



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

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ  
ΕΠΙΣΤΗΜΗ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ**

**Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία**

Μελέτη της παραγωγής κυτταρικής μάζας και αιθυλικής αλκοόλης κατά την ανάπτυξη νέων στελεχών ζυμών σε ζυμώσεις βυθού

**Ειρήνη Μ. Προβατά**

Επιβλέπων καθηγητής  
Σεραφείμ Παπανικολάου, Καθηγητής ΓΠΑ

**ΑΘΗΝΑ  
2023**

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

**Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία**

Μελέτη της παραγωγής κυτταρικής μάζας και αιθυλικής αλκοόλης κατά την ανάπτυξη νέων στελεχών ζυμών σε ζυμώσεις βυθού

“Research of the production of cellular mass and ethyl alcohol during the growth of new strains of yeasts in bottom fermentations”

**Ειρήνη Μ. Προβατά**

Εξεταστική Επιτροπή:

Σεραφείμ Παπανικολάου, Καθηγητής ΓΠΑ (επιβλέπων)

Σταματίνα Καλλίθρακα, Καθηγήτρια ΓΠΑ

Μαρία Δημοπούλου, Επίκουρη Καθηγήτρια ΠΑΔΑ

## Μελέτη της παραγωγής κυτταρικής μάζας και αιθυλικής αλκοόλης κατά την ανάπτυξη νέων στελεχών ζυμών σε ζυμώσεις βουθού

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

### ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στη συγκεκριμένη μελέτη διερευνήθηκε η ικανότητα παραγωγής κυτταρικής μάζας (βιομάζας) και αιθυλικής αλκοόλης από non-*Saccharomyces* ζύμες. Συγκεκριμένα οι υπό μελέτη ζύμες ήταν η *Metschnikowia pulcherrima* καθώς και προσφάτως απομονωμένα νέα στελέχη ζυμών των ειδών *Pichia manshurica*, *Trigonopsis californica*, *Zygosaccharomyces bailii* και *Priceomyces carsonii*. Οι ζύμες αναπτύχθηκαν σε υγρή καλλιέργεια, που περιείχε ως πηγή άνθρακα εμπορική γλυκόζη και εμπορική φρουκτόζη. Τα πειράματα διεξάχθηκαν υπό αερόβιες και αναερόβιες συνθήκες σε κυμαινόμενες και υψηλές συγκεντρώσεις σακχάρων. Συγκεκριμένα, το υγρό θρεπτικό μέσο στο οποίο πραγματοποιήθηκαν οι ζυμώσεις περιείχε: 50 g/L – 200 g/L γλυκόζη και 50 g/L – 200 g/L φρουκτόζη (με ίσες ποσότητες γλυκόζης και φρουκτόζης). Επιπλέον, στα πλαίσια της συγκεκριμένης μελέτης διερευνήθηκε και η ικανότητα παραγωγής λιπιδίων από τις προαναφερόμενες ζύμες.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης μελέτης οι ζύμες *Metschnikowia pulcherrima*, *Trigonopsis californica* και *Zygosaccharomyces bailii* είναι θετικές στο φαινόμενο Crabtree. Αντιθέτως, οι ζύμες *Pichia manshurica* και *Priceomyces carsonii* είναι αρνητικές στο φαινόμενο Crabtree. Επίσης, οι ζύμες *Trigonopsis californica* και *Zygosaccharomyces bailii* είναι θετικές στο φαινόμενο Pasteur, ενώ οι ζύμες *Metschnikowia pulcherrima*, *Pichia manshurica* και *Priceomyces carsonii* είναι αρνητικές στο φαινόμενο Pasteur. Τέλος, όλες οι ζύμες παρήγαγαν μικρές ποσότητες λιπιδίων είτε υπό αερόβιες είτε υπό αναερόβιες συνθήκες.

**Επιστημονική περιοχή:** Αιθυλική αλκοόλη

**Λέξεις κλειδιά:** Αιθυλική αλκοόλη, Φαινόμενο Crabtree, Φαινόμενο Pasteur, *Metschnikowia pulcherrima*, *Trigonopsis californica*, *Zygosaccharomyces bailii*, *Pichia manshurica*, *Priceomyces carsonii*

## Research of the production of cellular mass and ethyl alcohol during the growth of new strains of yeasts in bottom fermentations

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

### ABSTRACT

In this study the ability of the production of cellular mass (biomass) and ethyl alcohol from non-*Saccharomyces* yeasts was investigated. Specifically, the yeast that are under research were *Metschnikowia pulcherrima* as well as new strains of yeasts that were recently isolated of the species *Pichia manshurica*, *Trigonopsis californica*, *Zygosaccharomyces bailii* και *Priceomyces carsonii*. Yeasts were grown in liquid culture, which contained commercial glucose and commercial fructose as carbon source. Experiments were carried out under aerobic and anaerobic conditions at fluctuating and high concentrations of sugars. Specifically, the liquid medium in which fermentations were carried out contained 50 g/L – 200 g/L glucose and 50 g/L – 200 g/L fructose (with equal amounts of glucose and fructose). In addition, within the framework of this study the ability of lipid's production from the above yeasts was investigated too.

According to the results of this specific study yeasts such as *Metschnikowia pulcherrima*, *Trigonopsis californica* and *Zygosaccharomyces bailii* are Crabtree-positive yeasts. On the contrary, yeast such as *Pichia manshurica* and *Priceomyces carsonii* are Crabtree-negative yeasts. Furthermore, yeasts such as *Trigonopsis californica* and *Zygosaccharomyces bailii* are Pasteur positive, while yeasts such as *Metschnikowia pulcherrima*, *Pichia manshurica* and *Priceomyces carsonii* are Pasteur negative yeasts. Finally, all the yeasts produced small amounts of lipids under aerobic and anaerobic conditions.

**Scientific area:** Ethyl alcohol

**Keywords:** Ethyl alcohol, Crabtree effect, Pasteur effect, *Metschnikowia pulcherrima*, *Trigonopsis californica*, *Zygosaccharomyces bailii*, *Pichia manshurica*, *Priceomyces carsonii*

## **Ευχαριστίες**

Η μεταπτυχιακή διπλωματική μου εργασία πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων, στο Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών. Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Σεραφείμ Παπανικολάου, ο οποίος συμφώνησε να εκπονήσω τη διπλωματική μου εργασία στο Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων για τη συνεργασία του και για το θέμα το οποίο μου ανέθεσε να ασχοληθώ στην παρούσα μελέτη. Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω την κ. Σταματίνα Καλλίθρακα και την κ. Μαρία Δημοπούλου που δέχτηκαν να οριστούν ως μέλη της τριμελούς επιτροπής για τη συγκεκριμένη διπλωματική εργασία. Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω την κ. Ουρανία Καλαντζή που αποτελεί μέλος ΕΔΙΠ στο Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων και την κ. Μαρία Σανιδά που είναι υποψήφια διδάκτωρ του τμήματος Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου, για τη συνεργασία τους και για τις χρήσιμες πληροφορίες που παρείχαν τόσο για το θεωρητικό όσο και για το πειραματικό μέρος των διαδικασιών που πραγματοποιήθηκαν στα πλαίσια της συγκεκριμένης διπλωματικής εργασίας. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω και το υπόλοιπο εργαστηριακό προσωπικό για τις χρήσιμες πληροφορίες και τη βοήθεια τους για τη διεξαγωγή των πειραματικών διαδικασιών της παρούσας μελέτης.

Με την άδειά μου, η παρούσα εργασία ελέγχθηκε από την Εξεταστική Επιτροπή μέσα από λογισμικό ανίχνευσης λογοκλοπής που διαθέτει το ΓΠΑ και διασταυρώθηκε η εγκυρότητα και η πρωτοτυπία της.

## **ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ**

ACL: ATP citrate lyase

ADP: adenosine diphosphate

acetyl-CoA: acetyl coenzyme A

AMP: adenosine monophosphate

AR: aldose reductase

ATP: adenosine triphosphate

1,3-BGP: 1,3-biphosphoglycerate

CE: conversion efficiency

cGPDH: NAD<sup>+</sup> -dependent GPDH

DHAP: dixydroxyacetone phosphate

EtOH: ethanol

F1, 6BP: fructose-1,6-bisphosphate

FAD: flavin adenine dinucleotide

F6P: fructose-6-phosphate

GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

G3P: glycerol-3-phosphate

G6P: glucose-6-phosphate

G3PP: G3P phosphatase

GPDH: G3P-dehydrogenase

LAD: L-arabitol-4-dehydrogenase

LXR: L-xylulose reductase

NAD: Nicotinamide adenine dinucleotide

NAD<sup>+</sup> - ICDH: NAD<sup>+</sup> icocitrate dehydrogenase

PEP: phosphoenolpyruvate

PFK: phosphofructokinase

PK: pyruvate kinase

PPP: pentose phosphate pathway

SCOs: single cell oils

TAG: triacylglycerol

TPP: thiamine pyrophosphate

## Περιεχόμενα

|  |    |
|--|----|
| ΠΕΡΙΛΗΨΗ .....   | 3  |
| ABSTRACT .....   | 4  |
| Ευχαριστίες .....  | 5  |
| ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ .....   | 6  |
| ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ .....   | 10 |
| ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ .....  | 11 |
| 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ .....  | 12 |
| 1.1. Βιοαιθανόλη .....   | 12 |
| 1.2. Ζύμες .....   | 15 |
| 1.2.1. Φαινόμενο Pasteur .....   | 15 |
| 1.2.2. Φαινόμενο Crabtree .....  | 16 |
| 1.2.3. Χαρακτηριστικά ζυμών .....  | 17 |
| 1.2.4. Παραγωγή αιθανόλης με τη χρήση ζυμών .....  | 20 |
| 1.2.5. Παράγοντες που επηρεάζουν την παραγωγή βιοαιθανόλης .....   | 21 |
| 1.3. Βιοχημικά μονοπάτια για την παραγωγή βιοαιθανόλης .....   | 23 |
| 1.3.1. Γλυκόλυση .....   | 24 |
| 1.3.2. Αλκοολική ζύμωση .....  | 26 |
| 1.3.3. Γλυκεροπυροσταφυλική ζύμωση .....   | 27 |
| 1.3.4. Αναπνοή .....   | 28 |
| 1.4. Συσσώρευση λιπιδίων στους μικροοργανισμούς .....  | 29 |
| 1.4.1. Βιοχημικά μονοπάτια για τη συσσώρευση λιπιδίων στις ζύμες .....                                       | 30 |
| 1.5. Παραγωγή αραβιτόλης από ζύμες .....   | 31 |
| 1.5.1. Ο μεταβολισμός της L-αραβινόζης σε αραβιτόλη στις ζύμες .....   | 32 |
| 1.5.2. Μεταβολικά μονοπάτια για τη μετατροπή της γλυκόζης και της γλυκερόλης σε D-αραβιτόλη στις ζύμες ..... | 32 |
| 2. ΣΚΟΠΟΣ .....  | 34 |
| 3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ .....   | 34 |
| 3.1. ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ ΚΑΙ ΠΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ .....  | 34 |
| 3.2. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΥΓΡΗΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΡΑΓΜΑΤΟΠΟΙΗΣΗ ΑΛΚΟΟΛΙΚΗΣ ΖΥΜΩΣΗΣ .....                            | 35 |
| 3.3. ΑΝΑΛΥΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ .....  | 36 |
| 3.3.1. Προσδιορισμός της συγκέντρωσης των πηγών άνθρακα και της αιθανόλης .....                              | 36 |
| 3.3.2. Προσδιορισμός γλυκερόλης και αραβιτόλης .....   | 37 |
| 3.3.3. Προσδιορισμός της βιομάζας και του μικροβιακού λίπους .....   | 37 |



|        |   |    |
|--------|---|----|
| 4.     | ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ .....   | 39 |
| 4.1.   | ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΥΠΟ ΑΕΡΟΒΙΕΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ .....   | 39 |
| 4.1.1. | <i>Metschnikowia pulcherrima</i> .....  | 40 |
| 4.1.2. | <i>Trigonopsis californica</i> (στέλεχος A9Y1) .....  | 42 |
| 4.1.3. | <i>Zygosaccharomyces bailii</i> (στέλεχος: A19Y5).....  | 44 |
| 4.1.4. | <i>Pichia manshurica</i> (στέλεχος: K34Y10) .....   | 46 |
| 4.1.5. | <i>Priceomyces carsonii</i> (στέλεχος: K21Y9) .....   | 48 |
| 4.2.   | ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΥΠΟ ΑΝΑΕΡΟΒΙΕΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ .....   | 49 |
| 4.2.1. | <i>Trigonopsis californica</i> (στέλεχος: A9Y1) .....   | 49 |
| 4.2.2. | <i>Zygosaccharomyces bailii</i> (στέλεχος: A19Y5).....  | 51 |
| 4.3.   | ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΜΕΤΑΞΥ ΤΩΝ ΠΕΙΡΑΜΑΤΩΝ ΠΟΥ ΔΙΕΞΑΧΘΗΚΑΝ ΥΠΟ ΑΕΡΟΒΙΕΣ ΚΑΙ ΑΝΑΕΡΟΒΙΕΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ ..... | 52 |
| 4.4.   | ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΑΠΟ ΤΗΝ ΠΑΡΟΥΣΑ ΕΡΓΑΣΙΑ ΚΑΙ ΑΠΟ ΑΛΛΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ .....  | 54 |
| 5.     | ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....   | 57 |
| 6.     | ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....  | 59 |

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

- Εικόνα 1:** Η χημική εξίσωση για αλκοολική ζύμωση σε ζύμη (εξίσωση Gay-Lussac) (Τροποποιημένη εικόνα από Walker & Walker, 2018).....24
- Εικόνα 2:** Διάγραμμα που απεικονίζεται η κινητική κατανάλωσης της γλυκόζης (Glucose: Glu) και της φρουκτόζης (Fructose: Fru) καθώς και η παραγωγή αιθανόλης (EtOH) και αραβιτόλης (Arabitol), υπό αερόβιες συνθήκες.....40
- Εικόνα 3:** Διάγραμμα που απεικονίζεται η κινητική κατανάλωσης της γλυκόζης (Glucose: Glu) και της φρουκτόζης (Fructose: Fru) καθώς και η παραγωγή αιθανόλης (EtOH), αραβιτόλης (Arabitol) και γλυκερόλης (Glycerol), υπό αερόβιες συνθήκες.....41
- Εικόνα 4:** Διάγραμμα που απεικονίζεται η κινητική κατανάλωσης της γλυκόζης (Glucose: Glu) και της φρουκτόζης (Fructose: Fru) καθώς και η παραγωγή αιθανόλης (EtOH) και γλυκερόλης (Glycerol), υπό αερόβιες συνθήκες.....42
- Εικόνα 5:** Διάγραμμα που απεικονίζεται η κινητική κατανάλωσης της γλυκόζης (Glucose: Glu) και της φρουκτόζης (Fructose: Fru) καθώς και η παραγωγή αιθανόλης (EtOH) και γλυκερόλης (Glycerol), υπό αερόβιες συνθήκες.....44
- Εικόνα 6:** Διάγραμμα που απεικονίζεται η κινητική κατανάλωσης της γλυκόζης (Glucose: Glu) και της φρουκτόζης (Fructose: Fru) καθώς και η παραγωγή αιθανόλης (EtOH) και γλυκερόλης (Glycerol), υπό αερόβιες συνθήκες.....45
- Εικόνα 7:** Διάγραμμα που απεικονίζεται η κινητική κατανάλωσης της γλυκόζης (Glucose: Glu) και της φρουκτόζης (Fructose: Fru) καθώς και η παραγωγή γλυκερόλης (Glycerol) και αραβιτόλης (Arabitol), υπό αερόβιες συνθήκες.....46
- Εικόνα 8:** Διάγραμμα που απεικονίζεται η κινητική κατανάλωσης της γλυκόζης (Glucose: Glu) και της φρουκτόζης (Fructose: Fru) καθώς και η παραγωγή γλυκερόλης (Glycerol) και αραβιτόλης (Arabitol), υπό αερόβιες συνθήκες.....47
- Εικόνα 9:** Διάγραμμα που απεικονίζεται η κινητική κατανάλωσης της γλυκόζης (Glucose: Glu) και της φρουκτόζης (Fructose: Fru) καθώς και η παραγωγή γλυκερόλης (Glycerol) και αραβιτόλης (Arabitol), υπό αερόβιες συνθήκες.....48
- Εικόνα 10:** Διάγραμμα που απεικονίζεται η κινητική κατανάλωσης της γλυκόζης (Glucose: Glu) και της φρουκτόζης (Fructose: Fru) καθώς και η παραγωγή αιθανόλης (EtOH) και γλυκερόλης (Glycerol), υπό αναερόβιες συνθήκες.....50
- Εικόνα 11:** Διάγραμμα που απεικονίζεται η κινητική κατανάλωσης της γλυκόζης (Glucose: Glu) και της φρουκτόζης (Fructose: Fru) καθώς και η παραγωγή αιθανόλης (EtOH) και γλυκερόλης (Glycerol), υπό αναερόβιες συνθήκες.....51

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

|  |    |
|--|----|
| <b>Πίνακας 1:</b> Αποτελέσματα για τις ζύμες: <i>M. pulcherrima</i> , <i>T. californica</i> και <i>Z. bailii</i> μετά την ανάπτυξή τους υπό αερόβιες συνθήκες, σε υπόστρωμα που περιείχε ως κύρια πηγή άνθρακα γλυκόζη και φρουκτόζη. Τα αποτελέσματα παρατηρήθηκαν τη χρονική στιγμή που η παραγωγή της αιθανόλης ήταν μέγιστη.....     | 39 |
| <b>Πίνακας 2:</b> Αποτελέσματα για τις ζύμες: <i>Pichia manshurica</i> και <i>Priceomyces carsonii</i> μετά την ανάπτυξή τους υπό αερόβιες συνθήκες, σε υπόστρωμα που περιείχε ως κύρια πηγή άνθρακα γλυκόζη και φρουκτόζη. Τα αποτελέσματα παρατηρήθηκαν τη χρονική στιγμή που η συγκέντρωση της γλυκερόλης ήταν υψηλή.....             | 39 |
| <b>Πίνακας 3:</b> Παραγωγή μικροβιακού λίπους (Lipids: Λιπίδια) στις 121 h.....  | 41 |
| <b>Πίνακας 4:</b> Παραγωγή μικροβιακών λιπιδίων (Lipids) σε συνάρτηση με τον χρόνο.....  | 43 |
| <b>Πίνακας 5:</b> Παραγωγή μικροβιακών λιπιδίων (Lipids) και συγκέντρωση της τελικής ξηρής βιομάζας (Dry Weight: DW) στις 407 h.....   | 44 |
| <b>Πίνακας 6:</b> Παραγωγή μικροβιακών λιπιδίων (Lipids) σε διάφορες χρονικές στιγμές.....   | 45 |
| <b>Πίνακας 7:</b> Παραγωγή μικροβιακών λιπιδίων (Lipids) στις 360 h.....   | 46 |
| <b>Πίνακας 8:</b> Παραγωγή μικροβιακών λιπιδίων (Lipids) στις 699 h.....   | 47 |
| <b>Πίνακας 9:</b> Παραγωγή μικροβιακών λιπιδίων (Lipids) σε διάφορες χρονικές στιγμές.....   | 48 |
| <b>Πίνακας 10:</b> Αποτελέσματα για τους μικροοργανισμούς: <i>T. californica</i> και <i>Z. bailii</i> μετά την ανάπτυξή τους σε αναερόβιες συνθήκες, σε υπόστρωμα που περιείχε ως κύρια πηγή άνθρακα γλυκόζη και φρουκτόζη. Τα αποτελέσματα παρατηρήθηκαν τη χρονική στιγμή που η παραγωγή της αιθανόλης ήταν μέγιστη.....               | 49 |
| <b>Πίνακας 11:</b> Παραγωγή μικροβιακών λιπιδίων (Lipids) και συγκέντρωση της τελικής ξηρής βιομάζας (Dry Weight: DW) στις 308 h.....  | 50 |
| <b>Πίνακας 12:</b> Παραγωγή μικροβιακών λιπιδίων (Lipids) και συγκέντρωση της τελικής ξηρής βιομάζας (Dry Weight: DW) στις 308 h.....  | 52 |
| <b>Πίνακας 13:</b> Αποτελέσματα για τους μικροοργανισμούς: <i>T. californica</i> και <i>Z. bailii</i> μετά την ανάπτυξή τους υπό αερόβιες και αναερόβιες συνθήκες, σε υπόστρωμα που περιείχε ως κύρια πηγή άνθρακα γλυκόζη και φρουκτόζη. Τα αποτελέσματα παρατηρήθηκαν τη χρονική στιγμή που η παραγωγή της αιθανόλης ήταν μέγιστη..... | 53 |
| <b>Πίνακας 14:</b> Παραγωγή αιθανόλης χρησιμοποιώντας τους μικροοργανισμούς <i>Metschnikowia pulcherrima</i> και <i>Zygosaccharomyces bailii</i> σύμφωνα με τη διεθνή βιβλιογραφία και την παρούσα μελέτη.....   | 55 |

# 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η παραγωγή κρασιού βασίζεται σε μία βιοχημική διαδικασία που ονομάζεται αλκοολική ζύμωση, που συνεπάγεται την μετατροπή των σακχάρων (γλυκόζη και φρουκτόζη) σε αιθανόλη και διοξείδιο του άνθρακα η οποία πραγματοποιείται μέσω ζύμης, συνήθως του γένους *Saccharomyces* (Schorn-García et al., 2021). Οι non – *Saccharomyces* ζύμες συνεισφέρουν στο αρωματικό προφίλ των οίνων αφού παράγουν αρωματικά συστατικά όπως αρωματικές αλκοόλες, αιθυλεστέρες και οξικούς εστέρες (Mencher et al., 2021). Επιπρόσθετα, οι non – *Saccharomyces* ζύμες παίζουν σημαντικό ρόλο στην ποιότητα του φρουτώδους οίνου (Yin et al., 2020). Οι ζύμες είναι οι πιο καλά αναγνωρισμένοι μικροοργανισμοί που παράγουν αιθανόλη, που έχουν αξιοποιηθεί για χιλιετίες στα ζυμούμενα ποτά (Walker & Walker, 2018).

## 1.1. Βιοαιθανόλη

Βιοαιθανόλη (αιθυλική αλκοόλη, αλκοόλη των δημητριακών,  $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-OH}$  ή  $\text{EtOH}$ ) είναι ένα υγρό βιοκαύσιμο που μπορεί να παραχθεί από αρκετές διαφορετικές πρώτες ύλες βιομάζας και τεχνολογίες μετατροπής (Balat et al., 2008). Η βιοαιθανόλη έχει υψηλότερο αριθμό οκτανίου, ευρύτερα όρια ευφλεξιμότητας, υψηλότερες ταχύτητες φλόγας και υψηλότερες θερμότητες εξάτμισης από τη βενζίνη (Balat et al., 2008). Τα μειονεκτήματα της βιοαιθανόλης είναι η χαμηλή ενεργειακή της πυκνότητα απ' ότι της βενζίνης, (η βιοαιθανόλη έχει 66% της ενέργειας που έχει η βενζίνη), η διαβρωτικότητα της, η χαμηλή φωτοβολία φλόγας, η χαμηλότερη πίεση ατμού, αναμειξιμότητα με το νερό και τοξικότητα στα οικοσυστήματα (Balat et al., 2008). Η βιοαιθανόλη είναι κατάλληλη για το μικτό καύσιμο για τον κινητήρα βενζίνης εξαιτίας του υψηλού της αριθμού οκτανίων, και του χαμηλού αριθμού κετανίου και η υψηλή θερμότητα της εξάτμισης εμποδίζει την αυτανάφλεξη στον κινητήρα πετρελαίου (Balat et al., 2008). Το πιο δημοφιλές μείγμα για ελαφρά οχήματα είναι γνωστό ως E85, και περιλαμβάνει 85% βιοαιθανόλη και 15% βενζίνη (Balat et al., 2008). Σε μερικές πολιτείες των Ηνωμένων Πολιτειών, μια μικρή ποσότητα βιοαιθανόλης (10% κατ' όγκο) προστίθεται στη βενζίνη, γνωστή ως βενζινόλη ή E10 (Balat et al., 2008).

Οι όροι αιθανόλη και βιοαιθανόλη συνήθως χρησιμοποιούνται εναλλακτικά (Melendez et al., 2022). Ενώ η αιθανόλη παρασκευάζεται από πετρέλαιο μέσω υδρόλυσης του αιθυλενίου, η βιοαιθανόλη παράγεται από προϋπάρχουσα ή ανανεώσιμη βιομάζα. Η αιθανόλη είναι επίσης γνωστή ως πετρελαιο-προερχόμενη αιθανόλη, και σημαντικές

ποσότητες αιθανόλης που παράγονται στον κόσμο παράγονται από πετρέλαιο, ενώ η βιοαιθανόλη αντιπροσωπεύει την ανανεώσιμη αιθανόλη. Η χημική σύνθεση της πετρελαιο-παραγόμενης αιθανόλης και της βιοαιθανόλης είναι η ίδια. Παρόλα αυτά είναι ισοτοπικά διαφορετικές. Η βιοαιθανόλη περιέχει  $^{14}\text{C}$ , στην ίδια κατανομή όπως μέσα στις πρώτες ύλες της, ενώ δεν υπάρχει  $^{14}\text{C}$  περιεκτικότητα στην πετρελαιο-παραγόμενη αιθανόλη δεδομένου ότι οι  $^{14}\text{C}$  διασπώνται στο πέρασμα του χρόνου (Melendez et al., 2022).

Η αιθυλική αλκοόλη ( $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ ) είναι το πιο διάσημο ενεργό συστατικό μεταξύ των απολυμαντικών που βασίζονται στην αλκοόλη και έχει χρησιμοποιηθεί ως αντισηπτικό και απολυμαντικό επιφανειών (Cruz et al., 2022). Η αιθανόλη είναι η πιο άφθονη ουσία που προσδίδει γεύση στον οίνο και έτσι έχει μία σημαντική επιρροή στο άρωμα και τη γεύση του (Wang et al., 2023). Ωστόσο, η αύξηση της παγκόσμιας θερμοκρασίας τα τελευταία χρόνια έχει αυξήσει τη συσσώρευση των σακχάρων στα σταφύλια, καταλήγοντας σε υψηλότερα επίπεδα αιθανόλης σε πολλά κρασιά (Wang et al., 2023). Το υπερβολικό αλκοόλ δεν επιδρά μόνο στη γεύση των οίνων, κάνοντάς τη πιο πικρή και υπερισχύοντας έναντι των άλλων αρωματικών χαρακτηριστικών του, αλλά είναι επίσης επιβλαβές για την ανθρώπινη υγεία (Wang et al., 2023). Η ζύμη *Saccharomyces cerevisiae* με την υψηλή ικανότητα ζύμωσης, χρησιμοποιεί πλήρως τα συστατικά του χυμού σταφυλιού, στα οποία συμπεριλαμβάνονται η γλυκόζη και η φρουκτόζη, οι οποίες μετατρέπονται σε αιθανόλη, ενώ οι *non-Saccharomyces* ζύμες αποτελούν λιγότερο δυνατές ζυμωτές (Wang et al., 2023). Γι' αυτό, οι ερευνητές προτείνουν τη χρήση κατάλληλων *non-Saccharomyces* ζυμών μόνων τους ή σε συνδυασμό με τη ζύμη *Saccharomyces cerevisiae* όχι μόνο για να ελαττώσουν την περιεκτικότητα αιθανόλης στον οίνο, αλλά και για να συνθέσουν ανώτερες αρωματικές ουσίες και να παράγουν μοναδικά αρώματα (Wang et al., 2023). Σίγουρα οι *non-Saccharomyces* ζύμες είναι ευρέως γνωστό ότι έχουν μία συγκριτικά καλύτερη ικανότητα να παραγάγουν πτητικές αρωματικές ουσίες απ' ό,τι η ζύμη *Saccharomyces cerevisiae*, αφού διαφορετικές ζύμες κωδικοποιούν διαφορετικά εξωκυτταρικά ένζυμα τα οποία με τη σειρά τους έχουν ποικίλα αποτελέσματα στο άρωμα του οίνου (Wang et al., 2023). Το γένος *Hanseniaspora spp.*, *Pichia spp.* και η ζύμη *Metschnikowia pulcherrima*, μεταξύ άλλων, παρουσιάζουν καλή ικανότητα παραγωγής β-γλυκοσιδάσης και μπορούν, έτσι, να χρησιμοποιηθούν για να ενισχύσουν την ποικιλία του αρώματος στον οίνο, βελτιώνοντας το περιεχόμενο μερικών πτητικών αρωματικών

ουσιών, ή ελαττώνοντας την αιθανόλη ή τις περιεκτικότητες πτητικών οξέων (Wang et al., 2023).

Η παγκόσμια ενεργειακή απαίτηση και η ανάγκη για βιώσιμες πηγές αναμένεται να αυξηθεί τα επόμενα χρόνια (Malik et al., 2022). Τα 1<sup>η</sup>ς γενιάς βιοκαύσιμα περιλαμβάνουν τη χρήση εδώδιμων πρώτων υλών (όπως κριθάρι, καλαμπόκι, αραβόσιτος, ζαχαροκάλαμο, σιτάρι, *Miscanthus*, και ζαχαρότευτλα). Το καλαμπόκι είναι η πιο ευρέως χρησιμοποιημένη πρώτη ύλη για παραγωγή βιοαιθανόλης (60,64 δισεκατομμύρια L/ χρόνο) στις ηνωμένες πολιτείες (Malik et al., 2022). Το βιοκαύσιμο 1<sup>η</sup>ς γενιάς παράγεται κυρίως από καλλιέργειες με διατροφική ποιότητα που ανταγωνίζονται την αυξημένη ανάγκη για τροφή (Mahapatra et al, 2021; Malik et al., 2022). Η παραγωγή δεύτερης γενιάς αιθανόλης προέρχεται από μη εδώδιμες καλλιέργειες ή κατάλοιπα καλλιεργειών με το κύριο συστατικό να είναι η λιγνοκυτταρινούχος βιομάζα (Sharma et al., 2020). Η παραγωγή βιοαιθανόλης από λιγνοκυτταρινούχο βιομάζα είναι αξιοπρόσεκτη λόγω της υψηλής διαθεσιμότητας, του θετικού περιβαλλοντικού αντικτύπου και της οικονομικής ικανότητας (Bilal et al., 2017; Malik et al., 2022). Τα βιοκαύσιμα δεύτερης γενιάς παράγονται κυρίως από μη εδώδιμες πηγές και έτσι δεν παρεμβαίνουν στην ανθρώπινη τροφική προμήθεια (Robac & Balcerac, 2018; Malik et al., 2022). Η παραγωγή της βιοαιθανόλης από λιγνοκυτταρινούχο βιομάζα απαιτεί προκατεργασίες και συνζύμωση των πεντοζών (C5) και εξοζών (C6) σακχάρων η οποία μπορεί να ελαττώσει το χρόνο διαδικασίας και ανασταλτικές ενώσεις (Gao et al, 2021; Malik et al., 2022). Τα μικροάλγη είναι μια τρίτης γενιάς πηγή βιομάζας που μπορούν ενδεχομένως να χρησιμοποιηθούν ως πρώτη ύλη για παραγωγή βιοαιθανόλης (Kusmiyati et al., 2023). Η βιοαιθανόλη από τα μικροάλγη δεν ανταγωνίζεται τις ανάγκες της τροφής. Επιπλέον, η βιομάζα τρίτης γενιάς μπορεί να αναπτυχθεί σε υδατικά περιβάλλοντα και έχει μεγάλης κλίμακας απαιτήσεις σε CO<sub>2</sub> (Kusmiyati et al., 2023).

## 1.2. Ζύμες

Οι ζύμες είναι μονοκύτταροι, ευκαρυωτικοί μικροοργανισμοί καταταγμένοι στο βασίλειο των μυκήτων (Bennett, 1998; Shurson, 2018). Αυτοί οι μικροσκοπικοί μύκητες είναι γενικά περίπου 3-4 μm στο μέγεθος, έχουν μία πυρηνική μεμβράνη και κυτταρικά τοιχώματα, αλλά σε αντίθεση με τα φυτά, δεν περιέχουν χλωροπλάστες (Shurson, 2018). Τα κύτταρα ζύμης προσλαμβάνουν τις θρεπτικές ουσίες τους παράγοντας και ελευθερώνοντας διάφορα πρωτεολυτικά, γλυκολυτικά, ή λιπολυτικά ένζυμα για να πέψουν την οργανική ύλη, ή απορροφώντας αμινοξέα και μονοσακχαρίτες μέσω του κυτταρικού τοιχώματος. Η αναπαραγωγή πραγματοποιείται μέσω εκβλάστησης και διαχωρισμού. Οι ζύμες βρίσκονται σχεδόν παντού στο περιβάλλον και σε άφθονες ποσότητες. Οι ζύμες βρίσκονται φυσικά σε κοινά συστατικά τροφίμων όπως δημητριακά, παραπροϊόντα δημητριακών, φρέσκο χορτάρι και σανό για τα ζώα (Shurson, 2018). Εμπορικές εφαρμογές για τη ζύμη περιλαμβάνουν την παραγωγή των αλκοολούχων ποτών (δηλαδή μπύρα, κρασί και spirits), μη αλκοολούχων ποτών (δηλαδή μπύρα ρίζας, κβας, kombucha, κεφίρ, mauby), το ψήσιμο του ψωμιού και το ψήσιμο στη ζαχαροπλαστική, τη βιοαποκατάσταση, τη βιομηχανική παραγωγή αιθανόλης, τα θρεπτικά συμπληρώματα, τα προβιοτικά, τα πρόσθετα τροφίμων και την επιστημονική έρευνα (Shurson, 2018).

### 1.2.1. Φαινόμενο Pasteur

Το 1861 ο Luis Pasteur (Pasteur, 1861), ανέφερε ότι το οξυγόνο καθυστερεί τη ζύμωση, δηλαδή την παραγωγή αιθανόλης από γλυκόλυση στη ζύμη (Hardie, 2000). Το συμπέρασμα από αυτό είναι ότι η ανοξία, η απουσία του οξυγόνου, διεγείρει τη γλυκόλυση (Hardie, 2000). Αυτό το φαινόμενο, που συμβαίνει στα κύτταρα των θηλαστικών καθώς επίσης και στη ζύμη, έγινε γνωστό ως το 'φαινόμενο Pasteur' (Hardie, 2000). Με το πλεονέκτημα μιας μετέπειτα γνώσης, μια προφανής εξήγηση για το φαινόμενο Pasteur είναι ότι τα νουκλεοτίδια αδεΐνης ελέγχουν τη γλυκόλυση (Hardie, 2000). Ο τελευταίος συνδετικός κρίκος ήταν το εύρημα από την Passonneau και τον Lowry (Passonneau & Lowry, 1962; Hardie, 2000) και άλλους στις αρχές του 1960 ότι το γλυκολυτικό ένζυμο φωσφοφρουκτοκινάση είναι αλλοστερικά ενεργοποιημένο από το AMP, και ότι αυτό ανταγωνίζεται από υψηλές συγκεντρώσεις ATP (Hardie, 2000). Με μια πρώτη ματιά ίσως φαίνεται πιο λογικό για το ADP να ρυθμίζει τη φωσφοφρουκτοκινάση απ' ό,τι το AMP. Αυτή είναι η 'κλασσική' εξήγηση για το φαινόμενο Pasteur: απουσία οξυγόνου, η παραγωγή του ATP ελαττώνεται, ο λόγος

AMP:ATP αυξάνεται και αυξάνεται η φωσφοφρουκτοκινάση, και ως εκ τούτου η γλυκόλυση, θα παρακινηθεί (Hardie, 2000).

### 1.2.2. Φαινόμενο Crabtree

Υπό αερόβιες συνθήκες, η αναπνοή είναι δυνατή με οξυγόνο ως ο τελευταίος αποδέκτης ηλεκτρονίων, αλλά η ζύμη *S. cerevisiae* πραγματοποιεί αλκοολική ζύμωση μέχρι το σάκχαρο να φτάσει ένα χαμηλό επίπεδο (Dashko et al., 2014). Αυτό το φαινόμενο ονομάζεται φαινόμενο Crabtree, και οι ζύμες που εκφράζουν αυτό το χαρακτηριστικό αποκαλούνται ζύμες θετικές στο φαινόμενο Crabtree. Αντιθέτως, οι ζύμες που είναι αρνητικές στο φαινόμενο Crabtree δεν βοηθούν στην παραγωγή προϊόντων ζύμωσης με αποτέλεσμα τα μόνο προϊόντα που παράγονται υπό αερόβιες συνθήκες να είναι η βιομάζα και το διοξείδιο του άνθρακα (Dashko et al., 2014).

Η σπουδαιότητα της παραγωγής αιθανόλης φαίνεται ξεκάθαρα στο φαινόμενο Crabtree-Warburg, ένα κύριο χαρακτηριστικό του μεταβολισμού της ζύμης *S. cerevisiae* (Gambacorta et al., 2020). Υπό συνθήκες όπου η γλυκόζη είναι υψηλή, οι ζύμες που είναι θετικές στο φαινόμενο Crabtree ζυμώνουν τα σάκχαρα και τα μετατρέπουν σε αιθανόλη ακόμα και υπό αερόβιες συνθήκες (Gambacorta et al., 2020). Το φαινόμενο Crabtree, ενεργοποιείται από «υπερχείλιση» του μεταβολισμού στον πυρουβικό κόμβο (βραχυπρόθεσμο φαινόμενο) και από την καταστολή των αναπνευστικών ενζύμων η οποία καθοδηγείται από τη γλυκόζη (μακροπρόθεσμο φαινόμενο) (Gambacorta et al., 2020).

Ο μηχανισμός με τον οποίον επάγεται το φαινόμενο Crabtree είναι άγνωστος (Diaz-Ruiz et al., 2011). Επιπλέον, είναι πιθανό ότι η επαγωγή του μπορεί να οφείλεται σε έναν συνδυασμό μερικών παραγόντων (Rodríguez-Enríquez et al., 2001; Diaz-Ruiz et al., 2011). Η πιο αποδεκτή υπόθεση είναι ότι τα ένζυμα της γλυκόλυσης (φωσφογλυκερική κινάση και πυρουβική κινάση) και τα μιτοχόνδρια ανταγωνίζονται για ελεύθερο κυτοπλασματικό ADP (Gatt & Racker, 1959; Winehouse, 1972; Diaz-Ruiz et al., 2011). Αν η γλυκόλυση πραγματοποιείται σε υψηλούς ρυθμούς θα μπορούσε θεωρητικά να υπερσχύσει από τα μιτοχόνδρια ανάλογα με την πρόσληψη ADP (Diaz-Ruiz et al., 2011). Αφού το ADP είναι ένα από τα υποστρώματα της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης, αυτό θα περιόριζε ένα από τα υποστρώματα της ATP συνθάσης και συνεπώς η αναπνοή θα μειωνόταν. Ωστόσο, αυτό είναι απίθανο να συμβεί *in vivo* καθώς η Km για τη μιτοχονδριακή τρανσλοκάση νουκλεοτιδίου αδενίνης (ANT) είναι



περίπου 100 φορές χαμηλότερη απ' ό τι εκείνη των ενζύμων της γλυκόλυσης (Veech et al, 1979; Diaz-Ruiz et al., 2011). Αυτό συνεπάγεται ότι τα μιτοχόνδρια θα μπορούσαν να χρησιμοποιήσουν το κυτοσολικό ADP ακόμα και αν τα ένζυμα της γλυκόλυσης αυξάνουν την ενεργότητα τους (Diaz-Ruiz et al., 2011).

### 1.2.3. Χαρακτηριστικά ζυμών

- *Metschnikowia pulcherrima*

Η ζύμη *Metschnikowia pulcherrima* μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε διάφορες βιομηχανικές διεργασίες. Επίσης, η ζύμη *Metschnikowia pulcherrima* παράγει υψηλότερες συγκεντρώσεις φαιλυλεθανόλης και 2-φαινυλοξικού συγκριτικά με τη ζύμη *Saccharomces cerevisiae* (Windholtz et al., 2021). Μέσω της ζύμης *M. pulcherrima* απελευθερώνονται ποικίλα αρώματα από μη πτητικές πρόδρομες ουσίες στα σταφύλια όπως τερπένια ή θειόλες (Windholtz et al., 2021). Η *M. pulcherrima* μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως παράγοντας βιοελέγχου, επειδή παράγει πουλχεριμίνη, που είναι μια χρωστική κόκκινου χρώματος που έχει αντιμυκητιακές ιδιότητες (Canónico et al., 2023). Η ζύμη *Metschnikowia pulcherrima* έχει προοπτική για την παραγωγή κρασιών με χαμηλότερη περιεκτικότητα αιθανόλης (Hranilovic et al., 2020). Επίσης παράγει πουλχερριμικό οξύ, το οποίο μπορεί να προσδεθεί σε σίδηρο με αποτέλεσμα ο διαθέσιμος σίδηρος στο θρεπτικό μέσο να μειώνεται εμποδίζοντας την ανάπτυξη βακτηρίων (Poontawee et al., 2023). Η ζύμη *M. pulcherrima* ταξινομείται ως μη ελαιογενής ζύμη (Santamauro et al., 2014; Anbarasan et al., 2018), αλλά με κατάλληλες συνθήκες μπορεί να συσσωρεύσει και αυτή λιπίδια και έτσι να ενταχθεί στις ελαιογενής ζύμες (Anbarasan et al., 2018).

- *Trigonopsis spp.*

Η οικογένεια *Trigonopsidaceae* κατέχει μία πρώιμη αποκλίνουσα θέση ανάμεσα στα είδη των *Saccharomycetales* (Lachance and Kurtzman, 2013). Στα ασκοσπορικά είδη, τα σπόρια είναι έλικες με κωνικές άκρες που καταλήγουν σε ένα εκβλάστημα που σχηματίζεται από κύτταρα μετά από ισογαμική σύζευξη. Το προφίλ της ανάπτυξης χαρακτηρίζεται από ένα στενό εύρος χρήσης σακχάρου που μπορεί να περιλαμβάνει τη γαλακτόζη, τρεχαλόζη, σορβόζη ή ξυλόζη, τη συχνή αφομοίωση του 2-κετογλουκονικού ή 1-βουτανόλης και απουσία ανάπτυξης στα νιτρικά ως μοναδική

πηγή αζώτου. Τα κύτταρα είναι είτε σχετικά μικρά, με διάμετρο που φτάνει λιγότερο από 1 μm, ή μπορεί να είναι διατεταγμένα με ένα κύτταρο σε σχήμα T που έχει την ικανότητα να προσκολλάται στην επιδερμίδα των νηματωδών (Lachance and Kurtzman, 2013).

- *Zygosaccharomyces bailii*

Το είδος *Zygosaccharomyces bailii* αποτελεί βασικό παράγοντα που συντελεί στην αλλοίωση των φρούτων, των σαλτσών, των χυμών, των ανθρακούχων αναψυκτικών και της ketchup (Karaman et al., 2016). Η ζύμη *Z. bailii* είναι μια ζύμη η οποία παρουσιάζει υψηλή αντίσταση στα συντηρητικά (Karaman et al., 2016). Στην πραγματικότητα, οι οίνοι που παράγονται χρησιμοποιώντας τη ζύμη *Z. bailii* έδειξαν αυξημένη συγκέντρωση πολυσακχαριτών γεγονός το οποίο θεωρείται ότι ασκεί θετική επίδραση στον τελικό οίνο (Contreras et al., 2015). Η ζύμη *Z. bailii* BCV 08 μπορεί ενδεχομένως να χρησιμοποιηθεί σε διεργασίες παρασκευής οίνου για ζυμώσεις από μούστο σταφυλιού σε ανάμεικτες καλλιέργειες με *S. cerevisiae* για να ενισχύσει τη γεύση των οίνων (Garavaglia et al., 2015). Τα γένη *Zygosaccharomyces* έχουν αναφερθεί ως ζύμες που αλλοιώνουν λόγω της υψηλής ανθεκτικότητας τους στο ωσμωτικό και οξειδωτικό στρες (Escott et al., 2018; Capece et al, 2022). Η αερόβια παραγωγή αιθανόλης (φαινόμενο Crabtree) στη ζύμη *Z. bailii* επηρεάζεται από την πηγή άνθρακα (Merico et al., 2003). Η ικανότητα της ζύμης *Zygosaccharomyces bailii* να μπορεί να ανταπεξέλθει σε υψηλές συγκεντρώσεις σακχάρων καθώς επίσης και σε υψηλές θερμοκρασίες και όξινα περιβάλλοντα καθιστά αυτή τη “μη-συμβατική” ζύμη κατάλληλη για την ανάπτυξη βιοτεχνολογικών διαδικασιών όπως η παραγωγή ετερόλογης πρωτεΐνης (Vigentini et al., 2005).

- *Pichia spp.*

Η ζύμη *Pichia manshurica* (φύλο Ascomycota, υπόφυλο Saccharomycotina) είναι μια κοινή ζύμη που βρίσκεται σε ζωοτροφές και τρόφιμα που έχουν υποστεί ζύμωση όπως ο ζυμωμένος χυμός maguey (Nolasco-Cancino et al., 2018; Toyotome et al, 2019), ένα παραδοσιακό ποτό της Burkina Faso (Toyotome et al, 2019), στους οίνους (Toyotome et al, 2019), και τα ενσιρώματα (Wang et al., 2018; Toyotome et al, 2019). Οι ζύμες

*Pichia manshurica* προκύπτουν φυσικά κατά τη διεργασία παραγωγής του Ishizuchi-kyrocha (Toyotome et al, 2019).

Μερικές ζύμες που ανήκουν κυρίως στο γένος *Pichia* θεωρούνται “φιλμ ζύμες” αφού μπορούν να σχηματίσουν ένα μεμβρανώδες στρώμα στην επιφάνεια του οίνου (Perpetuini et al, 2018). Αυτή η τροποποίηση είναι επιζήμια για την ποιότητα του οίνου επειδή προσδίδει μια οξειδωμένη γεύση λόγω της παραγωγής της ακεταλδεϋδης. Η ζύμη *Pichia manshurica* (πρώην *Pichia galeiformis*) συσχετίζεται συχνά με φυσικές ζυμώσεις (π.χ. οίνου, αγγουριών, σπόρων κακάου, επιτραπέζιων ελιών κ.α.) όπου εκεί θα μπορούσε να προκαλέσει αλλοίωση του προϊόντος (Saez et al., 2011; Tofalo et al, 2014; Maura et al., 2016; Perpetuini et al, 2018). Η ικανότητα να σχηματίζονται φιλμ από μέλη του γένους *Pichia* μπορεί πιθανόν να εξηγηθεί από την αερόβια φύση τους και τη γρήγορη ανάπτυξη και είναι γενικά σχετική με την παραγωγή ακεταλδεϋδης, που προσδίδει ένα οξειδωμένο άρωμα (Perpetuini et al, 2018). Τα βιολογικά κρασιά είναι πιο εκτεθειμένα στη μικροβιακή αλλοίωση απ’ ότι τα συμβατικά. Οι ζύμες που προκαλούν αλλοιώσεις όπως η *P. manshurica* είναι ικανές να αναπτυχθούν σε εκείνα τα κρασιά ακόμα και αν δεν παρουσιάζουν μεγάλη ανοχή σε αντιμικροβιακές ενώσεις και μέσα καθαρισμού. Αυτή η ανοχή θα μπορούσε να σχετίζεται με την ικανότητα να συγκροτούν βιοφίλμ, γι’ αυτό μια πιθανή στρατηγική για να ελαττωθεί η μόλυνση στα βιολογικά κρασιά θα μπορούσε να είναι η υποκατάσταση των φίλτρων των μεμβρανών πιο συχνά ή η αντικατάσταση του φιλτραρίσματος, το οποίο προφανώς δεν είναι ικανό να εμποδίσει την επιμόλυνση, με άλλες στρατηγικές όπως η παστερίωση (Perpetuini et al, 2018).

Σύμφωνα με άλλη μελέτη (Hernández et al., 2018) είδη του γένους *Pichia* που είναι ασκομύκητες αποτελούν ορισμένα από τα είδη που κυριαρχούν στην κοινότητα των ζυμών που υπάρχουν στα φρούτα. Κάποιες μελέτες που εστίασαν στο να μάθουν σχετικά για τον πληθυσμό των ζυμών στα κελάρια των οίνων και στον εξοπλισμό (Ocoñ et al., 2010; Hernández et al., 2018) έδειξαν μια ισχυρή επικράτηση (55-70% των ολικών ταυτοποιήσεων) non-*Saccharomyces* ζυμών. Ζύμες όπως το γένος *Pichia* έχουν ταυτοποιηθεί παράγοντας αιθανόλη ή σχηματίζοντας φιλμ (Bevilacqua et al., 2010; Hernández et al., 2018). Η ζύμη *P. manshurica* φαίνεται να βρίσκεται στο κελλάρι, συγκεκριμένα στην επιφάνεια των φίλτρων (Saez et al, 2011).

- *Priceomyces carsonii*

Σύμφωνα με μία μελέτη, η ζύμη *Priceomyces carsonii* έχει απομωνωθεί από έλαια (Gamero et al., 2016). Σε μία άλλη μελέτη (Mateus et al., 2016) μελετήθηκε το αποτέλεσμα από μερικές αντικαταστάσεις του NaCl με KCl και CaCl<sub>2</sub> της ζυμούμενης άλμης στη μικροβιακή ποιότητα των φυσικών χαραγμένων πράσινων *Maçanilha Algarvia* επιτραπέζιων ελιών. Οι ελιές ζυμώθηκαν σε διαφορετικούς συνδυασμούς αλάτων και εξακριβώθηκε η αφθονία των ζυμών. Μία από τις κυριότερες ζύμες που ταυτοποιήθηκε ήταν η *Priceomyces carsonii* (Mateus et al., 2016).

#### 1.2.4. Παραγωγή αιθανόλης με τη χρήση ζυμών

Οι μη – συμβατικές ζύμες, και συγκεκριμένα τα είδη των ζυμών που είναι non – *Saccharomyces*, έχουν δείξει δυνατότητες για την παραγωγή οίνων με χαμηλότερη συγκέντρωση αιθανόλης (Contreras et al., 2015). Στο παρελθόν θεωρήθηκαν ως μη επιθυμητές ή ζύμες που αλλοιώνουν και τώρα παίζουν σημαντικό ρόλο στο να ενισχύσουν τη σύνθεση και το αρωματικό προφίλ του οίνου και των αλκοολούχων ποτών (Gschaedler, 2017). Η επεξεργασία των αλκοολούχων ποτών (απεσταγμένα ή μη) περιλαμβάνει μία διαδικασία ζύμωσης που επιτρέπει τη μετατροπή των ζυμωμένων σακχάρων σε αιθανόλη καθώς και έναν υψηλό αριθμό συστατικών που ενεργοποιούν τη γεύση που δίνουν καθένα από τα ειδικά χαρακτηριστικά των ποτών (Gschaedler, 2017). Οι μικροοργανισμοί, ειδικότερα οι ζύμες, παίζουν σημαντικό ρόλο στην πολύπλοκη διαδικασία της ζύμωσης για την παραγωγή οίνου από σταφύλι (Wang et al., 2023).

Συγκριτικά με άλλους τύπους μικροοργανισμών, οι ζύμες ειδικά η ζύμη *Saccharomyces cerevisiae* είναι το συνηθισμένο μικρόβιο που χρησιμοποιείται στην παραγωγή αιθανόλης λόγω της υψηλής παραγωγικότητας σε αιθανόλη, της υψηλής αντοχής σε αιθανόλη και της ικανότητας να ζυμώνει ένα ευρύ φάσμα σακχάρων (Azhar et al., 2017). Η παραγωγή της βιοαιθανόλης κατά τη διάρκεια της ζύμωσης εξαρτάται από μερικούς παράγοντες όπως η θερμοκρασία, η συγκέντρωση των σακχάρων, το pH, η διάρκεια της ζύμωσης, ο ρυθμός ανάδευσης και το μέγεθος του εμβολίου. Η ικανότητα και η παραγωγικότητα της αιθανόλης μπορεί να ενισχυθεί μέσω ακινητοποίησης των κυττάρων ζύμης (Azhar et al., 2017).

Οι μικροοργανισμοί όπως οι ζύμες διαδραματίζουν έναν ουσιαστικό ρόλο στην παραγωγή αιθανόλης ζυμώνοντας ένα ευρύ φάσμα σακχάρων σε αιθανόλη (Azhar et

al., 2017). Χρησιμοποιούνται σε βιομηχανικά φυτά λόγω των πολύτιμων ιδιοτήτων που είναι ο συντελεστής αιθανόλης (> 90.0% θεωρητικός συντελεστής), η ανοχή στην αθανόλη (> 40.0 g/L), η παραγωγικότητα της αιθανόλης (>1.0 g/L/h), η ανάπτυξη σε απλό, φθινό μέσο και μη αραιωμένο υλικό ζύμωσης με αντίσταση σε αναστολείς και την επιβράδυνση των ρυπαντών από συνθήκες ανάπτυξης (Azhar et al., 2017). Ως το κύριο συστατικό στη ζύμωση, οι ζύμες επηρεάζουν την ποσότητα την απόδοση της αιθανόλης (Azhar et al., 2017).

Εδώ και χιλιάδες χρόνια πριν, ζύμες όπως η *S. cerevisiae* έχουν χρησιμοποιηθεί στην παραγωγή αλκοόλης ειδικά στη ζυθοποιεία και στις βιομηχανίες οίνου. Αυτή η ζύμη διατηρεί το κόστος της απόσταξης χαμηλό καθώς δίνει υψηλή απόδοση αιθανόλης, υψηλή παραγωγικότητα και μπορεί να αντέξει την υψηλή συγκέντρωση αιθανόλης (Kasavi et al, 2012; Azhar et al., 2017). Στις μέρες μας, οι ζύμες χρησιμοποιούνται για να παράγουν καύσιμη αιθανόλη από ανανεώσιμες πηγές ενέργειας (Kosaric & Velikonja, 1995; Azhar et al., 2017). Υπάρχουν κοινές προκλήσεις για τις ζύμες κατά τη διάρκεια της ζύμωσης των σακχάρων που εγείρονται σε θερμοκρασία (35-45 °C) και σε συγκέντρωση αιθανόλης (πάνω από 20%) (Tofighi et al., 2014; Azhar et al., 2017). Ο ρυθμός ανάπτυξης των ζυμών και ο μεταβολισμός αυξάνεται μέχρι να φτάσει τη βέλτιστη τιμή. Αύξηση στη συγκέντρωση αιθανόλης κατά τη διάρκεια της ζύμωσης μπορεί να προκαλέσει αναστολή της ανάπτυξης και της βιωσιμότητας του μικροοργανισμού (Azhar et al., 2017).

#### 1.2.5. Παράγοντες που επηρεάζουν την παραγωγή βιοαιθανόλης

Υπάρχουν μερικοί παράγοντες που επηρεάζουν την παραγωγή βιοαιθανόλης στους οποίους περιλαμβάνεται η θερμοκρασία, η συγκέντρωση του σακχάρου, το pH, η διάρκεια ζύμωσης, ο ρυθμός ανάδευσης και το μέγεθος του εμβολίου (Azhar et al., 2017). Ο ρυθμός ανάπτυξης των μικροοργανισμών επηρεάζεται άμεσα από τη θερμοκρασία. Η υψηλή θερμοκρασία που είναι ανεπιθύμητη για την ανάπτυξη των κυττάρων γίνεται ένας στρεσογόνος παράγοντας για τους μικροοργανισμούς (Cot et al., 2007; Azhar et al., 2017). Το κατάλληλο εύρος θερμοκρασιών για ζύμωση είναι ανάμεσα στους 20 και 35 °C (Azhar et al., 2017). Επιπλέον, ένζυμα που ρυθμίζουν τη μικροβιακή ενεργότητα και τη διαδικασία της ζύμωσης είναι ευαίσθητα στην υψηλή θερμοκρασία η οποία μπορεί να μετουσιώσει την τεταρτοταγή δομή και να απενεργοποιήσει τα ένζυμα (Phisalaphong et al., 2006; Azhar et al., 2017). Έτσι, η

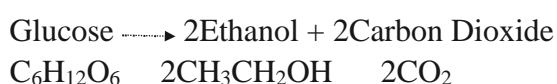
θερμοκρασία ρυθμίζεται προσεκτικά καθ' όλη τη διάρκεια της διεργασίας της ζύμωσης (Azhar et al., 2017). Η αύξηση στη συγκέντρωση της γλυκόζης μέχρι ένα ορισμένο επίπεδο προκαλεί τον ρυθμό της ζύμωσης να αυξηθεί. Ωστόσο, η χρήση υπερβολικής συγκέντρωσης σακχάρου θα προκαλέσει σταθερό ρυθμό ζύμωσης. Γενικά ο μέγιστος ρυθμός παραγωγής αιθανόλης κατορθώνεται όταν χρησιμοποιούνται σάκχαρα σε συγκέντρωση 150 g/L (Azhar et al., 2017). Η αρχική συγκέντρωση σακχάρου έχει επίσης θεωρηθεί ως ένας σημαντικός παράγοντας στην παραγωγή αιθανόλης. Υψηλή παραγωγικότητα αιθανόλης και απόδοση σε ασυνεχή ζύμωση μπορεί να εξασφαλιστεί χρησιμοποιώντας υψηλότερη αρχική συγκέντρωση σακχάρου. Ωστόσο, χρειάζεται μεγαλύτερη διάρκεια ζύμωσης και υψηλότερο κόστος ανάκτησης (Azhar et al., 2017). Η παραγωγή αιθανόλης επηρεάζεται από το pH του υλικού καθώς αυτό επηρεάζει τη βακτηριακή επιμόλυνση, την ανάπτυξη της ζύμης, το ρυθμό ζύμωσης και τον σχηματισμό παραπροϊόντων. Η διαπερατότητα μερικών βασικών θρεπτικών μέσα στα κύτταρα επηρεάζεται από τη συγκέντρωση των  $H^+$  στο υλικό ζύμωσης (Azhar et al., 2017). Επιπλέον, η επιβίωση και η ανάπτυξη των ζυμών επηρεάζεται από το pH στο εύρος του 2,75-4,25 (Azhar et al., 2017). Η διάρκεια της ζύμωσης επηρεάζει την ανάπτυξη των μικροοργανισμών. Μικρότερη διάρκεια ζύμωσης προκαλεί μη αποτελεσματική ζύμωση λόγω ανεπαρκούς ανάπτυξης των μικροοργανισμών. Από την άλλη πλευρά, περισσότερος χρόνος δίνει τοξικό αποτέλεσμα στη μικροβιακή ανάπτυξη ειδικά σε ασυνεχή τρόπο λόγω της υψηλής συγκέντρωσης αιθανόλης στο υλικό ζύμωσης (Azhar et al., 2017). Ο ρυθμός ανάδευσης ελέγχει τη διαπερατότητα των θρεπτικών από το θρεπτικό ζύμωσης προς το εσωτερικό των κυττάρων και τη μετακίνηση της αιθανόλης από τα κύτταρα προς το υλικό ζύμωσης. Όσο πιο μεγάλος είναι ο ρυθμός ανάδευσης τόσο υψηλότερη είναι η ποσότητα αιθανόλης που παράγεται. Ο κοινός ρυθμός ανάδευσης για ζύμωση από κύτταρα ζύμης είναι 150-200 rpm. Η συγκέντρωση του εμβολίου δεν δίνει σημαντικά αποτελέσματα στην τελική συγκέντρωση της αιθανόλης αλλά επηρεάζει τον ρυθμό κατανάλωσης των σακχάρων και την παραγωγικότητα της αιθανόλης (Azhar et al., 2017). Η παραγωγή αιθανόλης φάνηκε να είναι αυξημένη με την αύξηση του αριθμού των κυττάρων από  $1 \times 10^4$  σε  $1 \times 10^7$  ανά ml αλλά δε βρέθηκε σημαντική παραγωγή αιθανόλης ανάμεσα στα  $10^7$  και  $10^8$  κύτταρα ανά ml (Azhar et al., 2017).

### 1.3. Βιοχημικά μονοπάτια για την παραγωγή βιοαιθανόλης

Η παραγωγή της βιοαιθανόλης στηρίζεται στην ικανότητα των ζυμών να καταβολίζουν μόρια με 6 άνθρακες όπως η γλυκόζη σε συστατικά με 2 δυο άνθρακες, όπως η αιθανόλη, χωρίς να γίνει η διεργασία προς το τελικό προϊόν οξείδωσης που είναι το CO<sub>2</sub> (Azhar et al., 2017). Οι ζύμες που είναι θετικές στο φαινόμενο Crabtree όπως η *S. cerevisiae* συσσωρεύουν αιθανόλη παρουσία οξυγόνου, ωστόσο η ζύμη *Candida albicans* η οποία είναι αρνητική στο Crabtree φαινόμενο καταβολίζει σάκχαρα σε CO<sub>2</sub> παρουσία οξυγόνου. Η παρουσία των υδατανθράκων με έξι άτομα άνθρακα καταστέλλει το μονοπάτι της αναπνοής μέσω της οξείδωσης στις ζύμες που είναι θετικές στο φαινόμενο Crabtree και η ενέργεια για ανάπτυξη παράγεται μέσω της γλυκόλυσης. Κατά την εξάντληση των μορίων που αποτελούνται από έξι άτομα άνθρακα, ο καταβολισμός κατευθύνεται προς στην οξείδωση των μορίων με δυο άτομα άνθρακα με αποτέλεσμα την παραγωγή CO<sub>2</sub>. Το φαινόμενο αυτό ονομάζεται 'diauxic shift'. Η διαδικασία για την παραγωγή βιοαιθανόλης μέσω της ζύμωσης και του 'diauxic shift' εξαρτάται από το ένζυμο αλκοολική αφυδρογονάση (EC 1.1.1.1) το οποίο κωδικοποιείται στη θέση ADH1. Το ένζυμο ADH1 καταλύει τη μετατροπή της ακεταλδεΐδης σε αιθανόλη κατά τη διάρκεια της ζύμωσης της γλυκόζης και μπορεί να καταλύει την αντίστροφη αντίδραση η οποία είναι η μετατροπή της αιθανόλης σε ακεταλδεΐδη, ακόμη και με χαμηλή καταλυτική ικανότητα (Azhar et al., 2017).

Επίσης, άλλοι μικροοργανισμοί, ιδιαίτερα τα βακτήρια, μπορούν να ζυμώσουν σάκχαρα για να παραχθεί αιθανόλη (Walker & Walker, 2018). Για παράδειγμα βακτήρια του γένους *Zymomonas* spp. είναι πολύ αποτελεσματικά ως προς την παραγωγή αιθανόλης, αλλά χρησιμοποιούν διαφορετικό μεταβολικό μονοπάτι συγκριτικά με τη ζύμη *S. cerevisiae*. Για παράδειγμα, το βακτήριο *Z. mobilis* χρησιμοποιεί το μονοπάτι Entner-Doudoroff, το οποίο αναπαριστά ένα τροποποιημένο σχήμα της γλυκόλυσης που παράγει μόνο ένα μόριο ATP ανά γλυκόζη που μεταβολίζεται (συγκριτικά με τα 2 μόρια ATP από το γλυκολυτικό μονοπάτι Embden-Meyerhof-Parnas που χρησιμοποιεί η ζύμη) (Walker & Walker, 2018). Οι παραγωγοί καύσιμων αλκοολών, για παράδειγμα, εκείνοι που χρησιμοποιούν άμυλο καλαμποκιού ή μελάσες από ζαχαροκάλαμο, μπορούν να υπολογίσουν τις αποδόσεις με βάση το ποσοστό της θεωρητικής απόδοσης μετατροπής (% CE). Αυτός ο υπολογισμός προέρχεται από την εξίσωση Gay-Lussac (Εικόνα 1; Walker & Walker, 2018). Λαμβάνοντας τη γλυκόζη ως 100 μέρη κατά βάρος, τα βάρη των αντιδραστηρίων θα ήταν 51,1 και 48,9 για την αιθανόλη και το διοξείδιο του άνθρακα, αντίστοιχα. Επομένως ο τελικός μέγιστος συντελεστής για

την αιθανόλη από τα 100 μέρη γλυκόζης είναι 51,1%. Οι βιομηχανικές ζυμώσεις δεν μπορούν ποτέ να επιτύχουν αυτή τη θεωρητική μετατροπή επειδή μερική από τη διαθέσιμη γλυκόζη μετατρέπεται σε νέα κύτταρα ζύμης, αποθηκευτικούς υδατάνθρακες (π.χ. γλυκογόνο και τρεχαλόζη) και δευτερογενείς μεταβολίτες που προκύπτουν από τη ζύμωση. Επίσης υπάρχουν απώλειες αιθανόλης από διεργασίες λόγω αναδρομικής αποικοδόμησης του σακχάρου (π.χ. αντίδραση Maillard), μικροβιακή (κυρίως βακτηριακή) μόλυνση και μηχανικοί περιορισμοί. Αργές σε διάρκεια ζυμώσεις και ζύμες που υπόκεινται σε στρες μπορούν να επηρεάσουν αρνητικά τον συντελεστή απόδοσης της αιθανόλης. Ωστόσο, οι παραγωγοί αλκοόλης σε βιομηχανική κλίμακα πρέπει να επιδιώκουν τουλάχιστον 90% της θεωρητικής CE, κατά προτίμηση μεγαλύτερη.



**Εικόνα 1:** Η χημική εξίσωση για αλκοολική ζύμωση σε ζύμη (εξίσωση Gay-Lussac) (Τροποποιημένη εικόνα από Walker & Walker, 2018).

### 1.3.1. Γλυκόλυση

Το Embden-Meyerhof-Parnas μονοπάτι, γνωστό ως γλυκόλυση αποκάλυψε την ύπαρξη των ενδοκυτταρικών ενζύμων, τα πρώτα μεταβολικά ενδιάμεσα, συμπαραγοντες, καθώς επίσης και αρχές της σηματοδότησης, τη ρύθμιση του μεταβολισμού, και πτυχές της εξελικτικής προέλευσης του μεταβολισμού (Grüning & Ralser, 2021). Ο καταβολισμός της γλυκόζης είναι μία βιοχημική διεργασία που κοινώς αναφέρεται ως 'γλυκόλυση'. Οι απαρχές της έρευνας για τη γλυκόλυση ήταν στενά συνυφασμένες με τη βιομηχανία του οίνου και τη ζυθοποιεία στον 18<sup>ο</sup> και 19<sup>ο</sup> αιώνα (Grüning & Ralser, 2021).

Η γλυκόλυση, ένας αναερόβιος μηχανισμός, θεωρείται ότι είναι το πρώτο μονοπάτι παραγωγής ATP που διεξάγεται, καθώς είναι κοινό και για τους προκαρυώτες και για τους ευκαρυώτες (Patil et al., 2022). Η διαδικασία της γλυκόλυσης ανακαλύφθηκε πρώτα από τον Luis Pasteur τη δεκαετία του 1800, και χρειάστηκαν περίπου 100 χρόνια να διευκρινιστεί εντελώς το ολοκληρωμένο μονοπάτι, που προτάθηκε από τους Embden, Meyerhof και Parnas τη δεκαετία του 1940 (Barnett et al., 2003; Patil et al., 2022).



Το πρώτο στάδιο της γλυκόλυσης είναι η μετατροπή της γλυκόζης σε 1,6-διφωσφορική φρουκτόζη, απαιτώντας 2 μόρια ATP, το οποίο περιλαμβάνει 3 βήματα: μια αρχική φωσφορυλίωση της γλυκόζης προς τον σχηματισμό της 6-φωσφορικής γλυκόζης, που καταλύεται από μια οικογένεια ενζύμων που ονομάζονται εξοκινάσες (Sarris & Papanikolaou, 2016). Αυτή η αντίδραση καταναλώνει ATP, αλλά διατηρεί την ενδοκυτταρική συγκέντρωση της εξόζης χαμηλή και έτσι ευνοεί τη συνεχή μεταφορά των σακχάρων μέσα στο κύτταρο μέσω των μεταφορέων της πλασματικής μεμβράνης. Μετά πραγματοποιείται ο ισομερισμός της 6-φωσφορικής γλυκόζης σε 6-φωσφορική φρουκτόζη μέσω της ισομεράσης της φωσφογλυκόζης, όπου ακολουθείται από τη φωσφορυλίωση της 6-φωσφορικής φρουκτόζης μέσω της δράσης της φωσφοφρουκτοκινάσης (PFK), σχηματίζοντας 1,6-διφωσφορική φρουκτόζη και καταναλώνοντας ένα μόριο ATP (Bellou et al., 2014; Sarris & Papanikolaou, 2016). Το ένζυμο PFK αποτελεί ένα από τα περιοριστικά στάδια του AMP γλυκολυτικού μονοπατιού, αφού ενεργοποιείται αλλοστερικά από την παρουσία του AMP εντός του μικροβιακού κυττάρου (σε κύτταρα πλούσια σε AMP υπάρχει επιτάχυνση της πρόσληψης της γλυκόζης και του καταβολισμού της γλυκόζης αφού το μικροβιακό κύτταρο χρειάζεται ATP), ενώ απενεργοποιείται αλλοστερικά από την παρουσία του ATP ( το μικροβιακό κύτταρο δεν χρειάζεται περισσότερη γλυκόζη αφού είναι “πλούσιο σε ενέργεια”) (Bellou et al., 2014; Sarris & Papanikolaou, 2016).

Στο δεύτερο στάδιο της γλυκόλυσης (C3 μονοπάτι), δυο ισομερή φωσφορικής τριόζης, που ονομάζονται 3-φωσφορική γλυκεραλδεΐδη (G3P) και φωσφορική διϋδροξυακετόνη σχηματίζονται όταν η 1,6-διφωσφορική φρουκτόζη διασπάται από την καταλυτική δράση της αλδολάσης (Sarris & Papanikolaou, 2016). Αυτή η αντίδραση παράγει ένα πολύ μεγαλύτερο ποσοστό φωσφορικής διϋδροξυακετόνης (DHAP) (96%), το οποίο γρήγορα μετατρέπεται σε G3P από ισομεράση φωσφορικής τριόζης. Μετά, η G3P μετατρέπεται σε 1,3-διφωσφογλυκερικό (1,3-BGP), αντίδραση που καταλύεται από την αφυδρογονάση της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεΐδης. Αυτή η αντίδραση περιλαμβάνει τη σύνθεση ενός μορίου NADH. Στη συνέχεια, το 1,3 BGP μετατρέπεται σε 3-φωσφογλυκερικό, αντίδραση που καταλύεται από τη φωσφογλυκερική κινάση, με ταυτόχρονη απελευθέρωση ενός μορίου ATP. Το τελευταίο στάδιο της γλυκόλυσης μετατρέπει το 3-φωσφογλυκερικό σε πυροσταφυλικό το οποίο είναι το τελικό προϊόν της γλυκόλυσης. Η φωσφογλυκερο-μουτάση καταλύει τη μετατροπή του 3-φωσφογλυκερικού σε 2-φωσφογλυκερικό το οποίο υφίσταται αφυδρογόνωση από το ένζυμο ενολάση, σχηματίζοντας φωσφοενολοπυροσταφυλικό

(PEP). Τελικά, το PEP μετατρέπεται σε πυροσταφυλικό οξύ, αντίδραση που καταλύεται από την πυροσταφυλική κινάση, με ταυτόχρονο σχηματισμό ενός ακόμα μορίου ATP (Bellou et al., 2014; Sarris & Paranikolaou, 2016). Με αυτόν τον τρόπο, από ένα μόριο γλυκόζης, η γλυκόλυση δημιουργεί δυο μόρια πυροσταφυλικού οξέος, τέσσερα μόρια ATP και δυο μόρια NADH (Sarris & Paranikolaou, 2016). Δεδομένου ότι δυο μόρια ATP είχαν χρησιμοποιηθεί αμέσως για να ενεργοποιήσουν ένα νέο μόριο εξόζης, το καθαρό ενεργειακό κέρδος της γλυκόλυσης για το κύτταρο συμπερασματικά είναι δυο μόρια ATP ανά μόριο εξόζης που μεταβολίζεται. Το πυροσταφυλικό που παράχθηκε από τη γλυκόλυση μπορεί να χρησιμοποιηθεί από ζύμες για μερικά μεταβολικά μονοπάτια. Προφανώς, ο μικροοργανισμός πρέπει να αναγεννήσει  $\text{NAD}^+$  από το NADH για να αποκαταστήσει το οξειδο-αναγωγικό δυναμικό του κυττάρου. Αυτό μπορεί να γίνει μέσω ζύμωσης ή αναπνοής. Αυτό το στάδιο σηματοδοτεί το τέλος του κοινού κορμού της γλυκόλυσης. Ακολουθούν οι αντιδράσεις της αλκοολικής ζύμωσης, της γλυκεροπυροσταφυλικής ζύμωσης ή της αναπνοής, ανάλογα με διάφορες συνθήκες (Sarris & Paranikolaou, 2016).

### 1.3.2. Αλκοολική ζύμωση

Η αναγωγική δύναμη του NADH που παράγεται μέσω της γλυκόλυσης πρέπει να μεταφερθεί σε έναν αποδέκτη ηλεκτρονίων για να αναγεννήσει  $\text{NAD}^+$  που καταναλώθηκε από τη γλυκόλυση (Sarris & Paranikolaou, 2016). Στην περίπτωση της ζύμης *S. cerevisiae* και άλλων ειδών ζύμης, αυτή η διαδικασία ονομάζεται αλκοολική ζύμωση και πραγματοποιείται εντός του κυτταροπλάσματος, όπου η ακεταλδεΐδη (η αιθανάλη: το προϊόν αποκαρβοξυλίωσης του πυροσταφυλικού οξέος) χρησιμεύει ως ο τελικός αποδέκτης ηλεκτρονίου. Όσον αφορά τη γλυκόλυση, η αλκοολική ζύμωση περιέχει δυο επιπλέον ενζυμικές αντιδράσεις. Το πυροσταφυλικό αρχικά αποκαρβοξυλιώνεται σε ακεταλδεΐδη από την πυροσταφυλική αποκαρβοξυλάση. Οι συμπαραγόντες είναι η πυροφωσφορική θειαμίνη (TPP) και το μαγνήσιο. Μετά, η ακεταλδεΐδη ανάγεται σε αιθανόλη ανακυκλώνοντας το NADH σε  $\text{NAD}^+$ . Αυτή η αντίδραση καταλύεται από την αλκοολική αφυδρογονάση χρησιμοποιώντας τον ψευδάργυρο ως συμπάραγοντα. Τα δυο τελικά προϊόντα της αλκοολικής ζύμωσης, η αιθανόλη και το διοξείδιο του άνθρακα, μεταφέρονται έξω από το κύτταρο μέσω απλής διάχυσης (Sarris & Paranikolaou, 2016).

### 1.3.3. Γλυκεροπυροσταφυλική ζύμωση

Ουσιαστικά ο λόγος που οι ζύμες παράγουν αλκοόλη είναι το γεγονός ότι τα κύτταρα ζύμης χρειάζονται ενέργεια και διατηρούν την οξειδοαναγωγική ισορροπία όταν καταναλώνουν σάκχαρα υπό αναερόβιες συνθήκες (Walker & Walker, 2018). Το τελευταίο το καταφέρνουν αναγεννώντας το  $\text{NAD}^+$  στην τελική αντίδραση της ζύμωσης έτσι εναλλακτικά θα μπορούσε κάποιος να θεωρήσει ότι η ζύμη *S. cerevisiae* παράγει αιθανόλη για να διατηρήσει το ενδοκυτταρικό ισοζύγιο των ηλεκτρονίων της. Δηλαδή, ο λόγος  $\text{NADH}/\text{NAD}^+$  στη ζύμωση είναι αναλοίωτος (Walker & Walker, 2018).

Ένας άλλος τρόπος για τις ζύμες να διατηρήσουν το οξειδοαναγωγική ισορροπία κατά τη διάρκεια της ζύμωσης σακχάρων είναι να παραγάγουν γλυκερόλη (το  $\text{NAD}^+$  αναγεννάται μέσω της φωσφορικής διυδροξυακετόνης στη γλυκόλυση) (Walker & Walker, 2018). Επίσης, αυτή η σακχαρώδης αλκοόλη παράγεται ως απόκριση στο οξειδωτικό στρες και συχνά περιγράφεται ως συμβατή διαλυμένη ουσία που ενεργοποιεί τα κύτταρα να αντισταθμίσουν την απώλεια νερού (Walker & Walker, 2018).

Η γλυκερόλη είναι μια σημαντική ένωση που συνθέτουν οι ζύμες και οι μύκητες εντός του κυττάρου ως απόκριση σε διάφορα είδη στρες, όπως είναι το κρύο, οι οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις και το ωσμωτικό στρες (Xue et al., 2017). Το σύστημα που ρυθμίζει την ώσμωση στη ζύμη *Saccharomyces cerevisiae* έχει μελετηθεί καλά. Στη ζύμη *S. cerevisiae*, μετά τη φωσφορυλίωση και κατάλυση από αλδολάση, η γλυκόζη μεταβολίζεται σε 3-φωσφορική γλυκεριναλδεΐδη και DHAP. Το προϊόν που παράγεται από τη 3-φωσφορική γλυκεριναλδεΐδη εισέρχεται στον κύκλο των τρικαρβοξυλικών οξέων ή στη γλυκόλυση μετά από αποκαρβοξυλίωση, και η DHAP ανάγεται σε G3P από το ένζυμο cGpdh. Αυτή είναι η πρώτη ενζυμική αντίδραση που εισέρχεται στο τμήμα του μονοπατιού για τη βιοσύνθεση της γλυκερόλης. Η G3P καταλύεται τότε από το ένζυμο G3pp για να μετατραπεί η G3P σε γλυκερόλη, αντίδραση η οποία αποτελεί την τελευταία ενζυμική αντίδραση της βιοσύνθεσης της γλυκερόλης. Η ενζυμική ενεργότητα της cGpdh καθορίζει άμεσα τη ροή άνθρακα του καταβολισμού της γλυκόζης προς τη σύνθεση γλυκερόλης και την τελική παραγωγή γλυκερόλης (Xue et al., 2017).

#### 1.3.4. Αναπνοή

Οι ζύμες είναι προαιρετικά αναερόβιοι μικροοργανισμοί επειδή κατέχουν τον γενετικό εξοπλισμό για να μεταβολίσουν τα σάκχαρα υπό αερόβιες ή αναερόβιες συνθήκες (Sarris & Papanikolaou, 2016). Επομένως, τα σάκχαρα μπορούν να καταναλωθούν και μέσω της αναπνοής, στην οποία όταν τα εμπλεκόμενα σάκχαρα (ή γλυκερόλη) χρησιμοποιούνται από την αναπνευστική οδό, το πυροσταφυλικό οξύ υφίσταται οξειδωτική αποκαρβοξυλίωση, αντίδραση η οποία καταλύεται από την πυροσταφυλική αφυδρογονάση στο εσωτερικό των μιτοχονδρίων. Η TPP, το λιποαμίδιο και το φλαβινο-αδενινο δινουκλεοτίδιο (FAD) χρησιμεύουν ως καταλυτικοί συμπαραγόντες. Αυτή η αντίδραση μετατρέπει το NAD<sup>+</sup> σε NADH και πρέπει να ενσωματώσει το ακέτυλο συνένζυμο Α (acetyl-CoA) (η ακετυλομάδα που απορρέει από το πυροσταφυλικό ενεργοποιείται σε μορφή ακέτυλο-CoA). Το ακέτυλο-CoA μπορεί τότε να ενσωματωθεί στον κύκλο του κιτρικού οξέος (κύκλος τρικαρβοξυλικών οξέων ή κύκλος του Krebs), έτσι ώστε να οξειδωθεί εντελώς σε διοξείδιο του άνθρακα και να παράξει αναγωγική δύναμη (NADH και FADH). Επίσης αυτές οι αντιδράσεις συμβαίνουν στα μιτοχόνδρια. Η αναπνοή ενός mol γλυκόζης παράγει ένα συνολικό ενεργειακό κέρδος των 36-38 μορίων ATP. Έτσι, η αναπνοή της ίδιας ποσότητας σακχάρων παράγει 18 με 19 φορές περισσότερη βιολογικά χρήσιμη ενέργεια διαθέσιμη στις ζύμες απ' ό τι στη ζύμωση υποδεικνύοντας ότι αυτή είναι μια πολύ πιο ωφέλιμη διαδικασία όσον αφορά τη παραγωγή ενέργειας απ' ό τι εκείνη της ζύμωσης. Σε κάθε περίπτωση, η μετατροπή του πυροσταφυλικού σε ακεταλδεΐδη ή ακέτυλο-CoA είναι ως εκ τούτου ένα βασικό σημείο για τη ρύθμιση του μεταβολισμού της ζύμης (Sarris & Papanikolaou, 2016).

#### 1.4. Συσσώρευση λιπιδίων στους μικροοργανισμούς

Τα λιπίδια ορίζονται ως υδρόφοβα μόρια που είναι διαλυτά σε οργανικούς διαλύτες και αυτές οι ενώσεις βρίσκονται στους μικροοργανισμούς, στα φυτά και στα ζώα με λειτουργίες που σχετίζονται με την κυτταρική δομή, την αποθήκευση ενέργειας, την ενζυμική ενεργότητα και τη σηματοδότηση (Mbuyane et al., 2021). Το πιο σημαντικό είναι ότι τα λιπίδια σχηματίζουν τη ραχοκοκαλιά όλων των κυτταρικών μεμβρανών και είναι υπεύθυνα για την πλασματική μεμβράνη και τη διατήρηση της δομής των οργανιδίων (Mbuyane et al., 2021).

Εκτός από τις παραδοσιακές πηγές των λιπιδίων (φυτά, ζώα και θαλάσσιες πηγές), πολλά στελέχη μικροοργανισμών, στα οποία περιλαμβάνονται οι ζύμες, οι μύκητες, τα άλγη, τα βακτήρια και θραυστοχυτρίδια θαλάσσιας προέλευσης, μπορούν να παράγουν διαφορετικούς τύπους λιπιδίων (Ghazani & Marangoni, 2022). Τα λιπίδια κατηγοριοποιούνται με βάση τις φυσικές και λειτουργικές τους ιδιότητες, και περιλαμβάνουν ακυλογλυκερόλες, γλυκεροφωσφολιπίδια, σφιγγολιπίδια, στερόλες, φαινολικά λιπίδια, σακχαρολιπίδια, λιποπρωτεΐνες και πολυκετίδια (Fahy et al., 2005; Ghazani & Marangoni, 2022). Όσον αφορά τον τομέα των τροφίμων, τα λιπίδια ενδιαφέροντος είναι οι τριακυλογλυκερόλες (TAGs) (Ghazani & Marangoni, 2022).

Γενικά, τα κύτταρα των ελαιογόνων μικροοργανισμών συσσωρεύουν λιπίδια όταν αναπτύσσονται σε ένα υλικό με περίσσεια πηγή άνθρακα και μια περιορισμένη πηγή αζώτου ή φωσφόρου (Poontawee et al., 2023). Η συσσώρευση των λιπιδίων μέσα σε ελαιογενή ζύμη είναι κυρίως ως τριακυλογλυκερόλες και μικρές ποσότητες από στερυλεστέρες που συσσωρεύονται ως αποθηκευτικά λιπίδια. Σε αντίθεση με τους ελαιογόνους μικροοργανισμούς, τα μη-ελαιογόνα είδη τείνουν να αποθηκεύουν πολυσακχαρίτες και να παράγουν δευτερογενείς μεταβολίτες (Poontawee et al., 2023).

Μεταξύ των μικροοργανισμών, οι ελαιογενείς ζύμες φαίνεται ότι είναι οι πιο κατάλληλοι μικροοργανισμοί για παραγωγή μικροβιακού λίπους (Poontawee et al., 2023). Η ζύμη έχει προτιμητέα χαρακτηριστικά συγκριτικά με τους νηματώδεις μύκητες και τα μικροάλγη επειδή οι ζύμες είναι μονοκύτταροι, προσφέρουν υψηλούς ρυθμούς ανάπτυξης και υψηλή περιεκτικότητα σε κυτταρικά λιπίδια (Poontawee et al., 2023). Η καλλιέργεια της ζύμης μπορεί να διεξαχθεί σε έναν ζυμωτήρα και εύκολα κλιμακώνεται και το φως δεν απαιτείται για την ανάπτυξή της (Sawangkeaw & Ngamprasertsith, 2013; Poontawee et al., 2023). Επιπλέον, οι ζύμες μπορούν να χρησιμοποιήσουν διάφορα υποστρώματα χαμηλού κόστους για ανάπτυξη και παραγωγή λιπιδίων (Han et al., 2019; Santamauro et al., 2014; Wen & Li, 2022; Poontawee et al., 2023). Τα

στελέχη των ελαιογενών ζυμών μπορούν να συσσωρεύσουν λιπίδια έως και 40% της ξηρής κυτταρικής μάζας σε περιοριστικές σε θρεπτικά συνθήκες (Poontawee et al., 2023).

#### 1.4.1. Βιοχημικά μονοπάτια για τη συσσώρευση λιπιδίων στις ζύμες

Η ικανότητα της συσσώρευσης των λιπιδίων εξαρτάται από τα ενζυμικά και μεταβολικά μονοπάτια κάθε είδους (Poontawee et al., 2023). Σε συνθήκες όπου το άζωτο είναι περιορισμένο, η συγκέντρωση της μονοφωσφορικής αδενοσίνης (AMP) ελαττώνεται λόγω της διάσπασης της από το ένζυμο AMP-απαμινάση και της αναστολής του ένζυμο NAD<sup>+</sup>-ισοκιτρική αφυδρογονάση (NAD<sup>+</sup>-ICDH), οδηγώντας στη συσσώρευση του κιτρικού οξέος στο εσωτερικό του μιτοχονδρίου και στην έκκριση στο εσωτερικό του κυτοσολίου. Κατά τη διάρκεια της λιπογενούς φάσης το κιτρικό οξύ διασπάται από την ATP κιτρική λυάση (ACL) σε οξαλοξικό και ακυλ-CoA, το πρόδρομο μόριο για τη βιοσύνθεση των λιπαρών οξέων. Στις μη-ελαιογενείς ζύμες το ακέτυλ-CoA παράγεται από οξικό στο κυτόπλασμα από το ένζυμο ακέτυλ-CoA συνθάση, ενώ στις ελαιογενείς ζύμες, παράγεται από το κιτρικό μέσω του ενζύμου ATP κιτρική λυάση στα περοξυσώματα (Poontawee et al., 2023).

Για χρόνια είναι γνωστό ότι οι ελαιογόνοι μικροοργανισμοί, ειδικότερα κάποιες μορφές ελαιογόνων ζυμών, μπορεί να συσσωρεύουν λιπίδια ως μονοκυτταρικά έλαια (SCOs) (Robles-Iglesias et al., 2023). Επίσης είναι αξιοσημείωτο ότι δεν μπορούν όλοι οι μικροοργανισμοί να αποθηκεύσουν λιπίδια ως τριακυλογλυκερόλη (TAG). Τα τελευταία χρόνια, η μέθοδος με την οποία αυτά τα μικρόβια συναθροίζουν αυτόν τον τύπο λιπιδίων έχει μελετηθεί και κατανοηθεί καλύτερα. Οι μηχανισμοί μέσω των οποίων οι ελαιογόνες ζύμες μπορούν να παράγουν TAGs μέσω της μετατροπής ενός δεδομένου υποστρώματος είναι ουσιαστικά οι δυο ακόλουθοι: η *de novo* σύνθεση και η *ex novo* σύνθεση (Papanikolaou & Aggelis, 2011; Robles-Iglesias et al., 2023). Όταν ο μικροοργανισμός βρίσκεται υπό στρεσογόνες συνθήκες, παρουσιάζοντας ένα υψηλό λόγο C/N με έλλειψη αζώτου, πραγματοποιείται η *de novo* σύνθεση (Kuttiraja et al., 2016; Robles-Iglesias et al., 2023). Υποβοηθάται από μια μεταβολική ανισορροπία υπό την παρουσία μιας κρίσιμης ανεπάρκειας σε θρεπτικό συστατικό στο μέσο ανάπτυξης, που προκαλεί μια μεταβολική μετάβαση στην οποία η ανάπτυξη σταματάει, και ευνοείται η λιπογονική φάση. Η *ex novo* σύνθεση, από την άλλη πλευρά, συνεπάγεται την υδρόλυση των υδρόφοβων υποστρωμάτων (όπως TAGs, αλκάνια και

ελεύθερα λιπαρά οξέα) για να παράγουν λιπαρά οξέα (FAs) και γλυκερόλη τα οποία στη συνέχεια μεταφέρονται στο εσωτερικό του κυττάρου για να μετατραπούν σε TAGs (Paranikolaou & Aggelis, 2011; Robles-Iglesias et al., 2023).

### 1.5. Παραγωγή αραβιτόλης από ζύμες

Η πολυόλη αραβιτόλη (αραβιτινόλη) μπορεί να επικρατήσει με δυο μορφές, ως L-αραβιτόλη και D-αραβιτόλη (Kordowska-Wiater, 2015). Αυτή η αλκοόλη σακχάρων με μοριακό βάρος 152 (και στις δυο μορφές) ανήκει στην οικογένεια των πεντιτολών μαζί με τη ξυλιτόλη και ριβιτόλη. Είναι γλυκιά, άχρωμη, κρυστάλλινη και διαλυτή στο νερό. Επί του παρόντος, η αραβιτόλη παράγεται σε βιομηχανική κλίμακα μέσω της χημικής μετατροπής σε λακτόνες των αραβινοικών και λυξονικών οξέων, μια αντίδραση που απαιτεί έναν ακριβό καταλύτη και μια σταθερή θερμοκρασία των 100 °C. Αντί για χημική παραγωγή της αραβιτόλης, ωστόσο, η αραβιτόλη μπορεί να συντεθεί χρησιμοποιώντας μια βιοτεχνολογική μέθοδο που είναι γνωστή ως βιομετατροπή ή βιομετασχηματισμός, που πιστεύεται ότι είναι περιβαλλοντικά φιλική και πιο οικονομική, καθώς δεν απαιτεί τη χρήση υποστρωμάτων καθαρής ζάχαρης και χημικών καταλυτών. Η βιομετατροπή περιλαμβάνει την εφαρμογή ζωντανών μικροβιακών κυττάρων που εκτελούν πολλαπλές καταλυόμενες από ένζυμα αντιδράσεις. Το καλύτερο υλικό έναρξης για την παραγωγή της D-αραβιτόλης είναι η γλυκόζη, ένας μονοσακχαρίτης που μπορεί να προμηθευτεί φθηνά λόγω της αφθονίας του στη φύση. Ένα άλλο υπόστρωμα από απόβλητα που έχει προταθεί για την παραγωγή της αραβιτόλης είναι η γλυκερόλη. Τα στελέχη ζυμών παίζουν σημαντικό ρόλο στην παραγωγή της αραβιτόλης μέσω βιομετατροπής (Kordowska-Wiater, 2015). Ένας αριθμός ωσμοφιλικών ή ωσμωανεκτικών ζυμών όπως η *Zygosaccharomyces rouxii*, η *D. hansenii*, η *Candida albicans*, η *Candida pelliculosa*, η *Candida famata*, και η *Pichia miso* μπορούν να παραγάγουν D-αραβιτόλη από γλυκόζη, αλλά συνήθως ο χρόνος επώασης είναι πολύ μεγάλος και οι αποδόσεις πολύ μικρές για να είναι βιομηχανικά αποδεκτές (Saha et al., 2007; Kordowska-Wiater, 2015).

Μελέτες σχετικά με τη χρήση γλυκερόλης ως υπόστρωμα για την παραγωγή αραβιτόλης έχουν διεξαχθεί τα τελευταία 5 χρόνια ως απάντηση στην αυξανόμενη παραγωγή βιοντίζελ (Kordowska-Wiater, 2015). Οι Koganti et al. (2011) μελέτησαν 214 στελέχη ζύμης, κυρίως από τα γένη *Debaryomyces*, *Geotrichum*, *Metschnikowia*, *Candida* και *Dipodascus*, μεταξύ των οποίων, τα γένη *Debaryomyces* και

*Metschnikowia* βρέθηκαν ότι έχουν τους μεγαλύτερους αριθμούς στελεχών που παράγουν αξιοσημείωτες ποσότητες αραβιτόλης και πολύ χαμηλές ποσότητες άλλων πολυολών από γλυκερόλη μετά από 3 μέρες ασυνεχούς καλλιέργειας (Kordowska-Wiater, 2015).

#### 1.5.1. Ο μεταβολισμός της L-αραβινόζης σε αραβιτόλη στις ζύμες

Η μεταφορά του σακχάρου μέσω της κυτταρικής μεμβράνης είναι το πρώτο στάδιο στον μεταβολισμό των πεντοζών (Kordowska-Wiater, 2015). Υπάρχουν πολύ λίγες πληροφορίες σχετικά με τη μεταφορά της L-αραβινόζης στις ζύμες χρησιμοποιώντας φυσική αραβινόζη. Στο αρχικό στάδιο μεταβολισμού της αραβινόζης στις ζύμες, αυτή η πεντόζη μετατρέπεται από την ρεδουκτάση της L-αραβινόζης (ρεδουκτάση αλδόζης) (AR; EC 1.1.1.21) σε πολυόλη, στην L-αραβιτόλη, η οποία στη συνέχεια οξειδώνεται σε L-ξυλουλόζη από την L-αραβιτόλ-4-αφυδρογονάση (LAD; EC 1.1.1.12). Στο επόμενο στάδιο, η L-ξυλουλόζη μετατρέπεται σε ξυλιτόλη από τη ρεδουκτάση της L-ξυλουλόζης (LXR; EC 1.1.1.10). Αυτή η πεντιτόλη είναι μια ενδιάμεση ένωση στα καταβολικά μονοπάτια της αραβινόζης και της ξυλόζης (Kordowska-Wiater, 2015). Πολλά είδη ζυμών είναι γνωστά ότι είναι ικανά να αφομοιώνουν L-αραβινόζη ως τον μοναδικό άνθρακα και πηγή ενέργειας. Παράγουν βιομάζα αερόβια και υπό συνθήκες με περιορισμένο αερισμό, εκκρίνουν L-αραβιτόλη στο μέσο (Kordowska-Wiater, 2015).

#### 1.5.2. Μεταβολικά μονοπάτια για τη μετατροπή της γλυκόζης και της γλυκερόλης σε D-αραβιτόλη στις ζύμες

Η γλυκόζη μεταφέρεται εντός του κυττάρου μέσω δυο συστημάτων: έναν μηχανισμό διευκολυνόμενης διάχυσης, βασισμένο στη βαθμίδωση της γλυκόζης, ή έναν ενεργό συμμεταφορέα σακχάρου-πρωτονίου, που επιτρέπει τη γλυκόζη να συσσωρευτεί εντός του κυττάρου από την πρωτονιακή κινητήρια δύναμη και ρυθμίζεται στενά από τη συγκέντρωση του σακχάρου στο περιβάλλον (Fonseca et al., 2007; Kordowska-Wiater, 2015). Το σύστημα μεταφοράς που χρησιμοποιείται εξαρτάται απ' τα είδη ζύμης, τους μεταφορείς της και τους διευκολυντές της. Η D-αραβιτόλη παράγεται από γλυκόζη μέσω δυο εναλλακτικών μονοπατιών (Kordowska-Wiater, 2015). Στο πρώτο στάδιο, αυτή η εξόζη φωσφορυλιώνεται σε 6-φωσφορική-γλυκόζη, η οποία ύστερα μετατρέπεται στο PPP. Μερικοί οργανισμοί μπορούν να μετατρέψουν την 6-φωσφορική-γλυκόζη σε 5-φωσφορική-D-ριβουλόζη, αποφωσφορυλιώνουν αυτήν την



τελευταία ένωση, και μετά μετατρέπουν την D-ριβουλόζη σε D-αραβιτόλη μέσω μιας NADP-εξαρτώμενης αφυδρογονάσης της D-αραβιτόλης (EC 1.1.1.11) (μονοπάτι που σχηματίζεται η D-ριβουλόζη). Άλλα στελέχη μπορούν να μετατρέψουν την 6-φωσφορική γλυκόζη σε 5-φωσφορική-D-ξυλουλόζη, και μετά από αποφωσφορυλίωση μετατρέπουν την D-ξυλουλόζη σε D-αραβιτόλη μέσω της NAD-εξαρτώμενης αφυδρογονάσης της D-αραβιτόλης (μονοπάτι που σχηματίζεται η D-ξυλουλόζη) (Saha et al., 2007; Kordowska-Wiater, 2015).

Στα κύτταρα ζύμης, η σύνθεση αραβιτόλης από γλυκερόλη αναμένεται να ακολουθήσει παρόμοιες πορείες με εκείνες που οδηγούν από τη γλυκόζη μέσω της 6-φωσφορικής-γλυκόζης (Kordowska-Wiater, 2015). Πρώτα, η γλυκερόλη που αφομοιώνεται μέσω απλής διάχυσης ή με ενεργό μεταφορά φωσφορυλιώνεται από την κινάση της γλυκερόλης (EC 2.7.1.30) (π.χ. στη ζύμη *Candida utilis* ή *S. cerevisiae*) προς 3-φωσφορική-γλυκερόλη και μετά προς φωσφορική διυδροξυακετόνη (DHAP) μέσω της αφυδρογονάσης της 3-φωσφορικής-γλυκερόλης (EC 1.1.1.8). Ένα εναλλακτικό μονοπάτι στις ζύμες που στερείται την κινάση της γλυκερόλης περιλαμβάνει την NAD-εξαρτώμενη αφυδρογονάση της γλυκερόλης (EC 1.1.1.6) και την κινάση της διυδροξυακετόνης (EC 2.7.1.29). Η φωσφορική διυδροξυακετόνη, που σχηματίστηκε στις παραπάνω οδούς, μετατρέπεται σε 3-φωσφορική-γλυκεραλδεΐδη και μετέπειτα μέσω του μονοπατιού της γλυκονεογένεσης σε 6-φωσφορική-γλυκόζη (Kordowska-Wiater, 2015). Αυτή η ένωση στη συνέχεια μετατρέπεται στο PPP σε αραβιτόλη μέσω της 5-φωσφορικής-ριβουλόζης και ριβουλόζης (Koganti et al., 2011; Kordowska-Wiater, 2015).

## 2. ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της συγκεκριμένης μελέτης είναι η διερεύνηση της ικανότητας παραγωγής αιθυλικής αλκοόλης από non-*Saccharomyces* ζύμες. Συγκεκριμένα οι υπό μελέτη ζύμες είναι η *Metschnikowia pulcherrima* καθώς και νέα στελέχη ζυμών των ειδών *Pichia manshurica*, *Trigonopsis californica*, *Zygosaccharomyces bailii* και *Priceomyces carsonii*, τα οποία έχουν απομονωθεί πρόσφατα (Tzamourani et al., 2023). Οι ζύμες αναπτύχθηκαν σε υγρή καλλιέργεια, που περιείχε ως κύρια πηγή άνθρακα εμπορική γλυκόζη και εμπορική φρουκτόζη. Η μελέτη της παραγωγής της αιθυλικής αλκοόλης με τη χρήση των παραπάνω ζυμών πραγματοποιήθηκε υπό αερόβιες και αναερόβιες συνθήκες, σε κυμαινόμενες και σχετικά υψηλές συγκεντρώσεις σακχάρων. Επιπλέον, στα πλαίσια της συγκεκριμένης μελέτης διερευνήθηκε η ικανότητα παραγωγής βιομάζας και λιπιδίων από τις προαναφερόμενες ζύμες.

## 3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 3.1. ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ ΚΑΙ ΠΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ

Στην παρούσα διπλωματική εργασία χρησιμοποιήθηκαν 5 διαφορετικά είδη μικροοργανισμών. Συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκε αλκοολική ζύμωση χρησιμοποιώντας τη ζύμη *Metschnikowia pulcherrima*, που δόθηκε από το Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών και άλλα 4 είδη ζυμομυκήτων που δόθηκαν από το Εργαστήριο Μικροβιολογίας Οίνων από το Τμήμα Επιστημών Οίνου, Αμπέλου και Ποτών του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής τα οποία είναι τα εξής: *Pichia manshurica* (στέλεχος: K34Y10), *Trigonopsis californica* (στέλεχος: A9Y1), *Zygosaccharomyces bailii* (στέλεχος: A19Y5) και *Priceomyces carsonii* (στέλεχος: K21Y9). Τα στελέχη των ειδών *Pichia manshurica*, *Trigonopsis californica*, *Zygosaccharomyces bailii* και *Priceomyces carsonii* απομονώθηκαν πρόσφατα στο τέλος των αυθόρμητων αλκοολικών ζυμώσεων ελληνικών οίνων (Tzamourani et al., 2023) και έχουν χαρακτηριστεί ως προς το οινολογικό τους δυναμικό σε μούστο από Ασύρτικο (Tzamourani et al., 2024).

Κάθε ζύμη διατηρούταν στην κατάψυξη σε cryovial το οποίο περιείχε 0,5 ml γλυκερόλης και 0,5 ml της εκάστοτε ζύμης. Κατά την έναρξη κάθε πειράματος παρασκευάστηκε για κάθε μικροοργανισμό υγρό θρεπτικό υλικό που εναποτέθηκε σε

κωνικές φιάλες των 250 ml και περιείχε σε 100 ml διαλύματος: 1 g γλυκόζης, 1 g πεπτόνης και 1 g εκχυλίσματος ζύμης. Το υγρό θρεπτικό υλικό αποστειρώθηκε στους 121,1 °C για 20 λεπτά σε αυτόκαυστο και μετά εμβολιάστηκε χρησιμοποιώντας ως εμβόλιο κάθε ζύμη (η οποία προϋπήρχε σε cryovial). Η υγρή προκαλλιέργεια επωάστηκε στους 22°C - 25 °C για 24 h – 48 h στον αναδευτήρα για να αναπτυχθεί σε ικανοποιητικό βαθμό η ζύμη που περιέχεται σ' αυτήν. Στη συνέχεια, η υγρή προκαλλιέργεια χρησιμοποιήθηκε ως εμβόλιο για να εμβολιαστεί υγρή καλλιέργεια η οποία θα χρησιμοποιούνταν μετέπειτα για να πραγματοποιηθούν σ' αυτή ζυμώσεις.

### **3.2. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΥΓΡΗΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΡΑΓΜΑΤΟΠΟΙΗΣΗ ΑΛΚΟΟΛΙΚΗΣ ΖΥΜΩΣΗΣ**

Το υγρό θρεπτικό μέσο στο οποίο πραγματοποιήθηκαν όλες οι ζυμώσεις περιείχε τα ακόλουθα υλικά: 50 g/L – 200 g/L γλυκόζη και 50 g/L – 200 g/L φρουκτόζη (με ίσες ποσότητες γλυκόζης και φρουκτόζης), 4 g/L εκχύλισμα ζύμης, 4 g/L πεπτόνη, 7 g/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 2,5 g/L  $\text{NA}_2\text{HPO}_4$ , 1,5 g/L  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,15 g/L  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 0,02 g/L  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,06 g/L  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  και 0,15 g/L  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ . Η αποστείρωση του υγρού θρεπτικού μέσου πραγματοποιήθηκε στους 121,1 °C για 20 λεπτά σε αυτόκαυστο.

Ύστερα, το υγρό θρεπτικό υλικό εμβολιάστηκε χρησιμοποιώντας ως εμβόλιο 2% v/v υγρής προκαλλιέργειας (η παρασκευή της οποίας αναφέρθηκε στην ενότητα 3.1.). Τα πειράματα διεξάχθηκαν υπό αερόβιες συνθήκες σε αναδευόμενες κωνικές φιάλες των 250 ml, με ενεργό όγκο 50 ml, στους 22 °C – 25 °C στα 180 rpm, για περίπου 6 – 30 ημέρες ανάλογα τον μικροοργανισμό και το πείραμα. Υπό αναερόβιες συνθήκες οι καλλιέργειες έλαβαν χώρα σε φιάλες Duran των 100 ml με ενεργό όγκο 100 ml σε θερμοκρασία δωματίου για περίπου 13 ημέρες. Από τα πειράματα που διεξάχθηκαν υπό αερόβιες και αναερόβιες συνθήκες λαμβάνονταν δείγματα, για τα οποία πραγματοποιήθηκαν αναλύσεις ως προς τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης της γλυκόζης, της φρουκτόζης, της αιθανόλης, της βιομάζας και του μικροβιακού λίπους.

### 3.3. ΑΝΑΛΥΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

#### 3.3.1. Προσδιορισμός της συγκέντρωσης των πηγών άνθρακα και της αιθανόλης

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης της γλυκόζης και της φρουκτόζης πραγματοποιήθηκε μέσω Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Πίεσης (High Pressure Liquid Chromatography ή αλλιώς HPLC). Για κάθε δείγμα που λήφθηκε από την υγρή καλλιέργεια πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση για 10 min στα 9000 rpm. Τα δείγματα αραιώθηκαν (όποτε ήταν αναγκαίο) και πραγματοποιήθηκε φιλτράρισμα σε αυτά χρησιμοποιώντας ειδικό φίλτρο Whatman με διάμετρο σπών 0,22  $\mu\text{m}$ . Στη συνέχεια το δείγμα αναλυόταν μέσω HPLC. Ο υγρός χρωματογράφος ήταν τύπου Waters Alliance 2695 με έναν ανιχνευτή UV και έναν ανιχνευτή RI [2410 Refractive Index (R.I.) Detector]. Η διαχωριστική στήλη που χρησιμοποιήθηκε ήταν της εταιρείας Phenomenex, ο τύπος της στήλης ήταν ROA - Organic Acid H+ (8%) και οι διαστάσεις της στήλης ήταν 300 x 7.8 mm. Η κινητή φάση ήταν υδατικό διάλυμα θειϊκού οξέος ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) 5 mM με θερμοκρασία στήλης 60 °C και ροή 0,5 mL/min. Η δειγματοληψία ορίστηκε στα 20  $\mu\text{L}$  για 30 min. Το χρωματογράφημα που προέκυπτε υπόκειτο σε επεξεργασία μέσω του λογισμικού Empower και συγκεκριμένα μέσω ολοκλήρωσης των κορυφών των πηγών άνθρακα. Στα πειράματα που διεξάχθηκαν ο ανιχνευτής RI χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό της γλυκόζης, της φρουκτόζης και της αιθανόλης. Ο εντοπισμός της πηγής άνθρακα και ο ποσοτικός προσδιορισμός της συγκέντρωσης της πραγματοποιήθηκε αφού πρώτα είχαν δημιουργηθεί πρότυπες καμπύλες για τη γλυκόζη και τη φρουκτόζη. Για τη δημιουργία πρότυπων καμπυλών πραγματοποιήθηκαν διαδοχικές αραιώσεις πρότυπου διαλύματος για το εκάστοτε σάκχαρο.

Οι πηγές άνθρακα εντοπίστηκαν μέσω του χρόνου κατακράτησης (Retention Time) και η συγκέντρωση της εκάστοτε πηγής άνθρακα προσδιορίστηκε «εισάγοντας» το εμβαδόν της κορυφής (Area) στην εξίσωση της πρότυπης καμπύλης για το εκάστοτε σάκχαρο. Μέσω εξισώσεων πρότυπων καμπυλών για κάθε πηγή άνθρακα υπολογίστηκαν οι συγκεντρώσεις των υπολειπόμενων σακχάρων ( $S_R$  σε g/L). Έστερα, οι συγκεντρώσεις των σακχάρων υπολογίστηκαν με βάση την αραιώση που πραγματοποιούταν (όποτε ήταν αναγκαίο) για το εκάστοτε δείγμα πριν το φιλτράρισμα. Αντίστοιχα, η συγκέντρωση της αιθανόλης προσδιορίστηκε με ανάλογο τρόπο όπως στην περίπτωση των πηγών άνθρακα, χρησιμοποιώντας την κατάλληλη εξίσωση πρότυπης καμπύλης για την αιθανόλη.

### 3.3.2. Προσδιορισμός γλυκερόλης και αραβιτόλης

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης της γλυκερόλης και της αραβιτόλης υπολογίστηκε με ανάλογο τρόπο με τον οποίο προσδιορίστηκαν οι πηγές άνθρακα και η αιθανόλη, όπως περιγράφηκαν στην ενότητα 3.3.1.. Κάθε ουσία εντοπίστηκε μέσω του χρόνου κατακράτησης και μέσω της εξίσωσης πρότυπης καμπύλης για αυτήν υπολογίστηκε η συγκέντρωσή της. Ύστερα η συγκέντρωση της υπολογίστηκε με βάση την αραίωση που πραγματοποιήθηκε (όποτε ήταν αναγκαίο) για το δείγμα πριν το φιλτράρισμα.

### 3.3.3. Προσδιορισμός της βιομάζας και του μικροβιακού λίπους

Για να προσδιοριστεί η βιομάζα (ξηρή βιομάζα, Dry Weight ή DW) από το υγρό της καλλιέργειας αρχικά πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση για 10 min στα 9000 rpm σε  $T=4\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Hettich ZENTRIFUGEN, UNIVERSAL 320R, D-78532 Tuttlingen, Werk Nr.) σε κατάλληλους πλαστικούς σωλήνες (falcon tubes των 50 mL). Δείγμα υπερκειμένου λήφθηκε για να αναλυθεί μέσω της HPLC και το υπόλοιπο απορρίφθηκε. Το ίζημα επαναιωρήθηκε με απιονισμένο νερό και πραγματοποιήθηκε ξανά φυγοκέντρηση για να απομακρυνθεί εντελώς το υγρό της ζύμωσης. Το υπερκείμενο απορρίφθηκε και η βιομάζα μεταφέρθηκε σε προζυγισμένα φιαλίδια τύπου McCartney, τα οποία μεταφέρθηκαν σε κλίβανο σταθερής θερμοκρασίας  $80\text{ }^{\circ}\text{C}$  έτσι ώστε μέσω ξήρανσης να αφυδατωθεί πλήρως η βιομάζα. Αφού πραγματοποιήθηκε η ξήρανση, υπολογίστηκε το μικτό βάρος του φιαλιδίου με την ξηρή βιομάζα. Από τη διαφορά του απόβαρα από το μικτό βάρος του φιαλιδίου που περιείχε τη ξηρή βιομάζα υπολογίστηκε η ξηρή βιομάζα. Τέλος, η ξηρή βιομάζα ανάχθηκε σε βιομάζα ανά λίτρο υγρής καλλιέργειας (g/L).

Για να εκχυλιστεί το μικροβιακό λίπος από τη βιομάζα έπρεπε πρώτα να πραγματοποιηθεί σύνθλιψη της ξηρής βιομάζας και να προστεθεί στη βιομάζα κατάλληλο μίγμα οργανικών διαλυτών. Στην αποξηραμένη βιομάζα προστέθηκε διάλυμα που περιείχε χλωροφόρμιο και αιθανόλη με αναλογία 2:1 (Folch et al., 1957). Το διάλυμα με τη βιομάζα παρέμεινε σε κατάλληλο μέρος με απουσία φωτός για τουλάχιστον 3 ημέρες. Ύστερα η βιομάζα διαχωρίστηκε από τους διαλύτες μέσω διήθησης χρησιμοποιώντας κατάλληλα φίλτρα (Whatman No1) και οι διαλύτες (με τα λιπίδια) μεταφέρθηκαν σε προζυγισμένη σφαιρική φιάλη. Στη συνέχεια οι σφαιρικές

φιάλες τοποθετήθηκαν σε εξατμιστήρα υπό κενό (Flash Evaporator - Rotavapor R-114, BÜCHI Labortechnik AG, St. Gallen, Switzerland), η κάθε φιάλη θερμάνθηκε στους 50 °C και ο υγρός διαλύτης εξατμίστηκε. Το βάρος του λίπους προσδιορίστηκε από τη διαφορά του απόβαρου από το μικτό βάρος της φιάλης μετά την εξάτμιση. Τέλος, το λίπος ανάχθηκε σε λίπος ανά λίτρο καλλιέργειας (g/L).

## 4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

### 4.1. ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΥΠΟ ΑΕΡΟΒΙΕΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ

Στα πειράματα υπό αερόβιες συνθήκες μελετήθηκε κατά πόσο οι ζύμες είχαν την ικανότητα να αναπτυχθούν σε υποστρώματα που περιείχαν ως κύριες πηγές άνθρακα τη γλυκόζη και τη φρουκτόζη και κατά πόσο μπόρεσαν να καταναλώσουν τις πηγές αυτές για να παράγουν κυρίως αιθανόλη, γλυκερόλη και αραβιτόλη. Τα αποτελέσματα που παρατηρήθηκαν για τους μικροοργανισμούς: *M. pulcherrima*, *T. californica* και *Z. bailii* κατά τη χρονική στιγμή που η παραγωγή αιθανόλης ήταν μέγιστη παρουσιάζονται στον Πίνακα 1. Επιπλέον, τα αποτελέσματα που παρατηρήθηκαν για τους μικροοργανισμούς *P. manshurica* και *P. carsonii* τη χρονική στιγμή που η συγκέντρωση της γλυκερόλης ήταν υψηλή παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.

**Πίνακας 1:** Αποτελέσματα για τις ζύμες: *M. pulcherrima*, *T. californica* και *Z. bailii* μετά την ανάπτυξη τους υπό αερόβιες συνθήκες, σε υπόστρωμα που περιείχε ως κύρια πηγή άνθρακα γλυκόζη και φρουκτόζη. Τα αποτελέσματα παρατηρήθηκαν τη χρονική στιγμή που η παραγωγή της αιθανόλης ήταν μέγιστη.

| Αερόβιες συνθήκες     |          |                               |                                |            |                |                |          |                              |
|-----------------------|----------|-------------------------------|--------------------------------|------------|----------------|----------------|----------|------------------------------|
| Μικροοργανισμός       | Time (h) | Glucose: S <sub>0</sub> (g/L) | Fructose: S <sub>0</sub> (g/L) | EtOH (g/L) | Glycerol (g/L) | Arabitol (g/L) | DW (g/L) | Y <sub>EtOH/Scon</sub> (g/g) |
| <i>M. pulcherrima</i> | 74       | 105,32                        | 106,87                         | 53,21      | 0              | 28,38          | 8,50     | 0,26                         |
| <i>M. pulcherrima</i> | 100      | 153,45                        | 158,42                         | 58,15      | 4,38           | 14,25          | 4,59     | 0,26                         |
| <i>T. californica</i> | 120      | 135,98                        | 148,54                         | 88,59      | 6,96           | 0              | 7,70     | 0,36                         |
| <i>T. californica</i> | 166      | 195,11                        | 189,73                         | 107,31     | 11,69          | 0              | 5,00     | 0,38                         |
| <i>Z. bailii</i>      | 119      | 166,41                        | 183,07                         | 102,08     | 9,5            | 0              | 8,86     | 0,30                         |

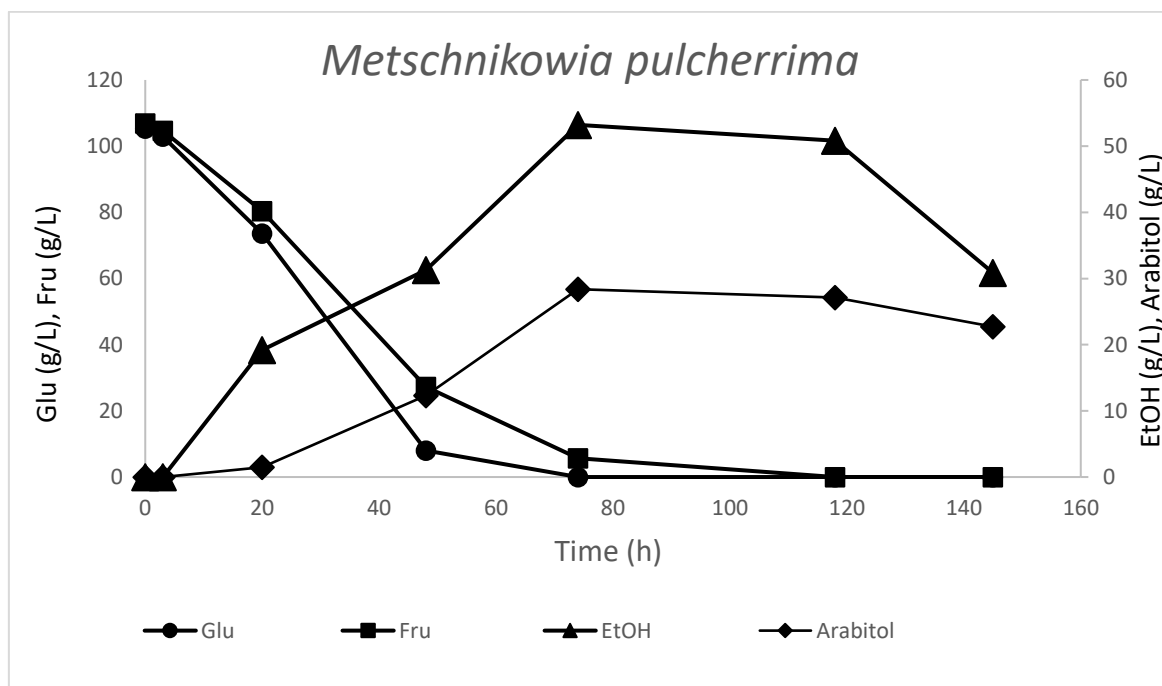
**Πίνακας 2:** Αποτελέσματα για τις ζύμες: *Pichia manshurica* και *Priceomyces carsonii* μετά την ανάπτυξη τους υπό αερόβιες συνθήκες, σε υπόστρωμα που περιείχε ως κύρια πηγή άνθρακα γλυκόζη και φρουκτόζη. Τα αποτελέσματα παρατηρήθηκαν τη χρονική στιγμή που η συγκέντρωση της γλυκερόλης ήταν υψηλή.

| Αερόβιες συνθήκες           |          |                               |                                |            |                |                |          |                        |
|-----------------------------|----------|-------------------------------|--------------------------------|------------|----------------|----------------|----------|------------------------|
| Μικροοργανισμός             | Time (h) | Glucose: S <sub>0</sub> (g/L) | Fructose: S <sub>0</sub> (g/L) | EtOH (g/L) | Glycerol (g/L) | Arabitol (g/L) | DW (g/L) | Y <sub>EtOH/Scon</sub> |
| <i>Pichia manshurica</i>    | 172      | 52,79                         | 52,98                          | 0          | 15,25          | 1,51           | 15,98    | 0,00                   |
| <i>Pichia manshurica</i>    | 553      | 100,42                        | 104,30                         | 0          | 37,09          | 2,55           | 14,33    | 0,00                   |
| <i>Priceomyces carsonii</i> | 500      | 98,45                         | 102,43                         | 0          | 39,89          | 29,48          | 24,00    | 0,00                   |

#### 4.1.1. *Metschnikowia pulcherrima*

- Ζύμωση με αρχική συγκέντρωση σακχάρων: 100 g/L γλυκόζη και 100 g/L φρουκτόζη

Η ζύμη *Metschnikowia pulcherrima* αναπτύχθηκε σε υπόστρωμα που περιείχε 200 g/L σάκχαρα (100 g/L γλυκόζη και 100 g/L φρουκτόζη). Η ζύμη μελετήθηκε ως προς την ικανότητα παραγωγής αιθανόλης υπό αερόβιες συνθήκες. Σύμφωνα με το παρακάτω διάγραμμα (Εικόνα 2) στις 74 h η γλυκόζη καταναλώθηκε πλήρως και η φρουκτόζη καταναλώθηκε σχεδόν πλήρως αφού απέκτησε τιμή  $S_R=5,65$  g/L. Στις 74 h η αιθανόλη που παράχθηκε απέκτησε μέγιστη τιμή 53,21 g/L και μετά τις 74 h μειώθηκε η τιμή της φτάνοντας τα 30,86 g/L. Όσον αφορά την αραβιτόλη, παρατηρήθηκε ότι παράχθηκε σε μέγιστο βαθμό στις 74 h (28,38 g/L) και μέχρι το τέλος της ζύμωσης διατηρήθηκε σχετικά σταθερή. Τέλος, στις 74 h η απόδοση της ζύμωσης ( $Y_{EtOH/S_{con}}$ ) ήταν 0,26 g αιθανόλης/g καταναλωθέντων σακχάρων και η παραγωγικότητα για την αιθανόλη ( $P_{EtOH}$ ) ήταν 0,72 (g/L)/h.

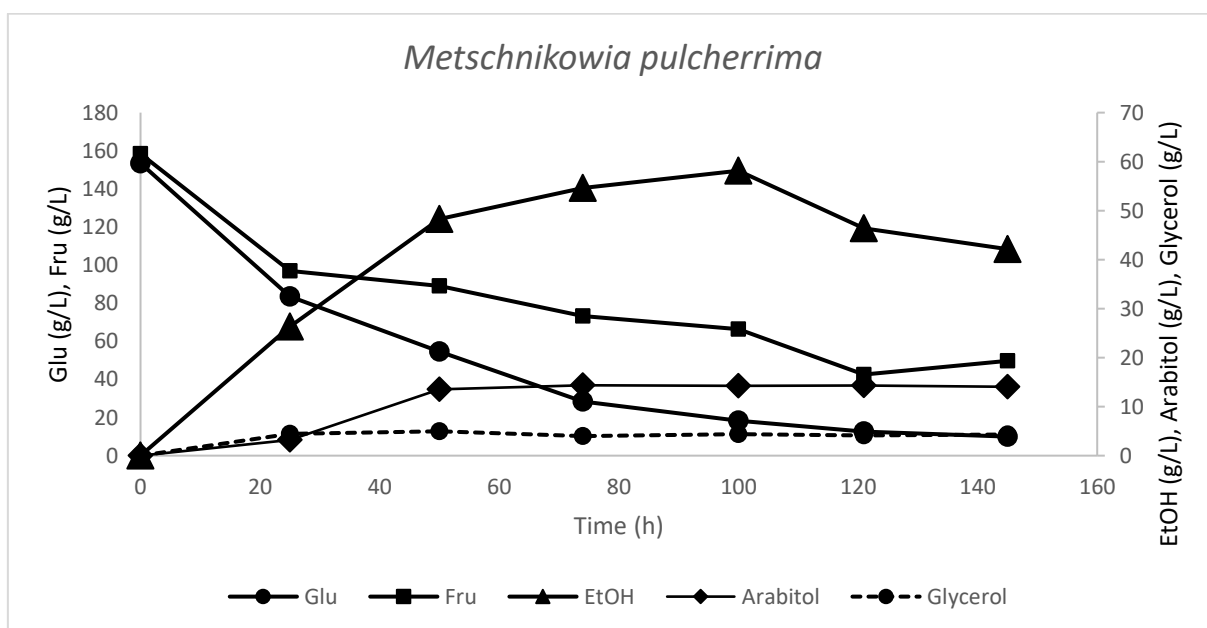


**Εικόνα 2:** Διάγραμμα που απεικονίζεται η κινητική κατανάλωσης της γλυκόζης (Glucose: Glu) και της φρουκτόζης (Fructose: Fru) καθώς και η παραγωγή αιθανόλης (EtOH) και αραβιτόλης (Arabitol), υπό αερόβιες συνθήκες.



- Ζύμωση με αρχική συγκέντρωση σακχάρων: 150 g/L γλυκόζη και 150 g/L φρουκτόζη

Η ζύμη *Metschnikowia pulcherrima* αναπτύχθηκε σε υπόστρωμα που περιείχε 300 g/L σάκχαρα (150 g/L γλυκόζη και 150 g/L φρουκτόζη). Η ζύμη μελετήθηκε ως προς την ικανότητα παραγωγής αιθανόλης υπό αερόβιες συνθήκες. Σύμφωνα με το παρακάτω διάγραμμα (Εικόνα 3) η γλυκόζη καταναλώθηκε σχεδόν πλήρως στις 145 h με τιμή  $S_R=10$  g/L. Στις 121 h, η φρουκτόζη απέκτησε τιμή 42,56 g/L και διατηρήθηκε περίπου ίδια έως τις 145 h. Στις 100 h η αιθανόλη απέκτησε μέγιστη τιμή 58,15 g/L και ύστερα μειώθηκε η τιμή της στα 42,16 g/L στις 145 h. Η αραβιτόλη από τις 50 h απέκτησε τιμή 13,53 g/L και παρέμεινε σταθερή έως τις 145 h. Η γλυκερόλη απέκτησε μέγιστη τιμή 4,47 g/L στις 25 h και διατηρήθηκε σχετικά σταθερή έως τις 145 h. Στις 100 h, ο συντελεστής απόδοσης για την αιθανόλη ( $Y_{EtOH/S_{con}}$ ) ήταν 0,26 g αιθανόλης/g καταναλωθέντων σακχάρων και  $P_{EtOH}=0,58$  (g/L)/h. Επιπλέον, στις 121 h παράχθηκε 3,92% επί της ξηρής βιομάζας μικροβιακό λίπος (Πίνακας 3).



**Εικόνα 3:** Διάγραμμα που απεικονίζεται η κινητική κατανάλωσης της γλυκόζης (Glucose: Glu) και της φρουκτόζης (Fructose: Fru) καθώς και η παραγωγή αιθανόλης (EtOH), αραβιτόλης (Arabitol) και γλυκερόλης (Glycerol), υπό αερόβιες συνθήκες.

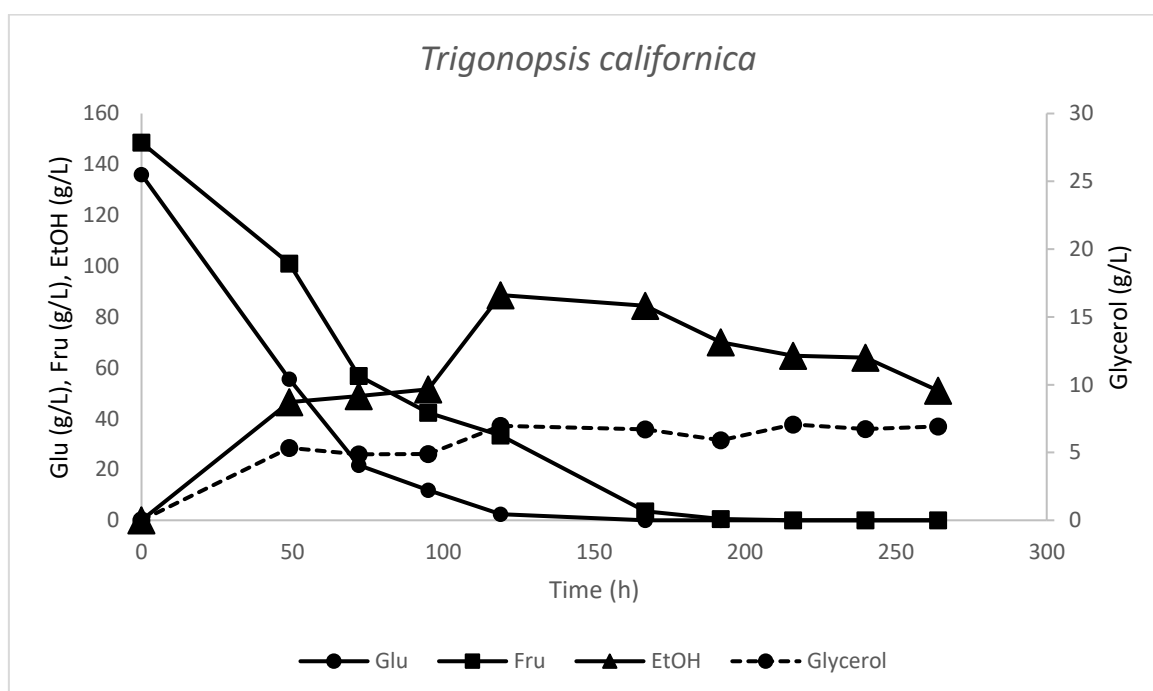
**Πίνακας 3:** Παραγωγή μικροβιακού λίπους (Lipids: Λιπίδια) στις 121 h.

| <i>M. pulcherrima</i> |              |                                   |
|-----------------------|--------------|-----------------------------------|
| Time (h)              | Lipids (g/L) | Lipids (% επί της ξηρής βιομάζας) |
| 121                   | 0,17 g/L     | 3,92                              |

#### 4.1.2. *Trigonopsis californica* (στέλεχος A9Y1)

- Ζύμωση με αρχική συγκέντρωση σακχάρων: 150 g/L γλυκόζη και 150 g/L φρουκτόζη

Το στέλεχος A9Y1 της ζύμης *Trigonopsis californica* αναπτύχθηκε σε υπόστρωμα που περιείχε 300 g/L σάκχαρα (150 g/L γλυκόζη και 150 g/L φρουκτόζη). Η ζύμη μελετήθηκε ως προς την ικανότητα παραγωγής αιθανόλης υπό αερόβιες συνθήκες. Σύμφωνα με το παρακάτω διάγραμμα (Εικόνα 4) στις 120 h η γλυκόζη καταναλώθηκε σχεδόν πλήρως ( $S_R=2,45$  g/L) και η φρουκτόζη καταναλώθηκε σχεδόν όλη ( $S_R=3,53$  g/L) στις 167 h. Η συγκέντρωση της αιθανόλης μεγιστοποιήθηκε στα 88,59 g/L στις 120 h και στη συνέχεια μειώθηκε σταδιακά με τελική τιμή 50,99 g/L στις 264 h. Η συγκέντρωση της γλυκερόλης έφτασε τα 6,96 g/L στις 120 h και παρέμεινε σταθερή ως τις 264 h. Στις 120 h ο συντελεστής απόδοσης ( $Y_{EtOH/S_{con}}$ ) ήταν 0,36 g αιθανόλης/g καταναλωθέντων σακχάρων και η παραγωγικότητα για την αιθανόλη ήταν 0,74 (g/L)/h. Στον πίνακα 4 παρουσιάζεται η παραγωγή του μικροβιακού λίπους σε διάφορες χρονικές στιγμές.



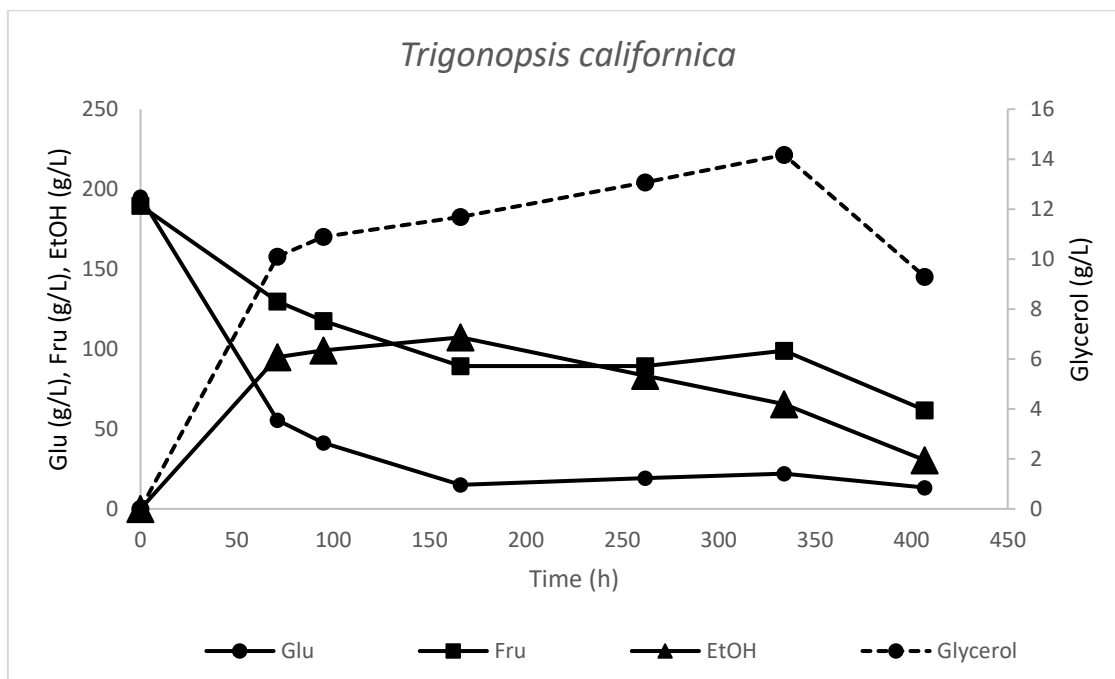
**Εικόνα 4:** Διάγραμμα που απεικονίζεται η κινητική κατανάλωσης της γλυκόζης (Glucose: Glu) και της φρουκτόζης (Fructose: Fru) καθώς και η παραγωγή αιθανόλης (EtOH) και γλυκερόλης (Glycerol), υπό αερόβιες συνθήκες.

**Πίνακας 4:** Παραγωγή μικροβιακών λιπιδίων (Lipids) σε συνάρτηση με τον χρόνο.

| <i>T. californica</i> |              |                                   |
|-----------------------|--------------|-----------------------------------|
| Time (h)              | Lipids (g/L) | Lipids (% επί της ξηρής βιομάζας) |
| 167                   | 0,22         | 3,39                              |
| 216                   | 0,20         | 4,13                              |
| 240                   | 0,14         | 2,57                              |
| 264                   | 0,14         | 2,80                              |

- Ζύμωση με αρχική συγκέντρωση σακχάρων: 200 g/L γλυκόζη και 200 g/L φρουκτόζη

Το στέλεχος A9Y1 της ζύμης *Trigonopsis californica* αναπτύχθηκε σε υπόστρωμα που περιείχε 400 g/L σάκχαρα (200 g/L γλυκόζη και 200 g/L φρουκτόζη). Η ζύμη μελετήθηκε ως προς την ικανότητα παραγωγής αιθανόλης υπό αερόβιες συνθήκες. Σύμφωνα με το παρακάτω διάγραμμα (Εικόνα 5), στις 166 h η συγκέντρωση της γλυκόζης κατήλθε στα 14,95 g/L ( $S_R=14,95$  g/L) και στις 407 h η συγκέντρωση της απέκτησε ελάχιστη τιμή  $S_R=13,35$  g/L. Η φρουκτόζη στις 166 h είχε τιμή  $S_R=89,34$  g/L και στις 407 h τα επίπεδα της μειώθηκαν ( $S_R=61,77$  g/L). Η αιθανόλη απέκτησε μέγιστη τιμή 107,31 g/L στις 166 h και τις επόμενες ώρες η συγκέντρωση της μειώθηκε φτάνοντας τα 30,38 g/L στις 407 h. Η μέγιστη παραγωγή γλυκερόλης παρατηρήθηκε στις 334 h με συγκέντρωση 14,17 g/L και τις επόμενες ώρες ελαττώθηκε έχοντας τιμή 9,29 g/L στις 407 h. Στις 166 h, όπου η παραγωγή αιθανόλης ήταν μέγιστη, ο συντελεστής απόδοσης ( $Y_{EtOH/S_{con}}$ ) ήταν 0,38 g αιθανόλης/g καταναλωθέντων σακχάρων και η παραγωγικότητα για την αιθανόλη ήταν 0,65 (g/L)/h. Στις 407 h η συγκέντρωση της τελικής βιομάζας ήταν 4,80 g/L και το μικροβιακό λίπος ήταν 9,59% επί της ξηρής βιομάζας (Πίνακας 5).



**Εικόνα 5:** Διάγραμμα που απεικονίζεται η κινητική κατανάλωσης της γλυκόζης (Glucose: Glu) και της φρουκτόζης (Fructose: Fru) καθώς και η παραγωγή αιθανόλης (EtOH) και γλυκερόλης (Glycerol), υπό αερόβιες συνθήκες.

**Πίνακας 5:** Παραγωγή μικροβιακών λιπιδίων (Lipids) και συγκέντρωση της τελικής ξηρής βιομάζας (Dry Weight: DW) στις 407 h.

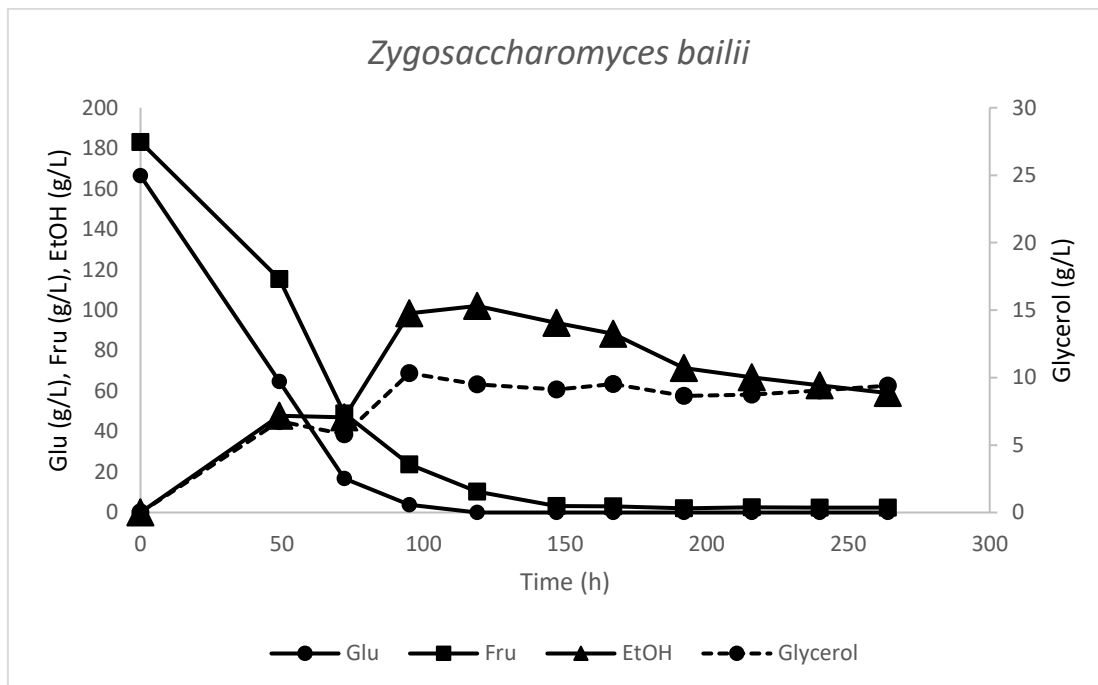
| <i>T. californica</i> |              |                                   |          |
|-----------------------|--------------|-----------------------------------|----------|
| Time (h)              | Lipids (g/L) | Lipids (% επί της ξηρής βιομάζας) | DW (g/L) |
| 407                   | 0,46         | 9,59                              | 4,80     |

#### 4.1.3. *Zygosaccharomyces bailii* (στέλεχος: A19Y5)

- Ζύμωση με αρχική συγκέντρωση σακχάρων: 150 g/L γλυκόζη και 150 g/L φρουκτόζη

Το στέλεχος A19Y5 της ζύμης *Zygosaccharomyces bailii* αναπτύχθηκε σε υπόστρωμα που περιείχε 300 g/L σάκχαρα (150 g/L γλυκόζη και 150 g/L φρουκτόζη). Η ζύμη μελετήθηκε ως προς την ικανότητα παραγωγής αιθανόλης υπό αερόβιες συνθήκες. Σύμφωνα με το παρακάτω διάγραμμα (Εικόνα 6) η γλυκόζη καταναλώθηκε πλήρως στις 119 h και η φρουκτόζη καταναλώθηκε σχεδόν όλη ( $S_R=3,14$  g/L) στις 147 h. Η συγκέντρωση της αιθανόλης μεγιστοποιήθηκε στα 102,08 g/L στις 119 h και τις επόμενες ώρες μειωνόταν σταδιακά, αποκτώντας στις 264 h την τιμή 59,08 g/L. Η συγκέντρωση της γλυκερόλης αυξήθηκε στις 95 h και απέκτησε τιμή 10,33 g/L και παρέμεινε σχετικά σταθερή ως τις 264 h. Ο συντελεστής απόδοσης για την αιθανόλη ( $Y_{EtOH/S_{con}}$ ) ήταν 0,3 g αιθανόλης/g καταναλωθέντων σακχάρων και η παραγωγικότητα

για την αιθανόλη ήταν 0,86 (g/L)/h στις 119 h, όταν δηλαδή η παραγωγή αιθανόλης ήταν μέγιστη. Στον πίνακα 6 παρουσιάζεται η παραγωγή του μικροβιακού λίπους σε διάφορες χρονικές στιγμές.



**Εικόνα 6:** Διάγραμμα που απεικονίζεται η κινητική κατανάλωσης της γλυκόζης (Glucose: Glu) και της φρουκτόζης (Fructose: Fru) καθώς και η παραγωγή αιθανόλης (EtOH) και γλυκερόλης (Glycerol), υπό αερόβιες συνθήκες.

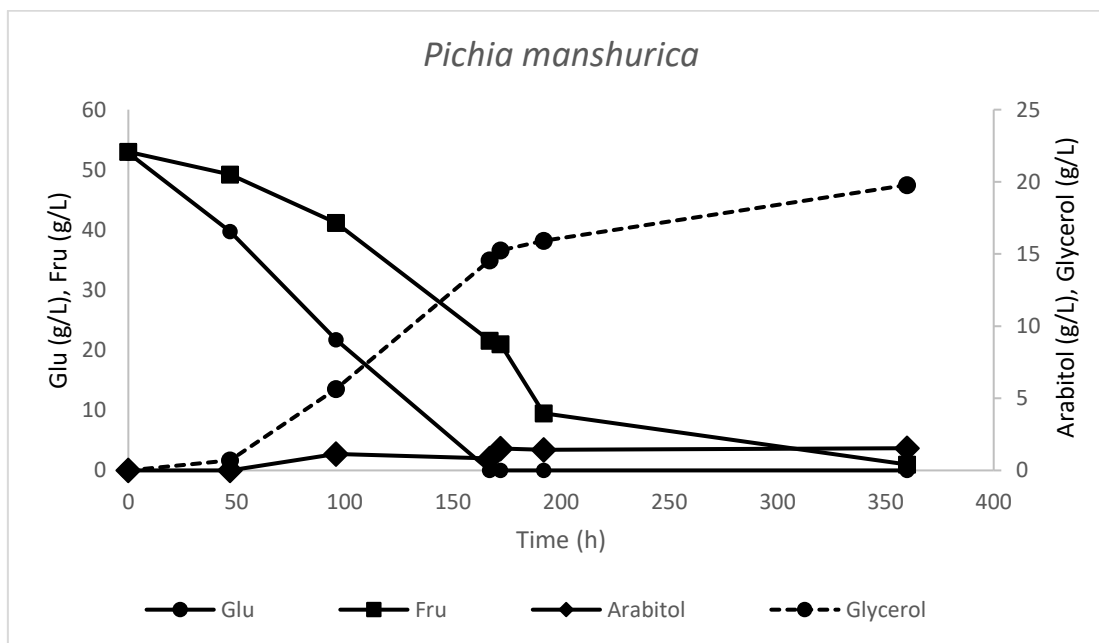
**Πίνακας 6:** Παραγωγή μικροβιακών λιπιδίων (Lipids) σε διάφορες χρονικές στιγμές.

| <i>Z. bailii</i> |              |                                   |
|------------------|--------------|-----------------------------------|
| Time (h)         | Lipids (g/L) | Lipids (% επί της ξηρής βιομάζας) |
| 167              | 0,10         | 1,29                              |
| 216              | 0,03         | 0,63                              |
| 240              | 0,22         | 3,54                              |
| 264              | 0,11         | 1,96                              |

#### 4.1.4. *Pichia manshurica* (στέλεχος: K34Y10)

- Αρχική συγκέντρωση σακχάρων: 50 g/L γλυκόζη και 50 g/L φρουκτόζη

Το στέλεχος K34Y10 της ζύμης *Pichia manshurica* αναπτύχθηκε σε υπόστρωμα που περιείχε 100 g/L σάκχαρα (50 g/L γλυκόζη και 50 g/L φρουκτόζη). Η ζύμη μελετήθηκε ως προς την ικανότητα παραγωγής αιθανόλης υπό αερόβιες συνθήκες. Σύμφωνα με το παρακάτω διάγραμμα (Εικόνα 7) η γλυκόζη καταναλώθηκε πλήρως στις 167 h και η φρουκτόζη καταναλώθηκε σχεδόν πλήρως ( $S_R=0,99$  g/L) στις 360 h. Δεν παράχθηκε καθόλου αιθανόλη. Παράχθηκε γλυκερόλη η συγκέντρωση της οποίας αυξήθηκε σημαντικά στις 172 h (15,25 g/L) και μεγιστοποιήθηκε με τιμή 19,78 g/L στις 360 h. Επιπλέον, παράχθηκε αραβιτόλη η τιμή της οποίας αυξήθηκε στα 1,51 g/L στις 172 h. Στον πίνακα 7 παρουσιάζεται η παραγωγή του μικροβιακού λίπους στις 360 h.



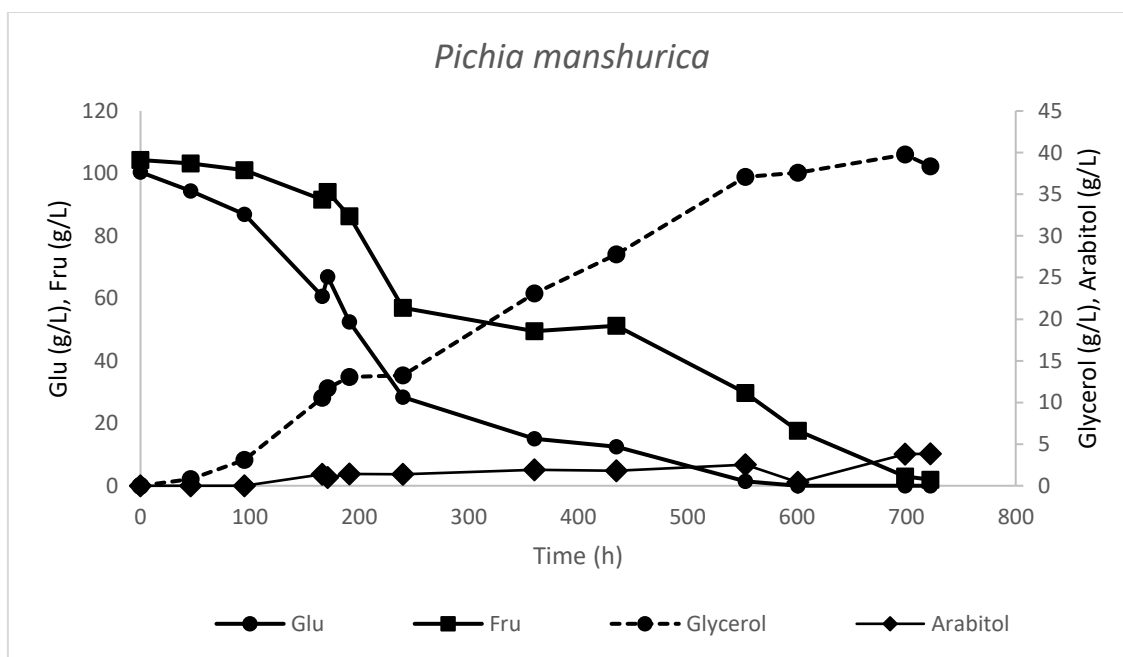
**Εικόνα 7:** Διάγραμμα που απεικονίζεται η κινητική κατανάλωσης της γλυκόζης (Glucose: Glu) και της φρουκτόζης (Fructose: Fru) καθώς και η παραγωγή γλυκερόλης (Glycerol) και αραβιτόλης (Arabitol), υπό αερόβιες συνθήκες.

**Πίνακας 7:** Παραγωγή μικροβιακών λιπιδίων (Lipids) στις 360 h.

| <i>Pichia manshurica</i> |              |                                   |
|--------------------------|--------------|-----------------------------------|
| Time (h)                 | Lipids (g/L) | Lipids (% επί της ξηρής βιομάζας) |
| 360                      | 0,14         | 0,91                              |

- Αρχική συγκέντρωση σακχάρων: 100 g/L γλυκόζη και 100 g/L φρουκτόζη

Το στέλεχος K34Y10 του μικροοργανισμού *Pichia manshurica* αναπτύχθηκε σε υπόστρωμα που περιείχε 200 g/L σάκχαρα (100 g/L γλυκόζη και 100 g/L φρουκτόζη). Η ζύμη μελετήθηκε ως προς την ικανότητα παραγωγής αιθανόλης υπό αερόβιες συνθήκες. Σύμφωνα με το παρακάτω διάγραμμα (Εικόνα 8) η γλυκόζη καταναλώθηκε σχεδόν πλήρως στις 553 h ( $S_R=1,43$  g/L) και η φρουκτόζη καταναλώθηκε σχεδόν πλήρως στις 699 h ( $S_R=2,94$  g/L). Δεν παράχθηκε καθόλου αιθανόλη. Παράχθηκε γλυκερόλη η συγκέντρωση της οποίας αυξήθηκε σημαντικά στις 553 h (37,09 g/L) και μεγιστοποιήθηκε έχοντας τιμή 39,77 g/L στις 699 h. Επιπλέον, παράχθηκε αραβιτόλη η συγκέντρωση της οποίας αυξήθηκε με τιμή 2,55 g/L στις 553 h. Στον πίνακα 8 παρουσιάζεται η παραγωγή του μικροβιακού λίπους στις 699 h.



**Εικόνα 8:** Διάγραμμα που απεικονίζεται η κινητική κατανάλωσης της γλυκόζης (Glucose: Glu) και της φρουκτόζης (Fructose: Fru) καθώς και η παραγωγή γλυκερόλης (Glycerol) και αραβιτόλης (Arabitol), υπό αερόβιες συνθήκες.

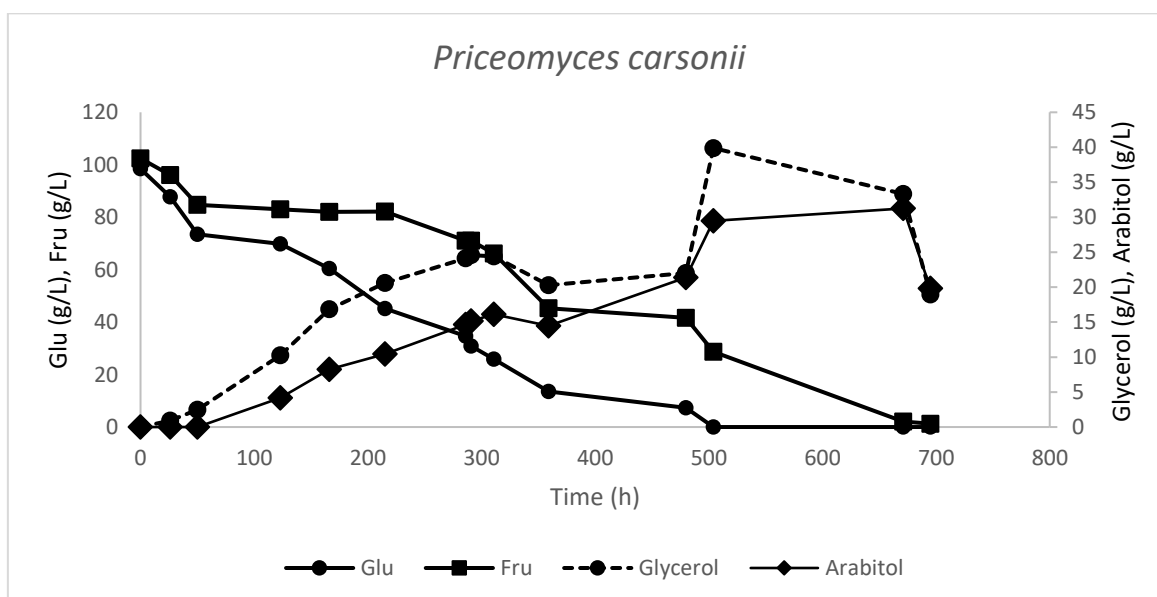
**Πίνακας 8:** Παραγωγή μικροβιακών λιπιδίων (Lipids) στις 699 h.

| <i>Pichia manshurica</i> |              |                                   |
|--------------------------|--------------|-----------------------------------|
| Time (h)                 | Lipids (g/L) | Lipids (% επί της ξηρής βιομάζας) |
| 699                      | 0,11         | 0,78                              |

#### 4.1.5. *Priceomyces carsonii* (στέλεχος: K21Y9)

- Αρχική συγκέντρωση σακχάρων: 100 g/L γλυκόζη και 100 g/L φρουκτόζη

Το στέλεχος K21Y9 του μικροοργανισμού *Priceomyces carsonii* αναπτύχθηκε σε υπόστρωμα που περιείχε 200 g/L σάκχαρα (100 g/L γλυκόζη και 100 g/L φρουκτόζη). Η ζύμη μελετήθηκε ως προς την ικανότητα παραγωγής αιθανόλης υπό αερόβιες συνθήκες. Σύμφωνα με το παρακάτω διάγραμμα (Εικόνα 9) η γλυκόζη καταναλώθηκε πλήρως στις 500 h και η φρουκτόζη καταναλώθηκε σχεδόν πλήρως στις 671 h ( $S_R=2,05$  g/L). Δεν παράχθηκε καθόλου αιθανόλη. Παράχθηκε γλυκερόλη η συγκέντρωση της οποίας ήταν 24,38 g/L στις 311 h. Η μέγιστη παραγωγή γλυκερόλης παρατηρήθηκε στις 500 h με τιμή 39,89 g/L. Τις επόμενες ώρες παρατηρήθηκε η μείωση της με ελάχιστη τιμή τα 18,97 g/L στις 695 h. Παράχθηκε αραβιτόλη η συγκέντρωση της οποίας ήταν 29,48 g/L στις 500 h, μεγιστοποιήθηκε στα 31,25 g/L στις 671 h και ύστερα ελαττώθηκε στα 19,83 g/L στις 695 h. Στον πίνακα 9 παρουσιάζεται η παραγωγή του μικροβιακού λίπους σε διάφορες χρονικές στιγμές.



**Εικόνα 9:** Διάγραμμα που απεικονίζεται η κινητική κατανάλωσης της γλυκόζης (Glucose: Glu) και της φρουκτόζης (Fructose: Fru) καθώς και η παραγωγή γλυκερόλης (Glycerol) και αραβιτόλης (Arabitol), υπό αερόβιες συνθήκες.

**Πίνακας 9:** Παραγωγή μικροβιακών λιπιδίων (Lipids) σε διάφορες χρονικές στιγμές.

| <i>Priceomyces carsonii</i> |              |                                   |
|-----------------------------|--------------|-----------------------------------|
| Time (h)                    | Lipids (g/L) | Lipids (% επί της ξηρής βιομάζας) |
| 359                         | 0,23         | 1,05                              |
| 480                         | 1,37         | 5,51                              |
| 695                         | 0,17         | 0,94                              |



## 4.2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΥΠΟ ΑΝΑΕΡΟΒΙΕΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ

Στα πειράματα υπό αναερόβιες συνθήκες μελετήθηκε κατά πόσο οι ζύμες είχαν την ικανότητα να αναπυχθούν σε υποστρώματα που περιείχαν ως κύριες πηγές άνθρακα τη γλυκόζη και τη φρουκτόζη και κατά πόσο μπόρεσαν να καταναλώσουν τις πηγές αυτές για να παράγουν αιθανόλη. Τα αποτελέσματα που παρατηρήθηκαν για τους μικροοργανισμούς: *Trigonopsis californica* και *Zygosaccharomyces bailii* κατά τη χρονική στιγμή που η παραγωγή αιθανόλης ήταν μέγιστη παρουσιάζονται στον πίνακα 10. Για τους μικροοργανισμούς: *Metschnikowia pulcherrima*, *Pichia manshurica* και *Priceomyces carsonii* πραγματοποιήθηκαν πειράματα υπό αναερόβιες συνθήκες σε υπόστρωμα που περιείχε ως κύρια πηγή άνθρακα 300 g/L σάκχαρα (150 g/L γλυκόζη και 150 g/L φρουκτόζη) και παρατηρήθηκε ότι οι μικροοργανισμοί δεν αναπτύχθηκαν και δεν καταναλώθηκαν τα σάκχαρα με αποτέλεσμα να μην παραχθεί αιθανόλη.

**Πίνακας 10:** Αποτελέσματα για τους μικροοργανισμούς: *T. californica* και *Z. bailii* μετά την ανάπτυξη τους σε αναερόβιες συνθήκες, σε υπόστρωμα που περιείχε ως κύρια πηγή άνθρακα γλυκόζη και φρουκτόζη. Τα αποτελέσματα παρατηρήθηκαν τη χρονική στιγμή που η παραγωγή της αιθανόλης ήταν μέγιστη.

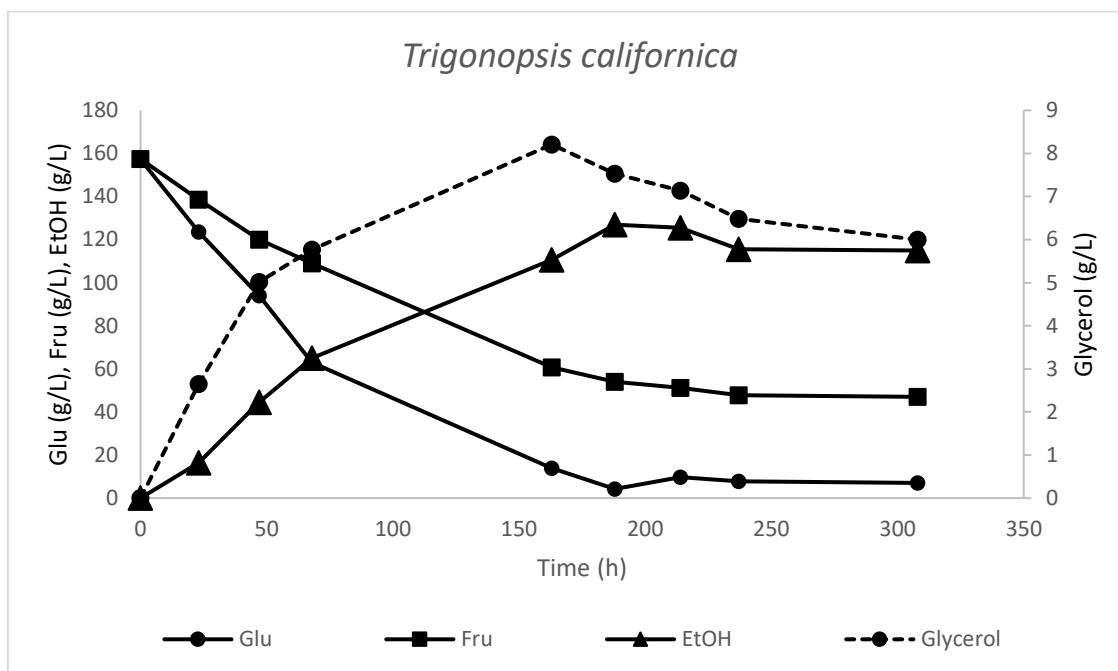
| Αναερόβιες συνθήκες   |          |                               |                                |            |                |                |          |                              |
|-----------------------|----------|-------------------------------|--------------------------------|------------|----------------|----------------|----------|------------------------------|
| Μικροοργανισμός       | Time (h) | Glucose: S <sub>0</sub> (g/L) | Fructose: S <sub>0</sub> (g/L) | EtOH (g/L) | Glycerol (g/L) | Arabitol (g/L) | DW (g/L) | Y <sub>EtOH/Scon</sub> (g/g) |
| <i>T. californica</i> | 188      | 157,23                        | 157,45                         | 126,94     | 7,53           | 0              | 1,00     | 0,49                         |
| <i>Z. bailii</i>      | 188      | 156,94                        | 156,81                         | 137,90     | 6,97           | 0              | 2,00     | 0,48                         |

### 4.2.1. *Trigonopsis californica* (στέλεχος: A9Y1)

- Αρχική συγκέντρωση σακχάρων: 150 g/L γλυκόζη και 150 g/L φρουκτόζη

Το στέλεχος A9Y1 της ζύμης *Trigonopsis californica* αναπτύχθηκε σε υπόστρωμα που περιείχε 300 g/L σάκχαρα (150 g/L γλυκόζη και 150 g/L φρουκτόζη). Η ζύμη μελετήθηκε ως προς την ικανότητα παραγωγής αιθανόλης υπό αναερόβιες συνθήκες. Σύμφωνα με το παρακάτω διάγραμμα (Εικόνα 10) στις 188 h η γλυκόζη καταναλώθηκε σχεδόν πλήρως (S<sub>R</sub>=4,24 g/L) και διατηρήθηκε σχετικά σταθερή έως τις 308 h. Η συγκέντρωση της φρουκτόζης ελαττώθηκε και απέκτησε τελική τιμή S<sub>R</sub>=47 g/L. Η συγκέντρωση της αιθανόλης μεγιστοποιήθηκε στα 126,94 g/L στις 188 h και τις επόμενες ώρες ελαττώθηκε με τελική τιμή 115 g/L στις 308 h. Η συγκέντρωση της

γλυκερόλης απέκτησε μέγιστη τιμή τα 8,21 g/L στις 163 h, παρέμεινε σχετικά σταθερή ως τις 188 h και τις επόμενες ώρες μειώθηκε ελάχιστα αποκτώντας τιμή 6 g/L στις 308 h. Ο συντελεστής απόδοσης ( $Y_{EtOH/Scon}$ ) ήταν 0,49 g αιθανόλης/g καταναλωθέντων σακχάρων και η παραγωγικότητα για την αιθανόλη ήταν 0,68 (g/L)/h στις 188 h. Στις 308 h το μικροβιακό λίπος ήταν 2,96% επί της ξηρής βιομάζας και η συγκέντρωση της βιομάζας ήταν 1,35 g/L (Πίνακας 11).



**Εικόνα 10:** Διάγραμμα που απεικονίζεται η κινητική κατανάλωσης της γλυκόζης (Glucose: Glu) και της φρουκτόζης (Fructose: Fru) καθώς και η παραγωγή αιθανόλης (EtOH) και γλυκερόλης (Glycerol), υπό αναερόβιες συνθήκες.

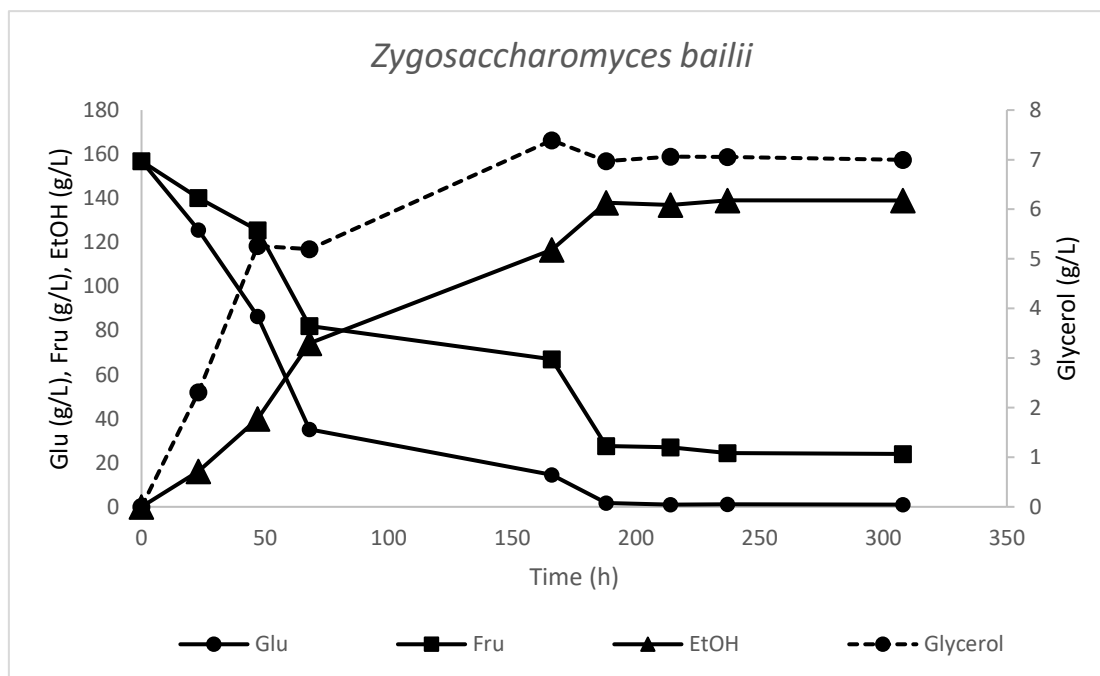
**Πίνακας 11:** Παραγωγή μικροβιακών λιπιδίων (Lipids) και συγκέντρωση της τελικής ξηρής βιομάζας (Dry Weight: DW) στις 308 h.

| <i>T. californica</i> |              |                                   |          |
|-----------------------|--------------|-----------------------------------|----------|
| Time (h)              | Lipids (g/L) | Lipids (% επί της ξηρής βιομάζας) | DW (g/L) |
| 308                   | 0,04         | 2,96                              | 1,35     |

#### 4.2.2. *Zygosaccharomyces bailii* (στέλεχος: A19Y5)

- Αρχική συγκέντρωση σακχάρων: 150 g/L γλυκόζη και 150 g/L φρουκτόζη

Το στέλεχος A19Y5 της ζύμης *Zygosaccharomyces bailii* αναπτύχθηκε σε υπόστρωμα που περιείχε 300 g/L σάκχαρα (150 g/L γλυκόζη και 150 g/L φρουκτόζη). Η ζύμη μελετήθηκε ως προς την ικανότητα παραγωγής αιθανόλης υπό αναερόβιες συνθήκες. Σύμφωνα με το παρακάτω διάγραμμα (Εικόνα 11) η γλυκόζη καταναλώθηκε σχεδόν πλήρως στις 188 h ( $S_R=1,78$  g/L) και διατηρήθηκε σταθερή μέχρι τις 308 h. Η φρουκτόζη έως τις 188 h ελαττωνόταν και απέκτησε τιμή  $S_R=27,62$  g/L στις 188 h και τελική ελάχιστη  $S_R=24$  g/L στις 308 h. Η συγκέντρωση της αιθανόλης αυξανόταν και απέκτησε τιμή 137,90 g/L στις 188 h και διατηρήθηκε σταθερή έως τις 308 h. Η συγκέντρωση της γλυκερόλης μεγιστοποιήθηκε στις 166 h με συγκέντρωση 7,39 g/L και παρέμεινε σταθερή ως τις 308 h. Στις 188 h ο συντελεστής απόδοσης για την αιθανόλη ( $Y_{EtOH/S_{con}}$ ) ήταν 0,48 g αιθανόλης/g καταναλωθέντων σακχάρων και η παραγωγικότητα για την αιθανόλη ήταν 0,73 (g/L)/h. Στις 308 h το μικροβιακό λίπος ήταν 2,59% επί της ξηρής βιομάζας και η συγκέντρωση της βιομάζας ήταν 1,68 g/L (Πίνακας 12).



**Εικόνα 11:** Διάγραμμα που απεικονίζεται η κινητική κατανάλωσης της γλυκόζης (Glucose: Glu) και της φρουκτόζης (Fructose: Fru) καθώς και η παραγωγή αιθανόλης (EtOH) και γλυκερόλης (Glycerol), υπό αναερόβιες συνθήκες.

**Πίνακας 12:** Παραγωγή μικροβιακών λιπιδίων (Lipids) και συγκέντρωση της τελικής ξηρής βιομάζας (Dry Weight: DW) στις 308 h.

| <b>Z. bailii</b> |              |                                   |          |
|------------------|--------------|-----------------------------------|----------|
| Time (h)         | Lipids (g/L) | Lipids (% επί της ξηρής βιομάζας) | DW (g/L) |
| 308              | 0,04         | 2,59                              | 1,68     |

#### **4.3. ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΜΕΤΑΞΥ ΤΩΝ ΠΕΙΡΑΜΑΤΩΝ ΠΟΥ ΔΙΕΞΑΧΘΗΚΑΝ ΥΠΟ ΑΕΡΟΒΙΕΣ ΚΑΙ ΑΝΑΕΡΟΒΙΕΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ**

Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 13) παρουσιάζονται τα αποτελέσματα για τους μικροοργανισμούς: *T. californica* και *Z. bailii* μετά την ανάπτυξή τους υπό αερόβιες και αναερόβιες συνθήκες, σε υπόστρωμα που περιείχε ως κύρια πηγή άνθρακα γλυκόζη και φρουκτόζη. Τα αποτελέσματα παρατηρήθηκαν τη χρονική στιγμή που η παραγωγή της αιθανόλης ήταν μέγιστη. Γενικά, η παραγωγή της αιθανόλης ήταν μεγαλύτερη υπό αναερόβιες συνθήκες, συγκριτικά με την παραγωγή της αιθανόλης υπό αερόβιες συνθήκες. Επίσης, για τους μικροοργανισμούς: *Metschnikowia pulcherrima*, *Pichia manshurica* και *Priceomyces carsonii* πραγματοποιήθηκαν πειράματα υπό αναερόβιες συνθήκες σε υπόστρωμα που περιείχε ως κύρια πηγή άνθρακα 300 g/L σάκχαρο (150 g/L γλυκόζη και 150 g/L φρουκτόζη) και προέκυψε ότι οι μικροοργανισμοί δεν αναπτύχθηκαν, με αποτέλεσμα να μην παραχθεί αιθανόλη.

Η ζύμη *T. californica* (Πίνακας 13), στην περίπτωση που καλλιεργήθηκε υπό αερόβιες συνθήκες με αρχική συγκέντρωση σακχάρων 150 g/L γλυκόζη και 150 g/L φρουκτόζη (Glucose:  $S_0=135,98$  g/L και Fructose:  $S_0=148,54$  g/L, Πίνακας 13) παράγαγε στις 120 h 88,59 g/L αιθανόλη και 7,70 g/L βιομάζα. Όταν η αρχική συγκέντρωση σακχάρων ήταν 200 g/L γλυκόζη και 200 g/L φρουκτόζη (Glucose:  $S_0=195,11$  g/L και Fructose:  $S_0=189,73$  g/L, Πίνακας 13), υπό αερόβιες συνθήκες, στις 166 h παράχθηκε αιθανόλη 107,31 g/L, 11,69 g/L γλυκερόλη και η βιομάζα είχε συγκέντρωση 5 g/L. Ο συντελεστής απόδοσης ( $Y_{EtOH/S_{con}}$ ) ήταν 0,38 g/L, σχεδόν ίδιος όταν υπό αερόβιες συνθήκες η αρχική συγκέντρωση σακχάρων ήταν 150 g/L γλυκόζη και 150 g/L φρουκτόζη (Πίνακας 13). Υπό αναερόβιες συνθήκες με αρχική ολική συγκέντρωση σακχάρων 300 g/L (Πίνακας 13, Glucose:  $S_0=157,23$  g/L και Fructose:  $S_0=157,45$  g/L), στις 188 h παρατηρήθηκε μέγιστη παραγωγή αιθανόλης 126,94 g/L. Άρα, η μέγιστη παραγωγή της αιθανόλης ήταν περισσότερη υπό αναερόβιες συνθήκες, συγκριτικά με τη μέγιστη παραγωγή αιθανόλης υπό αερόβιες συνθήκες. Η γλυκερόλη που παράχθηκε υπό αερόβιες και αναερόβιες συνθήκες σε θρεπτικό μέσο με αρχική συγκέντρωση σακχάρων 300 g/L, απέκτησε μέγιστη τιμή 6,96 g/L και 7,53 g/L αντίστοιχα (Πίνακας

13). Επομένως η μέγιστη παραγωγή γλυκερόλης ήταν περίπου ίδια υπό αερόβιες και αναερόβιες συνθήκες. Υπό αερόβιες συνθήκες με αρχική συγκέντρωση σακχάρων 400 g/L (Glucose:  $S_0=195,11$  g/L και Fructose:  $S_0=189,73$  g/L, Πίνακας 13) η γλυκερόλη έφτασε τα 11,69 g/L στις 166 h. Υπό αναερόβιες συνθήκες, στις 188 h η βιομάζα ήταν ελάχιστη (1 g/L) και ο συντελεστής απόδοσης για την αιθανόλη ήταν 0,49 g αιθανόλης/g καταναλωθέντων σακχάρων και υψηλότερος συγκριτικά με τον συντελεστή απόδοσης της αιθανόλης όταν οι συνθήκες ήταν αερόβιες.

Η ζύμη *Z. bailii* στην περίπτωση που καλλιεργήθηκε υπό αερόβιες συνθήκες σε υπόστρωμα με αρχική συγκέντρωση σακχάρων 150 g/L γλυκόζη και 150 g/L φρουκτόζη (Glucose:  $S_0=166,41$  g/L και Fructose:  $S_0=183,07$  g/L, Πίνακας 13), παρήγαγε στις 119 h 102,08 g/L αιθανόλη, 9,50 g/L γλυκερόλη, 8,86 g/L βιομάζα και ο συντελεστής απόδοσης της αιθανόλης ( $Y_{EtOH/Scon}$ ) ήταν 0,30 g/L (Πίνακας 13). Υπό αναερόβιες συνθήκες με αρχική συγκέντρωση σακχάρων 300 g/L (Glucose:  $S_0=156,94$  g/L και Fructose:  $S_0=156,81$  g/L, Πίνακας 13), στις 188 h παρατηρήθηκε μέγιστη παραγωγή αιθανόλης με συγκέντρωση 137,90 g/L (Πίνακας 13). Άρα, υπό αναερόβιες συνθήκες η μέγιστη παραγωγή αιθανόλης ήταν περισσότερη, συγκριτικά με τη μέγιστη παραγωγή της υπό αερόβιες συνθήκες. Επιπλέον, η παραγωγή γλυκερόλης ήταν περισσότερη υπό αερόβιες συνθήκες συγκριτικά με τα πειράματα που διεξάχθηκαν υπό αναερόβιες συνθήκες χωρίς όμως να παρατηρηθεί αξιοσημείωτη διαφορά. Τέλος, υπό αναερόβιες συνθήκες, στις 188 h η βιομάζα ήταν ελάχιστη (1 g/L) και ο συντελεστής απόδοσης για την αιθανόλη ήταν 0,48 g αιθανόλης/g καταναλωθέντων σακχάρων και υψηλότερος συγκριτικά με τα πειράματα που διεξάχθηκαν υπό αερόβιες συνθήκες (Πίνακας 13).

**Πίνακας 13:** Αποτελέσματα για τους μικροοργανισμούς: *T. californica* και *Z. bailii* μετά την ανάπτυξη τους υπό αερόβιες και αναερόβιες συνθήκες, σε υπόστρωμα που περιείχε ως κύρια πηγή άνθρακα γλυκόζη και φρουκτόζη. Τα αποτελέσματα παρατηρήθηκαν τη χρονική στιγμή που η παραγωγή της αιθανόλης ήταν μέγιστη.

| Μικροοργανισμός              | Συνθήκες   | Time (h) | Glucose: $S_0$ (g/L) | Fructose: $S_0$ (g/L) | EtOH (g/L) | Glycerol (g/L) | DW (g/L) | $Y_{EtOH/Scon}$ (g/g) |
|------------------------------|------------|----------|----------------------|-----------------------|------------|----------------|----------|-----------------------|
| <i>T. californica</i> (A9Y1) | Αερόβιες   | 120      | 135,98               | 148,54                | 88,59      | 6,96           | 7,70     | 0,36                  |
| <i>T. californica</i> (A9Y1) | Αερόβιες   | 166      | 195,11               | 189,73                | 107,31     | 11,69          | 5        | 0,38                  |
| <i>T. californica</i> (A9Y1) | Αναερόβιες | 188      | 157,23               | 157,45                | 126,94     | 7,53           | 1        | 0,49                  |
| <i>Z. bailii</i> (A19Y5)     | Αερόβιες   | 119      | 166,41               | 183,07                | 102,08     | 9,50           | 8,86     | 0,30                  |
| <i>Z. bailii</i> (A19Y5)     | Αναερόβιες | 188      | 156,94               | 156,81                | 137,90     | 6,97           | 1        | 0,48                  |

#### 4.4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΑΠΟ ΤΗΝ ΠΑΡΟΥΣΑ ΕΡΓΑΣΙΑ ΚΑΙ ΑΠΟ ΆΛΛΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ

Οι ζύμες *Metschnikowia pulcherrima* και *Zygosaccharomyces bailii* έχουν αποτελέσει αντικείμενο μελέτης σε διάφορες έρευνες. Συγκεκριμένα, σύμφωνα με τον πίνακα 14, σε υπόστρωμα που αποτελούταν από γλυκόζη και φρουκτόζη αναπτύχθηκε η ζύμη *Metschnikowia pulcherrima* για 14 μέρες υπό ανάδευση στους 28 °C και παράχθηκε 4,7% v/v αιθανόλη την 6<sup>η</sup> μέρα ζύμωσης (Giovani et al., 2012). Στη συγκεκριμένη περίπτωση το υπόστρωμα ήταν συνθετικό μέσο πολυσακχαριδικής σύστασης που προσομοίαζε τον χυμό σταφυλιού. Σε άλλη μελέτη (Carbon et al., 2023) και σύμφωνα με τον πίνακα 14, η ζύμη *Mt. pulcherrima* (*Metschnikowia pulcherrima*) αναπτύχθηκε σε συνθετικό μέσο που περιέχει χυμό σταφυλιού στο οποίο περιέχονταν γλυκόζη και φρουκτόζη. Η ζύμωση είχε διάρκεια 7 μέρες στους 25 °C σε περιστρεφόμενο αναδευτήρα, σε μπουκάλια των 500 ml. Σε αυτήν την περίπτωση παράχθηκε 6% v/v αιθανόλη την 7<sup>η</sup> μέρα της ζύμωσης.

Στην παρούσα μελέτη η ζύμη *M. pulcherrima* αναπτύχθηκε σε υπόστρωμα που περιείχε 100 g/L γλυκόζη και 100 g/L φρουκτόζη υπό αερόβιες συνθήκες, στους 22 °C – 25 °C σε κωνικές φιάλες των 250 ml, με ενεργό όγκο 50 ml και παρήχθησαν 53 g/L αλκοόλη (Πίνακας 14). Στην ίδια μελέτη η ζύμη *M. pulcherrima* αναπτύχθηκε σε υπόστρωμα που περιείχε 150 g/L γλυκόζη και 150 g/L φρουκτόζη υπό αερόβιες συνθήκες, στους 22 °C – 25 °C σε κωνικές φιάλες των 250 ml, με ενεργό όγκο 50 ml και παρήχθησαν 58 g/L αιθανόλη (Πίνακας 14). Σύμφωνα με άλλη μελέτη (Karaman & Sagdic, 2019) σε υπόστρωμα που περιείχε χυμό μήλου αναπτύχθηκε η ζύμη *Zygosaccharomyces bailii* (στέλεχος DSM 70492), στους 20 °C για 41 μέρες και παράχθηκε 14,21% αιθανόλη. Σύμφωνα με τους Giovani et al. (2012), σε συνθετικό μέσο πολυσακχαριδικής σύστασης που προσομοίαζε τον χυμό σταφυλιού και αποτελούταν από γλυκόζη και φρουκτόζη, αναπτύχθηκε η ζύμη *Z. bailii* (6102) για 13 μέρες στους 28 °C, υπό ανάδευση σε κωνικές φιάλες. Την 13<sup>η</sup> μέρα παρήχθησαν 5,7% v/v αιθανόλης. Επιπλέον, σύμφωνα με τους Li et al. (2022), χρησιμοποιώντας 10<sup>7</sup> mL<sup>-1</sup> ζύμη *Z. bailii* πραγματοποιήθηκε ζύμωση για 14 μέρες στους 25 °C σε 2,5 L χυμού από ακτινίδια και σουκρόζη και παρήχθησαν 57,88 g/L αιθανόλη. Τέλος, σύμφωνα με τους Garavaglia et al. (2015), η ζύμη *Zygosaccharomyces bailii* BCV 08 αναπτύχθηκε σε μούστο από σταφύλι στους 28 °C χωρίς ανάδευση, υπό αναερόβιες συνθήκες, σε βιοαντιδραστήρα των 5 L και προέκυψε ότι η μέγιστη παραγωγή αιθανόλης ήταν 3,17% vol/vol.

Στην παρούσα μελέτη η ζύμη *Zygosaccharomyces bailii* αναπτύχθηκε σε υποστρώμα που περιείχε 150 g/L γλυκόζη και 150 g/L φρουκτόζη υπό αερόβιες συνθήκες στους 22 °C – 25 °C σε κωνικές φιάλες των 250 ml, με ενεργό όγκο 50 ml και παρήχθησαν 102 g/L αιθυλική αλκοόλη. Επιπλέον, στην παρούσα μελέτη η ζύμη *Zygosaccharomyces bailii* αναπτύχθηκε σε 150 g/L γλυκόζη και 150 g/L φρουκτόζη, υπό αναερόβιες συνθήκες, σε θερμοκρασία δωματίου, σε Φιάλες Duran των 100 ml και παρήχθησαν 138 g/L αιθανόλη.

**Πίνακας 14:** Παραγωγή αιθανόλης χρησιμοποιώντας τους μικροοργανισμούς *Metschnikowia pulcherrima* και *Zygosaccharomyces bailii* σύμφωνα με τη διεθνή βιβλιογραφία και την παρούσα μελέτη.

| Μικροοργανισμός                                      | Συνθήκες ζύμωσης  | Υπόστρωμα  | Τύπος ζύμωσης   | Αιθανόλη                                       | Βιβλιογραφική πηγή      |
|--|---|--|---|--|-------------------------|
| <i>M. pulcherrima</i>                                | 14 μέρες, 28 °C, υπό ανάδευση στις 150 rpm              | Συνθετικό μέσο που προσομοιάζει τον χυμό σταφυλιού   | Κωνικές φιάλες των 500 ml που περιείχαν 300 ml υποστρώματος | 4,7% v/v, την 6 <sup>η</sup> μέρα ζύμωσης      | Giovani et al., 2012    |
| <i>Mt. Pulcherrima</i>                               | 7 μέρες, 25 °C, σε περιστρεφόμενο αναδευτήρα με 100 rpm | Συνθετικό μέσο που περιέχει χυμό σταφυλιού   | Μπουκάλια των 500 mL που περιλαμβάνουν τον χυμό             | 6% v/v την 7 <sup>η</sup> μέρα ζύμωσης         | Carbon et al., 2023     |
| <i>Zygosaccharomyces bailii</i> (στέλεχος DSM 70492) | 20 °C, 41 μέρες   | Χυμός μήλου στον οποίο υπήρχαν 500 ppm αιθέριο έλαιο από μέντα                                       | Γυάλινα μπουκάλια των 100 mL                                | 14,21%   | Karaman & Sagdic, 2019  |
| <i>Zygosaccharomyces bailii</i> (6102)               | 13 μέρες, 28 °C υπό ανάδευση στις 150 rpm               | Γλυκόζη και φρουκτόζη  | Κωνικές φιάλες των 500 ml που περιείχαν 300 ml υποστρώματος | 5,7% v/v, την 13 <sup>η</sup> μέρα της ζύμωσης | Giovani et al., 2012    |
| <i>Zygosaccharomyces bailii</i>                      | Επώαση στους 25 °C, στατική υγρή ζύμωση για 14 μέρες    | 2,5 L χυμού που είχε ακτινίδια + πηκτινάση + K <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>5</sub> + σουκρόζη | Ζύμωση εργαστηριακής κλίμακας, 2,5 L χυμού                  | 57,88 g/L                                      | Li et al., 2022         |
| <i>Zygosaccharomyces bailii</i> BCV 08               | pH=5, 28 °C, χωρίς ανάδευση, αναερόβιες συνθήκες        | Μούστος από σταφύλι  | Βιοαντιδραστήρας των 5 L                                    | 3,17% vol/vol μέγιστη παραγωγή αιθανόλης       | Garavaglia et al., 2015 |

|                                  |   |                                       |   |         |                |
|----------------------------------|---|---------------------------------------|---|---------|----------------|
| <i>Metschnikowia pulcherrima</i> | 22 ° C – 25 ° C, αερόβιες συνθήκες        | 100 g/L γλυκόζη και 100 g/L φρουκτόζη | Κωνικές φιάλες των 250 ml, με ενεργό όγκο 50 ml | 53 g/L  | Παρούσα μελέτη |
| <i>Metschnikowia pulcherrima</i> | 22 ° C – 25 ° C, αερόβιες συνθήκες        | 150 g/L γλυκόζη και 150 g/L φρουκτόζη | Κωνικές φιάλες των 250 ml, με ενεργό όγκο 50 ml | 58 g/L  | Παρούσα μελέτη |
| <i>Zygosaccharomyces bailii</i>  | 22 ° C – 25 ° C, αερόβιες συνθήκες        | 150 g/L γλυκόζη και 150 g/L φρουκτόζη | Κωνικές φιάλες των 250 ml, με ενεργό όγκο 50 ml | 102 g/L | Παρούσα μελέτη |
| <i>Zygosaccharomyces bailii</i>  | Θερμοκρασία δωματίου, αναερόβιες συνθήκες | 150 g/L γλυκόζη και 150 g/L φρουκτόζη | Φιάλες Duran των 100 ml                         | 138 g/L | Παρούσα μελέτη |



## 5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα μελέτη διερευνήθηκε η ικανότητα παραγωγής αιθανόλης από πέντε non-*Saccharomyces* ζύμες. Συγκεκριμένα μελετήθηκε η ζύμη *Metschnikowia pulcherrima* καθώς και νέα στελέχη ζυμών των ειδών *Pichia manshurica*, *Trigonopsis californica*, *Zygosaccharomyces bailii* και *Priceomyces carsonii*, τα οποία έχουν απομονωθεί πρόσφατα. Οι ζύμες αναπτύχθηκαν σε υγρή καλλιέργεια, που περιείχε ως κύρια πηγή άνθρακα εμπορική γλυκόζη και εμπορική φρουκτόζη. Τα πειράματα διεξάχθηκαν υπό αερόβιες και αναερόβιες συνθήκες, σε κυμαινόμενες και υψηλές συγκεντρώσεις σακχάρων. Συγκεκριμένα, το υγρό θρεπτικό μέσο στο οποίο πραγματοποιήθηκαν οι ζυμώσεις περιείχε: 50 g/L – 200 g/L γλυκόζη και 50 g/L – 200 g/L φρουκτόζη (με ίσες ποσότητες γλυκόζης και φρουκτόζης). Επιπλέον, στα πλαίσια της συγκεκριμένης μελέτης διερευνήθηκε η ικανότητα παραγωγής βιομάζας και λιπιδίων από τις προαναφερόμενες ζύμες.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης μελέτης οι ζύμες *Metschnikowia pulcherrima*, *Trigonopsis californica* και *Zygosaccharomyces bailii* είναι θετικές στο φαινόμενο Crabtree. Αντιθέτως, οι ζύμες *Pichia manshurica* και *Priceomyces carsonii* είναι αρνητικές στο φαινόμενο Crabtree. Επίσης, οι ζύμες *Trigonopsis californica* και *Zygosaccharomyces bailii* είναι θετικές στο φαινόμενο Pasteur, ενώ οι ζύμες *Metschnikowia pulcherrima*, *Pichia manshurica* και *Priceomyces carsonii* είναι αρνητικές στο φαινόμενο Pasteur. Τέλος, όλες οι ζύμες παρήγαγαν χαμηλά ποσοστά % μικροβιακών λιπιδίων επί της ξηρής βιομάζας είτε υπό αερόβιες είτε υπό αναερόβιες συνθήκες. Γενικά, υπό αερόβιες και αναερόβιες συνθήκες, οι ζύμες κατανάλωναν πρωτύτερα και γρηγορότερα τη γλυκόζη απ' ό τι τη φρουκτόζη, εκτός απ' τις περιπτώσεις που ορισμένες ζύμες δεν μπορούσαν να αναπτυχθούν καθόλου στο υγρό θρεπτικό μέσο. Επίσης, σύμφωνα με τα αποτελέσματα που αφορούν τις ζύμες *Trigonopsis californica* και *Zygosaccharomyces bailii* προκύπτει ότι η μέγιστη παραγωγή αιθανόλης ήταν περισσότερη υπό αναερόβιες συνθήκες, συγκριτικά με την μέγιστη παραγωγή αιθανόλης υπό αερόβιες συνθήκες.

Αναλυτικότερα, η ζύμη *Metschnikowia pulcherrima* αναπτύχθηκε υπό αερόβιες συνθήκες σε υπόστρωμα που περιείχε ολική συγκέντρωση σακχάρων 300 g/L και παρήγαγε αιθανόλη (58,15 g/L), αραβιτόλη (14,25 g/L) και γλυκερόλη (μέσω γλυκεροπυροσταφυλικής ζύμωσης). Αντιθέτως, υπό αναερόβιες συνθήκες η παραπάνω ζύμη δεν αναπτύχθηκε σε υπόστρωμα που περιείχε 300 g/L σάκχαρα. Η ζύμη *Trigonopsis californica* καλλιεργήθηκε υπό αερόβιες συνθήκες σε υπόστρωμα με

αρχική συγκέντρωση σακχάρων 300 g/L και παρήγαγε 88,59 g/L αιθανόλη και γλυκερόλη, ενώ όταν η αρχική συγκέντρωση σακχάρων ήταν 400 g/L παράχθηκαν 107,31 g/L αιθανόλης και 11,69 g/L γλυκερόλη. Υπό αναερόβιες συνθήκες σε υγρό θρεπτικό μέσο με αρχική ολική συγκέντρωση σακχάρων 300 g/L, η ζύμη *Trigonopsis californica* παρήγαγε αιθανόλη με μέγιστη τιμή τα 126,94 g/L καθώς και γλυκερόλη (μέσω γλυκεροπυροσταφυλικής ζύμωσης). Η ζύμη *Zygosaccharomyces bailii* καλλιεργήθηκε υπό αερόβιες συνθήκες σε υπόστρωμα με αρχική ολική συγκέντρωση σακχάρων 300 g/L, παρήγαγε αιθανόλη με μέγιστη τιμή 102,08 g/L και 9,50 g/L γλυκερόλη. Υπό αναερόβιες συνθήκες η ζύμη *Zygosaccharomyces bailii* σε υγρό θρεπτικό μέσο με αρχική συγκέντρωση σακχάρων 300 g/L, παρήγαγε αιθανόλη με μέγιστη τιμή τα 137,90 g/L.

Η ζύμη *Pichia manshurica* καλλιεργήθηκε υπό αερόβιες συνθήκες σε υπόστρωμα με συνολική συγκέντρωση σακχάρων 100 g/L και 200 g/L. Στην περίπτωση που η αρχική ολική συγκέντρωση σακχάρων ήταν 100 g/L, παρατηρήθηκε μέγιστη συγκέντρωση της γλυκερόλης με τιμή 19,78 g/L. Δεν παράχθηκε αιθανόλη και η συγκέντρωση της βιομάζας ήταν 15,15 g/L όταν η συγκέντρωση της γλυκερόλης ήταν μέγιστη. Η παραγωγή αραβιτόλης ήταν ελάχιστη. Όταν η αρχική συγκέντρωση σακχάρων ήταν 200 g/L, δεν παράχθηκε αιθανόλη, η συγκέντρωση της γλυκερόλης απέκτησε μέγιστη τιμή τα 37,09 g/L και την ίδια χρονική στιγμή η συγκέντρωση της βιομάζας ήταν 14,33 g/L. Υπό αναερόβιες συνθήκες, σε υπόστρωμα με αρχική ολική συγκέντρωση σακχάρων 300 g/L η ζύμη *Pichia manshurica* δεν αναπτύχθηκε.

Τέλος, η ζύμη *Priceomyces carsonii* καλλιεργήθηκε υπό αερόβιες συνθήκες σε υπόστρωμα με αρχική ολική συγκέντρωση σακχάρων 200 g/L και παράχθηκε αραβιτόλη με μέγιστη συγκέντρωση τα 29,48 g/L και γλυκερόλη που απέκτησε μέγιστη τιμή τα 39,89 g/L. Δεν παράχθηκε αιθανόλη και η συγκέντρωση της βιομάζας ήταν 24 g/L όταν η γλυκερόλη είχε μέγιστη τιμή. Τέλος, υπό αναερόβιες συνθήκες η ζύμη *Priceomyces carsonii* σε υπόστρωμα με αρχική ολική συγκέντρωση σακχάρων 300 g/L δεν αναπτύχθηκε. Στο μέλλον, θα μπορούσαν να διεξαχθούν παρόμοια πειράματα με τη χρήση αγρίου τύπου non-*Saccharomyces* ζυμών και να μελετηθεί η ικανότητα τους ως προς την παραγωγή βιοαιθανόλης. Τέλος, η βιοαιθανόλη θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως μια εναλλακτική μορφή καυσίμου και για την παραγωγή της θα μπορούσαν να αξιοποιηθούν πηγές άνθρακα από πρώτες ύλες χαμηλού κόστους.

## 6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Anbarasan, T., Jayanthi, S. & Ragina, Y. (2018). Investigation on Synthesis of Biodiesel from Distillery Spent Wash using Oleaginous Yeast *Metschnikowia Pulcherrima*. *Materials Today: Proceedings*, 5, 23293–23301.
- 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., Balat, H. & Öz, C. (2008). Progress in bioethanol processing. *Progress in Energy and Combustion Science*, 34, 551–573.
- Bellou, S., Baeshen, M. N., Elazzazy, A. M., Aggeli, D., Sayegh, F. & Aggelis, G. (2014). Microalgal lipids biochemistry and biotechnological perspectives. *Biotechnology Advances*, 32, 1476–1493.
- Bennett, J. W. (1998). Mycotechnology: the role of fungi in biotechnology. *Journal of Biotechnology*, 66, 101–107.
- Barnett, J. A. (2003). A history of research on yeasts 5: the fermentation Pathway. *Yeast*, 20, 509–543.
- Bevilacqua, A., Corbo, M. R. & Sinigaglia M. (2010). In Vitro Evaluation of the Antimicrobial Activity of Eugenol, Limonene, and Citrus Extract against Bacteria and Yeasts, Representative of the Spoiling Microflora of Fruit Juices. *Journal of Food Protection*, 73, 888–894.
- Bilal, M., Asgher, M., Iqbal, H. M.N., Hu, H., Zhang, X. (2017). Biotransformation of lignocellulosic materials into value-added products—A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 98, 447–458.
- Canonico, L., Agarbati, A., Galli, E., Comitini, F., Ciani, M. (2023). *Metschnikowia pulcherrima* as biocontrol agent and wine aroma enhancer in combination with a native *Saccharomyces cerevisiae*. *LWT - Food Science and Technology*, 181, 114758.
- Capece, A., Pietrafesa, A., Pietrafesa, R., Garrigós, V., Tedesco, F., Romano, P, Matallana, E., Siesto, G. & Aranda, A. (2022). Impact of *Starmarella bacillaris* and *Zygosaccharomyces bailii* on ethanol reduction and *Saccharomyces cerevisiae* metabolism during mixed wine fermentations. *Food Research International*, 159, 111649.
- Carbon, H. N., Aplin, J. J., Jiang, G. Z., Gibney, P. A & Edwards C. G. (2023). Fate of carbon in synthetic media fermentations containing *Metschnikowia pulcherrima* or *Meyerozyma guilliermondii* in the presence and absence of *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Microbiology*, 114, 104308.
- Contreras, A., Hidalgo, C., Schmidt, S., Henschke, P.A., Curtina, C. & Varela, C. (2015). The application of non-*Saccharomyces* yeast in fermentations with limited aeration as a strategy for the production of wine with reduced alcohol content. *International Journal of Food Microbiology*, 205, 7–15.
- Cot, M., Loret, M.-O., François, J., & Benbadis L. (2007). Physiological behaviour of *Saccharomyces cerevisiae* in aerated fed-batch fermentation for high level production of bioethanol. *FEMS Yeast Res*, 7, 22–32.
- Cruz, A. F. D., Abreu, A. O. D., Souza, P. A. D., Deveza, B., Medeiros, C. T., Sousa, V. S., Sabagh, B. P., Simões, M. H., Bôas, V. (2022). Adaptation and validation of a

method for evaluating the bactericidal activity of ethyl alcohol in gel format 70% (w/w). *Journal of Microbiological Methods*, 193, 106402.

Dashko, S., Zhou, N., Compagno, C. & Jure Piškur. (2014). Why, when, and how did yeast evolve alcoholic fermentation?. *FEMS Yeast Research*, 14, 826–832.

Diaz-Ruiz, R., Rigoulet, M. & Devin A. (2011). The Warburg and Crabtree effects: On the origin of cancer cell energy metabolism and of yeast glucose repression. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1807, 568–576.

Enrique, M., Marcos, J. F., Yuste, M., Martínez, M., Vallés, S. & Manzanares, P. (2007). Antimicrobial action of synthetic peptides towards wine spoilage yeasts. *International Journal of Food Microbiology*, 118, 318–325.

Escott, C., Del Fresno, J. M., Loira, I., Morata, A., & Suárez-Lepe, J. A. (2018). *Zygosaccharomyces rouxii*: Control Strategies and Applications in Food and Winemaking. *Fermentation*, 4, 69.

Fahy, E., Subramaniam, S., Brown, H. A., Glass, C. K., Alfred H. Merrill, A. H., Jr., Robert C. Murphy, Raetz, C. R. H., Russell, D. W., Seyama, Y., Shaw, W., Shimizu, T., Spener, F., Meer, G. V., VanNieuwenhze, M. S., White, S. H., Witztum, J. L. & Dennis, E. A. (2005). A comprehensive classification system for lipids. *Journal of Lipid Research*, 46, 839-861.

Fonseca, C., Romão, R., de Sousa, H. R., Hahn-Hägerdal, B. & Spencer-Martins, I. (2007). L-Arabinose transport and catabolism in yeast. *FEBS Journal*, 274, 3589–3600.

Gambacorta, F. V., Dietrich, J. J., Yan, Q. & Pflieger B. F. (2020). Rewiring yeast metabolism to synthesize products beyond ethanol. *Current Opinion in Chemical Biology*, 59, 182–192.

Gamero, A., Quintilla, R., Groenewald, M., Wynand Alkema, W., Boekhout, T. & Hazelwood L. (2016). High-throughput screening of a large collection of non-conventional yeasts reveals their potential for aroma formation in food fermentation. *Food Microbiology*, 60, 147-159.

Garavaglia, J., Schneider, R. d. C. d. S., Mendes, S. D. C., Welked J. E., Zinie C. A., Caramão E. B., Valente P. (2015). Evaluation of *Zygosaccharomyces bailii* BCV 08 as a co-starter in wine fermentation for the improvement of ethyl esters production. *Microbiological Research*, 173, 59–65.

Gatt, S. & Racker, E. (1959). Regulatory mechanisms in carbohydrate metabolism: I. Crabtree effect in reconstituted systems. *J. Biol. Chem.*, 234, 1015–1023.

Ghazani, S. M. & Marangoni, A. G. (2022). Microbial lipids for foods. *Trends in Food Science & Technology*, 119, 593–607.

Giovani, G., Rosi, I., Bertuccioli, M. (2012). Quantification and characterization of cell wall polysaccharides released by non-Saccharomyces yeast strains during alcoholic fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 160, 113–118.

Grüning, N.-M. & Ralser, M. (2021). Glycolysis: How a 300yr long research journey that started with the desire to improve alcoholic beverages kept revolutionizing biochemistry. *Current Opinion in Systems Biology*, 28, 100380.

Gschaedler A. (2017). Contribution of non-conventional yeasts in alcoholic beverages. *Current Opinion in Food Science*, 13, 73–77.

- Han, S., Kim, G.-Y. & Han, J.-I. Biodiesel production from oleaginous yeast, *Cryptococcus* sp. by using banana peel as carbon source. *Energy Reports*, 5, 1077–1081.
- Hardie, D. G. (2000). Metabolic control: A new solution to an old problem. *Current Biology*, 10, R757–R759.
- Hernández, A., Pérez-Navado, F., Ruiz-Moyano, S., Serradilla, M.J., Villalobos, M.C., Martín, A & Córdoba M.G. (2018). Spoilage yeasts: What are the sources of contamination of foods and beverages?. *International Journal of Food Microbiology*, 286, 98–110.
- Hranilovic, A., Gambetta, J.M., Jeffery, D. W., Grbin, P. R., Jiranek, V. (2020). Lower-alcohol wines produced by *Metschnikowia pulcherrima* and *Saccharomyces cerevisiae* co-fermentations: The effect of sequential inoculation timing. *International Journal of Food Microbiology*, 329,108651.
- Karaman, K., Sagdic, O. & Yilmaz, M. T. (2016). Multiple response surface optimization for effects of processing parameters on physicochemical and bioactive properties of apple juice inoculated with *Zygosaccharomyces rouxii* and *Zygosaccharomyces bailii*. *LWT - Food Science and Technology*, 69, 258 – 272.
- Karaman, K., Sagdic, O. (2019). *Zygosaccharomyces bailii* and *Z. rouxii* induced ethanol formation in apple juice supplemented with different natural preservatives: A response surface methodology approach. *Journal of Microbiological Methods*, 163,105659.
- Kasavi, C., Finore, I., Lama, L., Nicolaus, B., Oliver, S. G., Oner, E. T., Kirdar, B. (2012). BIOMASS AND BIOENERGY, 45, 230-238.
- Koganti, S.& Kuo, T. M., Kurtzman, C. P., Smith, N. & Ju, L.-K. (2011). Production of arabitol from glycerol: strain screening and study of factors affecting production yield. *Appl Microbiol Biotechnol*, 90, 257–267.
- Kordowska-Wiater, M. (2015). Production of arabitol by yeasts: current status and future prospects. *Journal of Applied Microbiology*, 119, 303—314.
- Kosaric, N. & Velikonja, J. (1995). Liquid and gaseous fuels from biotechnology: challenge and opportunities. *FEMS Microbiology Reviews*, 16, 111-142.
- Kusmiyati, K., Hadiyanto, H. & Fudholi, A. (2023). Treatment updates of microalgae biomass for bioethanol production: A comparative study. *Journal of Cleaner Production*, 383, 135236.
- Lachance, M.-A. & Kurtzman C. P. (2013). The yeast genus *Tortispora* gen. nov., description of *Tortispora ganteri* sp. nov., *Tortispora mauiana* f.a., sp. nov., *Tortispora agaves* f.a., sp. nov., *Tortispora sangerardonensis* f.a., sp. nov., *Tortispora cuajiniquilana* f.a., sp. nov., *Tortispora starmeri* f.a., sp. nov. and *Tortispora phaffii* f.a., sp. nov., reassignment of *Candida caseinolytica* to *Tortispora caseinolytica* f.a., comb. nov., emendation of *Botryozyma*, and assignment of *Botryozyma*, *Tortispora* gen. nov. and *Trigonopsis* to the family *Trigonopsidaceae* fam. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63, 3104–3114.
- Li, S., Bi, P., Sun, N., Gao, Z., Chen, X. & Guo, J. (2022). Characterization of different non-*Saccharomyces* yeasts via mono-fermentation to produce polyphenol-enriched and fragrant kiwi wine. *Food Microbiology*, 103, 103867.

- Liu, C., Li, M., Ren, T., Wang, J., Niu, C., Zheng, F. & Li, Q. (2022). Effect of *Saccharomyces cerevisiae* and non-*Saccharomyces* strains on alcoholic fermentation behavior and aroma profile of yellow-fleshed peach wine. *LWT - Food Science and Technology*, 155, 112993.
- Mahapatra, S., Kumar, D., Singh, B. & Sachan, P.K. (2021). Biofuels and their sources of production: A review on cleaner sustainable alternative against conventional fuel, in the framework of the food and energy nexus. *Energy Nexus*, 4, 100036.
- Malik, K., Sharma, P., Yang, Y., Zhang, P., Zhang, L., Xing, X., Yue, J., Song, Z., Nan, L., Yujun, S., El-Dalatony, M. M., Salama, El-S. & Li, X. (2022). Lignocellulosic biomass for bioethanol: Insight into the advanced pretreatment and fermentation approaches. *Industrial Crops & Products*, 188, 115569.
- Mateus, T., Santo, D., Saúde, C., Pires-Cabral, P. & Quintas, C. (2016). The effect of NaCl reduction in the microbiological quality of cracked green table olives of the Maçanilha Algarvia cultivar. *International Journal of Food Microbiology*, 218, 57–65.
- Maura, Y. F., Balzarini, T., Borges, P. C., Evrard, P., Vuyst, L. D. & Daniel H.-M. (2016). *International Journal of Food Microbiology*, 233, 34–43.
- Mbuyane, L. L., Bauer, F. F & Divol, B. (2021). The metabolism of lipids in yeasts and applications in oenology. *Food Research International*, 141, 110142.
- Mencher, A., Morales, P., Curiel, J. A., Gonzalez & R., Tronchoni, J. (2021). *Metschnikowia pulcherrima* represses aerobic respiration in *Saccharomyces cerevisiae* suggesting a direct response to co-cultivation. *Food Microbiology*, 94, 103670.
- Melendez, J. R., Mátyás, B., Hena, S., Lowy, D. A. & Salous, A. El. (2022). Perspectives in the production of bioethanol: A review of sustainable methods, technologies, and bioprocesses. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 160, 112260.
- Merico, A., Capitanio, D., Vigentini, I., Ranzi, B. M. & Compagno C. (2003). Aerobic sugar metabolism in the spoilage yeast *Zygosaccharomyces bailii*. *FEMS Yeast Research*, 4, 277-283.
- Morata, A., Loira, I., Escott, C., del Fresno, J.M., Bañuelos, M.A. & Suárez-Lepe, J.A. (2019). Applications of *Metschnikowia pulcherrima* in wine biotechnology. *Fermentation*, 5, 63.
- Nolasco-Cancino, H., Santiago-Urbina, J. A., Wachter, C. & Ruíz-Terán, F. (2018). Predominant Yeasts During Artisanal Mezcal Fermentation and Their Capacity to Ferment ry Juice. *Frontiers in Microbiology*, 9, Article 2900.
- Ocón, E., Gutiérrez, A.R., Garijo, P., López, R. & Santamaría P. (2010). Presence of non-*Saccharomyces* yeasts in cellar equipment and grape juice during harvest time. *Food Microbiology*, 27, 1023-1027.
- Papanikolaou, S. & Aggelis, G. (2011). Lipids of oleaginous yeasts. Part I: Biochemistry of single cell oil production. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 113, 1031-1051.
- Passonneau, J. V., Lowry O.H. (1962). Phosphofructokinase and the Pasteur effect. *Biochem Biophys Res Commun*, 7, 10-15.
- Pasteur, L. (1861). Expériences et vues nouvelles sur la nature des fermentations. *Comp Rend Acad Sci*, 52,1260-1264.

- Patil, N., Howe, O., Cahill, P. & Byrne, H. J. (2022). Monitoring and modelling the dynamics of the cellular glycolysis pathway: A review and future perspectives. *MOLECULAR METABOLISM*, 66, 101635.
- Perpetuini, G., Tittarelli, F., Schirone, M., Gianvito, P. D., Corsetti, A., Arfelli, G., Suzzi, G. & Tofalo, R. (2018). Adhesion properties and surface hydrophobicity of *Pichia manshurica* strains isolated from organic wines. *LWT - Food Science and Technology*, 87, 385-392.
- Poontawee, R., Lorliam, W., Polburee, P. & Limtong, S. (2023). Oleaginous yeasts: Biodiversity and cultivation. *FUNGAL BIOLOGY REVIEWS*, 44, 100295.
- Phisalaphong, M., Srirattana, N. & Tanthapanichakoon, W. (2006). Mathematical modeling to investigate temperature effect on kinetic parameters of ethanol fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, 28, 36–43.
- Rajas, F., Amandine Gautier-Stein, A. & Mithieux, G. (2019). Glucose-6 Phosphate, a Central Hub for Liver Carbohydrate Metabolism. *Metabolites*, 9, 282.
- Robak K. & Balcerek M. (2018). Review of Second Generation Bioethanol Production from Residual Biomass. *Food Technol. Biotechnol.*, 56, 174-187.
- Robles-Iglesias, R., Naveira-Pazos, C., Fernández-Blanco, C., Veiga, M. C. & Kennes, C. (2023). Factors affecting the optimisation and scale-up of lipid accumulation in oleaginous yeasts for sustainable biofuels production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 171, 113043.
- Rodríguez-Enriquez, S., Juárez, O., Rodríguez-Zavala, J. S. & Moreno-Sánchez, R. (2001). Multisite control of the Crabtree effect in ascites hepatoma cells. *Eur. J. Biochem.*, 268, 2512–2519.
- Saez, J. S., Lopes, C. A., Kirs, V. E. & Sangorrín M. (2011). Production of volatile phenols by *Pichia manshurica* and *Pichia membranifaciens* isolated from spoiled wines and cellar environment in Patagonia. *Food Microbiology*, 28, 503-509.
- Saha, B. C., Sakakibara, Y. & Cotta, M. A. (2007). Production of D-arabitol by a newly isolated *Zygosaccharomyces rouxii*. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 34, 519–523.
- Santamauro, F., Whiffin, F. M, Scott, R. J. & Chuck, C. J. (2014). Low-cost lipid production by an oleaginous yeast cultured in non-sterile conditions using model waste resources. *Biotechnology for Biofuels*, 7, 34.
- Sarris, D. & Papanikolaou, S. (2016). Biotechnological production of ethanol: Biochemistry processes and technologies. *Eng. Life Sci.*, 16, 307-329.
- Sharma, B., Larroche, C. & Dussap, C-G. Comprehensive assessment of 2G bioethanol production. (2020). *Bioresource Technology*, 313, 123630.
- Sawangkeawa, R. & Ngamprasertsith, S. (2013). A review of lipid-based biomasses as feedstocks for biofuels production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 25, 97–108.
- Schorn-García, D, Cavaglia, J., Giussani, B., Busto, O., Aceña, L., Mestres, M. & Boqué, R. (2021). ATR-MIR spectroscopy as a process analytical technology in wine alcoholic fermentation – A tutorial. *Microchemical Journal*, 166, 106215.

- Shurson, G. C. (2018). Yeast and yeast derivatives in feed additives and ingredients: Sources, characteristics, animal responses, and quantification methods. *Animal Feed Science and Technology*, 235, 60–76.
- Tofalo, R., Perpetuini, G., Fasoli, G., Schirone, M., Corsetti, A. & Suzzi, G. (2014). Biodiversity study of wine yeasts belonging to the “terroir” of Montepulciano d’Abruzzo “Colline Teramane” revealed *Saccharomyces cerevisiae* strains exhibiting atypical and unique 5.8S-ITS restriction patterns. *Food Microbiology*, 39, 7-12.
- Toyotome, T., Yamamoto, M. & Horie M. (2019). Draft Genome Sequence of the Yeast *Pichia manshurica* YM63, a Participant in Secondary Fermentation of Ishizuchi-Kurocha, a Japanese Fermented Tea. *Microbiol Resour Announc*, 8, e00528-19.
- Tzamourani, A., Evangelou, A., Ntourtoglou, G., Lytra, G., Paraskevopoulos, I. & Dimopoulou, M. (2024). Effect of Non-*Saccharomyces* Species Monocultures on Alcoholic Fermentation Behavior and Aromatic Profile of Assyrtiko Wine. *Appl. Sci.*, 14, 1522.
- Tzamourani, A. P., Taliadouros, V., Paraskevopoulos, I. & Dimopoulou, M. (2023). Developing a novel selection method for alcoholic fermentation starters by exploring wine yeast microbiota from Greece. *Frontiers in Microbiology*, 14, 1301325.
- Veech, R. L., Lawson, J. W. R., Cornell, N. W. & Krebs, H. A. (1979). Cytosolic phosphorylation potential. *J. Biol. Chem.*, 254, 6538–6547.
- Vigentini, I., Brambilla, L., Branduardi, P., Merico, A., Porro, D. & Compagno C. (2005). Heterologous protein production in *Zygosaccharomyces bailii*: physiological effects and fermentative strategies. *FEMS Yeast Research*, 5, 647–652.
- Walker, G. M. & Walker, R. S.K. (2018). Enhancing Yeast Alcoholic Fermentations. *Advances in Applied Microbiology*, 105, 87-129.
- Wang, H., Hao, W., Ning, T., Zheng, M. & Xu, C. (2018). Characterization of culturable yeast species associating with whole crop corn and total mixed ration silage. *Asian-Australas J Anim Sci*, 31, 198-207.
- Wang, X., Fan, G., Peng, Y., Xu, N., Xie, Y., Zhou, H., Liang, H., Zhan, J., Huang, W. & You, Y. (2023). Mechanisms and effects of non-*Saccharomyces* yeast fermentation on the aromatic profile of wine. *Journal of Food Composition and Analysis*, 124, 105660.
- Wen, L. & Li, X.-y. (2022). Production of intracellular lipids from thermally hydrolyzed waste sludge by oleaginous yeast for energy and resource recovery. *Energy Conversion and Management*, 252, 115129.
- Windholtz, S., Redon, P., Lacampagne, S., Farris, L., Lytra, G., Cameleyre, M., Barbe, J. – C., Coulon, J., Thibon, C., Masneuf-Pomarède, I. (2021). Non-*Saccharomyces* yeasts as bioprotection in the composition of red wine and in the reduction of sulfur dioxide. *LWT - Food Science and Technology*, 149, 111781.
- Winehouse, S. (1972). Glycolysis, respiration and anomalous gene expression in experimental hepatomas: G.H.A. Clawes memorial lecture. *Cancer Res.*, 32, 2007–2016.
- Xue, L.-L., Chen, H.H. & Jiang, J.-G. (2017). Implications of glycerol metabolism for lipid production. *Progress in Lipid Research*, 68, 12–25.



Yin, L., Wang, C., Zhu, X., Ning, C., Gao, L., Zhang, J., Wang, Y. & Huang, R. (2020). A multi-step screening approach of suitable non-*Saccharomyces* yeast for the fermentation of hawthorn wine. *LWT - Food Science and Technology*, 127, 109432.

## Μελέτη της παραγωγής κυτταρικής

### ORIGINALITY REPORT

|                                |                                |                           |                             |
|--------------------------------|--------------------------------|---------------------------|-----------------------------|
| <b>10%</b><br>SIMILARITY INDEX | <b>10%</b><br>INTERNET SOURCES | <b>1%</b><br>PUBLICATIONS | <b>0%</b><br>STUDENT PAPERS |
|--------------------------------|--------------------------------|---------------------------|-----------------------------|

### PRIMARY SOURCES

|          |  |           |
|----------|--|-----------|
| <b>1</b> | <b>dspace.aua.gr</b><br>Internet Source    | <b>8%</b> |
| <b>2</b> | <b>digit-biotech.eu</b><br>Internet Source | <b>2%</b> |

Exclude quotes  On  
Exclude bibliography  On

Exclude matches  < 1%