμωσης, όπως θα αναπτυχθεί στη συνέχεια.

Σε έρευνα, που πραγματοποιήθηκε από τους Kim et al. (2014), σημειώθηκε μία από τις υψηλότερες συγκεντρώσεις αιθανόλης που ήταν ίση με 96,9 g/L με παραγωγικότητα 3,46 g/L/h. Η ζύμωση πραγματοποιήθηκε σε βιοαντιδραστήρα ημι-συνεχούς λειτουργίας με τη χρήση ενός άγριου στελέχους ζύμης, του *Saccharomyces cerevisiae* KL17 σε θρεπτικό υπόστρωμα γαλακτόζης και γλυκόζης. Το στέλεχος έχει τη δυνατότητα να καταναλώσει ταυτόχρονα τόσο τη γλυκόζη όσο και τη γαλακτόζη. Σε έρευνα των Demiray et al. (2020), το στέλεχος ζύμης *K. marxianus* μελετήθηκε ως προς την ικανότητα παραγωγής αιθανόλης σε λιγνοκυτταρινούχο υπόστρωμα από φλοιό ροδιού, καθώς σε σχέση με τον *S. cerevisiae* έχει το πλεονέκτημα να καταβολίζει και πεντόζες, εκτός από εξόζες. Η ζύμωση πραγματοποιήθηκε με αρχική συγκέντρωση σακχάρων υποστρώματος 100 g/L σε κωνικές φιάλες των 100 mL με ενεργό όγκο 50 mL, με τη μέγιστη παραγωγή αιθανόλης να ανέρχεται στα 7,2 g/L, με παραγωγικότητα ίση με 0,60 g/L/h και απόδοση $Y_{EtOH/S}$ ίση με 0,48 g/g.

Οι Basa et al. (2022) σε μελέτη που πραγματοποίησαν, χρησιμοποίησαν το πρόσφατα απομονωμένο στέλεχος *Saccharomyces cerevisiae* LMBF Y-54, για ζύμωση προς παραγωγή αιθανόλης με υπόστρωμα μούστο ποικιλίας Ασύρτικου και Μαυροτράγανου σταφυλιού (γλυκόζη και φρουκτόζη). Οι ζυμώσεις πραγματοποιήθηκαν σε στατική κατάσταση σε φιάλες Duran (1 L), υπό συνθήκες οινοποίησης, αρχικά υπό μικροαναερόφιλη ζύμωση, που συνεχίστηκε σε αυτοαναερόβια μετά την παραγωγή CO₂. Η μέγιστη παραγωγή αιθανόλης ήταν στην περίπτωση του Ασύρτικου, όπου έφτασε τα 106,3 g/L, ενώ στην περίπτωση του Μαυροτράγανου η αιθανόλη έφτασε τα

99,7 g/L. Ο συντελεστής απόδοσης παραγωγής αιθανόλης προς τα συνολικά καταναλωθέντα σάκχαρα ήταν 0,50 και 0,48 g/g για το Ασύρτικο και το Μαυροτράγανο, αντίστοιχα. Παράλληλα οι Phukoetphim et al. (2019), πραγματοποίησαν μελέτη παραγωγής αιθανόλης με το στέλεχος *Saccharomyces cerevisiae* NP01, μέσω ζύμωσης σε υπόστρωμα χυμού σόργου, που είναι πλούσιος σε γλυκόζη, φρουκτόζη και σουκρόζη. Η μέγιστη παραγωγή αιθανόλης σε βιοαντιδραστήρα κλειστού τύπου έφτασε τα 134,3 g/L, με απόδοση 0,50 g αιθανόλης/g καταναλωθέντων σακχάρων.

Επιπλέον, οι Dourou et al. (2021) αξιοποίησαν τα απόβλητα ροδιού πραγματοποιώντας ζυμώσεις κλειστού τύπου σε κωνικές φιάλες με το στέλεχος *Saccharomyces cerevisiae* υπό αναερόβιες συνθήκες. Η μέγιστη συγκέντρωση αιθανόλης ήταν ίση με 12,5 g/L με αρχική συγκέντρωση σακχάρων ίση με 37 g/L. Οι Yu et al. (2013), εξέτασαν την παραγωγή αιθανόλης από υδρόλυμα πούλπας καρότου με τη χρήση του μικροοργανισμού *Kluyveromyces marxianus* μέσω ταυτόχρονης σακχαροποίησης και ζύμωσης (SSF). Η μέγιστη παραγωγή αιθανόλης ήταν 37 g/L και επιτεύχθηκε με συγκέντρωση πούλπας 20% w/v. Τέλος, το στέλεχος *K. marxianus* URM 7404 έχει αξιολογηθεί ως προς την παραγωγή αιθανόλης σε ζύμωση κλειστού τύπου με υπόστρωμα ορού γάλακτος σε βιοαντιδραστήρα. Η μέγιστη παραγωγή αιθανόλης ήταν 28 g/L με αρχική συγκέντρωση γαλακτόζης 60 g/L (Murari et al., 2019).

Πίνακας 7: Συγκεντρωτικά αποτελέσματα περί της παραγωγής βιοαιθανόλης από διάφορα στελέχη ζυμών σύμφωνα με τη διεθνή βιβλιογραφία.

Στέλεχος	Υπόστρωμα	Συνθήκες ζύμωσης	Τύπος ζύμωσης	Αιθανόλη (g/L)	Πηγή
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> KL17	Γαλακτόζη και γλυκόζη	30 °C, 28h, 200 rpm	Βιοαντιδραστήρας Ημι-συνεχούς λειτουργίας	96,9	Kim et al., 2014
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	Φλοιός ροδιού	30 °C, 24h, 100 rpm	Erlenmeyer flasks 100 mL, Κλειστού τύπου (ενεργός όγκος 50 mL)	7,2	Demiray et al., 2020
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> NP01	Χυμός σόργου (Γλυκόζη, Σουκρόζη, Φρουκτόζη)	Αερόβια,	Βιοαντιδραστήρας κλειστού τύπου, V=1L	134,3	Phukoetphim et al., 2019
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Απόβλητα ροδιού	Αναερόβια	Erlenmeyer flasks, Κλειστού τύπου	12,5	Dourou et al., 2021
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	Υδρόλυμα πούλπας καρότου (Γλυκόζη, Σουκρόζη, Φρουκτόζη)		SSF	37,0	Yu et al., 2013
<i>Kluyveromyces marxianus</i> UR M 7404	Ορός γάλακτος (Γαλακτόζη)	Αερόβια	Βιοαντιδραστήρας, κλειστού τύπου	28,0	Murari et al., 2019

<i>Saccharomyces cerevisiae</i> LMBF Y-54	Μούστος Ασύρτικου (Γλυκόζη και φρουκτόζη)	Αναερόβια	Κλειστού τύπου, Duran 1L	106,3	Basa et al., 2022
	Μούστος Μαυροτράγανου (Γλυκόζη και φρουκτόζη)	Αναερόβια		99,7	
<i>Kluyveromyces marxianus</i> LPBH6	Γλυκόζη και Φρουκτόζη	Αναερόβια	Κλειστού τύπου, Duran 100 mL	91,0	Παρούσα μελέτη
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> XS				95,0	

5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα μελέτη αξιολογήθηκαν νέα, πρόσφατα απομονωμένα στελέχη ζυμών (*Saccharomyces cerevisiae* XS, *Pichia fermentans* 5265, *Pichia anomala*, *Pichia kluyveri*, *Pichia guillermondi*, *Kluyveromyces marxianus* LPBH6) ως προς την ικανότητά τους να αυξάνονται σε υπόστρωμα γλυκόζης και φρουκτόζης υπό αερόβιες και αναερόβιες συνθήκες και να παράγουν μεταβολίτες, με κύρια αυτών τη αιθανόλη, καθώς και μικροβιακά λιπίδια και ενδοπολυσακχαρίτες. Οι μικροβιακές ζυμώσεις που πραγματοποιήθηκαν υπό αερόβιες, όσο και υπό αναερόβιες συνθήκες σε αρχική συγκέντρωση σακχάρων ίση με 120 g/L οδήγησαν σε πλήρη αφομοίωση των σακχάρων για το σύνολο των μικροοργανισμών, ενώ στις καλλιέργειες αναεροβίωσης, ο ρυθμός αφομοίωσης των σακχάρων ήταν ιδιαίτερα χαμηλός στις περιπτώσεις των στελεχών *P. anomala*, *P. kluyveri* και *P. guuillermondi*, αφήνοντας υπόλειμμα σακχάρων και κυρίως φρουκτόζης στο υγρό της ζύμωσης, έπειτα από πολύ παρατεταμένες ζυμώσεις. Παρατηρώντας τις κινητικές στις περισσότερες των περιπτώσεων γίνεται αντιληπτό ότι η γλυκόζη καταναλώνεται πιο γρήγορα και πιο εύκολα από τους μικροοργανισμούς σε σχέση με τη φρουκτόζη.

Τα παραπάνω πειραματικά δεδομένα, δεικνύουν ότι όλα τα εξεταζόμενα στελέχη, ακόμη και τα ανήκοντα στο γένος *Pichia* sp. είναι θετικά στο φαινόμενο Crabtree, δηλαδή ικανά να βιομετατρέψουν τις διαθέσιμες πηγές άνθρακα σε αιθανόλη, ακόμη και υπό αερόβιες συνθήκες, εφόσον η συγκέντρωση των διαθέσιμων σακχάρων είναι σε υψηλά επίπεδα. Τα στελέχη του γένους *Pichia* sp. και συγκεκριμένα τα *P. fermentans* 5265 και *P. anomala* επέδειξαν την υψηλότερη παραγωγή και παραγωγικότητα αιθανόλης, υπό αερόβιες συνθήκες, αποτελώντας πολύ αξιόλογες εναλλακτικές μικροοργανισμών παραγωγών βιοαιθανόλης, με συγκρίσιμα αποτελέσματα σε σχέση με το πλέον διαδεδομένο είδος *Saccharomyces cerevisiae*. Στις αερόβιες ζυμώσεις, αν και σημαντικό μέρος του διαθέσιμου άνθρακα στρέφεται προς τη σύνθεση βιομάζας, φαίνεται πως τα σαφώς περισσότερα κύτταρα ενισχύουν το ρυθμό βιομετατροπής των σακχάρων σε βιοαιθανόλη, αποδίδοντας πολύ υψηλές παραγωγικότητες.

Όσον αφορά τα μικροβιακά λιπίδια, τα στελέχη ζύμης που αξιολογήθηκαν σημείωσαν αρκετά χαμηλά ποσοστά ενδοκυτταρικού λίπους, μικρότερων του 5%, ενώ στις αερόβιες ζυμώσεις παρήχθη περισσότερο λίπος από ότι στις αναερόβιες, ως φυσικό

επακόλουθο της υψηλότερης παραγωγής βιομάζας σε συνθήκες αεροβίωσης. Τα λιπίδια αυτά, κυρίες υπό μορφή πολικών μορίων (φωσφολιπίδια, κ.α.), ήταν πλούσια ακόρεστα λιπαρά οξέα, με κυρίαρχο το ελαϊκό οξύ. Οι πολυσακχαρίτες κυμάνθηκαν σε ποσοστά περί το 30% w/w επί της ξηρής βιομάζας, ως μακρομόρια απαραίτητα για την κυτταρική ανάπτυξη. Αναερόβιες ζυμώσεις σε υψηλότερη συγκέντρωση σακχάρων οδήγησαν σε υψηλές τιμές παραχθείσας αιθανόλης, συγκρίσιμες με τις καλύτερες τιμές της διεθνούς βιβλιογραφίας, αποδεικνύοντας και την μεγάλη αλκοολοανθεκτικότητα των ζυμών, που εξετάστηκαν. Μελλοντικά, τα υποσχόμενα στελέχη ζύμης, όπως αυτά που ανήκουν στο γένος *Pichia* sp., θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για την αξιοποίηση σχετικά φθηνών πηγών άνθρακα, ιδίως πεντοζών με προέλευση από λιγνοκυτταρινούχα υποστρώματα, προς παραγωγή αειφόρων προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας όπως είναι η βιοκάυσιμη αιθανόλη, μέσω βιοδιεργασιών ημι-συνεχούς καλλιέργειας, για μεγιστοποίηση της παραγωγικότητας.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Σουφλερός Ε. (2009). Οινολογία: Επιστήμη και τεχνολογία, Τόμος 1.
- Attfield, P. V. (1997). Stress tolerance: the key to effective strains of industrial baker's yeast. *Nature biotechnology*, *15*, 1351-1357.
- Azhar, S. H. M., Abdulla, R., Jambo, S. A., Marbawi, H., Gansau, J. A., Faik, A. A. M., & Rodrigues, K. F. (2017). Yeasts in sustainable bioethanol production: A review. *Biochemistry and biophysics reports*, *10*, 52-61.
- Balat, M. (2011). Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: a review. *Energy conversion and management*, *52*, 858-875.
- Balat, M., Balat, H., & Öz, C. (2008). Progress in bioethanol processing. *Progress in energy and combustion science*, *34*, 551-573.
- Basa, K., Papanikolaou, S., Dimopoulou, M., Terpou, A., Kallithraka, S., & Nychas, G. J. E. (2022). Trials of commercial-and wild-type *Saccharomyces cerevisiae* strains under aerobic and microaerophilic/anaerobic conditions: Ethanol production and must fermentation from grapes of Santorini (Greece) native varieties. *Fermentation*, *8*, 249.
- Basso, L. C., De Amorim, H. V., De Oliveira, A. J., & Lopes, M. L. (2008). Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil. *FEMS yeast research*, *8*, 1155-1163.
- Bellou, S., Triantaphyllidou, I. E., Aggeli, D., Elazzazy, A. M., Baeshen, M. N., & Aggelis, G. (2016). Microbial oils as food additives: recent approaches for improving microbial oil production and its polyunsaturated fatty acid content. *Current opinion in Biotechnology*, *37*, 24-35.
- Bogdanov, M., Dowhan, W., & Vitrac, H. (2014). Lipids and topological rules governing membrane protein assembly. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, *1843*, 1475-1488.
- Botham, P. A., & Ratledge, C. (1979). A biochemical explanation for lipid accumulation in *Candida* 107 and other oleaginous micro-organisms. *Microbiology*, *114*, 361-375.
- Dashko, S., Zhou, N., Compagno, C., & Piškur, J. (2014). Why, when, and how did yeast evolve alcoholic fermentation? *FEMS yeast research*, *14*, 826-832.
- Davies, R. J., & Holdsworth, J. E. (1992). Synthesis of lipids in yeasts: Biochemistry, physiology and production. *Adv. Appl. Lipid Res*, *1*.
- Demiray, E., Ertuğrul Karatay, S., & Dönmez, G. (2020). Efficient bioethanol production from pomegranate peels by newly isolated *Kluyveromyces marxianus*. *Energy Sources, Part A: Recovery, Utilization, and Environmental Effects*, *42*, 709-718.
- Diamantopoulou, P., Papanikolaou, S., Kapoti, M., Komaitis, M., Aggelis, G., & Philippoussis, A. (2012). Mushroom polysaccharides and lipids synthesized in liquid agitated and static cultures. Part I: Screening various mushroom species. *Applied biochemistry and biotechnology*, *167*, 536-551.

- Díaz-Montaño, D. M. (2013). Continuous agave juice fermentation for producing bioethanol. *Biomass now-sustainable growth and use*, 209-230.
- Dien, B. S., Cotta, M. A., & Jeffries, T. W. (2003). Bacteria engineered for fuel ethanol production: current status. *Applied microbiology and biotechnology*, 63, 258-266.
- Dourou, M., Economou, C. N., Aggeli, L., Janák, M., Valdés, G., Elezi, N., Kakavas, D., Papageorgiou, T., Lianou, A., Vayenas, D.V., Certik, M., & Aggelis, G. (2021). Bioconversion of pomegranate residues into biofuels and bioactive lipids. *Journal of Cleaner Production*, 323, 129193.
- Faria-Oliveira, F., Puga, S., & Ferreira, C. (2013). Yeast: world's finest chef. In *Food Industry*. IntechOpen, 519-547.
- Fickers, P., Benetti, P. H., Waché, Y., Marty, A., Mauersberger, S., Smit, M. S., & Nicaud, J. M. (2005). Hydrophobic substrate utilisation by the yeast *Yarrowia lipolytica*, and its potential applications. *FEMS yeast research*, 5, 527-543.
- 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, 497-509.
- Jin, Y. L., & Speers, R. A. (1998). Flocculation of *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Research International*, 31, 421-440.
- Kasavi, C., Finore, I., Lama, L., Nicolaus, B., Oliver, S. G., Oner, E. T., & Kirdar, B. (2012). Evaluation of industrial *Saccharomyces cerevisiae* strains for ethanol production from biomass. *Biomass and Bioenergy*, 45, 230-238.
- Kim, J. H., Ryu, J., Huh, I. Y., Hong, S. K., Kang, H. A., & Chang, Y. K. (2014). Ethanol production from galactose by a newly isolated *Saccharomyces cerevisiae* KL17. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 37, 1871-1878.
- Kresge, N., Simoni, R. D., & Hill, R. L. (2005). Otto Fritz Meyerhof and the elucidation of the glycolytic pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 280, e3.
- Kumar, A., Singh, L. K., & Ghosh, S. (2009). Bioconversion of lignocellulosic fraction of water-hyacinth (*Eichhornia crassipes*) hemicellulose acid hydrolysate to ethanol by *Pichia stipitis*. *Bioresource technology*, 100, 3293-3297.
- Lane, M. M., & Morrissey, J. P. (2010). *Kluyveromyces marxianus*: a yeast emerging from its sister's shadow. *Fungal biology reviews*, 24, 17-26.
- 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 microagal fermentation. *Bioresour. Technol.*, 101, 6745–6750.
- Mavrommati, M., Daskalaki, A., Papanikolaou, S., & Aggelis, G. 2021. Adaptive laboratory evolution principles and applications in industrial biotechnology. *Biotechnology Advances*, 54, 107795.
- Miller G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* 31, 426-428.

- Morgunov, I. G., Solodovnikova, N. Y., Sharyshev, A. A., Kamzolova, S. V., & Finogenova, T. V. (2004). Regulation of NAD⁺-Dependent isocitrate dehydrogenase in the citrate producing yeast *Yarrowia lipolytica*. *Biochemistry (Moscow)*, *69*, 1391-1398.
- Müllner H, & Daum G. (2004), 'Dynamics of neutral lipid storage in yeast'. *Acta Biochim Polonica*, *51*, 323-347.
- Murari, C. S., Machado, W. R. C., Schuina, G. L., & Del Bianchi, V. L. (2019). Optimization of bioethanol production from cheese whey using *Kluyveromyces marxianus* URM 7404. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, *20*, 101182.
- 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.
- Papanikolaou, S., & Aggelis, G. (2009). Biotechnological valorisation of biodiesel derived glycerol waste through production of single cell oil and citric acid by *Yarrowia lipolytica*. *Lipid Technology*, *21*, 83-87.
- Papanikolaou, S., & Aggelis, G. (2010). *Yarrowia lipolytica*: A model microorganism used for the production of tailor-made lipids. *European Journal of Lipid Science and Technology*, *112*, 639-654.
- 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*, 1031-1051.
- Passoth, V., Fredlund, E., Druvefors, U. Ä., & Schnürer, J. (2006). Biotechnology, physiology and genetics of the yeast *Pichia anomala*. *FEMS yeast research*, *6*, 3-13.
- Phukoetphim, N., Chan-u-tit, P., Laopaiboon, P., & Laopaiboon, L. (2019). Improvement of bioethanol production from sweet sorghum juice under very high gravity fermentation: Effect of nitrogen, osmoprotectant, and aeration. *Energies*, *12*, 3620.
- Ratledge, C. (1991). Microorganisms for lipids. *Acta Biotechnologica*, *11*, 429-438.
- Ratledge, C., & Wynn, J. P. (2002). The biochemistry and molecular biology of lipid accumulation in oleaginous microorganisms. *Advances in Applied Microbiology*, *51*, 1-52.
- Sarris, D., & Papanikolaou, S. (2016). Biotechnological production of ethanol: biochemistry, processes and technologies. *Engineering in life sciences*, *16*, 307-329.
- Staniszewski, M., Kujawski, W., & Lewandowska, M. (2007). Ethanol production from whey in bioreactor with co-immobilized enzyme and yeast cells followed by pervaporative recovery of product—Kinetic model predictions. *Journal of Food Engineering*, *82*, 618-625.
- Stewart, G. G. (2014). SACCHAROMYCES| *Saccharomyces cerevisiae*.

- Sutjahjo, D. H. (2018). The characteristics of bioethanol fuel made of vegetable raw materials. In *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 296, 012019. IOP Publishing.
- Vicente, J., Calderón, F., Santos, A., Marquina, D., & Benito, S. (2021). High potential of *Pichia kluyveri* and other *Pichia* species in wine technology. *International Journal of Molecular Sciences*, 22, 1196.
- Wang, W., Xue, C., & Mao, X. (2020). Radioprotective effects and mechanisms of animal, plant and microbial polysaccharides. *International journal of biological macromolecules*, 153, 373-384.
- Yu, C. Y., Jiang, B. H., & Duan, K. J. (2013). Production of bioethanol from carrot pomace using the thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus*. *Energies*, 6, 1794-1801.
- Zabed, H., Faruq, G., Sahu, J. N., Azirun, M. S., Hashim, R., & Nasrulhaq Boyce, A. (2014). Bioethanol production from fermentable sugar juice. *The scientific world journal*, 2014.
- Zamora, F. (2009). Biochemistry of alcoholic fermentation. In: *Wine chemistry and biochemistry*, 3-26. Springer, New York, NY.
- Zhang, L., Zhao, H., Gan, M., Jin, Y., Gao, X., Chen, Q., Guan, J., & Wang, Z. (2011). Application of simultaneous saccharification and fermentation (SSF) from viscosity reducing of raw sweet potato for bioethanol production at laboratory, pilot and industrial scales. *Bioresource technology*, 102, 4573-4579.