

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
Π.Μ.Σ. «Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων και Διατροφής του
Ανθρώπου»
Κατεύθυνση «Διατροφή του Ανθρώπου»

ΤΙΤΛΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ:

«Παραγωγή μικροβιακού λίπους υψηλού διατροφικού και
φαρμακευτικού ενδιαφέροντος κατά την αύξηση μυκήτων της τάξης
Mucorales σε σακχαρούχες ανανεώσιμες πηγές άνθρακα»



Cunninghamella echinulata (Mucorales)

Μεταπτυχιακή φοιτήτρια: Χατζηφράγκου Αφροδίτη

Πενταμελής Επιτροπή:

Παπανικολάου Σεραφείμ, Λέκτορας (Επιβλέπον μέλος Δ.Ε.Π.)
Γαλιώτου-Παναγιώτου Μαρία, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια
Κωμαΐτης Μιχαήλ, Καθηγητής
Καψοκεφάλου Μαρία, Επίκουρος Καθηγήτρια
Δροσινός Ελευθέριος, Επίκουρος Καθηγητής

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα μελέτη εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, στα πλαίσια του Π.Μ.Σ. «Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου». Θα ήθελα να εκφράσω τις θερμότερες ευχαριστίες μου στον διδάσκαλό μου και επιβλέπον μέλος Δ.Ε.Π. κ. Σεραφείμ Παπανικολάου για την εμπιστοσύνη του στο πρόσωπό μου και την άψογη συνεργασία μας κατά την διάρκεια της μελέτης αυτής. Ευχαριστώ ακόμη τον υποψήφιο διδάκτορα κ. Δημήτριο Σαρρή, για την πολύτιμη βοήθειά του και συνεργασία του στον εργαστηριακό χώρο. Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω την κα Αυγή Γαρδέλη για την ουσιαστική βοήθειά της στην χρήση του αέριου χρωματογράφου (G.C). Τέλος, επιθυμώ να εκφράσω τις εγκάρδιες ευχαριστίες μου στην οικογένεια μου για την αρωγή και την συμπαράστασή τους καθ' όλη την διάρκεια διεξαγωγής της μελέτης αυτής.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η διερεύνηση της βιοχημικής δυνατότητας των στελεχών *Cunninghamella echinulata* και *Mortierella isabellina*, ανηκόντων στην τάξη *Mucorales*, να συσσωρεύσουν μικροβιακό λίπος με σημαντικές ποσότητες γ-λινολενικού οξέος (GLA, $\Delta^{6,9,12}\text{C18:3}$), ένα πολυακόρεστο λιπαρό οξύ υψηλής φαρμακευτικής και διατροφικής σημασίας, κατά την καλλιέργειά τους σε σακχαρούχες ανανεώσιμες πηγές άνθρακα. Τα υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν η εμπορική γλυκόζη, η εμπορική φρουκτόζη, η εμπορική ζάχαρη και η μελάσα, σε αρχική συγκέντρωση 60 g/L. Όλες οι ζυμώσεις πραγματοποιήθηκαν σε καλλιέργειες κλειστού τύπου, ενώ ο λόγος C/N ήταν σε κάθε περίπτωση υψηλός (200 moles/moles), ώστε να κατευθυνθεί ο μικροβιακός μεταβολισμός προς την σύνθεση αποθηκευτικού λίπους. Κατά την διεξαγωγή των πειραμάτων στην εμπορική γλυκόζη, και οι δύο μύκητες παρουσίασαν ικανοποιητική ανάπτυξη και παραγωγή λίπους με σημαντικές ποσότητες GLA. Ειδικότερα, ο μύκητας *Cunninghamella echinulata* παρήγαγε 12.9 g/L βιομάζα, με 3.8 g/L λίπος και 740 mg/L GLA, ενώ ο *Mortierella isabellina* 13.2 g/L βιομάζα με 9.85 g/L λίπος και 345 mg/L GLA. Στην εμπορική φρουκτόζη, ο μὲν *Cunninghamella echinulata* παρήγαγε 16.7 g/L βιομάζα με 3.6 g/L λίπος και 360 mg/L GLA, ο δε *Mortierella isabellina* παρήγαγε 11.4 g/L βιομάζας, με 7.36 g/L λίπος και 110 mg/L GLA. Ωστόσο, ενώ στην εμπορική ζάχαρη ο *Cunninghamella echinulata* αναπτύχθηκε ικανοποιητικά (16.6 g/L βιομάζα, 3.1 g/L λίπος και 435 mg/L GLA), ο *Mortierella isabellina* απέτυχε να αναπτυχθεί επαρκώς (5 g/L βιομάζα και 0.5 g/L λίπος). Στο εν λόγω υπόστρωμα μετρήθηκε και η ενεργότητα της εξωκυτταρικής ιμβερτάσης, με μέγιστη τιμή 0.5 U/mL από τον *Cunninghamella echinulata*. Επιπλέον, στο υπόστρωμα της μελάσας και οι δύο μικροοργανισμοί αναπτύχθηκαν επαρκώς (12.1 g/L βιομάζας με 3.8 g/L λίπος και 420 mg/L για τον *Cunninghamella echinulata* και 10.1 g/L βιομάζα με 4.8 g/L λίπος και 168 mg/L GLA για τον *Mortierella isabellina*). Στο εν λόγω υπόστρωμα παρατηρήθηκε έντονος αποχρωματισμός της μελάσας, ήτοι 75%, από τον μύκητα *Cunninghamella echinulata*. Τέλος, πραγματοποιήθηκε περαιτέρω επεξεργασία των λιπιδίων του μύκητα *Mortierella isabellina*, κατά την κλασμάτωση και ανάλυση τους στον αέριο

χρωματογράφο. Παρατηρήθηκε ότι το κλάσμα των ουδέτερων λιπιδίων παρουσίαζε ομοιότητες ως προς την σύστασή του σε σχέση με το ολικό λίπος, ενώ το κλάσμα των φωσφολιπιδίων περιείχε μεγαλύτερες ποσότητες ακόρεστων λιπαρών οξέων (και κυρίως γ-λινολενικού οξέος), σε σχέση με το ολικό λίπος του *Mortierella isabellina*.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η διερεύνηση της βιοχημικής δυνατότητας των στελεχών *Cunninghamella echinulata* και *Mortierella isabellina*, ανηκόντων στην τάξη *Mucorales*, να συσσωρεύσουν μικροβιακό λίπος με σημαντικές ποσότητες γ-λινολενικού οξέος (GLA, $\Delta^{6,9,12}\text{C18:3}$), ένα πολυακόρεστο λιπαρό οξύ υψηλής φαρμακευτικής και διατροφικής σημασίας, κατά την καλλιέργειά τους σε σακχαρούχες ανανεώσιμες πηγές άνθρακα. Τα υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν η εμπορική γλυκόζη, η εμπορική φρουκτόζη, η εμπορική ζάχαρη και η μελάσα, σε αρχική συγκέντρωση 60 g/L. Όλες οι ζυμώσεις πραγματοποιήθηκαν σε καλλιέργειες κλειστού τύπου, ενώ ο λόγος C/N ήταν σε κάθε περίπτωση υψηλός (200 moles/moles), ώστε να κατευθυνθεί ο μικροβιακός μεταβολισμός προς την σύνθεση αποθηκευτικού λίπους. Κατά την διεξαγωγή των πειραμάτων στην εμπορική γλυκόζη, και οι δύο μύκητες παρουσίασαν ικανοποιητική ανάπτυξη και παραγωγή λίπους με σημαντικές ποσότητες GLA. Ειδικότερα, ο μύκητας *Cunninghamella echinulata* παρήγαγε 12.9 g/L βιομάζα, με 3.8 g/L λίπος και 740 mg/L GLA, ενώ ο *Mortierella isabellina* 13.2 g/L βιομάζα με 9.85 g/L λίπος και 345 mg/L GLA. Στην εμπορική φρουκτόζη, ο μὲν *Cunninghamella echinulata* παρήγαγε 16.7 g/L βιομάζα με 3.6 g/L λίπος και 360 mg/L GLA, ο δε *Mortierella isabellina* παρήγαγε 11.4 g/L βιομάζας, με 7.36 g/L λίπος και 110 mg/L GLA. Ωστόσο, ενώ στην εμπορική ζάχαρη ο *Cunninghamella echinulata* αναπτύχθηκε ικανοποιητικά (16.6 g/L βιομάζα, 3.1 g/L λίπος και 435 mg/L GLA), ο *Mortierella isabellina* απέτυχε να αναπτυχθεί επαρκώς (5 g/L βιομάζα και 0.5 g/L λίπος). Στο εν λόγω υπόστρωμα μετρήθηκε και η ενεργότητα της εξωκυτταρικής ιμβερτάσης, με μέγιστη τιμή 0.5 U/mL από τον *Cunninghamella echinulata*. Επιπλέον, στο υπόστρωμα της μελάσας και οι δύο μικροοργανισμοί αναπτύχθηκαν επαρκώς (12.1 g/L βιομάζας με 3.8 g/L λίπος και 420 mg/L για τον *Cunninghamella echinulata* και 10.1 g/L βιομάζα με 4.8 g/L λίπος και 168 mg/L GLA για τον *Mortierella isabellina*). Στο εν λόγω υπόστρωμα παρατηρήθηκε έντονος αποχρωματισμός της μελάσας, ήτοι 75%, από τον μύκητα *Cunninghamella echinulata*. Τέλος, πραγματοποιήθηκε περαιτέρω επεξεργασία των λιπιδίων του μύκητα *Mortierella isabellina*, κατά την κλασμάτωση και ανάλυση τους στον αέριο

χρωματογράφο. Παρατηρήθηκε ότι το κλάσμα των ουδέτερων λιπιδίων παρουσίαζε ομοιότητες ως προς την σύστασή του σε σχέση με το ολικό λίπος, ενώ το κλάσμα των φωσφολιπιδίων περιείχε μεγαλύτερες ποσότητες ακόρεστων λιπαρών οξέων (και κυρίως γ-λινολενικού οξέος), σε σχέση με το ολικό λίπος του *Mortierella isabellina*.

ABSTRACT

Aim of the present study was to investigate the biochemical potentialities of two mould strains belonging to the order of *Mucorales*, in particular *Cunninghamella echinulata* and *Mortierella isabellina*, of accumulating single cell oil containing important quantities of γ -linolenic acid (GLA, $\Delta^{6,9,12}$ C18:3), an unsaturated fatty acid of significant medical and nutritional importance, during their growth on sugar-based renewable carbon sources. The substrates used for this purpose were industrial glucose, industrial fructose, industrial sugar and molasse, in an initial carbohydrates concentration of 60 g/L. All cultures were conducted in batch-flask type, while in all experiments, nitrogen-limited media were employed in order to direct the microbial metabolism towards the synthesis of reserve lipid (initial molar C/N ratio 200 moles/moles). In the case of industrial glucose, both strains grew satisfactorily. Specifically, *Cunninghamella echinulata* produced 12.9 g/L biomass, with 3.8 g/L of lipid, containing 740 mg/L GLA, whereas *Mortierella isabellina* produced 13.2 g/L biomass with 9.85 g/L of lipid, containing 345 mg/L. Growth on commercial fructose resulted in 16.7 g/L of biomass with 3.6 g/L of oil, containing 473 mg/L GLA for *Cunninghamella echinulata*, whereas *Mortierella isabellina* produced 12.1 g/L biomass, with 7.36 g/L of oil containing 110 mg/L γ -linolenic acid. *Mortierella isabellina* failed to grow satisfactorily on industrial sugar [biomass produced of 5.0 g/L containing 10% (wt/wt) lipid] with negligible quantities of extra-cellular invertase produced, while *Cunninghamella echinulata* yielded 17.6 g/L of biomass, with 3.1 g/L of oil containing 310 mg/L. Also, *Cunninghamella echinulata* produced a maximum of 0.5 U/mL of extracellular invertase. Moreover, both moulds showed remarkable growth on molasse [12.1 g/L of biomass with 3.8 g/L of oil containing 490 mg/L GLA for *Cunninghamella echinulata* and 11.3 g/L of biomass with 4.8 g/L of oil containing 168 mg/L GLA). Worth noticing is the fact that *Cunninghamella echinulata* decolorised the medium containing molasse up to 75%. Last but not least, further analysis via fractionalization was conducted in single cell oil obtained from lipid-accumulating period of *Mortierella isabellina*, showed that the composition of fatty acids of the neutral fraction resembles with that of total lipids. Phospholipids contained a

somehow higher quantity of unsaturated fatty acids (and principally γ -linolenic acid) compared with total *Mortierella isabellina* lipid.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

	Σελίδα
I. Εισαγωγή	1
I.1 Ελαιογόνοι μικροοργανισμοί και λιπαρά οξέα	1
I.1.1 Απαραίτητα λιπαρά οξέα	1
I.1.2 γ-Λινολενικό οξύ (GLA, GLA, C18:3, ω-6) και in vitro μελέτες	4
I.1.3 Μικροβιακό λίπος	6
I.2 Βιοχημεία συσσώρευσης λίπους	10
I.3 Υποστρώματα κατάλληλα για την συσσώρευση λίπους	14
II. Υλικά και Μέθοδοι	18
II.1 Βιολογικό υλικό	18
II.2 Θρεπτικό μέσο καλλιέργειας των μυκήτων	18
II.3 Χημικές αναλύσεις	20
II.3.1 Προσδιορισμός διαλελυμένου O ₂ και pH	20
II.3.2 Συλλογή βιομάζας	20
II.3.3 Προσδιορισμός γλυκόζης	21
II.3.4 Προσδιορισμός ολικών σακχάρων	22
II.3.5 Μελέτη ενδοκυτταρικού λίπους	23
II.3.6 Μέτρηση αμμωνιακών στο θρεπτικό μέσο	26
II.3.7 Μέτρηση ενεργότητας εξωκυτταρικής ιμπερτάσης (Invertase assay)	27
II.3.8 Προσδιορισμός αποχρωματισμού μελάσας	27
III. Αποτελέσματα	29
III.1.1 Καλλιέργεια του Ζυγομύκητα <i>Cunninghamella echinulata</i> σε εμπορική γλυκόζη (S ₀ =60 g/L)	32
III.1.1.1 Κινητική της αύξησης, της κατανάλωσης υποστρώματος και της παραγωγής λίπους	32
III.1.2 Καλλιέργεια του Ζυγομύκητα <i>Cunninghamella echinulata</i> σε εμπορική φρουκτόζη (S ₀ =60 g/L).	35
III.1.2.1 Κινητική της αύξησης, της κατανάλωσης υποστρώματος και της παραγωγής λίπους.	35

III.1.3. Καλλιέργεια του Ζυγομόκητα <i>Cunninghamella echinulata</i> σε εμπορική ζάχαρη (S0=60 g/L).	37
III.1.3.1 Κινητική της αύξησης, της κατανάλωσης υποστρώματος και της παραγωγής λίπους.	37
III.1.4. Καλλιέργεια του Ζυγομόκητα <i>Cunninghamella echinulata</i> στην μελάσα (S0=60 g/L).	40
III.1.4.1 Κινητική της αύξησης, της κατανάλωσης υποστρώματος και της παραγωγής λίπους	40
III.2.1 Καλλιέργεια του Ζυγομόκητα <i>Mortierella isabellina</i> σε εμπορική γλυκόζη (S0=60 g/L)	43
III.2.1.1 Κινητική της αύξησης, της κατανάλωσης υποστρώματος και της παραγωγής λίπους.	43
III.2.2 Καλλιέργεια του Ζυγομόκητα <i>Mortierella isabellina</i> σε εμπορική φρουκτόζη (S0=60 g/L)	46
III.2.2.1 Κινητική της αύξησης, της κατανάλωσης υποστρώματος και της παραγωγής λίπους.	46
III.2.3 Καλλιέργεια του Ζυγομόκητα <i>Mortierella isabellina</i> σε εμπορική ζάχαρη (S0=60 g/L)	48
III.2.3.1. Κινητική της αύξησης, της κατανάλωσης υποστρώματος και της παραγωγής λίπους.	48
III.2.4. Καλλιέργεια του Ζυγομόκητα <i>Mortierella isabellina</i> στη μελάσα (S0=60 g/L)	49
III.2.4.1 Κινητική της αύξησης, της κατανάλωσης υποστρώματος και της παραγωγής λίπους.	49
IV. Συζήτηση	52
Βιβλιογραφία	61

I. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

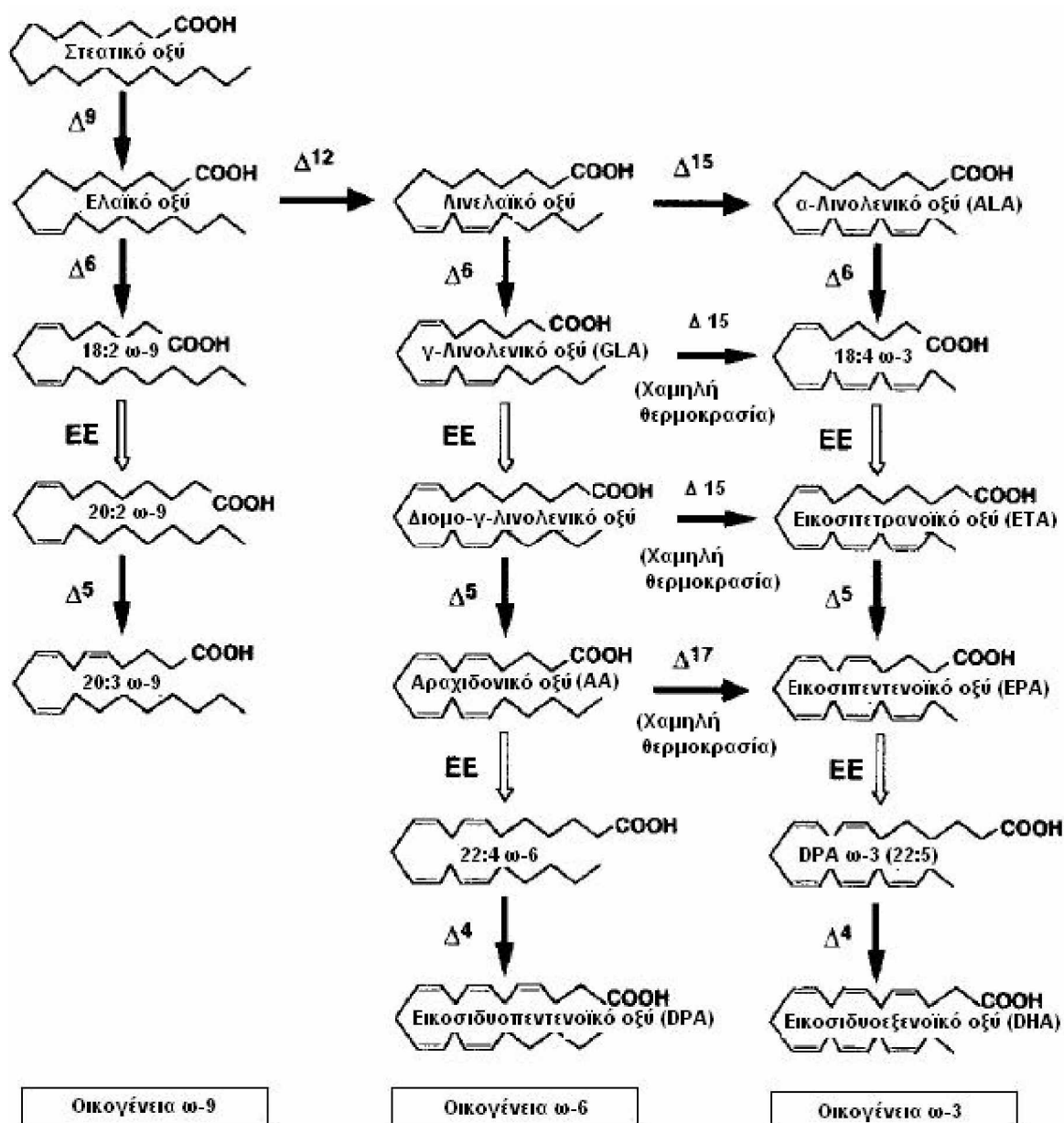
I.1 Ελαιογόνοι μικροοργανισμοί και λιπαρά οξέα

I.1.1 Απαραίτητα λιπαρά οξέα

Ανάλογα με την θέση του πρώτου διπλού δεσμού του μεθυλικού άκρου του μορίου, τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (Polyunsaturated fatty acids – PUFAs) διακρίνονται σε τέσσερις ομάδες (ω -9, ω -7, ω -6 και ω -3). Μεταξύ αυτών, τα λιπαρά οξέα που ανήκουν στις ω -6 και ω -3 ομάδες αποτελούν τα λεγόμενα απαραίτητα λιπαρά οξέα (Essential fatty acids - EFAs). Όλα τα απαραίτητα λιπαρά οξέα είναι πολυακόρεστα και δεν μπορούν να συντεθούν *de novo* στον ανθρώπινο οργανισμό, ως εκ τούτου η πρόσληψη τους γίνεται μέσω της διατροφής. Τέτοια λιπαρά οξέα, με την αυστηρή έννοια του όρου, είναι το λινελαϊκό οξύ (C18:2, ω -6) και το α -λινολενικό οξύ (C18:3, ω -3). Τα υπόλοιπα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα των ομάδων ω -3 και ω -6 προκύπτουν είτε ως συνέπεια αντιδράσεων επιμήκυνσης και αφυδρογόνωσης των απαραίτητων λιπαρών οξέων, είτε παραλαμβάνονται απευθείας μέσω της διατροφής (Jiang et al. 1998; Certik and Shimizu 1999; Tapiero et al. 2002)

Τα απαραίτητα λιπαρά οξέα (EFAs) αποτελούν στοιχεία-κλειδιά και επιτελούν σημαντικές λειτουργίες στην φυσιολογία του ανθρώπινου οργανισμού. Πέρα από τον ρόλο τους ως λιπίδια στην παροχή ενέργειας (μέσω της β -οξειδωσης των λιπαρών οξέων), τα λιπαρά οξέα καθώς και οι μεταβολίτες τους αποτελούν δομικά τμήματα της κυτταρικής μεμβράνης, ρυθμίζοντας μεταξύ άλλων την ρευστότητα και την σταθερότητα αυτής. Ακόμη, τα λιπαρά οξέα ελέγχουν την έκφραση διαφόρων γονιδίων, επηρεάζοντας την βιοσύνθεση των λιπαρών οξέων και την μεταφορά και σύνθεση της χοληστερόλης (Horrobin 1992). Ωστόσο, το μεγαλύτερο ενδιαφέρον για τον ρόλο αυτών των μακρομορίων εστιάζεται στην ιδιότητά τους ως προάγγελοι για την σύνθεση ενός μεγάλου εύρους βραχύβιων ρυθμιστικών μορίων του οργανισμού, όπως προσταγλανδίνες, προστακυκλίνες, θρομβοξάνες και υδροξύ-λιπαρά οξέα, ουσίες γνωστές και ως εικοσανοειδή, υπεύθυνες για την ρύθμιση σημαντικών βιολογικών λειτουργιών (Horrobin 1992; Certik and Shimizu 1999; Ratledge 2005). Συγκεκριμένα, το λινελαϊκό οξύ (LA, C18:2, ω -6) αποτελεί πρόδρομη ένωση για την

σύνθεση του γ-λινολενικού (GLA, C18:3, ω-6) και αραχιδονικού οξέος (AA, C20:4, ω-6), απ' όπου προέρχονται οι προσταγλανδίνες, ενώ το α-λινολενικό οξύ (ALA, C18:3, ω-3) αποτελεί τον προάγγελο για την σύνθεση του εικοσιπεντενοϊκού (EPA, C 20:5, ω-3) και του εικοσιδυοξενοϊκού οξέος (DHA, C22:6, ω-3) (Tariero et al. 2002). Η βάση της βιοσύνθεσης των λιπαρών οξέων είναι το στεατικό οξύ (C18:0), οι δε βιοχημικές αντιδράσεις σύνθεσης των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων χωρούν κατά το ακόλουθο σχήμα:



Σχήμα Ι.1. Βιοσυνθετική οδός *de novo* γένεσης των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (PUFA) (Certik and Shimizu 1999)

Τα εικοσανοειδή αποτελούν μια ξεχωριστή κλάση μορίων που επιτελούν ρόλο παρόμοιο με εκείνων των ορμονών. Συγκεκριμένα, οι προσταγλανδίνες απαντώνται σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις σχεδόν σε όλους τους ιστούς των θηλαστικών. Εμπλέκονται σ' ένα ευρύ φάσμα επιδράσεων στον ανθρώπινο οργανισμό, όπως στην σύσπαση των λείων μυών και δρουν συνεργιστικά με την ορμόνη ωκυτοκίνη κατά τον τοκετό (Lehninger 1993; Tapiero et al. 2002; Dyal and Narine 2005). Οι θρομβοξάνες εμπλέκονται τόσο στην σύσπαση των λείων μυϊκών ινών, όσο και στην συσσωμάτωση των αιμοπεταλίων (Lehninger 1993). Επίσης, τα λευκοτριένια καταλαμβάνουν αξιοσημείωτη θέση σε καταστάσεις φλεγμονής και αλλεργικών αντιδράσεων. Αξίζει να σημειωθεί ότι τα εικοσανοειδή ως σύνολο έχουν ποικίλες λειτουργίες, εξ'αυτών και ανταγωνιστικές μεταξύ τους. Επίσης, το γεγονός ότι ορισμένα εικοσανοειδή προέρχονται από το ίδιο λιπαρό οξύ-πρόδρομη ουσία, δεν σημαίνει κατ' ανάγκη ότι έχουν και την ίδια αποστολή στην φυσιολογία του ανθρώπινου σώματος.

Εξάλλου, ήσσονος σημασίας θέμα αποτελεί η διατήρηση της ομοιοστασίας του ανθρώπινου οργανισμού. Επομένως, η ανεπάρκεια απαραίτητων λιπαρών οξέων και κατ'επέκταση η ελλιπής σύνθεση εικοσανοειδών στον ανθρώπινο οργανισμό οδηγεί σε ανωμαλίες του δέρματος, του νευρικού και ανοσοποιητικού συστήματος, καθώς επίσης και καρδιαγγειακά, νεφρικά, ενδοκρινολογικά και αναπνευστικά προβλήματα (Certik and Shimizu 1999). Τέλος, αξίζει να σημειωθεί ότι πολυακόρεστα λιπαρά οξέα τα οποία δεν είναι απαραίτητα δεδομένου ότι υπό φυσιολογικές συνθήκες και σε υγιή άτομα μπορούν να βιοσυντεθούν (π.χ. γ-λινολενικό οξύ (GLA), C18:3, ω-6), θεωρούνται παρόλα αυτά μεγάλης φαρμακευτικής, εμπορικής και βιολογικής σημασίας, αφού σε πολλές περιπτώσεις (π.χ. λόγω stress, υπερλιπιδαιμίας, φτωχής διατροφής, κατάχρησης αλκοόλ κλπ) ο ανθρώπινος οργανισμός δεν μπορεί να τα βιοσυνθέσει και επομένως πρέπει να ληφθούν μέσω της διατροφής.

Ι.1.2 γ-Λινολενικό οξύ (GLA, C18:3, ω-6) και *in vitro* μελέτες

Η σύνθεση του γ-λινολενικού οξέος, προάγγελου μορίου των προσταγλανδινών, πραγματοποιείται μετά από την Δ6 αφυδρογόνωση του λινελαϊκού οξέος (C18:2, ω-6). Το εν λόγω λιπαρό οξύ συναντάται σπανίως σε σημαντικές ποσότητες σε φυτικούς ιστούς, ενώ κυριότερες πηγές του αποτελούν οι σπόροι του ηράνθεμου (*Oenothera biennis*), στο έλαιο των οποίων το GLA ευρίσκεται σε ποσοστό 8-10% (w/w), οι σπόροι του βοτάνου *Borago officinalis* σε ποσοστό 24-25% (w/w) και οι σπόροι του φυτού *Ribes nigrum* σε ποσοστό 16-17% (w/w) (Ratledge 1994; Chen and Liu 1997; Certik and Shimizu 1999). Εκτός από διατροφικό παράγοντα, το γ-λινολενικό οξύ αποτελεί και έναν θεραπευτικό παράγοντα, καθώς υφίσταται ως ουσία εντός φαρμακευτικών σκευασμάτων υπό μορφή κάψουλας για την αντιμετώπιση περιπτώσεων εκζέματος, προεμμηνορροϊκής έντασης, του διαβήτη, ορισμένων μορφών καρκίνου και άλλων παθολογικών καταστάσεων (Horrobin 1992).

Στην βιβλιογραφία περιέχονται αρκετές δημοσιεύσεις σχετικά με την μελέτη της επίδρασης των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων σε *in vitro* καλλιέργειες κυττάρων Caco-2. Τα Caco-2 αποτελούν σειρές καρκινικών κυττάρων προερχόμενες από απομονωμένο ανθρώπινο αδενοκαρκίνωμα του επιθηλίου του εντέρου και συγκεκριμένα από το κόλον. Ως εκ τούτου, τα κύτταρα αυτά έχουν πολλές ιδιότητες ομοιάζουσες με εκείνες του λεπτού εντέρου και καθίστανται ένα χρήσιμο εργαλείο στην μελέτη μεταβολικών μονοπατιών και μηχανισμών μεταφοράς του επιθηλίου του εντέρου. Συνεπώς, τα Caco-2 κύτταρα αποτελούν ένα κοινό μοντέλο για πλήθος μελετών που αφορούν στην διερεύνηση μηχανισμών απορρόφησης συστατικών όπως ιχνοστοιχεία, αντιοξειδωτικά, λιπαρά οξέα, φάρμακα κ.α.. Πιο συχνά απαντώμενοι δείκτες για την εκτίμηση της επίδρασης των PUFA αποτελούν ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός και η απόπτωση.

Είναι γενικά αποδεκτό ότι ο κυτταρικός θάνατος μπορεί να επέλθει μέσω μηχανισμών όπως η νέκρωση ή η απόπτωση. Μελέτες δεικνύουν ότι πολυακόρεστα λιπαρά οξέα όπως το γ-λινολενικό (GLA), το αραχιδονικό (AA) ή το εικοσιδύο-εξαενοϊκό οξύ (DHA), προκαλούν απόπτωση σε μια πλειάδα καρκινικών κυττάρων (Das 1999). Ο ακριβής μηχανισμός απόπτωσης των PUFA δεν είναι ακόμη πλήρως αποσαφηνισμένος. Ωστόσο, πρόσφατες μελέτες κάνουν λόγο για πιθανή ικανότητα

των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων να δρουν σε γονιδιακό και ογκογονιδιακό επίπεδο, είτε εμποδίζοντας την έκφραση γονιδίων υπεύθυνων για την σύνθεση πρωτεϊνών που έχουν αντιοξειδωτική δράση εντός των καρκινικών κυττάρων, είτε μέσω της φωσφορυλίωσης αντιοξειδωτικών παραγόντων των καρκινικών κυττάρων (π.χ. η πρωτεΐνη BCL-2), προκαλώντας έτσι απόπτωση σε διάφορα είδη καρκινικών κυττάρων (Das 1999; Roynette et al. 2003).

Εξάλλου, είναι βέβαιο πώς η δημιουργία ελεύθερων ριζών και κατά συνέπεια η πρόκληση οξείδωσης των λιπαρών οξέων, αποτελούν έναν μηχανισμό πρόκλησης απόπτωσης σε σειρές καρκινικών κυττάρων κατά την έκθεση τους σε PUFAs (Jiang et al. 1998; Roynette et al. 2003). Είναι γνωστή η επίδραση των ελεύθερων ριζών και των υπεροξειδίων στην φυσιολογία των κυττάρων, προκαλώντας βλάβες στο DNA, σε διάφορες ενδοκυτταρικές πρωτεΐνες και αδρανοποιώντας ένζυμα. Πρόσφατες μελέτες καταλήγουν στο συμπέρασμα πώς τα προϊόντα που παράγονται από την οξείδωση των λιπαρών οξέων είναι τελικώς εκείνα που προσδένονται σε ογκογονίδια και αποτρέπουν την έκφραση τους, οδηγώντας τα καρκινικά κύτταρα σε απόπτωση (Das 1999).

Η έκθεση σειρών καρκινικών κυττάρων του επιθηλίου του εντέρου σε PUFAs προκαλεί παρεμπόδιση στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων σε διαφορετικό βαθμό και με τρόπο δοσο-εξαρτώμενο, αυξάνει την ρευστότητα της κυτταρικής μεμβράνης και την οξείδωση των λιπαρών οξέων, με αποτέλεσμα σε πρώτο στάδιο την παρεμπόδιση της σύνθεσης κυτταρικού DNA και κατά δεύτερο την κατάτμησή του, στοιχεία χαρακτηριστικά της απόπτωσης των κυττάρων (Mengeaud et al. 1992; Seegers et al. 1997; Hrelia et al. 1999; Nano et al. 2003). Σημειώνεται δε, ότι όταν τα κύτταρα υποστούν προεπώαση ή συνεπώαση με αντιοξειδωτικούς παράγοντες όπως η βιταμίνη E, παρατηρείται μερική ή και ολική αναστροφή της κυτταροτοξικής επίδρασης των PUFAs στα καρκινικά κύτταρα. Το γεγονός αυτό οφείλεται στην παρεμπόδιση που ασκεί η βιταμίνη E στην οξείδωση των λιπαρών οξέων, αποτρέποντας την φωσφορυλίωση της BCL-2 και τελικά την απόπτωση των κυττάρων (Mengeaud et al. 1992; Das 1999; Nano et al. 2003).

Μια εξίσου σημαντική παράμετρος της δράσης των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων επί των καρκινικών κυττάρων αποτελεί το φαινόμενο της ρύθμισης της

κυτταροτοξικής επίδρασης ορισμένων αντικαρκινικών φαρμάκων. Ο μηχανισμός δράσης τους στην διαμόρφωση της αποτελεσματικότητας της χημειοθεραπείας δεν είναι απολύτως γνωστός, ωστόσο δύο είναι οι κύριες υποθέσεις. Η πρώτη υπόθεση στηρίζεται στην αλλαγή που επιφέρουν τα PUFAs στις ιδιότητες της κυτταρικής μεμβράνης των καρκινικών κυττάρων. Μάλιστα, όσο μεγαλύτερο είναι το ποσοστό των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων, τόσο αυξάνει και η ρευστότητα της κυτταρικής μεμβράνης, με αποτέλεσμα την αύξηση της διάχυσης του φαρμάκου εντός του κυττάρου, γεγονός ιδιαίτερα σημαντικό για φάρμακα τα οποία εισχωρούν στο κύτταρο μέσω της παθητικής διάχυσης. Η δεύτερη υπόθεση σχετίζεται με την οξείδωση των λιπαρών οξέων. Συγκεκριμένα, ορισμένα φάρμακα φαίνεται πως αντιδρούν με τους διπλούς δεσμούς των PUFAs, επάγοντας έτσι την διαδικασία της οξείδωσης (Menendez et al. 2001). Ως εκ τούτου, μελέτες δεικνύουν πως λιπαρά οξέα όπως το γ-λινολενικό οξύ (GLA, C18:3, ω-6) μπορεί να εμφανίσουν συνεργιστική τοξική δράση μαζί με την ενεργό ουσία ενός αντικαρκινικού φαρμάκου σε καρκινικά κύτταρα (Menéndez et al. 2001). Αξίζει δε να σημειωθεί πως το γ-λινολενικό οξύ, ενώ έχει σαφή κυτταροτοξική επίδραση σε σειρές καρκινικών κυττάρων, προκαλεί μικρή ή και καμία βλάβη σε σειρές υγιών κυττάρων. Το γεγονός αυτό φαίνεται να έχει αντίκτυπο σε κλινικό επίπεδο, καθώς κατά την χημειοθεραπεία κακοηθών όγκων, είναι επιθυμητή η επίδραση των φαρμάκων εκλεκτικά μόνο στον όγκο και όχι σε παρακείμενα υγιή κύτταρα. Επίσης, η δράση του γ-λινολενικού οξέος μπορεί να αποδειχθεί χρήσιμη στην αντιμετώπιση φαινομένων αντίστασης των καρκινικών κυττάρων σε συνήθη αντικαρκινικά φάρμακα (Hrelia et al. 1999; Menéndez et al. 2001)

I.1.3 Μικροβιακό λίπος

Ως ελαιογόνοι νοούνται οι μικροοργανισμοί εκείνοι, οι οποίοι αναπτυσσόμενοι σε συγκεκριμένες συνθήκες περιβάλλοντος, δύναται να συσσωρεύσουν λίπος εντός των κυττάρων τους, σε ποσοστά μεγαλύτερα από 20% κατά βάρος επί ξηράς ουσίας. Μάλιστα, ορισμένοι μικροοργανισμοί είναι ικανοί να συσσωρεύσουν ενδοκυτταρικό λίπος έως και 70% κ. β. επί της ξηράς τους ουσίας (Ratledge 2002). Το εν λόγω λίπος μπορεί να περιέχει υψηλές ποσότητες πολυακόρεστων λιπαρών οξέων διατροφικής

και φαρμακευτικής σημασίας. Το κυρίαρχο κλάσμα των μικροβιακών αποθησαυριστικών λιπιδίων συνίσταται από τριγλυκερίδια, τα οποία αντιπροσωπεύουν το 55-80% (w/w) των συνολικών κυτταρικών ελαίων (Papanikolaou et al. 2001; Fakas et al. 2006; 2007). Τα μικροβιακά τριγλυκερίδια είναι φυτικού τύπου, δηλαδή η θέση sn2 της γλυκερόλης είναι εστεροποιημένη με ακόρεστο λιπαρό οξύ (Ratledge 1994; Ratledge 2005). Το μικροβιακό λίπος έχει συνήθως ενδιαφέρουσα σύσταση σε λιπαρά οξέα, καθώς είναι πλούσιο σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (π.χ. λινελαϊκό οξύ $\Delta^{9,12}\text{C}18:2$), το λίπος δε ορισμένων κατηγοριών μικροοργανισμών (π.χ. Ζυγομύκητες) εμφανίζει PUFAs «σπανίως» απαντώμενα, όπως το GLA. Καθίσταται λοιπόν σαφές, ότι το μικροβιακό λίπος παρουσιάζει ιδιαίτερα χαρακτηριστικά που διαφοροποιούνται σε σχέση με το λίπος φυτικής ή ζωικής προέλευσης, αφού τα τελευταία εμφανίζουν διακυμάνσεις στην σύστασή τους τόσο σε ακόρεστα, όσο και σε κορεσμένα λιπαρά οξέα.

Πίνακας I.1. Συμβατικές και μικροβιακές πηγές παραγωγής διαφόρων πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (PUFAs) (Certik and Shimizu 1999; Van Beelen et al. 2007)

Λιπαρά οξέα	Συμβατικές πηγές	Μικροοργανισμοί- Πηγές
γ-Λινολενικό οξύ (GLA) C18:3 ω-6	Φυτά (<i>Oenothera biennis</i> , <i>Borago officinalis</i> , <i>Ribes nigrum</i>)	Μύκητες (<i>Mucor spp.</i> , <i>Mortierella spp.</i> , <i>Cunninghamella spp.</i>)
Αραχιδονικό οξύ (ARA) C20:4 ω-6	Ζωικοί ιστοί Ψάρια	Μύκητες (κυρίως <i>Mortierella spp.</i>) Μικροφύκη (<i>Porphyridium cruentum</i>)
Εικοσιπεντενοϊκό οξύ (EPA) C20:5 ω-3	Ψάρια Οστρακοειδή	Μύκητες (<i>Mortierella spp.</i>) Μικροφύκη
Εικοσιδυοπεντενοϊκό οξύ (DPA) C 22:5 ω-6	Ψάρια	Μύκητες (<i>Schyzochytrium sp.</i>)
Εικοσιδωδεξαενοϊκό οξύ (DHA) C22:6 ω-3	Ψάρια Οστρακοειδή	Μύκητες (<i>Thraustochytrium spp.</i>) Μικροφύκη (<i>Cryptocodinium cohnii</i>)

Η εκάστοτε σύνθεση του μικροβιακού λίπους είναι αποτέλεσμα γενετικών αλλά και περιβαλλοντικών παραγόντων για κάθε ελαιογόνο μικροοργανισμό (Ratledge 2004). Ωστόσο, ο κύριος λόγος ενδιαφέροντος για τα μικροβιακά έλαια έγκειται στην δυνατότητά τους να υποκαταστήσουν φυτικά ή ζωικά λίπη εξεζητημένης σύστασης και δομής, όπως έλαια πλούσια σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα σπανίως απαντώμενα στην φύση ή λίπη εξεζητημένης δομής τριγλυκεριδίων όπως το λίπος του κακάο.

Όσον αφορά σε υποκατάστατα του λίπος του κακάο, συντίθενται ως επί το πλείστον από στελέχη ζυμών όπως *Candida curvata* και *Yarrowia lipolytica*. Το λίπος του κακάο αποτελείται από μια ξεχωριστή σύνθεση λιπαρών οξέων καθώς αντίθετα με την πλειονότητα των φυτικών ελαίων, περιέχει εξαιρετικά υψηλά ποσοστά κορεσμένων λιπαρών οξέων (περίπου 60%), εκ των οποίων το μισό είναι στεατικό οξύ και το λοιπό 25% παλμιτικό οξύ (Paranikolaou et al. 2001; 2003; Dyal and Narine 2005). Εξάλλου, η εν λόγω σύνθεση είναι η αιτία για τις επιθυμητές οργανοληπτικές ιδιότητες που το λίπος του κακάο προσδίδει στην σοκολάτα, τελικό προϊόν στο οποίο προστίθεται. Για την αύξηση του ποσοστού του στεατικού οξέος εντός των λιπιδίων των ζυμών εφαρμόστηκαν διάφορες τεχνικές όπως η καλλιέργεια ζυμών σε χαμηλές συγκεντρώσεις οξυγόνου κατά την ζύμωση (Davies et al. 1990), η χρήση παρεμποδιστών της Δ^9 αφυδογονάσης (ένζυμο υπεύθυνο για την μετατροπή του στεατικού οξέος σε ελαϊκό και του παλμιτικού οξέος σε παλμιτελαϊκό) (Moreton 1985), η δημιουργία γενετικώς τροποποιημένων στελεχών τα οποία εμφανίζουν μειωμένη δυνατότητα έκφρασης της Δ^9 αφυδογονάσης (Ykema et al. 1989; Ykema et al. 1990), αλλά και η καλλιέργεια σε ευτελούς αξίας λιπαρές ύλες, πλούσιες σε στεατικό οξύ (Paranikolaou et al. 2001; Paranikolaou et al. 2003).

Για την παραγωγή μικροβιακών ελαίων πλούσιων σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα χρησιμοποιούνται ποικίλοι μικροοργανισμοί όπως ετερότροφα μικροφύκη. Οι εν λόγω μικροοργανισμοί έχουν προσελκύσει το ενδιαφέρον των επιστημόνων ως μια πιθανή εναλλακτική πηγή απαραίτητων λιπαρών οξέων, κατάλληλα προς βρώση. Το κίνητρο για την διερεύνηση αυτής της πιθανότητας ήταν οι αμφιβολίες όσον αφορά στην χρήση ιχθυελαίων ως συμπληρώματα διατροφής (και επομένως πηγές ω -3 λιπαρών οξέων όπως το DHA), δεδομένης της παρουσίας ρυπογόνων ενώσεων εξαιτίας της ανθρωποκεντρικής δραστηριότητας (διοξίνες, PCBs, βαρέα μέταλλα)

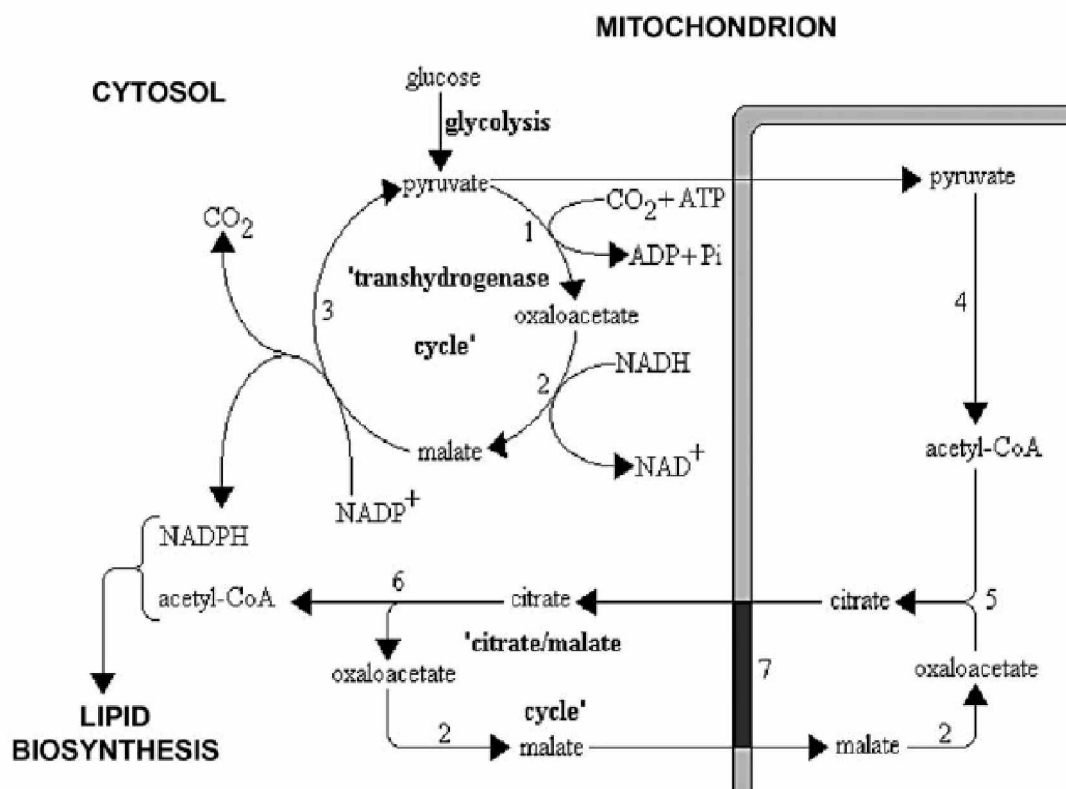
εντός των ιστών των ψαριών και κατ' επέκταση των ιχθυελαιών (Ratlidge 2004). Οι Muira et al. (1997) μελέτησαν την παραγωγή γ-λινολενικού οξέος από μικροφύκη του γένους *Chlorella sp.*, ενώ σε μία άλλη μελέτη χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος *Parietochloris incisa*, το οποίο συσσωρεύσε έως 50% επί της συνολικής απόδοσης λίπους αραχιδονικό οξύ. Επίσης, τα ετερότροφα μικροφύκη *Cryptocodinium cohnii* και *Schizochytrium sp.* χρησιμοποιούνται για την παραγωγή DHA, ενώ το στέλεχος *Nitzschia laevis* για την βιοτεχνολογική παραγωγή EPA (van Beelen et al. 2007). Ακόμη, το κυανοβακτήριο *Spirulina platensis* έχει μελετηθεί ως πιθανό στέλεχος ικανό για την παραγωγή γ-λινολενικού οξέος. Οι Tantichroen et al (1994) καλλιέργησαν τον εν λόγω μικροοργανισμό καθώς και γενετικώς τροποποιημένο στέλεχος αυτού υπό συνθήκες ευνοϊκές ως προς την παραγωγή γ-λινολενικού οξέος, με το γενετικώς τροποποιημένο στέλεχος Z19 να αποδίδει έως 2.4 % γ-λινολενικού οξέος επί ξηράς ουσίας. Τέλος, οι Chi et al (2007) καλλιέργησαν το μικροφύκος *Schizochytrium limacinum* σε βιομηχανική γλυκερόλη, για την παραγωγή DHA και το εν λόγω στέλεχος συσσωρεύσε έως 100 mg/L εικοσιδύοεξαενοϊκό οξύ (C 22:6 ω-3).

Ένα εξίσου σημαντικό κεφάλαιο στην παραγωγή μικροβιακού λίπους, αποτελεί η χρήση διαφόρων μυκήτων για τον σκοπό αυτό. Οι μύκητες που έχουν προσελκύσει το μεγαλύτερο ενδιαφέρον των ερευνητών για την βιοτεχνολογική παραγωγή απαραίτητων λιπαρών οξέων σε βιομηχανική κλίμακα, είναι οι Ζυγομύκητες ανήκοντες στην τάξη των *Mucorales* (Certik et al. 1999; Dyal et al. 2005). Ειδικότερα, οι μύκητες του γένους *Mortierella* (*M. alpina*, *M. elongata*, *M. hyaline*) αποτελούν πηγές παραγωγής λιπαρών οξέων C20 (αραχιδονικό οξύ, εικοσιπεντενοϊκό οξύ), ενώ οι μύκητες του γένους *Micromucor* θεωρούνται κατάλληλοι για την συσσωρεύση C18 λιπαρών οξέων (α-λινολενικό οξύ, γ-λινολενικό οξύ). Φαίνεται μάλιστα ότι στα στελέχη που έχουν την ικανότητα να συσσωρεύουν μεγάλες ποσότητες μικροβιακού λίπους, το τελευταίο περιέχει μικρές ποσότητες γ-λινολενικού οξέος, ενώ τα στελέχη δυνάμενα να παράγουν μεγάλες ποσότητες γ-λινολενικού οξέος, συσσωρεύουν σχετικά μικρές ποσότητες λίπους (Certik and Shimizu 1999).

1.2 Βιοχημεία συσσώρευσης μικροβιακού λίπους

Προκειμένου να επιτευχθεί συσσώρευση λίπους εντός των κυττάρων του μικροοργανισμού, αναγκαία συνθήκη αποτελεί η καλλιέργεια του μικροοργανισμού σε περιβάλλον με περίσσεια πηγής άνθρακα και περιορισμό σε άζωτο. Όταν το άζωτο της καλλιέργειας εξαντληθεί, οι ελαιογόνοι μικροοργανισμοί συνεχίζουν να αφομοιώνουν την πηγή άνθρακα (συνήθως γλυκόζη) μετατρέποντας την σε τριγλυκερίδια, τα οποία συσσωρεύονται εντός των κυττάρων

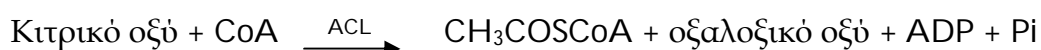
Οι λόγοι για τους οποίους ορισμένοι μικροοργανισμοί καθίσταται ελαιογόνοι επιμερίζονται σε δύο συνιστώσες. Η πρώτη αφορά στην δυνατότητα συνεχούς παραγωγής ακετυλοσυνενζύμου Α (Acetyl-CoA) απευθείας στο κυτταρόπλασμα του κυττάρου δρώντας ως ο απαραίτητος προάγγελος για την συνθετάση των λιπαρών οξέων. Η δεύτερη αφορά στην ικανότητα του μικροοργανισμού να παράγει επαρκείς ποσότητες NADPH, ενός βασικού αναγωγικού μέσου που χωρεί κατά την βιοσύνθεση των λιπαρών οξέων.



Σχήμα 1.2 Συνεισφορά του κύκλου του Krebs (transhydrogenase cycle) και του κύκλου κιτρικού/μηλικού οξέος (citrate/malate cycle) στην παροχή ακετυλοσυνένζυμου Α (acetyl-CoA) και

NADPH στην διαδικασία λιπογένεσης στους ελαιογόνους μικροοργανισμούς. Ένζυμα: 1 αποκαρβοξυλάση του πυροσταφυλικού οξέος, 2. αφυδρογονάση του μηλικού οξέος, 3. μηλικό ένζυμο, 4. αφυδρογονάση του πυροσταφυλικού οξέος, 5. κιτρική συνθάση, 6. ATP: κιτρική λύαση, 7. ενζύμο υπεύθυνο για την λειτουργία του συστήματος μεταφοράς κιτρικού/ μηλικού οξέος μεταξύ μιτοχονδρίου και κυτταροπλάσματος. (Ratledge 2004)

Κατά την εξάντληση της πηγής αζώτου στο μέσο της καλλιέργειας, παρατηρείται διακοπή του κύκλου του Krebs (Σχήμα 1.2). Το φαινόμενο αυτό οφείλεται στην ενεργοποίηση του ενζύμου AMP-απαμινάση, η οποία καταλύει την διάσπαση του AMP σε IMP και NH₃. Ως εκ τούτου, παρατηρείται ταχύτατη πτώση του επιπέδου του AMP και παρεμπόδιση της δράσης του ενζύμου ισοκιτρική αφυδρογονάση (Ratledge 1994; Paranikolaou et al. 2004), και κατά συνέπεια το κιτρικό οξύ συσσωρεύεται εντός του μιτοχονδρίου. Μέσω του συστήματος μεταφοράς κιτρικού/μηλικού οξέος, όταν η συγκέντρωση του κιτρικού οξέος υπερβεί την συγκέντρωση ανοχής, εξέρχεται από το μιτοχόνδριο στο κυτταρόπλασμα. Ο σχηματισμός του ακετυλοσυνένζυμου Α (acetyl-CoA) στους ελαιογόνους μικροοργανισμούς αποδίδεται από πολλούς ερευνητές στην παρουσία του ενζύμου ATP:κιτρική λύαση (ACL), η οποία δεν ευρίσκεται στους μη ελαιογόνους μικροοργανισμούς (Ratledge 2005). Η αντίδραση η οποία καταλύεται είναι η ακόλουθη:

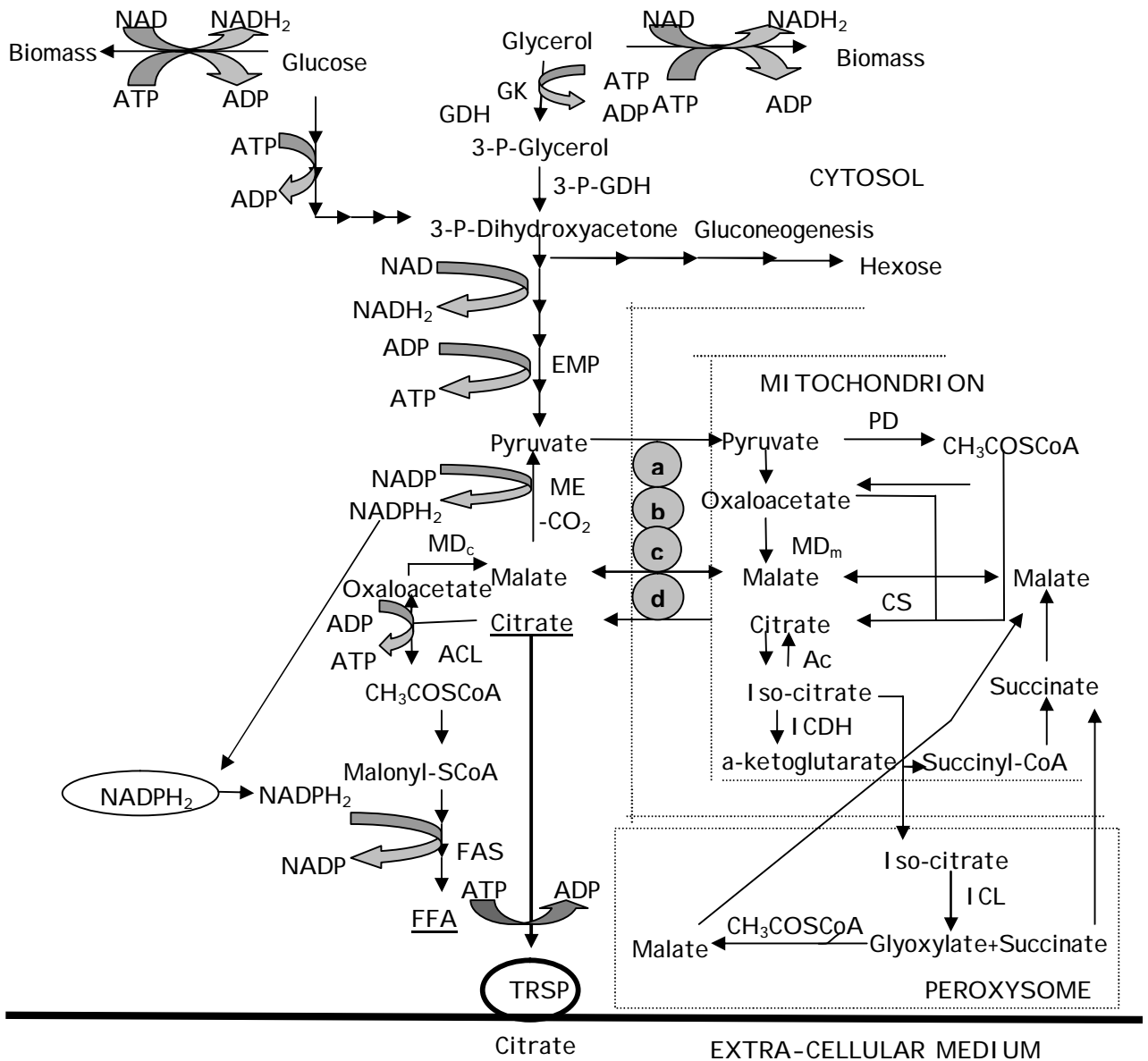


Εξίσου σημαντική είναι η συνεισφορά του μηλικού ενζύμου στην βιοσυνσώρευση λίπους ως προμηθευτής NADPH κατά την ακόλουθη αντίδραση:



Το μηλικό ένζυμο φέρεται να σχηματίζει ένα σταδιακό μεταβολικό σύμπλοκο που συνδυάζεται με την ATP:κιτρική λύαση και την συνθάση των λιπαρών οξέων, για την εξασφάλιση μιας άμεσης διόδου επικοινωνίας κατά την μετατροπή του ακετυλοσυνένζυμου Α (acetyl-CoA) σε λιπαρά οξέα, τα οποία εστεροποιούνται τελικώς με γλυκερόλη σε τριγλυκερίδια. Τα τελευταία ενσωματώνονται μέσω του ενδοπλασματικού δικτύου σε σταγονίδια λιπαρών οξέων (Ratledge 2004).

Θα πρέπει ωστόσο να επισημανθεί, ότι σε περίπτωση που το ένζυμο ATP:κιτρική λυάση απουσιάζει από έναν μικροοργανισμό ή είναι ανενεργό, η εξάντληση των αποθεμάτων αζώτου στο μέσο της καλλιέργειας οδηγεί σε απέκκριση του παραγόμενου ενδοκυτταρικού κιτρικού οξέος. Διαπιστώνεται λοιπόν, ότι οι διεργασίες συσσώρευσης ενδοκυτταρικού λίπους και συσσώρευσης κιτρικού οξέος, κατά τα πρώτα στάδια τους είναι βιοχημικά ταυτόσημες, και οι μικροοργανισμοί κατηγοριοποιούνται σε αυτούς οι οποίοι δύνανται να συνθέσουν λίπος και σε αυτούς οι οποίοι δύνανται να συνθέσουν κιτρικό οξύ (Anastassiadis and Rehm 2005). Ωστόσο, τουλάχιστον σε μία περίπτωση, ο ίδιος μικροοργανισμός (εν προκειμένω η ζύμη *Yarrowia lipolytica*) καλλιεργούμενος σε γλυκερόλη ως την μοναδική πηγή άνθρακα υπό συνθήκες που ευνοούσαν την σύνθεση λίπους ή/ και την παραγωγή κιτρικού οξέος (δηλαδή καλλιέργεια σε υψηλό λόγο C/N) παρήγαγε εξωκυτταρικώς υψηλές ποσότητες κιτρικού οξέος κατά την ζύμωση σε φιάλες, ενώ αναπτυσσόμενος σε βιοαντιδραστήρα συνεχούς ροής καλλιέργειας με υψηλή ανάδευση και αερισμό, παρήγαγε υψηλές ποσότητες ενδοκυτταρικού λίπους (Paranikolaou et al. 2002b; Paranikolaou and Aggelis 2002). Στο παρακάτω σχήμα απεικονίζεται η βιοσυσσώρευση λίπους στους ελαιογόνους μικροοργανισμούς, καθώς και η έκκριση κιτρικού οξέος κατά την καλλιέργειά τους σε γλυκόζη ή γλυκερόλη.



Σχήμα I.3 Διάμεσος μεταβολισμός γλυκόζης και γλυκερόλης στους ελαιογόνους μικροοργανισμούς. Παραγωγή κιτρικού οξέος και/ή μικροβιακού λίπους. a,b,c: Συστήματα μεταφοράς του πυροσταφυλικού οξέος από το κυτόπλασμα στο μιτοχόνδριο και του μηλικού οξέος αντιστρόφως, d: Σύστημα μεταφοράς του κιτρικού και του μηλικού οξέος μεταξύ κυτοπλάσματος και μιτοχονδρίου. TAGs: τριγλυκερίδια, EMP: Embden- Mayerhoff-Parnas (Papanikolaou 2008)

1.3 Υποστρώματα κατάλληλα για την συσσώρευση μικροβιακού λίπους

Οι ελαιογόνοι μικροοργανισμοί έχουν την δυνατότητα να αναπτύσσονται σε μια πλειάδα υποστρωμάτων χρησιμοποιούμενων ως πηγή άνθρακα και ενέργειας. Τα υποστρώματα αυτά μπορεί να είναι υδρόφιλα συστατικά όπως σάκχαρα ή παρομοίως μεταβολιζόμενα συστατικά (όπως άμυλο ή άλλα πολυσακχαρίδια) (Aggelis et al. 1996; Chen and Chang 1997), γλυκερόλη (Paranikolaou and Aggelis 2002), ή υδρόφοβα συστατικά όπως λίπος (Aggelis and Sourdis 1997) ή μίγματα ελεύθερων λιπαρών οξέων (Paranikolaou et al 2001; 2002a; Mličkova et al. 2004a; b) και n-αλκάνια (Fickers et al. 2005). Ακόμη, στις διαδικασίες ζύμωσης για την παραγωγή ενδοκυτταρικού λίπους λαμβάνουν χώρα βιομετατροπές υποστρωμάτων προερχόμενων από γεωργο-βιομηχανικά υποπροϊόντα, παραπροϊόντα ή και απόβλητα χαμηλής ή μηδενικής αξίας. Τέτοια υποστρώματα είναι διάφορα βιομηχανικά απόβλητα ή υποπροϊόντα λιπαρής φύσης, όπως διάφορα βιομηχανικά λίπη (σάπωνες, στεαρίνες κλπ) ή θερμικώς επεξεργασμένα έλαια, η ακάθαρτη βιομηχανική γλυκερόλη (ως υποπροϊόν ελαιουργικών βιομηχανιών και βιομηχανιών παραγωγής καυσίμου τύπου «μεθυλεστέρων») (Paranikolaou and Aggelis 2002), καθώς επίσης και υπολείμματα βιομηχανιών επεξεργασίας τροφίμων όπως η μελάσα και το τυρόγαλα.

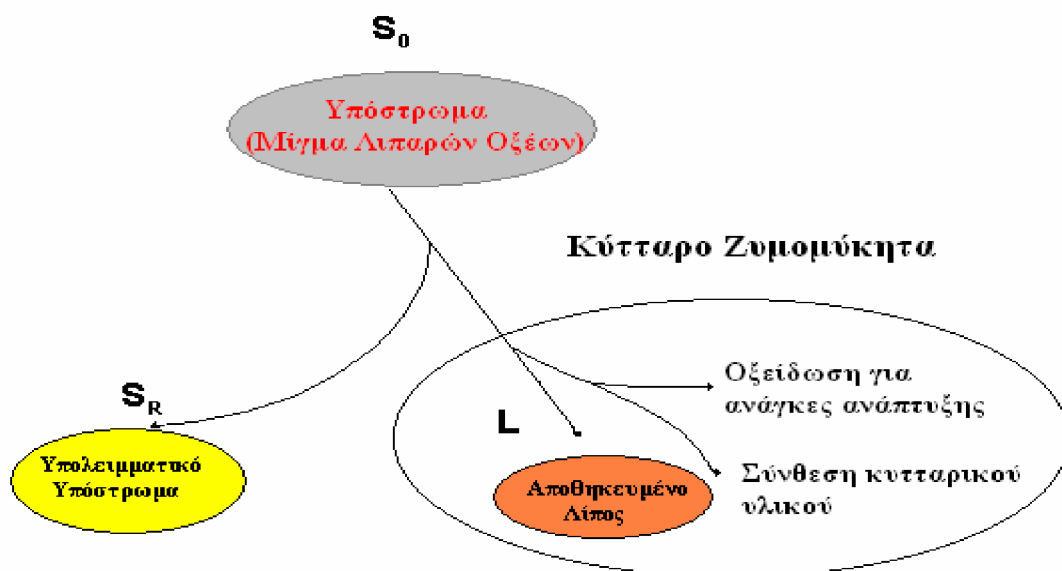
Όσον αφορά στα υδρόφιλα υποστρώματα, τα σάκχαρα αποτελούν μακράν το πιο σύννηθες χρησιμοποιούμενο υπόστρωμα ζύμωσης. Στην κατηγορία αυτή περιλαμβάνονται δισακχαρίτες όπως η σακχαρόζη, αλλά και μονοσακχαρίτες όπως η γλυκόζη και η φρουκτόζη (ως προϊόντα υδρόλυσης του αμύλου). Επίσης, ευρείας εφαρμογής υδρόφιλη πηγή άνθρακα αποτελεί η μελάσα, προϊόν ευτελούς αξίας παραγόμενο σε μεγάλες ποσότητες παγκοσμίως από την βιομηχανία ζάχαρης (Peters 2006). Η μελάσα αποτελείται από μικρές ποσότητες σύνθετων πολυσακχαριτών και σακχαρόζης, αλλά και αζωτούχων ενώσεων. Το σκούρο χρώμα της είναι αποτέλεσμα της καραμελοποίησης που υφίσταται κατά την θερμική επεξεργασία και την αλκαλοποίηση της στην παραγωγική διαδικασία. Ωστόσο, η απόρριψη των υδρολυμάτων μελάσας στο περιβάλλον την καθιστά δυνητικό παράγοντα ρύπανσης. Το σκούρο χρώμα της μελάσας προκαλεί μείωση της διείσδυσης του τών

ακτινών του ήλιου στους υπερκείμενους υδροφόρους ορίζοντες, προκαλώντας μείωση της φωτοσυνθετικής δραστηριότητας και των αποθεμάτων οξυγόνου, με σαφείς επιπτώσεις στο υδάτινο περιβάλλον. Επίσης, η απόρριψη της μελάσας στο έδαφος είναι εξίσου ζημιογόνος, αφού προκαλεί μείωση της αλκαλικότητας του εδάφους, παρεμπόδιση της εκβλάστησης των σπόρων και καταστροφή της βλάστησης. Επομένως, κρίνεται σημαντική η βιοτροποποίηση ενός τέτοιου υπολείμματος, τόσο για την παραγωγή μεταβολικών προϊόντων, όσο και για την βιοεξυγίανση του (Dahiya et al. 2001; Peters 2006).

Όσον αφορά στα υδρόφιλα χρησιμοποιούμενα υποστρώματα για την παραγωγή μονοκυτταρικού λίπους, σημαντική θέση κατέχει το τυρόγαλα. Το εν λόγω παραπροϊόν τυροκόμησης περιέχει περίπου 3-8% λακτόζη και 1% πρωτεΐνη γάλακτος. Η χρήση του ως υπόστρωμα ζύμωσης έχει κάποιους περιορισμούς καθώς ένας περιορισμένος αριθμός μικροοργανισμών μπορεί να αποκοδομήσει τη λακτόζη, όπως (κυρίως) ζύμες των γενών *Candida* sp., *Cryptococcus* sp. και *Apiotrichum* sp. (Ykema et al. 1988; 1990; Davies et al. 1990; Davies and Holdsworth 1992) και μύκητες του γένους *Mortierella* sp. (Paranikolaou et al. 2007). Ειδικότερα για το τυρόγαλα, θα πρέπει να σημειωθεί ότι ενώ στο παρελθόν είχε υπάρξει σημαντική χρήση του αποβλήτου αυτού για παραγωγή λίπους ζυμών με ιδιότητες προσομοιάζουσες του λίπους του κακάο (Ykema et al. 1988; 1990; Davies et al. 1990; Davies and Holdsworth 1992; Ratledge 1994; 2005), ο αριθμός των εργασιών που σχετίζονται με παραγωγή λίπους από τυρόγαλα κατά την αύξηση ελαιογόνων *Mucorales* είναι πραγματικά περιορισμένος.

Αξίζει να σημειωθεί πως υπάρχουν θεμελιώδεις διαφορές κατά την διεργασία συσσώρευσης λίπους σε σχέση με την πηγή άνθρακα που χρησιμοποιείται. Όταν την μόνη πηγή άνθρακα και ενέργειας αποτελούν σάκχαρα ή παρομοίως μεταβολιζόμενα συστατικά, η συσσώρευση του λίπους από τους ελαιογόνους μικροοργανισμούς λαμβάνει χώρα μόνον μετά από την εξάντληση της πηγής αζώτου στο μέσο της καλλιέργειας. Με άλλα λόγια, η λιποσυσσώρευση χωρεί μόνον όταν το άζωτο συνιστά τον περιοριστικό παράγοντα της αύξησης (βλέπε παράγραφο I.2). Αντίθετα, όταν κατά την καλλιέργεια ενός μικροοργανισμού χρησιμοποιείται ως πηγή άνθρακα κάποιο υδρόφοβο συστατικό (π.χ. λιπαρή ύλη, n-αλκάνια), η

λιποσυσσώρευση είναι ανεξάρτητη της πηγής αζώτου και λαμβάνει χώρα ταυτοχρόνως με την κυτταρική αύξηση (Aggelis and Sourdis 1997; Paranikolaou et al. 2001; 2002a; Paranikolaou and Aggelis 2003a). Ακολούθως, η τύχη των εξωκυτταρικών λιπαρών οξέων όταν αυτά ενσωματωθούν εντός των κυττάρων είναι είτε η πλήρης αποικοδόμηση τους προς ακετυλοσυνένζυμο Α και συνακόλουθη είσοδο του στον κύκλο του Krebs, είτε η μερική αποικοδόμηση τους προς σχηματισμό οργανικών ενδιάμεσων ενώσεων (αμινοξέα, οργανικά οξέα, μόρια ενδιάμεσης σύνθεσης νουκλεοξέων), είτε τέλος η αποθήκευσή τους εντός σταγονιδίων λίπους στο εσωτερικό των κυττάρων (Mlickova et al. 2004a; b; Fickers et al. 2005). Τέλος, ιδιαίτερο ενδιαφέρον κατά την ανάπτυξη των μικροοργανισμών σε υδρόφοβα υποστρώματα έχει η βιοτροποποίηση (biomodification) του υδρόφοβου υποστρώματος, αφού τα λιπαρά οξέα ή αλκάνια του υποστρώματος εισέρχονται εντός του κυττάρου. Ως εκ τούτου, παρατηρείται ενδεχομένως σημαντική τροποποίηση της σύστασης τόσο του υποστρώματος, όσο και του παραγόμενου ενδοκυτταρικού λίπους, με αποτέλεσμα ενίοτε την παραγωγή μικροβιακού λίπους ιδιαίτερης σύστασης (π.χ. ανάλογο του λίπους του κακάο). Σχηματικά η βιοτροποποίηση του λίπους κατά την αύξηση μικροοργανισμών (κυρίως ζυμών) σε λιπαρές ύλες εμφανίζεται στο σχήμα Ι.4.



Σχήμα Ι.4 Βιοτροποποίηση λίπους κατά την αύξηση ζύμης σε λιπαρά υλικά (Paranikolaou and Aggelis 2003b).

I.4 Σκοπός της μελέτης

Η παραγωγή ενδοκυτταρικού λίπους, εντός του οποίου περιέχονται σημαντικές ποσότητες πολυακόρεστων λιπαρών οξέων αποτελεί έναν προφανή στόχο για την Βιοτεχνολογία των Λιπαρών Σωμάτων. Τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα αποτελούν δομικές μονάδες για την σύνθεση λιπιδίων υψηλής φαρμακευτικής και διατροφικής σημασίας. Ειδικότερα, το γ-λινολενικό οξύ ($\Delta^{6,9,12}$ C18:3, ω -6) χρησιμοποιείται στην αντιμετώπιση ασθενειών όπως η ρευματοειδής αρθρίτιδα, η πολλαπλή σκλήρυνση και διάφορες μορφές καρκίνου. Ακόμη, το εικοσιδύοεξαενοϊκό οξύ (C 22:6 ω -3) έχει σημαντική επίδραση ενάντια σε παθήσεις του καρδιαγγειακού συστήματος, σε διάφορες μορφές καρκίνου και στην νόσο του Αλζχάϊμερ, ενώ ταυτόχρονα αποτελεί μια βασική θρεπτική ουσία κατά τη πρώιμη ανάπτυξη του ανθρώπινου οργανισμού.

Ωστόσο, η παραγωγή μικροβιακού λίπους εξακολουθεί να είναι μια δαπανηρή διαδικασία. Για το λόγο αυτό, κρίνεται επιτακτική η εξεύρεση νέων ελαιογόνων στελεχών ικανών να παράγουν σημαντικές ποσότητες ενδοκυτταρικού λίπους με την επιθυμητή σύσταση σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα, χρησιμοποιώντας παράλληλα ευτελούς ή μηδενικής αξίας πρώτες ύλες για την καλλιέργειά τους.

Ως εκ τούτου, σκοπός της παρούσας ερευνητικής μελέτης είναι η διερεύνηση της βιοχημικής δυναμικής και της ικανότητας συσσώρευσης λίπους των Ζυγομυκήτων *Cunninghamella echinulata* και *Mortierella isabellina*, κατά την καλλιέργειά τους σε σακχαρούχες ανανεώσιμες πηγές άνθρακα, για την παραγωγή γ-λινολενικού οξέος

II. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

II.1 ΒΙΟΛΟΓΙΚΟ ΥΛΙΚΟ

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν δύο στελέχη μυκήτων ανήκοντα στην κλάση των ζυγομυκήτων και συγκεκριμένα τα στελέχη *Cunninghamella echinulata* ATHUM 4411 και *Mortierella isabellina* ATHUM 2935.

Τα εν λόγω στελέχη διατηρούνταν σε κεκλιμένους σωλήνες πεπεληρωμένους με θρεπτικό μέσο PDA (Potato Dextrose Agar) στους 4 °C, ενώ η ανανέωση τους λάμβανε χώρα ανά τακτικά διαστήματα, προκειμένου να διατηρηθεί η ζωτικότητα τους. Επίσης, ανανέωση των στελεχών πραγματοποιούνταν πριν από κάθε εμβολιασμό του θρεπτικού μέσου της καλλιέργειας, έτσι ώστε το εμβόλιο να είναι σε κάθε περίπτωση ηλικίας περίπου πέντε ημερών.

II.2 ΘΡΕΠΤΙΚΟ ΜΕΣΟ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ ΤΩΝ ΜΥΚΗΤΩΝ

Όλες οι καλλιέργειες που πραγματοποιήθηκαν ήταν σε ζυμώσεις βυθού κλειστού τύπου, εντός κωνικών φιαλών των 250 mL, πληρωμένες κατά το 1/5 τους (50±1 mL) με θρεπτικό μέσο. Για την διεξαγωγή των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν ως πηγή άνθρακα η εμπορική-βιομηχανική γλυκόζη, η εμπορική ζάχαρη, η εμπορική φρουκτόζη και η μελάσα, προϊόντα χαμηλής προστιθέμενης αξίας, τα οποία παρελήφθησαν από την Ελληνική Βιομηχανία Ζάχαρης. Σημειώνεται ότι η μελάσα περιείχε 60% σάκχαρα (κυρίως σακχαρόζη αλλά και ένα σημαντικό ποσοστό ελεύθερης γλυκόζης, περίπου 50%). Κάθε ένας από τους δυο ζυγομύκητες καλλιεργήθηκε και στις τέσσερις ανωτέρω πηγές άνθρακα.

Σε όλα τα πειράματα, μαζί με την εκάστοτε πηγή άνθρακα προσθέτονταν στο θρεπτικό μέσο και ένα μίγμα αλάτων με σύσταση όπως αυτή περιγράφεται στον ακόλουθο πίνακα:

Πίνακας 11.1 Συγκεντρώσεις αλάτων στο θρεπτικό μέσο καλλιέργειας.

Συστατικά	Συγκεντρώσεις (g/L)
KH_2HPO_4	7
Na_2HPO_4	2.5
$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	1.5
$\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$	0.15
$\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	0.02
$\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$	0.06
$\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$	0.15

(Πηγή: Papanikolaou et al. 2002)

Οι καλλιέργειες πραγματοποιήθηκαν σε περιοριστικές σε άζωτο (nitrogen-limited) συνθήκες. Ως πηγές αζώτου χρησιμοποιήθηκαν το θειικό αμμώνιο $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$ σε συγκέντρωση 0.5 g/L και το εκχύλισμα ζύμης (yeast extract) σε συγκέντρωση 0.5 g/L, ο δε λόγος C/N του μέσου ήταν 200 mol/mol. Το pH του μέσου καλλιέργειας ήταν μετά την αποστείρωση 6.0 ± 0.1 .

Τα μίγματα καλλιέργειας μεταφέρονταν σε κωνικές φιάλες των 250 mL, κάθε μια εκ των οποίων περιείχε 50 ± 1 mL θρεπτικού υλικού και τοποθετούνταν σε αυτόκλειστο για αποστείρωση (115°C , για 20 min). Μαζί με το συνολικό αριθμό φιαλών που αποστειρώνονταν, προσθέτονταν και δύο μικρότερες κωνικές φιάλες των 50 mL, η μια πεπληρωμένη με απιονισμένο νερό και άλλη κενή. Μετά την αποστείρωση των φιαλών, ακολουθούσε η παραλαβή των σποριών του εκάστοτε χρησιμοποιούμενου μύκητα, προκειμένου να εμβολιαστεί κάθε κωνική φιάλη. Τούτο επιτυγχάνονταν με την προσθήκη του αποστειρωμένου νερού εντός του κεκλιμένου σωλήνα που περιείχε τον μύκητα με ασηπτικές συνθήκες, και μετά από έντονη ανάδευση του σωλήνα, τα σπόρια του μύκητα παραλαμβάνονταν στο αιώρημα, το οποίο συλλέγονταν στην άδεια κωνική φιάλη, ομοίως υπό ασηπτικές συνθήκες. Η ποσότητα του εμβολίου για κάθε φιάλη (1 mL), αντιστοιχούσε σε 10^5 - 10^7 cfu. Μετά τον εμβολιασμό, οι φιάλες τοποθετούνταν σε ανακινούμενο επωαστικό κλίβανο (New Brunswick Sc, Usa; 180 rpm, 28°C) με ρυθμό 180 rpm και θερμοκρασία $T=28^\circ\text{C}$.

11.3 ΧΗΜΙΚΕΣ ΑΝΑΛΥΣΕΙΣ

11.3.1 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΔΙΑΛΥΜΕΝΟΥ O₂ ΚΑΙ pH

Το διαλυμένο O₂ μετρήθηκε με φορητό οξυγονόμετρο τύπου Lovibond Oxi200 Sensodirect. Κατά την διαδικασία της μέτρησης, το ηλεκτρόδιο τοποθετείται εντός της κωνικής φιάλης και η τελευταία εντός του ανακινούμενου επωαστικού κλιβάνου. Ύστερα από παρέλευση 10min λαμβάνονταν η τιμή του διαλυμένου οξυγόνου (dissolved oxygen - D.O.%). Προκειμένου να μετρηθεί ο ειδικός ρυθμός κατανάλωσης οξυγόνου (q_{O_2} - mg/mg*h), το όργανο ετίθετο στην ένδειξη mg/L και η ανάδευση διακόπτονταν. Η ταχύτητα κατανάλωσης οξυγόνου (r_{O_2} - g/L* sec) προσδιορίζονταν από την κλίση της ευθείας $[O_2] = a * t$ και διαιρώντας με την τιμή της βιομάζας που αντιστοιχούσε στο συγκεκριμένο σημείο υπολογίζονταν ο ειδικός ρυθμός κατανάλωσης οξυγόνου.

Το pH της καλλιέργειας μετρήθηκε με pH-μετρο τύπου Jenway 3020 pH meter. Να σημειωθεί ότι μετά την μέτρηση εκάστοτε σημείου της κινητικής, πραγματοποιείτο διόρθωση του pH του θρεπτικού μέσου της καλλιέργειας στις υπόλοιπες φιάλες όποτε κρίνονταν απαραίτητο, ώστε το pH στο θρεπτικό μέσο να κυμαίνεται στην τιμή 6.0. Η διόρθωση του pH γίνονταν υπό ασηπτικές συνθήκες με διάλυμα καυστικού καλίου (KOH) 5M.

11.3.2 ΣΥΛΛΟΓΗ ΒΙΟΜΑΖΑΣ

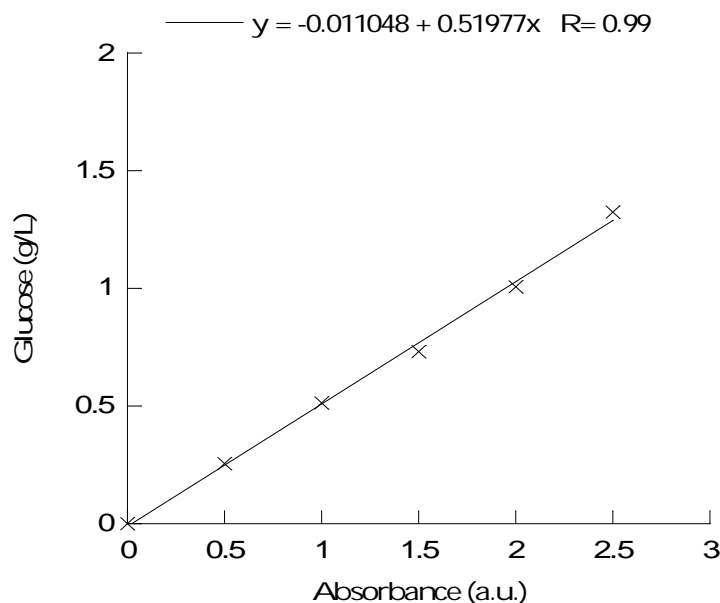
Η βιομάζα συλλέχθηκε με φυγοκέντρηση σε φυγόκεντρο τύπου Heraeus Sepatech Suprafuge 22 (10000 rpm, 15 min). Ακολούθησε έκπλυση των μυκηλίων με απιονισμένο νερό και δεύτερη φυγοκέντρηση. Στη συνέχεια η βιομάζα μεταφέρθηκε σε προζυγιζόμενα φιαλίδια και τοποθετήθηκε στον φούρνο προς ξήρανση ($90 \pm 5^\circ C$) μέχρι σταθερού βάρους. Το ξηρό υπόλειμμα ζυγίστηκε σε ζυγό ακριβείας τύπου Sartorius basic, εκφρασμένο σε g/L.

11.3.3 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΝΑΓΟΝΤΩΝ ΣΑΚΧΑΡΩΝ

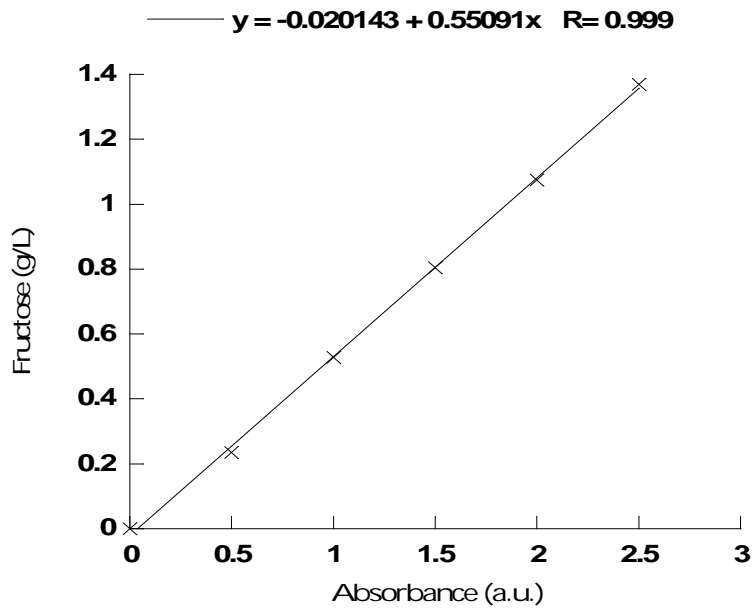
Ο προσδιορισμός της γλυκόζης και της φρουκτόζης πραγματοποιήθηκε με την φωτομετρική μέθοδο του δινιτροσαλικυλικού οξέος (DNS) (Miller 1959). Η μέθοδος στηρίζεται στην αναγωγή του 3,5-δινιτροσαλικυλικού οξέος προς 3-αμινο-5-νιτροσαλικυλικό οξύ παρουσία NaOH και την ταυτόχρονη οξείδωση της γλυκόζης προς γλυκονικό οξύ.

Εφαρμογή της μεθόδου

Σε 0.5 mL δείγματος προστίθενται 0.5 mL αντιδραστηρίου DNS και αναδεύονται. Στην συνέχεια μεταφέρονται τα δείγματα σε υδατόλουτρο (100°C) για 5 min ακριβώς και ψύχονται αμέσως με H₂O (25°C). Έπειτα προστίθενται 5 mL απιονισμένο H₂O, ακολουθεί ανάδευση και μέτρηση της απορρόφησης στα 540 nm. Η συγκέντρωση του δείγματος σε ανάγοντα σάκχαρα υπολογίστηκε με βάση τις ακόλουθες καμπύλες αναφοράς, εκφρασμένη σε g/L γλυκόζης ή φρουκτόζης αντίστοιχα. Όλες οι απορροφήσεις μετρήθηκαν με φασματοφωτόμετρο τύπου Hitachi U-2000 Spectrophotometer.



Γράφημα 11.1. Καμπύλη αναφοράς γλυκόζης με την μέθοδο DNS



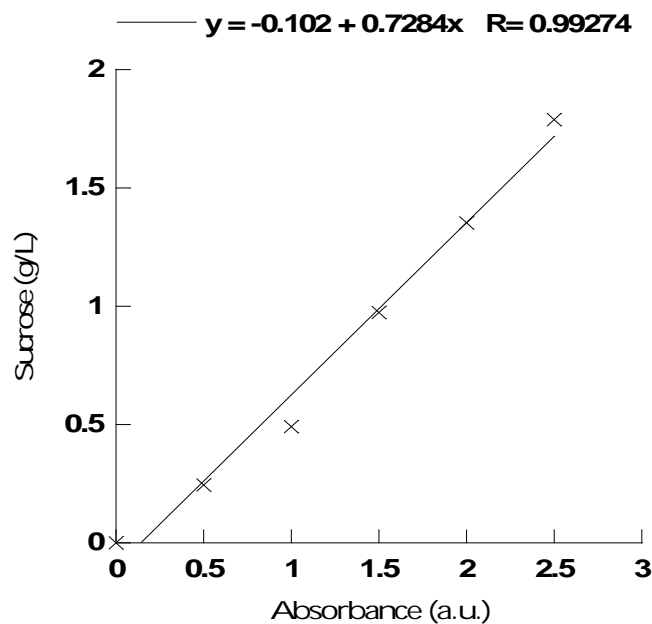
Γράφημα 11.2. Καμπύλη αναφοράς φρουκτόζης με την μέθοδο DNS

11.3.4 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΟΛΙΚΩΝ ΣΑΚΧΑΡΩΝ

Ο προσδιορισμός των ολικών σακχάρων πραγματοποιήθηκε βάση της φωτομετρικής μεθόδου Dubois et al. (1957). Η μέθοδος βασίζεται στην ιδιότητα των απλών σακχάρων, ολιγοσακχαρίτων, πολυσακχαρίτων και των παραγώγων τους να αποκτούν ένα κίτρινο-πορτοκαλί χρώμα όταν αντιδρούν με φαινόλη και πυκνό θειικό οξύ.

Εφαρμογή της μεθόδου

Σε 2 mL δείγματος προστίθενται 0.050 mL φαινόλης και 5 mL πυκνού θειικού οξέος (95% w/v). Το δείγμα αναδεύεται, αφήνεται σε ηρεμία για δέκα λεπτά και ακολουθεί μέτρηση στο φωτόμετρο στα 490 nm. Η συγκέντρωση του δείγματος σε ολικά σάκχαρα υπολογίστηκε με βάση την ακόλουθη πρότυπη καμπύλη αναφοράς εκφρασμένη σε g/L σακχαρόζης. Όλες οι απορροφήσεις μετρήθηκαν με φασματοφωτόμετρο τύπου Hitachi U-2000 Spectrophotometer.



Γράφημα 11.3. Καμπύλη αναφοράς σακχαρόζης με την μέθοδο Dubois.

11.3.5 ΜΕΛΕΤΗ ΕΝΔΟΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΛΙΠΟΥΣ

Σε ορισμένα σημεία από κάθε ζύμωση μελετήθηκε τόσο ποσοτικά, όσο και ποιοτικά το ενδοκυτταρικό λίπος των μυκήτων.

Εκχύλιση Λίπους

Για τον προσδιορισμό της παραγωγής ενδοκυτταρικού λίπους από το εκάστοτε στέλεχος μύκητα, μετά τη ζύγιση της βιομάζας προστίθετο ποσότητα ολίγων mL μίγματος διαλυτών χλωροφορμίου (CHCl_3)-μεθανόλης (Methanol) σε αναλογία 2:1 (Folch et al. 1957; Papanikolaou et al. 2001). Είναι προφανές ότι με το χρησιμοποιούμενο μίγμα διαλυτών εκχυλίζεται το συνολικό (total) μικροβιακό λίπος, ήτοι και τα αποθηκευτικά και τα δομικά λιπίδια. Κατόπιν η βιομάζα μαζί με το μίγμα διαλυτών υφίστατο διήθηση. Το διήθημα συλλέγονταν σε προζυγισμένη φιάλη εξάτμισης και ακολουθούσε εξάτμιση, σε περιστροφικό εξάτμιστήρα για την

απομάκρυνση των διαλυτών. Στην φιάλη εξάτμισης παρέμενε το μικροβιακό λίπος το οποίο υπολογίζονταν σε g/L.

Κλασμάτωση λιπιδίων

Μετά την εκχύλιση του μικροβιακού λίπους όπως προαναφέρθηκε, για την προετοιμασία των λιπιδίων προς κλασμάτωση, πραγματοποιείται έκπλυση τους με 0.88% KCl, απ' όπου και παραλαμβάνονταν η κάτω φάση. Στην συνέχεια, τα λιπίδια ξηραίνονταν παρουσία Na_2SO_4 , συμπυκνώνονταν μέχρι ξηρού βάρους με την βοήθεια του περιστροφικού εξατμιστήρα και το εναπομείναν μικροβιακό λίπος ζυγίζονταν.

Στην συνέχεια, για την προετοιμασία της στήλης (25mm × 100mm) ζυγίζονταν δεκαπλάσια ποσότητα silicic acid και τοποθετούνταν στο φούρνο (110°C) για 24 ώρες. Τα λιπίδια διαλύονταν σε 1-2 mL χλωροφορμίου ή διχλωρομεθανίου και με μια πιπέτα Pasteur προσθέτονταν στην στήλη. Στην συνέχεια προστίθετο με συνεχή ροή χλωροφόρμιο (100 mL χλωροφορμίου ανά 100 mg λιπιδίων) και σε προζυγισμένη σφαιρική φιάλη παραλαμβάνονταν το πρώτο κλάσμα λιπιδίων που περιέχει τα ουδέτερα λιπίδια (NL). Έπειτα, η ίδια διαδικασία επαναλαμβάνονταν χρησιμοποιώντας ως διαλύτη ακετόνη για την παραλαβή του κλάσματος σφιγγολιπιδίων και γλυκολιπιδίων (S+G) και τέλος, μεθανόλη για την παραλαβή του κλάσματος των φωσφολιπιδίων (P). Τα ανωτέρω κλάσματα εξατμιζονταν σε περιστροφικό εξατμιστήρα, υφίστατο μεθυλεστεροποίηση και αναλύονταν σε αέριο χρωματογράφο.

Μεθυλεστεροποίηση

Εν συνεχεία, το κυτταρικό λίπος μετατρέπεται με μεθυλίωση στους αντίστοιχους μεθυλικούς εστέρες, με την γενικευμένη μέθοδο AFNOR (1959), προκειμένου να γίνει ο ποιοτικός προσδιορισμός των λιπαρών οξέων που περιέχονται σε αυτό. Η εστεροποίηση πραγματοποιείται σε δύο στάδια, το πρώτο σε αλκαλικό περιβάλλον και το δεύτερο σε όξινο. Κατά το πρώτο στάδιο τελείται η πυρηνόφιλη υποκατάσταση στο μόριο των τριγλυκεριδίων και των φωσφολιπιδίων, με τελικό προϊόν τους αντίστοιχους μεθυλεστέρες των λιπαρών οξέων. Παράλληλα, τα ήδη υπάρχοντα

ελεύθερα λιπαρά οξέα αντιδρούν με το διάλυμα του μεθανολικού νατρίου και παραλαμβάνονται οι αντίστοιχοι σάπωνές τους. Στο δεύτερο στάδιο πραγματοποιείται η μετατροπή των σαπώνων των λιπαρών οξέων προς τους αντίστοιχους μεθυλεστέρες.

Εφαρμογή της μεθόδου

Στην σφαιρική φιάλη με το ζυγισθέν κυτταρικό λίπος προστίθενται ολίγες πέτρες βρασμού και 10 mL διαλύματος μεθανολικού νατρίου ($\text{MeO}\cdot\text{Na}^+$). Τοποθετείται το δείγμα προς βρασμό για 15 min σε κάθετο ψυκτήρα και με το πέρας του χρόνου προστίθεται με 5-10 mL υδροχλωρική μεθανόλη (έως ότου το δείγμα αποχρωματιστεί) και αφήνεται προς βρασμό για άλλα 15 min. Ακολουθεί προσθήκη νερού προκειμένου να λάβει τέλος η αντίδραση και το δείγμα μεταφέρεται σε εκχυλιστική χοάνη. Προστίθενται 6 mL εξανίου, το δείγμα αναδεύεται έντονα και αφήνεται για λίγα λεπτά προκειμένου να διαχωριστούν οι δύο φάσεις (η οργανική με το εξάνιο και η υδατική φάση). Η φάση του εξανίου συλλέγεται σε μικρό φιαλίδιο και προστίθεται μικρή ποσότητα άνυδρου θεικού νατρίου (Na_2SO_4) για την απορρόφηση της υγρασίας. Ακολουθεί η ανάλυση του δείγματος στον αέριο χρωματογράφο (GC)

Ανάλυση στον αέριο χρωματογράφο

Πραγματοποιείται έγχυση 1-2 μL από το διάλυμα μεθυλεστέρων με ειδική σύριγγα στην υποδοχή του αέριου χρωματογράφου 8000 series FISIONS.

Συνθήκες αέριου χρωματογράφου

- Θερμοκρασία εισαγωγέα 250°C
- Θερμοκρασία ανιχνευτή (FID) 250°C
- Φέρον αέριο He (ροή 1.38 mL/min), H_2 (60 kPa), O_2 (110 kPa)
- Τύπος στήλης Fused silica WCOT: CP-Sill 88 (0.2 μl)

Μήκος 50 m

Διάμετρος 0.32 m

Πάχος επικάλυψης εσωτερικά που έρχεται σε επαφή με το δείγμα DF= 0.2 μm .

Η θερμοκρασία της στήλης παρέμενε σταθερή στους 200°C για 20 min. Από το εμβαδόν της κάθε κορυφής προέκυπτε η συγκέντρωση του κάθε λιπαρού οξέος.

Με την βοήθεια πρότυπου διαλύματος που περιείχε τους μεθυλεστέρες των κυριότερων λιπαρών οξέων, βρέθηκαν οι χρόνοι κατακράτησης. Από το εμβαδόν της κάθε κορυφής προέκυψε η συγκέντρωση του κάθε λιπαρού οξέος.

11.3.6 ΜΕΤΡΗΣΗ ΑΜΜΩΝΙΑΚΩΝ ΣΤΟ ΘΡΕΠΤΙΚΟ ΜΕΣΟ

Για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης των αμμωνιακών στο θρεπτικό μέσο της καλλιέργειας, χρησιμοποιήθηκε το ηλεκτρόδιο HACH Sension2 Electrode Model 51927-00. Από το υπερκείμενο κάθε σημείου της κινητικής, ελήφθησαν 10 mL υπερκειμένου και μεταφέρθηκαν σε ποτήρι ζέσεως με μαγνήτη. Στην συνέχεια, το ποτήρι ζέσεως τοποθετούνταν σε μαγνητικό αναδευτήρα, εφαρμόζοντας το ηλεκτρόδιο για την μέτρηση των αμμωνιακών στην επιφάνεια του δείγματος, και υπό ανάδευση προστίθενται με πιπέτα 300 μ L διαλύματος HACH Ammonia ISA Solution. Ακολουθεί αναμονή έως ότου το όργανο δείξει την ένδειξη με την ποσότητα αμμωνίου που μετρήθηκε στο δείγμα.

II.3.7 ΜΕΤΡΗΣΗ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ ΕΞΩΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΙΜΒΕΡΤΑΣΗΣ (INVERTASE ASSAY)

Για την μέτρηση της ενεργότητας του ενζύμου ιμβερτάση κατά την καλλιέργεια των μυκήτων σε υποστρώματα με μόνη πηγή άνθρακα την εμπορική 'ζάχαρη ή την μελάσα, ακολουθήθηκε η μέθοδος των Oliveira et al. (2006). Εν αρχή, πραγματοποιήθηκε μια αριστοποίηση τόσο στο pH, όσο και στην συγκέντρωση του ρυθμιστικού διαλύματος που χρησιμοποιήθηκε για την ενζυμική αντίδραση. Το εύρος του pH στο οποίο πραγματοποιήθηκαν οι δοκιμές ήταν από 5 έως 7, ενώ το εύρος της συγκέντρωσης του διαλύματος ήταν από 0.05 έως 0.2 M. Το βέλτιστο pH για την μέτρηση της εξωκυτταρικής ιμβερτάσης ήταν το 7, ενώ η αντίστοιχη βέλτιστη συγκέντρωση του ρυθμιστικού διαλύματος ήταν 0.05 M. Στην συνέχεια, διερευνήθηκε η κατάλληλη θερμοκρασία για την ενζυμική αντίδραση σε συνάρτηση με το χρόνο, με βάση και τα βιβλιογραφικά δεδομένα, και ορίστηκε ως βέλτιστη αυτή των 50 °C για 30 λεπτά.

Το μέσο ενζυμικής αντίδρασης αποτελούνταν από 1 mL διαλύματος σακχαρόζης 1% (w/v), 2.7 mL ρυθμιστικού διαλύματος Na₂HPO₄-NaH₂PO₄ συγκέντρωσης 0.05 M και pH= 7, και 0.3 mL από το υπερκείμενο της καλλιέργειας, καταλλήλως αραιωμένο. Η ενζυμική αντίδραση πραγματοποιούνταν σε υδατόλουτρο στους 50°C για 30 λεπτά και ακολουθούσε αμέσως βρασμός (100°C, για 5 λεπτά) για τον τερματισμό της ενζυμικής αντίδρασης. Η ενεργότητα της ιμβερτάσης προσδιορίστηκε με την φωτομετρική μέθοδο DNS (βλέπε II.3.3).

Ως μονάδα ενζυμικής ενεργότητας (Unit) ορίστηκε η ποσότητα της ιμβερτάσης που παράγει ένα μολι γλυκόζης ανά λεπτό στους 50°C.

II.3.8 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΠΟΧΡΩΜΑΤΙΣΜΟΥ ΜΕΛΑΣΑΣ

Για τον προσδιορισμό του ποσοστού αποχρωματισμού της μελάσας, μια εκ των πηγών άνθρακα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη, ορίστηκε ως σημείο αναφοράς η απορρόφηση του δείγματος μελάσας πριν τον εμβολιασμό στα 475 nm, με αραιώση 1/10 (Dahiya et al. 2001; Thakkar et al. 2006). Στην συνέχεια, λαμβάνονταν μέτρηση της απορρόφησης του υπερκείμενου της καλλιέργειας από

κάθε σημείο της κινητικής στο ίδιο μήκος κύματος και στην ίδια αραιώση. Η διαφορά απορρόφησης μεταξύ αρχικού σημείου και εκάστοτε σημείου κινητικής εκφράστηκε σε ποσοστό επί τοις %.

III. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η διερεύνηση της βιοχημικής και φυσιολογικής συμπεριφοράς (ήτοι μικροβιακή αύξηση και κυτταρική παραγωγή, κατανάλωση του υποστρώματος, παραγωγή μικροβιακού λίπους, σύσταση σε λιπαρά οξέα του μικροβιακού λίπους) των Ζυγομυκήτων, *Cunninghamella echinulata* και *Mortierella isabellina*, κατά την καλλιέργειά τους σε σακχαρούχα ανανεώσιμα υποστρώματα, με το άζωτο να συνιστά το περιοριστικό στοιχείο της αύξησης. Έχει δειχθεί σε προηγούμενες εργασίες της ερευνητικής μας ομάδας ότι οι μύκητες αυτοί έχουν δυναμική συσσώρευσης μικροβιακού λίπους, υψηλής φαρμακευτικής και διατροφικής σημασίας, κατά την καλλιέργεια τους σε διάφορες πηγές άνθρακα (Paranikolaou et al. 2004a; b; 2007; Fakas et al. 2006; 2007). Συγκεκριμένα, στην παρούσα εργασία ως πηγή άνθρακα χρησιμοποιήθηκαν η εμπορική γλυκόζη, η εμπορική φρουκτόζη, η εμπορική ζάχαρη και η μελάσα, ενώ ως πηγή αζώτου προστέθηκαν στο θρεπτικό μέσο 0.5 g/L yeast extract και 0.5 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Σε κάθε περίπτωση, η αρχική συγκέντρωση (S_0) της πηγής άνθρακα ήταν 60 g/L, ενώ ο λόγος C/N ήταν υψηλός (200 mol/mol), ώστε να ευνοηθεί η συσσώρευση ενδοκυτταρικού λίπους (Evans and Ratledge 1985; McKay et al. 1994).

Πράγματι, σε κάθε περίπτωση μετά την εξάντληση του αμμωνιακού αζώτου στο μέσο ανάπτυξης του μικροοργανισμού, παρατηρήθηκε αξιοσημείωτη συσσώρευση ενδοκυτταρικού λίπους. Σημειώνεται, ότι το αμμωνιακό άζωτο σε όλες τις καλλιέργειες καταναλώθηκε σχετικά γρήγορα μετά τον εμβολιασμό (σε 75 ± 10 h, με αρχική συγκέντρωση αμμωνιακού αζώτου 110 ± 15 ppm και τελική συγκέντρωση 5 ± 3 ppm). Όσον αφορά στην τιμή του pH, κατά την διάρκεια των ζυμώσεων δεν παρουσίασε ιδιαίτερη πτώση (5.5 ± 0.2), γεγονός που δεικνύει την απουσία οργανικών οξέων στο μέσο της καλλιέργειας και την κατεύθυνση της μεταβολικής διαδικασίας προς την θεμιτή παραγωγή ενδοκυτταρικού λίπους.

Στον παρακάτω πίνακα εμφανίζεται μια σύνοψη των σημείων της κινητικής για κάθε ένα από τα χρησιμοποιούμενα υποστρώματα, στα οποία ο μύκητας *Cunninghamella echinulata* εμφάνισε την μεγαλύτερη παραγωγή ενδοκυτταρικού λίπους. Από τον πίνακα διαπιστώνεται ότι ο εν λόγω μύκητας παρουσίασε

ικανοποιητική κυτταρική ανάπτυξη σε όλα τα υποστρώματα (12.9-17.6 g/L), ενώ και η συσσώρευση ενδοκυτταρικού λίπους ήταν αξιοσημείωτη (3.1-3.8 g/L). Σημειώνεται επίσης ότι κατά την καλλιέργεια του *Cunninghamella echinulata* σε όλες της πηγές άνθρακα, ένα ποσοστό της τάξεως του 30-40% του υποστρώματος παρέμενε ακατανάλωτο μετά το πέρας της ζύμωσης.

Πίνακας III.1 Συγκεντρωτικός πίνακας αποτελεσμάτων της καλλιέργειας του Ζυγομύκητα *Cunninghamella echinulata* σε σακχαρούχες ανανεώσιμες πηγές άνθρακα χρησιμοποιούμενες ως μόνη πηγή άνθρακα, σε περιοριστικές σε άζωτο συνθήκες.

Υπόστρωμα	Χρόνος (h)	X (g/L)	S _r (g/L)	L _{max} (g/L)	Y _{L/X} %	GLA (mg/L)
Γλυκόζη	309	12.9	23.8	3.8	29	740
Φρουκτόζη	405	16.7	22.1	3.6	21	473
Ζάχαρη	376	17.6	37.1	3.1	18	310
Μελάσα	356	12.1	30.9	3.8	32	490

Συνθήκες καλλιέργειας: ασυνεχής ζύμωση σε ανακινούμενες κωνικές φιάλες (180 g/ml) και θερμοκρασία 28°C, αρχική συγκέντρωση υποστρώματος (S₀) 60 g/L, αρχική συγκέντρωση NH₄⁺ 110±15 ppm, υπό αερόβιες συνθήκες (συγκέντρωση διαλελυμένου οξυγόνου DO₂>50%). Όλες οι καλλιέργειες πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν με διαφορετικά αρχικά εμβόλια.

X: Η παραγόμενη βιομάζα (g/L)

L_{max}: Το μέγιστο παραγόμενο μικροβιακό λίπος (g/L)

S_r: Η συγκέντρωση του εναπομείναντος υποστρώματος (g/L)

Y_{L/X}: Συντελεστής απόδοσης παραγωγής ενδοκυτταρικού λίπους ως προς την παραγωγή βιομάζας

Y_{Xf/L}: Συντελεστής απόδοσης παραγωγής βιομάζας ελεύθερης λίπους.

GLA: γ-λινολενικό οξύ (Δ^{6,9}.12C18-3, ω-6)

Στην συνέχεια, παρατίθεται ο συγκεντρωτικός πίνακας αποτελεσμάτων για τον μύκητα *Mortierella isabellina*, με τα σημεία της κινητικής στα οποία εμφάνισε την μεγαλύτερη συσσώρευση μικροβιακού λίπους. Διαπιστώνεται ότι ο εν λόγω μύκητας συσσώρευσε σημαντικές ποσότητες ενδοκυτταρικού λίπους (μέγιστη συγκέντρωση λίπους 9.85 g/L κατά την καλλιέργεια στη γλυκόζη), αποδίδοντας ταυτόχρονα έναν υψηλό συντελεστή λίπους επί ξηρού βάρους (74% w/w – βλ. Πίνακα III.2). Ωστόσο, εκ του συνόλου των υποστρωμάτων, φαίνεται πως η εμπορική ζάχαρη δεν αποτέλεσε ικανοποιητικό υπόστρωμα για την ανάπτυξη του *Mortierella isabellina*, καθώς τόσο η βιομάζα, όσο και το παραγόμενο λίπος δεν παρήχθησαν σε αξιοσημείωτες ποσότητες,

ενδεικτικό της αδυναμίας του μικροοργανισμού να αναπτυχθεί ικανοποιητικά σε υπόστρωμα τύπου σακχαρόζης. Αντίθετα, ως το καταλληλότερο υπόστρωμα για την αύξηση και παραγωγή λίπους φαίνεται να είναι η εμπορική γλυκόζη, ενώ αρκετά ικανοποιητική ήταν και η ανάπτυξη του μικροοργανισμού στην φρουκτόζη.

Πίνακας III.2 Συγκεντρωτικός πίνακας αποτελεσμάτων της καλλιέργειας του Ζυγομύκητα *Mortierella isabellina* σε σακχαρούχες ανανεώσιμες πηγές άνθρακα χρησιμοποιούμενες ως μόνη πηγή άνθρακα, σε περιοριστικές σε άζωτο συνθήκες.

Υπόστρωμα	Χρόνος (h)	X (g/L)	S _f (g/L)	L _{max} (g/L)	Y _{L/X} %	GLA (mg/L)
Γλυκόζη	237	13.2	0.6	9.85	74	345
Φρουκτόζη	405	12.1	0.0	7.36	61	110
Ζάχαρη	309	5.2	38.2	0.48	9	32
Μελάσα	237	11.3	36.2	4.8	42	168

Συνθήκες καλλιέργειας: ασυνεχής ζύμωση σε ανακινούμενες κωνικές φιάλες (180 grm) και θερμοκρασία 28 °C, αρχική συγκέντρωση υποστρώματος (S₀) 60 g/L, αρχική συγκέντρωση NH₄⁺ 110±15 ppm, υπό αερόβιες συνθήκες (συγκέντρωση διαλυμένου οξυγόνου DO₂>50%).

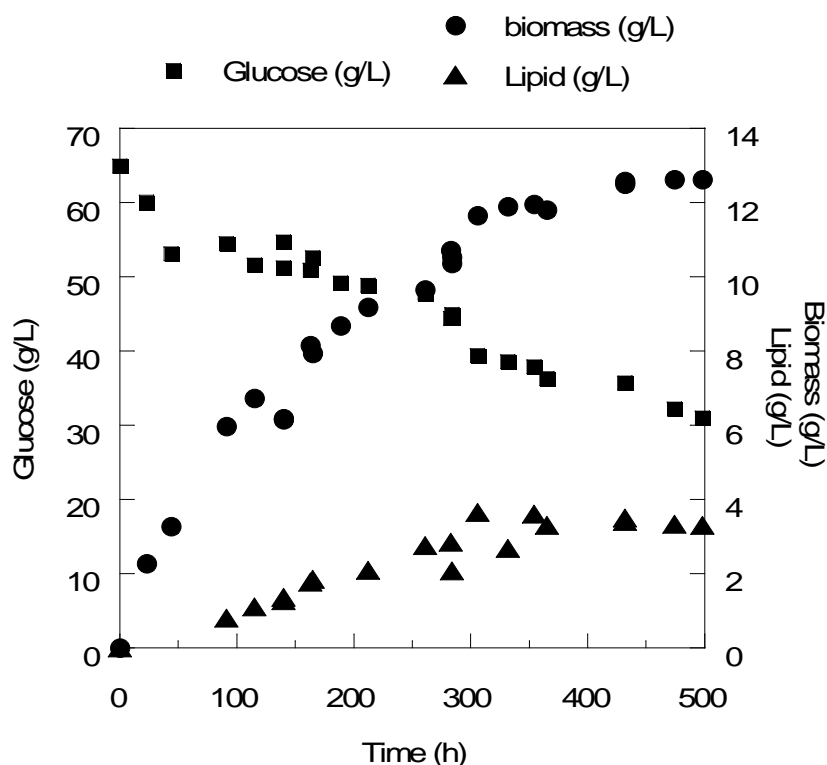
X (g/L), L (g/L), S_f (g/L), GLA: βλ. Πίνακας III.1

Όσον αφορά την παραγωγή της εξωκυτταρικής ιμβερτάσης, ήταν ικανή η μέτρηση της μόνο κατά την καλλιέργεια του μύκητα *Cunninghamella echinulata* στην εμπορική ζάχαρη. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι στο ίδιο υπόστρωμα η ανάπτυξη του μύκητα *Mortierella isabellina* ήταν φτωχή (λόγω μικρής δυνατότητας αφομοίωσης της σακχαρόζης, εξ αιτίας μεταξύ των άλλων και της αμελητέας ενεργότητας της ιμβερτάσης κατά την αύξηση σε αυτό το υπόστρωμα). Θα πρέπει να τονιστεί επίσης το γεγονός ότι η μελάσα (υπόστρωμα που επίσης περιείχε σημαντικές ποσότητες σακχαρόζης) περιείχε σε ικανοποιητική ποσότητα ελεύθερη γλυκόζη (βλέπε κεφάλαιο II. Υλικά και Μέθοδοι) που μεταβολίστηκε από αμφότερους τους μύκητες δίδοντας ικανοποιητική κυτταρική ανάπτυξη σε αμφότερες τις δοκιμές (βλ Πίνακες III.1 και III.2). Εξάλλου, τα αποτελέσματα δεικνύουν πως πιθανόν ένα αξιοσημείωτο ποσοστό της ιμβερτάσης βρίσκεται ενδοκυτταρικά, τόσο στην κυτταρική μεμβράνη, όσο και στο χυμοτόπιο των κυττάρων των εν λόγω μικροοργανισμών.

III.1.1 Καλλιέργεια του Ζυγομύκητα *Cunninghamella echinulata* σε εμπορική γλυκόζη ($S_0=60$ g/L)

III.1.1.1 Κινητική της αύξησης, της κατανάλωσης υποστρώματος και της παραγωγής λίπους.

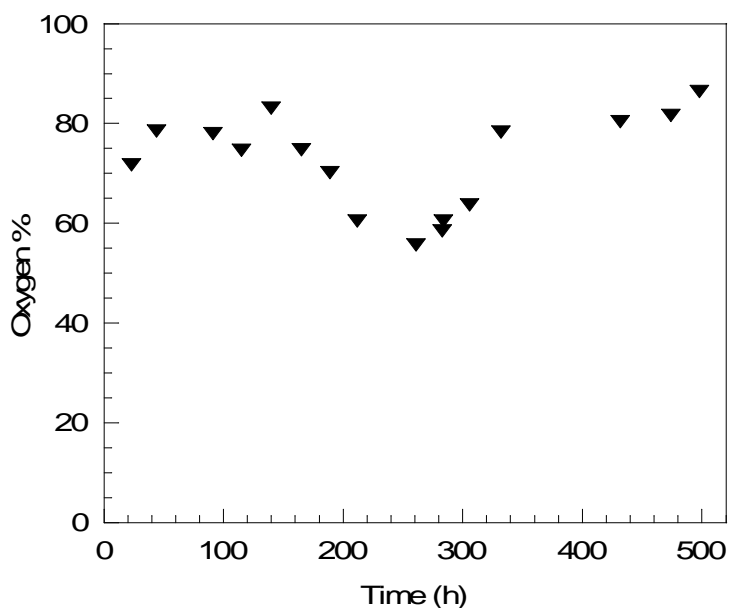
Η κινητική της παραγωγής βιομάζας και της κατανάλωσης του υποστρώματος από τον μύκητα *Cunninghamella echinulata* όταν αυτός αναπτύχθηκε σε θρεπτικό μέσο με εμπορική γλυκόζη ως μόνη πηγή άνθρακα, παρουσιάζονται στο γράφημα III.1.1.1.α. Από το γράφημα φαίνεται ότι ο μικροοργανισμός εμφάνισε ικανοποιητική κυτταρική ανάπτυξη, η οποία έλαβε την μέγιστη τιμή της 309h μετά τον εμβολιασμό, φτάνοντας τα 12.9 g/L. Η κατανάλωση του υποστρώματος ξεκινά λίγες ώρες μετά τον εμβολιασμό, χωρίς να παρατηρείται ιδιαίτερη λανθάνουσα φάση ανάπτυξης. Ωστόσο ένα ποσοστό περίπου 40-50% της αρχικής ποσότητας υποστρώματος έμεινε ακατανάλωτο μετά το πέρας της ζύμωσης.



Γράφημα III.1.1.1.α Κινητική εξέλιξης της βιομάζας (●), της κατανάλωσης υποστρώματος (■) και της παραγωγής ενδοκυτταρικού λίπους (▲) συναρτήσει του χρόνου για το στέλεχος *Cunninghamella echinulata*, σε εμπορική γλυκόζη χρησιμοποιούμενη ως μόνη πηγή άνθρακα, σε περιοριστικές σε άζωτο

συνθήκες. Συνθήκες καλλιέργειας: ασυνεχής ζύμωση σε ανακινούμενες κωνικές φιάλες (180 grm) και θερμοκρασία 28 °C, αρχική συγκέντρωση γλυκόζης (S_0) 60 g/L, αρχική συγκέντρωση NH_4^+ 110±15 ppm, υπό αερόβιες συνθήκες (συγκέντρωση διαλυμένου οξυγόνου $\text{DO}_2 > 50\%$).

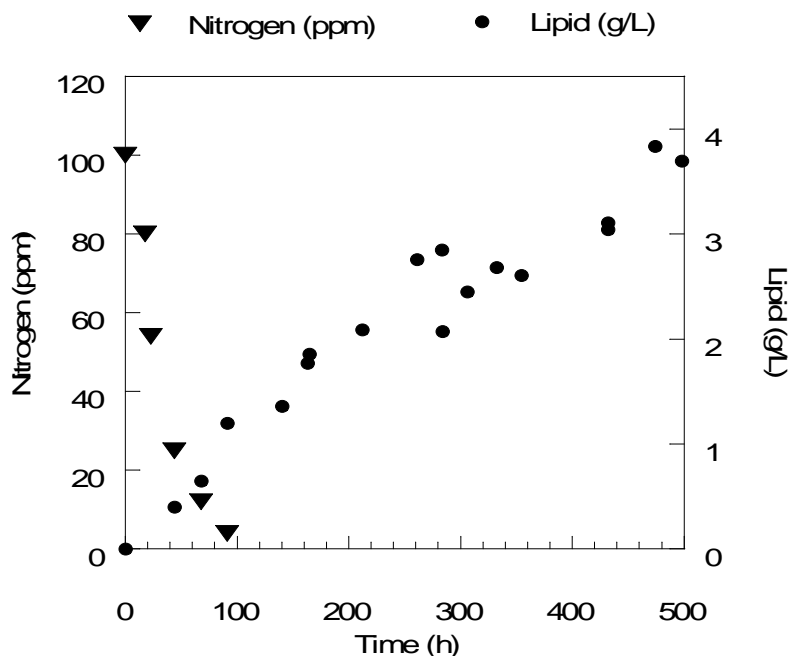
Σημειώνεται δε, ότι κατά τη διάρκεια του αυξητικού κύκλου μετρήθηκε το ποσοστό του διαλυμένου οξυγόνου στο περιβάλλον της ζύμωσης το οποίο παρουσιάζεται στο γράφημα III.1.1.1.β. Από το γράφημα φαίνεται ότι ο επί τοις εκατό (%) κορεσμός σε οξυγόνο του περιβάλλοντος ανάπτυξης του μικροοργανισμού αρχικά μειώνεται, λόγω των αυξημένων αναγκών του μικροοργανισμού σε οξυγόνο για τον καταβολισμό της πηγής άνθρακα και την συσσώρευση ενδοκυτταρικού λίπους, κατόπιν ανέρχεται πάλι σε υψηλά επίπεδα. Σε κάθε περίπτωση, η ζύμωση τελούσε υπό αυστηρά αερόβιες συνθήκες.



Γράφημα III.1.1.1.β: Κινητική του % διαλυμένου οξυγόνου για τον *Cunninghamella echinulata*. Συνθήκες καλλιέργειας: ασυνεχής καλλιέργεια σε εμπορική γλυκόζη χρησιμοποιούμενο ως μόνη πηγή άνθρακα (60 g/l), σε ανακινούμενες φιάλες (180 grm) και θερμοκρασία 28 °C, υπό αερόβιες συνθήκες ($\text{DO}_2 > 50\%$).

Με την εξάντληση των ιόντων αμμωνίου από το θρεπτικό μέσο εντός 75±10h από την στιγμή του εμβολιασμού, ξεκίνησε η συσσώρευση ενδοκυτταρικού λίπους, όπως εύκολα διαπιστώνεται στο παρακάτω γράφημα (III.1.1.1.γ.). Η μέγιστη

παραγωγή λίπους ήταν 3.6 g/L, με αντίστοιχο συντελεστή απόδοσης ($Y_{L/X}$) 0.29 g λίπους ανά g παραγόμενης βιομάζας.



Γράφημα III.1.1.1.γ. Κινητική εξέλιξης των ιόντων αμμωνίου (▼) και του ενδοκυτταρικού λίπους (●) κατά την καλλιέργεια του στελέχους *Cunninghamella echinulata* σε εμπορική γλυκόζη χρησιμοποιούμενη ως μόνη πηγή άνθρακα, σε περιοριστικές σε άζωτο συνθήκες. Συνθήκες καλλιέργειας: ασυνεχής ζύμωση σε ανακινούμενες κωνικές φιάλες (180 rpm) και θερμοκρασία 28 °C, αρχική συγκέντρωση γλυκόζης (S_0) 60 g/L, αρχική συγκέντρωση NH_4^+ 110±15 ppm, υπό αερόβιες συνθήκες (συγκέντρωση διαλελυμένου οξυγόνου $\text{DO}_2 > 50\%$).

Ακολούθησε η ποιοτική ανάλυση του μικροβιακού λίπους στον αέριο χρωματογράφο. Ελήφθησαν δείγματα προς ανάλυση για κάθε μια από τις εξής φάσεις-τμήματα του αυξητικού κύκλου: την μέση εκθετική αύξηση (ME), την τελευταία εκθετική φάση του αυξητικού κύκλου (LE) και την στάσιμη φάση του αυξητικού κύκλου (S). Το ίδιο σκεπτικό ακολουθήθηκε για όλα τα δείγματα ανάλυσης προς τον αέριο χρωματογράφο στην παρούσα μελέτη. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης παραθέτονται στον ακόλουθο πίνακα.

Πίνακας III.3 Σύσταση του μικροβιακού λίπους του *Cunninghamella echinulata*.

Φάση αύξησης	Χρόνος (h)	Λιπαρά Οξέα %						Λοιπά
		C 16:0	Δ^9 C 16:1	C 18:0	Δ^9 C18:1	$\Delta^{9,12}$ C18:2	$\Delta^{6,9,12}$ C18:3	
ME	187	17.2	1.3	9.1	34.2	16.1	19.1	2
LE	283	15.3	1.1	5.1	46.3	15.1	16.1	2
	284	13.2	1.6	3.5	45.5	16.5	15.2	1.9
S	354	16.9	1.6	3.5	48.4	15.4	13.5	1.1
	432	13.1	1.4	2.2	45.5	16.3	19.5	2

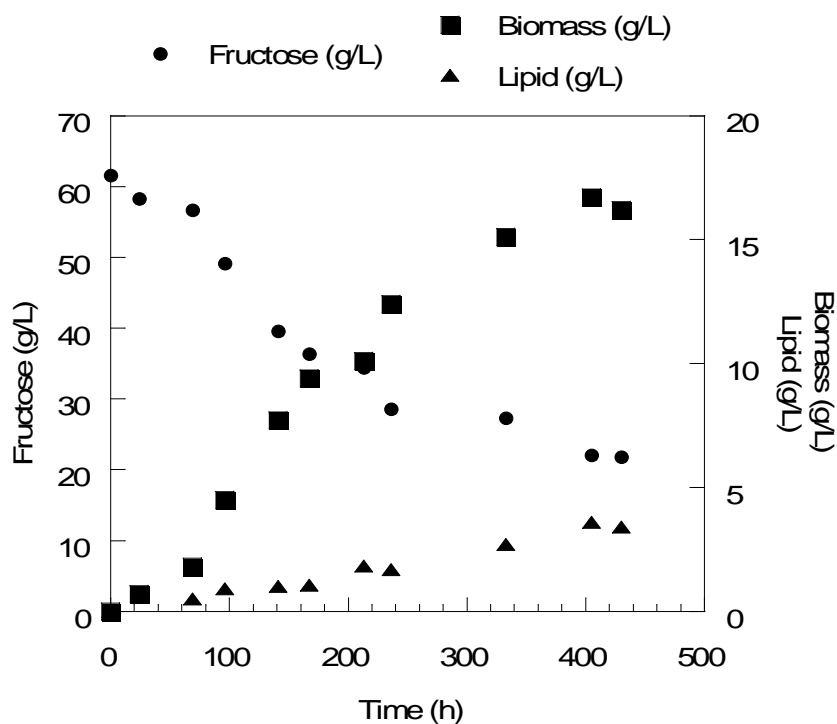
Συνθήκες καλλιέργειας: ασυνεχής ζύμωση σε ανακινούμενες κωνικές φιάλες (180 g/ml) και θερμοκρασία 28 °C, αρχική συγκέντρωση γλυκόζης (S_0) 60 g/L, αρχική συγκέντρωση NH_4^+ 110±15 ppm, υπό αερόβιες συνθήκες (συγκέντρωση διαλυμένου οξυγόνου $\text{DO}_2 > 50\%$).

Παρατηρούμε ότι αρχικά το ποσοστό του γ -λινολενικού οξέος ($\Delta^{6,9,12}$ C18:3) είναι υψηλό. Όμως, κατά την εξέλιξη της ζύμωσης, παρατηρείται αύξηση του ποσοστού του ελαϊκού οξέος (Δ^9 C18:1), με συνακόλουθη μείωση του γ -λινολενικού. Εν τούτοις, βαίνοντας προς το τέλος της ζύμωσης και φτάνοντας το ενδοκυτταρικό λίπος στα μέγιστα σημεία του, παρατηρείται αύξηση του ποσοστού του γ -λινολενικού οξέος, περίπου στα ίδια επίπεδα με αυτά των αρχικών ωρών της ζύμωσης. Εξάλλου, η μέγιστη συγκέντρωση γ -λινολενικού οξέος ήταν 740 mg/L.

III.1.2. Καλλιέργεια του Ζυγομύκητα *Cunninghamella echinulata* σε εμπορική φρουκτόζη ($S_0=60$ g/L).

III.1.2.1. Κινητική της αύξησης, της κατανάλωσης υποστρώματος και της παραγωγής λίπους.

Η κινητική της παραγωγής βιομάζας και της κατανάλωσης του υποστρώματος από τον μύκητα *Cunninghamella echinulata* όταν αυτός αναπτύχθηκε σε θρεπτικό μέσο με εμπορική φρουκτόζη ως μόνη πηγή άνθρακα, παρουσιάζονται στο γράφημα III.1.2.1.α. Από το γράφημα φαίνεται ότι ο μικροοργανισμός εμφάνισε ικανοποιητική κυτταρική ανάπτυξη, η οποία έλαβε την μέγιστη τιμή της 405h μετά τον εμβολιασμό, στα 16.7 g/L. Μετά το πέρας της ζύμωσης, ένα ποσοστό περίπου 30% της αρχικής συγκέντρωσης της φρουκτόζης παρέμεινε ακατανάλωτο.



Γράφημα III.1.2.1.α Κινητική εξέλιξης της βιομάζας (■), της κατανάλωσης υποστρώματος (●) και της παραγωγής ενδοκυτταρικού λίπους (▲) συναρτήσει του χρόνου για το στέλεχος *Cunninhamella echinulata*, σε εμπορική φρουκτόζη χρησιμοποιούμενη ως μόνη πηγή άνθρακα, σε περιοριστικές σε άζωτο συνθήκες. Συνθήκες καλλιέργειας: ασυνεχής ζύμωση σε ανακινούμενες κωνικές φιάλες (180 rpm) και θερμοκρασία 28 °C, αρχική συγκέντρωση φρουκτόζης (S_0) 60 g/L, αρχική συγκέντρωση NH_4^+ 110±15 ppm, υπό αερόβιες συνθήκες (συγκέντρωση διαλελυμένου οξυγόνου $\text{DO}_2 > 50\%$).

Η παραγωγή ενδοκυτταρικού λίπους ήταν και σε αυτή την περίπτωση αξιοσημείωτη, φτάνοντας τα 3.6 g/L, με συντελεστή απόδοσης για το παραγόμενο μικροβιακό λίπος 0.22 g/g παραγόμενης βιομάζας. Κατά την ανάλυση του μικροβιακού λίπους στον αέριο χρωματογράφο, παρατηρήθηκε και σε αυτή την περίπτωση η αυξομείωση του ποσοστού του γ-λινολενικού οξέος κατά την βιοσυνσύνθεση ενδοκυτταρικού λίπους. Η μέγιστη ποσότητα GLA ήταν 473 mg/L.

Πίνακας III.4. Σύσταση του μικροβιακού λίπους του *Cunninghamella echinulata*

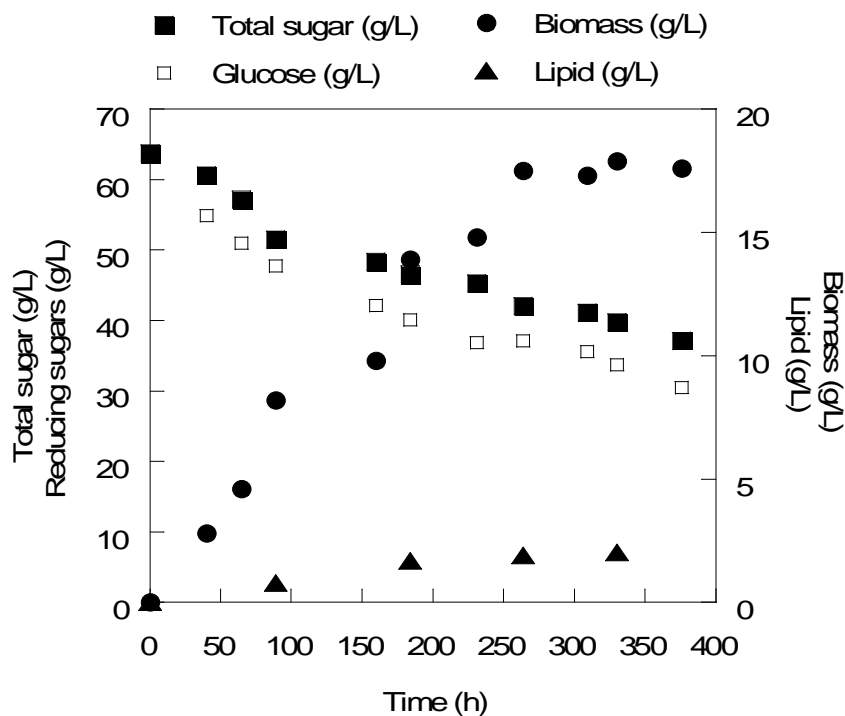
Φάση αύξεσης	Χρόνος (h)	Λιπαρά Οξέα %						Λοιπά
		C 16:0	^{Δ9} C 16:1	C 18:0	^{Δ9} C18:1	^{Δ9,12} C18:2	^{Δ6,9,12} C18:3	
ME	167	21.1	1.3	6.2	42.1	17.1	10.2	2
LE	236	17.2	1.4	4.5	48.3	29.5	7.6	1.5
S	333	20.1	1.5	5.3	43.4	17.5	10.1	2.1

Συνθήκες καλλιέργειας: ασυνεχής ζύμωση σε ανακινούμενες κωνικές φιάλες (180 g/ml) και θερμοκρασία 28 °C, αρχική συγκέντρωση φρουκτόζης (S_0) 60 g/L, αρχική συγκέντρωση NH_4^+ 110±15 ppm, υπό αερόβιες συνθήκες (συγκέντρωση διαλελυμένου οξυγόνου $\text{DO}_2 > 50\%$).

III.1.3. Καλλιέργεια του Ζυγομύκητα *Cunninghamella echinulata* σε εμπορική ζάχαρη ($S_0=60$ g/L).

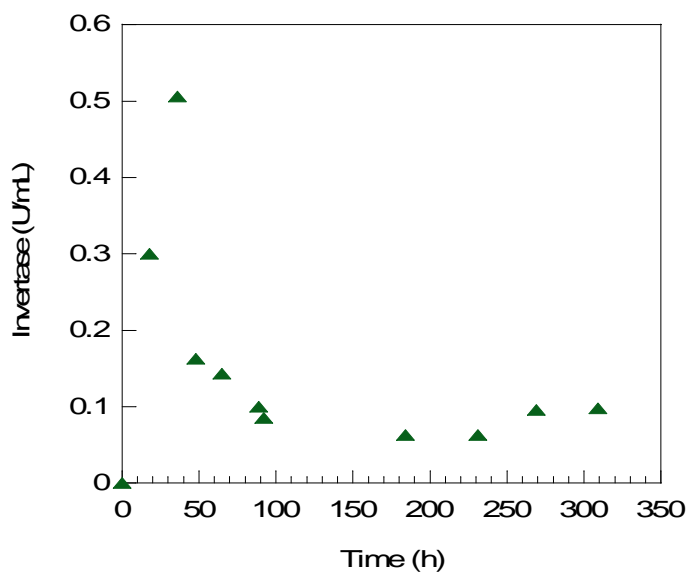
III.1.3.1. Κινητική της αύξεσης, της κατανάλωσης υποστρώματος και της παραγωγής λίπους.

Ομοίως και σε αυτό το υπόστρωμα ανάπτυξης, ο μύκητας *Cunninghamella echinulata* σημείωσε σημαντικές ποσότητες παραγόμενης βιομάζας. Παρατηρήθηκε ότι η εμπορική ζάχαρη αποτέλεσε το καλύτερο υπόστρωμα ανάπτυξης για τον *Cunninghamella echinulata*, αφού μετά το πέρας της ζύμωσης παρήχθη η μέγιστη ποσότητα βιομάζας, εν συγκρίσει με τις υπόλοιπες πηγές άνθρακα, ήτοι 17.6 g/L, 376h μετά τον εμβολιασμό. Όσον αφορά στην παραγωγή μικροβιακού λίπους, παρατηρήθηκε ικανοποιητική συσσώρευση, η οποία έφτασε τα 3.1 g/L, με συντελεστή απόδοσης 0.18 g/g παραγόμενης βιομάζας. Άξια αναφοράς είναι η ταχύτερη υδρόλυση της σακχαρόζης από τον μικροοργανισμό, προς παραγωγή ανάγοντων σακχάρων όπως γλυκόζη και φρουκτόζη. Η τάση αυτή του μικροοργανισμού να υδρολύει τον δισακχαρίτη από τις πρώτες ώρες της ζύμωσης είναι εμφανής στο ακόλουθο γράφημα (Σχήμα III.1.3.1.α.)



Σχήμα III.1.3.1.α. Κινητική εξέλιξης της βιομάζας (●), της κατανάλωσης ολικών σακχάρων (■), αναγόντων σακχάρων (□) και της παραγωγής ενδοκυτταρικού λίπους (▲) συναρτήσει του χρόνου για το στέλεχος *Cunninghamella echinulata*, σε εμπορική ζάχαρη χρησιμοποιούμενη ως μόνη πηγή άνθρακα, σε περιοριστικές σε άζωτο συνθήκες. Συνθήκες καλλιέργειας: ασυνεχής ζύμωση σε ανακινούμενες κωνικές φιάλες (180 grml) και θερμοκρασία 28 °C, αρχική συγκέντρωση ζάχαρης (S_0) 60 g/L, αρχική συγκέντρωση NH_4^+ 110 ± 15 ppm, υπό αερόβιες συνθήκες (συγκέντρωση διαλυμένου οξυγόνου $\text{DO}_2 > 50\%$).

Κατά την καλλιέργεια του *Cunninghamella echinulata* στην εμπορική ζάχαρη, ήταν εφικτή η μέτρηση της εξωκυτταρικής ενεργότητας του ενζύμου ιμπερτάσης. Η μέγιστη ενεργότητα διαπιστώθηκε περί τις 38-40h μετά τον εμβολιασμό και ήταν ίση με 0.5 U/ml (Σχήμα III.1.3.1.β).



Σχήμα III.1.3.1.β. Παραγωγή εξωκυτταρικής ινβερτάσης από τον μύκητα *Cunninghamella echinulata*. Συνθήκες καλλιέργειας: ασυνεχής ζύμωση σε ανακινούμενες κωνικές φιάλες (180 grm) και θερμοκρασία 28 °C, αρχική συγκέντρωση ζάχαρης (S_0) 60 g/L, αρχική συγκέντρωση NH_4^+ 110±15 ppm, υπό αερόβιες συνθήκες (συγκέντρωση διαλελυμένου οξυγόνου $DO_2 > 50\%$).

Κατά την περαιτέρω ανάλυση του μικροβιακού λίπους, διαπιστώθηκε ότι τα ποσοστά των λιπαρών οξέων εμφάνιζαν μια ενδιάμεση κατάσταση εν συγκρίσει με τα αντίστοιχα ποσοστά των λιπαρών οξέων στην εμπορική γλυκόζη και στην εμπορική φρουκτόζη. Αυτό, είναι ενδεικτικό του γεγονότος ότι στο υπόστρωμα της ζάχαρης, ο οργανισμός υδρολύει την σακχαρόζη, καταναλώνοντας τόσο γλυκόζη όσο και φρουκτόζη.

Πίνακας III.5. Σύσταση του μικροβιακού λίπους του *Cunninghamella echinulata*

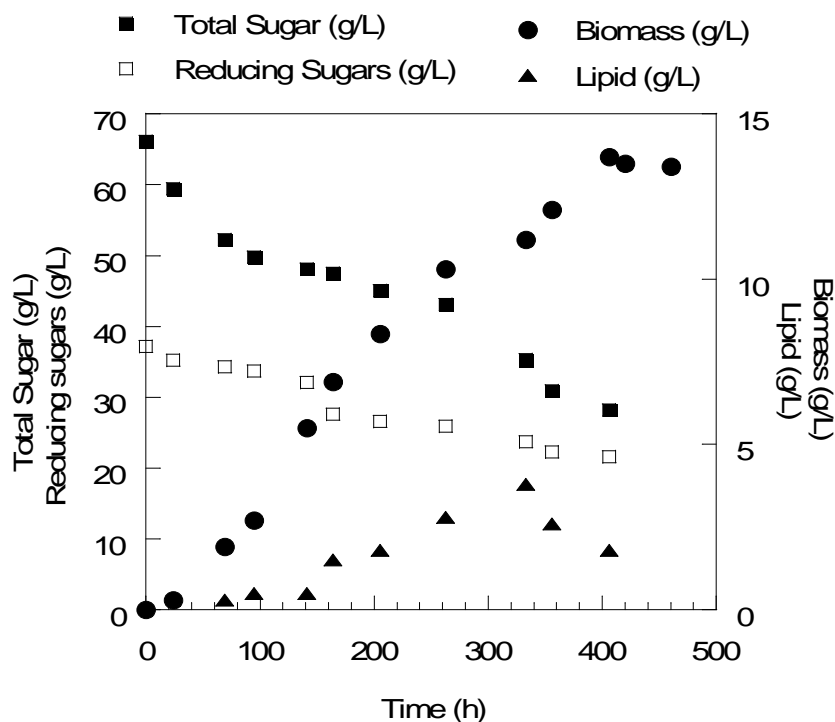
Φάση αύξησης	Χρόνος (h)	Λιπαρά Οξέα %						Λοιπά
		C 16:0	Δ^9 C 16:1	C 18:0	Δ^9 C18:1	$\Delta^{9,12}$ C18:2	$\Delta^{6,9,12}$ C18:3	
ME	184	2.1	1.2	9.1	56.2	15.1	14.2	2.1
LE	263	7.2	1.1	8.4	52.2	16.5	12.5	2.1
S	330	15.2	1.4	5.1	46.3	15.4	13.5	3.1

Συνθήκες καλλιέργειας: ασυνεχής ζύμωση σε ανακινούμενες κωνικές φιάλες (180 rpm) και θερμοκρασία 28 °C, αρχική συγκέντρωση ζάχαρης (S_0) 60 g/L, αρχική συγκέντρωση NH_4^+ 110±15 ppm, υπό αερόβιες συνθήκες (συγκέντρωση διαλυμένου οξυγόνου $\text{DO}_2 > 50\%$).

III.1.4. Καλλιέργεια του Ζυγομύκητα *Cunninghamella echinulata* στην μελάσα ($S_0=60$ g/L).

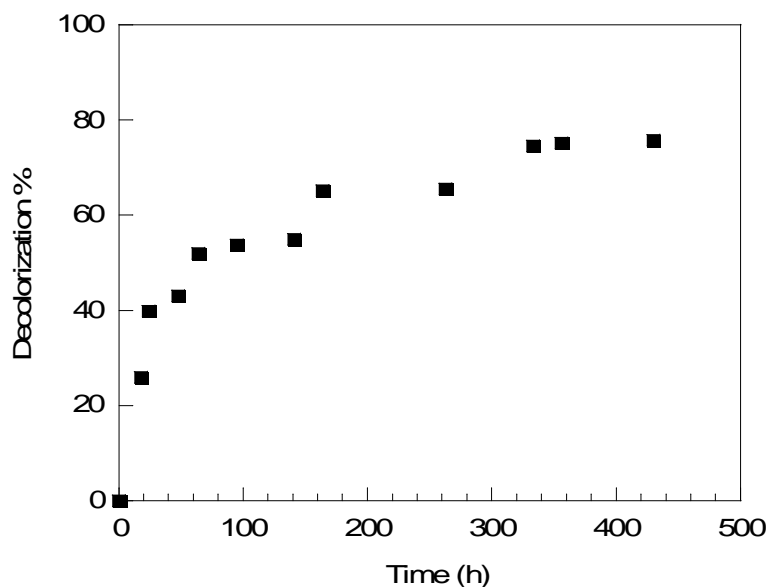
III.1.4.1. Κινητική της αύξησης, της κατανάλωσης υποστρώματος και της παραγωγής λίπους.

Ο μύκητας *Cunninghamella echinulata* παρουσίασε ικανοποιητική ανάπτυξη και κατά την καλλιέργεια του στην μελάσα. Η κινητική της αύξησης, της κατανάλωσης του υποστρώματος και της συσσώρευσης ενδοκυτταρικού λίπους δίδεται στο ακόλουθο σχήμα (Σχήμα III.1.4.1.α). Η μέγιστη παραγωγή βιομάζας ήταν 13.7 g/L, περί τις 406h μετά τον εμβολιασμό. Η μέγιστη συσσώρευση ενδοκυτταρικού λίπους ήταν 3.8 g/L, δίδοντας αντίστοιχο συντελεστή απόδοσης λίπους 0.32 g/g παραγόμενης βιομάζας. Ωστόσο, κατά την στάσιμη φάση του αυξητικού κύκλου, παρατηρείται αργός ρυθμός στην κατανάλωση του υποστρώματος και στροφή του μικροοργανισμού προς την κατανάλωση του ενδοκυτταρικού λίπους. Το φαινόμενο αυτό παρατηρείται μόνο στην μελάσα και όχι στα υπόλοιπα υποστρώματα που μελετήθηκαν. Σημειώνεται ότι ένα ποσοστό 30% της αρχικής συγκέντρωσης υποστρώματος παρέμεινε ακατανάλωτο μετά την ολοκλήρωση της ζύμωσης.



Σχήμα III.1.4.1.α. Κινητική εξέλιξης της βιομάζας (●), της κατανάλωσης ολικών σακχάρων (■), αναγόντων σακχάρων (□) και της παραγωγής ενδοκυτταρικού λίπους (▲) συναρτήσει του χρόνου για το στέλεχος *Cunninghamella echinulata*, σε μελάσα χρησιμοποιούμενη ως μόνη πηγή άνθρακα, σε περιοριστικές σε άζωτο συνθήκες. Συνθήκες καλλιέργειας: ασυνεχής ζύμωση σε ανακινούμενες κωνικές φιάλες (180 rpm) και θερμοκρασία 28 °C, αρχική συγκέντρωση μελάσας (S_0) 60 g/L, αρχική συγκέντρωση NH_4^+ 110 ± 15 ppm, υπό αερόβιες συνθήκες (συγκέντρωση διαλελυμένου οξυγόνου $DO_2 > 50\%$).

Επίσης, κατά την διάρκεια της ζύμωσης, παρατηρήθηκε αποχρωματισμός του θρεπτικού μέσου μελάσας κατά 75%, γεγονός που δεικνύει την δυνατότητα διάσπασης των μελανοϊδίων και των υπόλοιπων χρωστικών ουσιών, από τον μύκητα *Cunninghamella echinulata*. Στο γράφημα που ακολουθεί (Σχήμα III.1.4.1.β.) δίδεται σχηματικά η εξέλιξη του αποχρωματισμού κατά την διάρκεια της ζύμωσης.



Σχήμα 1.4.1.β. Εξέλιξη αποχρωματισμού του θρεπτικού μέσου μελάσας κατά την καλλιέργεια του μύκητα *Cunninghamella echinulata* στην μελάσα. Συνθήκες καλλιέργειας: ασυνεχής ζύμωση σε ανακινούμενες κωνικές φιάλες (180 grml) και θερμοκρασία 28 °C, αρχική συγκέντρωση μελάσας (S_0) 60 g/L, αρχική συγκέντρωση NH_4^+ 110±15 ppm, υπό αερόβιες συνθήκες (συγκέντρωση διαλυμένου οξυγόνου $DO_2 > 50\%$).

Εν συνεχεία, κατά την περαιτέρω ανάλυση του λίπους στον αέριο χρωματογράφο παρατηρείται μια αύξηση του παλμιτικού οξέος κατά το τέλος της εκθετικής φάσης, με ταυτόχρονη μείωση τόσο του λινελαϊκού, όσο και του γ-λινολενικού οξέος. Ωστόσο, κατά την στάσιμη φάση του αυξητικού κύκλου, τα ποσοστά αυτών των λιπαρών οξέων εξισορροπούνται στα ποσοστά που κατείχαν κατά το μέσο διάστημα της φάσης του αυξητικού κύκλου. Εν τούτοις, τα ποσοστά των λιπαρών οξέων σε αυτή την περίπτωση μάλλον προσομοιάζουν με τα αντίστοιχα κατά την καλλιέργεια του μύκητα στην εμπορική φρουκτόζη. Το γεγονός αυτό πιθανόν να οφείλεται στην μικρότερη αρχική συγκέντρωση αναγόντων σακχάρων που υπάρχουν στο εν λόγω υπόστρωμα, σε σχέση με την αντίστοιχη της εμπορικής φρουκτόζης.

Πίνακας III.6. . Σύσταση του μικροβιακού λίπους του *Cunninghamella echinulata*

Φάση αύξεσης	Χρόνος (h)	Λιπαρά Οξέα %						Λοιπά
		C 16:0	^{Δ9} C 16:1	C 18:0	^{Δ9} C18:1	^{Δ9,12} C18:2	^{Δ6,9,12} C18:3	
ME	184	19.1	2.1	8.2	40.3	18.1	10.3	1.9
LE	330	23	2.3	2.7	48.4	13.3	8.3	2.2
S	406	17.5	1.4	5.5	48.6	14.1	11.3	1.6

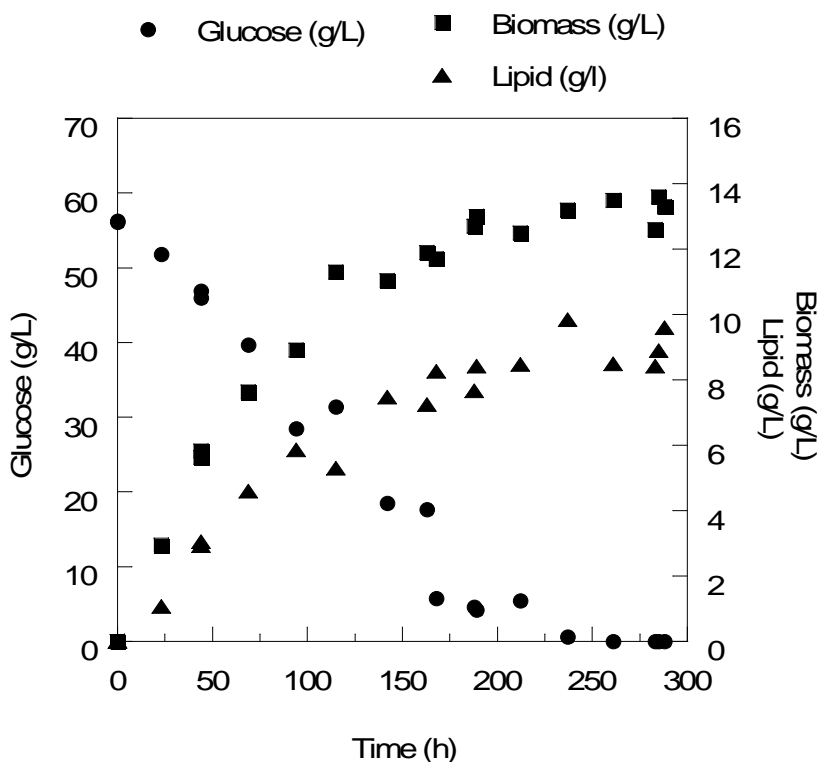
Συνθήκες καλλιέργειας: ασυνεχής ζύμωση σε ανακινούμενες κωνικές φιάλες (180 g/ml) και θερμοκρασία 28 °C, αρχική συγκέντρωση μελάσας (S₀) 60 g/L, αρχική συγκέντρωση NH₄⁺ 110±15 ppm, υπό αερόβιες συνθήκες (συγκέντρωση διαλελυμένου οξυγόνου DO₂>50%).

III.2.1 Καλλιέργεια του Ζυγομύκητα *Mortierella isabellina* σε εμπορική γλυκόζη (S₀=60 g/L)

III.2.1.1 Κινητική της αύξεσης, της κατανάλωσης υποστρώματος και της παραγωγής λίπους.

Κατά την καλλιέργεια του στην εμπορική γλυκόζη, ο μύκητας *Mortierella isabellina* εμφάνισε ικανοποιητική κυτταρική ανάπτυξη και αξιόλογη συσσώρευση ενδοκυτταρικού λίπους. Πιο συγκεκριμένα, η μέγιστη παραγωγή βιομάζας ήταν 13.2 g/L, με μέγιστη συσσώρευση λίπους 9.85 g/L, δίδοντας έναν υψηλό συντελεστή απόδοσης λίπους (Y_{L/X}), ήτοι 0.74 g/g παραγόμενης βιομάζας. Επίσης, η μέγιστη τιμή για την παραγωγή του γ-λινολενικού οξέος ήταν 345 mg/L. Η κινητική αύξεσης, κατανάλωσης υποστρώματος και παραγωγής λίπους για τον *Mortierella isabellina* στο εν λόγω υπόστρωμα δίδεται σχηματικά στο παρακάτω γράφημα (III.2.1.1.α.).

Και σε αυτή την περίπτωση, όπως άλλωστε ήταν αναμενόμενο, η έναρξη της συσσώρευσης ενδοκυτταρικού λίπους ξεκίνησε μετά την εξάντληση του αμμωνιακού αζώτου στο μέσο της καλλιέργειας. Ο μύκητας *Mortierella isabellina* κατανάλωσε μέχρι τέλους την πηγή άνθρακα, περίπου 250h μετά τον εμβολιασμό.



Γράφημα III.2.1.1.α. Κινητική εξέλιξης της βιομάζας (■), της κατανάλωσης υποστρώματος (●) και της παραγωγής ενδοκυτταρικού λίπους (▲) συναρτήσει του χρόνου για το στέλεχος *Mortierella isabellina*, σε εμπορική γλυκόζη χρησιμοποιούμενη ως μόνη πηγή άνθρακα, σε περιοριστικές σε άζωτο συνθήκες. Συνθήκες καλλιέργειας: ασυνεχής ζύμωση σε ανακινούμενες κωνικές φιάλες (180 g/ml) και θερμοκρασία 28 °C, αρχική συγκέντρωση γλυκόζης (S_0) 60 g/L, αρχική συγκέντρωση NH_4^+ 110±15 ppm, υπό αερόβιες συνθήκες (συγκέντρωση διαλελυμένου οξυγόνου $\text{DO}_2 > 50\%$).

Στην συνέχεια πραγματοποιήθηκε μεθυλίωση του μικροβιακού λίπους και ανάλυση στον αέριο χρωματογράφο. Από τον ακόλουθο πίνακα των αποτελεσμάτων, διαπιστώνεται ότι το ποσοστό του γ-λινολενικού οξέος δεν ξεπέρασε το 3.5% (w/w). Επίσης, κατά το τέλος της εκθετικής φάσης ανάπτυξης, το ποσοστό του παλμιτικού οξέος (C16:0) μειώνεται, ενώ παράλληλα αυξάνεται ποσοστό τόσο του ελαϊκού ($\Delta^9\text{C18:1}$) όσο και του λινελαϊκού οξέος ($\Delta^{9,12}\text{C18:2}$). Ωστόσο, κατά την στάσιμη φάση ανάπτυξης τα ποσοστά των προαναφερθέντων λιπαρών οξέων τείνουν να εξισορροπηθούν ως προς τα αντίστοιχα της εκθετικής φάσης ανάπτυξης.

Πίνακας III.7. Σύσταση του μικροβιακού λίπους του μύκητα *Mortierella isabellina*

Φάση αύξησης	Χρόνος (h)	Λιπαρά Οξέα %						Λοιπά
		C 16:0	Δ^9 C 16:1	C 18:0	Δ^9 C18:1	$\Delta^{9,12}$ C18:2	$\Delta^{6,9,12}$ C18:3	
ME	94	38.8	2.6	4.6	43.5	4.7	1.7	4.1
	168	28.5	3.2	2.5	53.4	7.2	1.1	4.1
LE	189	25.1	3.3	2.1	56.5	10.3	1.5	1.2
	212	16.4	2.8	1.7	60.6	13.1	2.9	2.5
S	283	28.1	3.3	3.1	53.3	7.2	3.5	1.5

Συνθήκες καλλιέργειας: ασυνεχής ζύμωση σε ανακινούμενες κωνικές φιάλες (180 grml) και θερμοκρασία 28 °C, αρχική συγκέντρωση εμπορικής γλυκόζης (S₀) 60 g/L, αρχική συγκέντρωση NH₄⁺ 110±15 ppm, υπό αερόβιες συνθήκες (συγκέντρωση διαλελυμένου οξυγόνου DO₂>50%).

Ακολούθησε περαιτέρω ανάλυση του μικροβιακού λίπους με την κλασμάτωση του στα επιμέρους κλάσματα των ουδέτερων λιπιδίων, σφιγγολιπιδίων-γλυκολιπιδίων και φωσφολιπιδίων. Συμπεραίνεται ότι το κλάσμα των ουδέτερων λιπιδίων ομοιάζει στην σύσταση με αυτό του ολικού λίπους. Ακόμη, το πολικό κλάσμα των λιπιδίων, αυτό των φωσφολιπιδίων, φαίνεται να είναι πιο ακόρεστο σε σχέση με τα υπόλοιπα κλάσματα του μικροβιακού λίπους του *Mortierella isabellina*.

Πίνακας III.8.. Σύσταση των λιπαρών οξέων των κλασμάτων του μικροβιακού λίπους του *Mortierella isabellina*

Λίπος	Λιπαρά Οξέα %					
	C 16:0	Δ^9 C 16:1	C 18:0	Δ^9 C18:1	$\Delta^{9,12}$ C18:2	$\Delta^{6,9,12}$ C18:3
Total Lipid	28.5	3.2	2.5	53.4	7.2	1.1
NL	30.3	3.1	3.2	52.6	6.8	1.9
G+S	37.5	2.3	9.4	40.9	5.8	1.7
P	27.6	3.4	14.2	46.5	6.3	2.1

NL: Κλάσμα ουδέτερων λιπιδίων

G+S: Κλάσμα σφιγγολιπιδίων-γλυκολιπιδίων

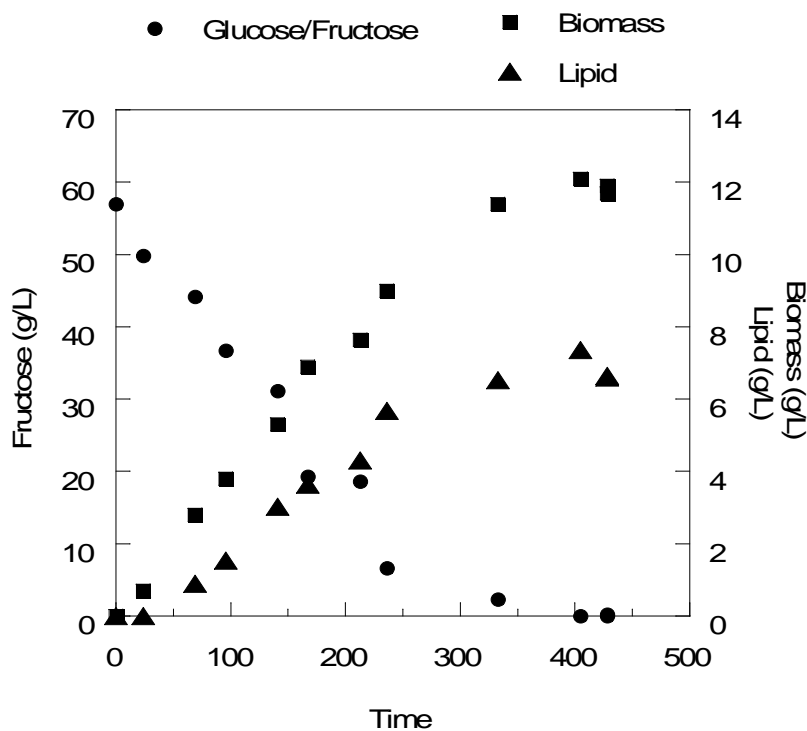
P: Κλάσμα φωσφολιπιδίων

Συνθήκες καλλιέργειας: ασυνεχής ζύμωση σε ανακινούμενες κωνικές φιάλες (180 grml) και θερμοκρασία 28 °C, αρχική συγκέντρωση εμπορικής γλυκόζης (S₀) 60 g/L, αρχική συγκέντρωση NH₄⁺ 110±15 ppm, υπό αερόβιες συνθήκες (συγκέντρωση διαλελυμένου οξυγόνου DO₂>50%).

III.2.2. Καλλιέργεια του Ζυγομύκητα *Mortierella isabellina* σε εμπορική φρουκτόζη ($S_0=60$ g/L)

III.2.2.1. Κινητική της αύξησης, της κατανάλωσης υποστρώματος και της παραγωγής λίπους.

Ο μύκητας *Mortierella isabellina* ικανοποιήθηκε ικανοποιητικά στο υπόστρωμα του εν λόγω μονοσακχαρίτη. Και σε αυτή την περίπτωση ο *Mortierella isabellina* κατανάλωσε μέχρι τέλος την πηγή άνθρακα, αποδίδοντας 12.1 g/L βιομάζας και 7.36 g/L λίπους. Η μέγιστη συγκέντρωση γ-λινολενικού οξέος ήταν 110 mg/L. Στο ακόλουθο γράφημα δίδονται τα σημεία της κινητικής του εν λόγω μύκητα, κατά την ανάπτυξη του στην εμπορική φρουκτόζη.



Γράφημα III.2.2.1.α. Κινητική εξέλιξης της βιομάζας (■), της κατανάλωσης υποστρώματος (●) και της παραγωγής ενδοκυτταρικού λίπους (▲) συναρτήσει του χρόνου για το στέλεχος *Mortierella isabellina*, σε εμπορική φρουκτόζη χρησιμοποιούμενη ως μόνη πηγή άνθρακα, σε περιοριστικές σε άζωτο συνθήκες. Συνθήκες καλλιέργειας: ασυνεχής ζύμωση σε ανακινούμενες κωνικές φιάλες (180 rpm) και θερμοκρασία 28 °C, αρχική συγκέντρωση φρουκτόζης (S_0) 60 g/L, αρχική συγκέντρωση NH_4^+ 110±15 ppm, υπό αερόβιες συνθήκες (συγκέντρωση διαλελυμένου οξυγόνου $\text{DO}_2 > 50\%$).

Αξίζει να σημειωθεί, ότι μετά την εξάντληση της πηγής άνθρακα στο μέσο της καλλιέργειας, ο μικροοργανισμός φαίνεται να ανακατανάλωσε ένα τμήμα του ενδοκυτταρικού λίπους, χρησιμοποιώντας το ως πηγή ενέργειας.

Ακολούθως, κατά την ανάλυση των λιπιδίων για κάθε στάδιο του αυξητικού κύκλου του μικροοργανισμού, διαπιστώνεται μείωση του παλμιτικού οξέος (C16:0) και του στεατικού οξέος (C18:0), αύξηση του λινελαϊκού ($\Delta^{9,12}$ C18:2) και του γ-λινολενικού οξέος ($\Delta^{6,9,12}$ C18:3), ενώ το ποσοστό του ελαϊκού οξέος (Δ^9 C18:2) εμφανίζει τάση σταθεροποίησης κατά την στάσιμη φάση του αυξητικού κύκλου.

Πίνακας III.9 Σύσταση του μικροβιακού λίπους του μύκητα *Mortierella isabellina*

		Λιπαρά Οξέα %						
Φάση	Χρόνος (h)	C 16:0	Δ^9 C 16:1	C 18:0	Δ^9 C18:1	$\Delta^{9,12}$ C18:2	$\Delta^{6,9,12}$ C18:3	Λοιπά
αύξησης								
ME	167	33.2	2.5	4.1	50.4	6.3	1.6	1.9
LE	332	38.2	2.6	3.2	46.5	5.2	1.4	2.9
S	405	28.5	3.8	2.2	51.3	9.6	2.5	2.1

Συνθήκες καλλιέργειας: ασυνεχής ζύμωση σε ανακινούμενες κωνικές φιάλες (180 grm) και θερμοκρασία 28 °C, αρχική συγκέντρωση εμπορικής φρουκτόζης (S₀) 60 g/L, αρχική συγκέντρωση NH₄⁺ 110±15 ppm, υπό αερόβιες συνθήκες (συγκέντρωση διαλελυμένου οξυγόνου DO₂>50%).

Τέλος, κατά την κλασμάτωση του μικροβιακού λίπους, διαπιστώνεται και σε αυτή την περίπτωση η προσομοιάζουσα σύσταση μεταξύ του ουδέτερου κλάσματος και των ολικών λιπιδίων καθώς και συγκριτικά πιο ακόρεστη σύσταση του κλάσματος των φωσφολιπιδίων.

Πίνακας III.10. Σύσταση λιπαρών οξέων των επιμέρους λιπαρών οξέων του *Mortierella isabellina*.

Λίπος	Λιπαρά Οξέα %					
	C 16:0	Δ^9 C 16:1	C 18:0	Δ^9 C18:1	$\Delta^{9,12}$ C18:2	$\Delta^{6,9,12}$ C18:3
Total Lipid	33.2	2.5	4.1	50.4	6.3	1.6
NL	37.2	2.6	4.7	47.1	6.5	1.2
G+S	35.1	1.4	12.2	45.1	4.2	1.5
P	20.1	2.1	8.2	51.3	12.1	4.2

NL: Κλάσμα ουδέτερων λιπιδίων

G+S: Κλάσμα σφιγγολιπιδίων-γλυκολιπιδίων

P: Κλάσμα φωσφολιπιδίων

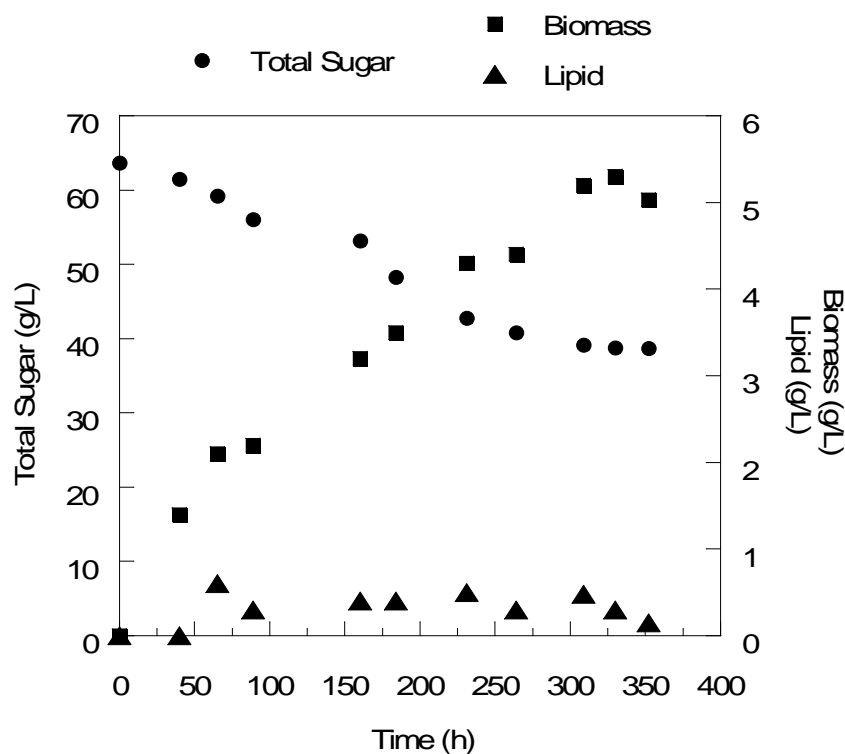
Συνθήκες καλλιέργειας: ασυνεχής ζύμωση σε ανακινούμενες κωνικές φιάλες (180 g/ml) και θερμοκρασία 28 °C, αρχική συγκέντρωση εμπορικής φρουκτόζης (S_0) 60 g/L, αρχική συγκέντρωση NH_4^+ 110±15 ppm, υπό αερόβιες συνθήκες (συγκέντρωση διαλυμένου οξυγόνου $\text{DO}_2 > 50\%$).

III.2.3. Καλλιέργεια του Ζυγομύκητα *Mortierella isabellina* σε εμπορική ζάχαρη ($S_0=60$ g/L)

III.2.3.1. Κινητική της αύξησης, της κατανάλωσης υποστρώματος και της παραγωγής λίπους.

Σε αντίθεση με τα υπόλοιπα υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάπτυξη του *Mortierella isabellina*, η εμπορική ζάχαρη δεν αποτέλεσε κατάλληλο υπόστρωμα ανάπτυξης για τον εν λόγω μύκητα (Σχήμα III.2.3.1.α.). Συγκεκριμένα, κατά την καλλιέργεια του στην εμπορική ζάχαρη, ο μύκητας *Mortierella isabellina* παρήγαγε 5.2 g/L βιομάζας, με ελάχιστη ποσότητα ενδοκυτταρικού λίπους και γ-λινολενικού οξέος (0.48 g/L λίπος και 32 mg/L GLA). Μόνο το 30% της αρχικής συγκέντρωσης του υποστρώματος καταναλώθηκε, ενώ η μη ύπαρξη ανάγοντων σακχάρων στο υπόστρωμα δεικνύει την άμεση κατανάλωση του υδρολυόμενου υποστρώματος από τον μικροοργανισμό. Μεταξύ άλλων, στην μικρή κατανάλωση του υποστρώματος συνέβαλε και η διαπίστωση της αμελητέας ενεργότητας της εξωκυτταρικής ιμβερτάσης.

Εξαιτίας της αμελητέας παραγωγής ενδοκυτταρικού λίπους, κρίθηκε ως μη σκόπιμη η περαιτέρω ανάλυση και κλασμάτωση των λιπιδίων του μύκητα σε αυτό το υπόστρωμα ανάπτυξης.



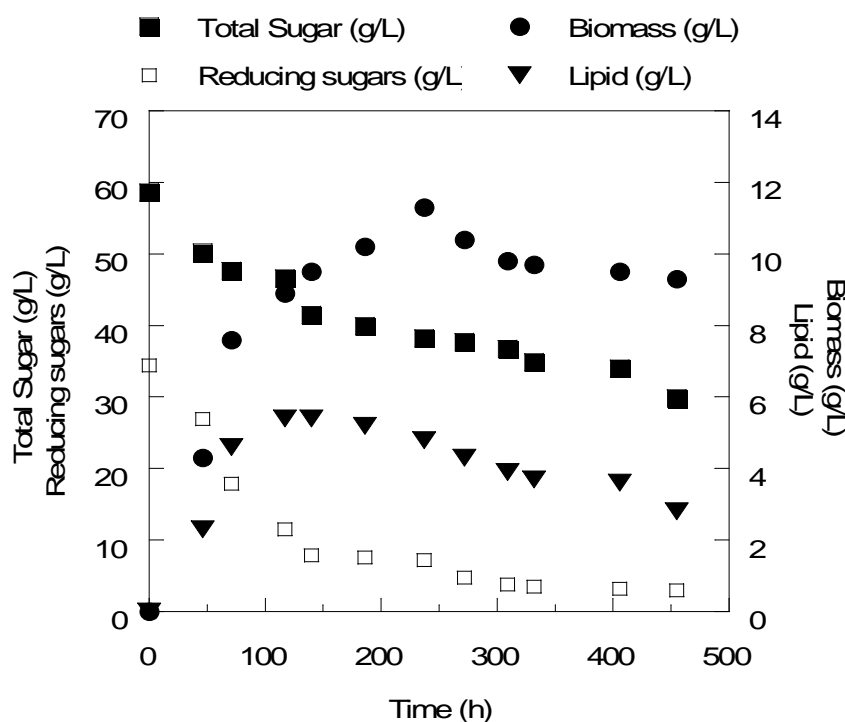
Γράφημα III.2.3.1.α. Κινητική εξέλιξης της βιομάζας (■), της κατανάλωσης υποστρώματος (●) και της παραγωγής ενδοκυτταρικού λίπους (▲) συναρτήσει του χρόνου για το στέλεχος *Mortierella isabellina*, σε εμπορική ζάχαρη χρησιμοποιούμενη ως μόνη πηγή άνθρακα, σε περιοριστικές σε άζωτο συνθήκες. Συνθήκες καλλιέργειας: ασυνεχής ζύμωση σε ανακινούμενες κωνικές φιάλες (180 g/ml) και θερμοκρασία 28 °C, αρχική συγκέντρωση ζάχαρης (S_0) 60 g/L, αρχική συγκέντρωση NH_4^+ 110±15 ppm, υπό αερόβιες συνθήκες (συγκέντρωση διαλελυμένου οξυγόνου $\text{DO}_2 > 50\%$).

III.2.4. Καλλιέργεια του Ζυγομύκητα *Mortierella isabellina* στη μελάσα ($S_0=60$ g/L)

III.2.4.1. Κινητική της αύξησης, της κατανάλωσης υποστρώματος και της παραγωγής λίπους.

Ο ζυγομύκητας *Mortierella isabellina* παρουσίασε ικανοποιητική ανάπτυξη στο υπόστρωμα της μελάσας. Συγκεκριμένα, ο μύκητας παρήγαγε 11.3 g/L βιομάζας και 4.8 g/L λίπος με 168 mg/L γ-λινολενικού οξέος. Η ύπαρξη σημαντικής ποσότητας ανάγοντων σακχάρων (34 g/L) στο υπόστρωμα της μελάσας, αποτέλεσε την κύρια

πηγή άνθρακα για την ανάπτυξη του μύκητα. Αυτό άλλωστε δεικνύει και η μέτρησή αμελητέας ενεργότητας της εξωκυτταρικής ιμβερτάσης στο εν λόγω υπόστρωμα. Μόλις η ποσότητα των ανάγοντων σακχάρων εξαντλήθηκε από το μέσο ανάπτυξης, ο *Mortierella isabellina* στράφηκε προς την κατανάλωση της σακχαρόζης, αλλά με αρκετά αργό ρυθμό, γεγονός που συνετέλεσε στην ανακατανάλωση ποσότητας του ενδοκυτταρικού λίπους.



Γράφημα III.2.4.1.α. Κινητική εξέλιξης της βιομάζας (●), της κατανάλωσης ολικών σακχάρων (■), ανάγοντων σακχάρων (□) και της παραγωγής ενδοκυτταρικού λίπους (▼) συναρτήσει του χρόνου για το στέλεχος *Mortierella isabellina*, σε μελάσα χρησιμοποιούμενη ως μόνη πηγή άνθρακα, σε περιοριστικές σε άζωτο συνθήκες. Συνθήκες καλλιέργειας: ασυνεχής ζύμωση σε ανακινούμενες κωνικές φιάλες (180 grml) και θερμοκρασία 28 °C, αρχική συγκέντρωση μελάσας (S_0) 60 g/L, αρχική συγκέντρωση NH_4^+ 110±15 ppm, υπό αερόβιες συνθήκες (συγκέντρωση διαλελυμένου οξυγόνου $\text{DO}_2 > 50\%$).

Ακολούθως, πραγματοποιήθηκε ανάλυση των ενδοκυτταρικών λιπιδίων του μύκητα. Η σύσταση του εν λόγω λίπους ομοιάζει με την ανάλογη σύσταση του λίπους κατά την καλλιέργεια του μύκητα στην γλυκόζη, κυρίως ως προς το παλμιτικό, το λινελαϊκό και το γ-λινολενικό οξύ.

Πίνακας III.11 Σύσταση λιπαρών οξέων του μικροβιακού λίπους του *Motrierella isabellina*

Φάση αύξησης	Χρόνος (h)	Λιπαρά Οξέα %						Λοιπά
		C 16:0	Δ^9 C 16:1	C 18:0	Δ^9 C18:1	$\Delta^{9,12}$ C18:2	$\Delta^{6,9,12}$ C18:3	
ME	140	29.1	2.1	3.8	51.2	10.1	2.1	1.5
LE	332	22.3	1.7	5.5	48.5	16.4	3.3	2.3
S	406	23.1	2.2	2.4	51.4	15.2	3.5	2.2

Συνθήκες καλλιέργειας: ασυνεχής ζύμωση σε ανακινούμενες κωνικές φιάλες (180 γρm) και θερμοκρασία 28 °C, αρχική συγκέντρωση μελάσας (S_0) 60 g/L, αρχική συγκέντρωση NH_4^+ 110±15 ppm, υπό αερόβιες συνθήκες (συγκέντρωση διαλελυμένου οξυγόνου $DO_2 > 50\%$).

Τέλος, κατά την κλασμάτωση των λιπιδίων του μύκητα, και σε αυτή την περίπτωση το κλάσμα των φωσφολιπιδίων ήταν πιο ακόρεστο σε σχέση με αυτά των ουδέτερων λιπιδίων και των σφιγγολιπιδίων-γλυκολιπιδίων.

Πίνακας III.12. Σύσταση σε λιπαρά οξέα των κλασμάτων του μικροβιακού λίπους του μύκητα *Mortierella isabellina*.

Λίπος	Λιπαρά Οξέα %					
	C 16:0	Δ^9 C 16:1	C 18:0	Δ^9 C18:1	$\Delta^{9,12}$ C18:2	$\Delta^{6,9,12}$ C18:3
Total Lipid	29.1	2.1	3.8	51.2	10.1	2.1
NL	33.1	2.2	5.4	50.1	6.8	1.3
G+S	43.5	1.8	14.6	33.4	3.8	1.9
P	32.1	2.1	15.7	36.4	10.2	2.8

NL: Κλάσμα ουδέτερων λιπιδίων

G+S: Κλάσμα σφιγγολιπιδίων-γλυκολιπιδίων

P: Κλάσμα φωσφολιπιδίων

Συνθήκες καλλιέργειας: ασυνεχής ζύμωση σε ανακινούμενες κωνικές φιάλες (180 γρm) και θερμοκρασία 28 °C, αρχική συγκέντρωση μελάσας (S_0) 60 g/L, αρχική συγκέντρωση NH_4^+ 110±15 ppm, υπό αερόβιες συνθήκες (συγκέντρωση διαλελυμένου οξυγόνου $DO_2 > 50\%$).

IV. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η μελέτη των λιπιδίων αποτελεί ένα πολύ σημαντικό κομμάτι στη μελέτη της φυσιολογίας και της βιοχημείας των μικροοργανισμών λόγω των πολλαπλών και εξόχως ουσιωδών ρόλων τον οποίο δύνανται να παίξουν τα λιπίδια στο μικροβιακό κύτταρο. Ειδικότερα, τα λιπίδια των μυκήτων αποτελούν δομικούς λίθους των μεμβρανών και του κυτταρικού τοιχώματος, αποθησαυριστικά μόρια και σε κάποιες περιπτώσεις εξω-κυτταρικά προϊόντα (Losel 1989). Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη της βιο-φυσιολογικής συμπεριφοράς (ήτοι η διερεύνηση των βιοκινητικών παραμέτρων της μικροβιακής αύξησης, η παραγωγή του κυτταρικού υλικού, η κατανάλωση του υποστρώματος, η συσσώρευση και ενίοτε η αποικοδόμηση του μικροβιακού λίπους, η σύσταση σε λιπαρά οξέα του κυτταρικού λίπους καθώς και ενίοτε η ενδεδειγμένη μελέτη αυτού) των Ζυγομυκήτων, *Cunninghamella echinulata* και *Mortierella isabellina* κατά την αύξηση τους σε σακχαρούχα ανανεώσιμα υλικά. Το ενδιαφέρον της παρούσας μελέτης εστιάστηκε κυρίως στη δυναμική συσσώρευσης ενδοκυτταρικών μικροβιακών λιπιδιακών αποθεμάτων από τους ανωτέρω μύκητες, καθόσον η ερευνητική μας ομάδα έχει δείξει ότι οι μικροοργανισμοί αυτοί μπορούν, καλλιεργούμενοι σε πληθώρα ανανεώσιμων υποστρωμάτων, να παράξουν υψηλές ποσότητες μικροβιακού λίπους το οποίο περιέχει σε αξιοσημείωτα (ενίοτε) ποσά το φαρμακευτικώς και διατροφικώς ιδιαίτερος σημαντικό γ-λινολενικό οξύ (Papanikolaou et al. 2004a; b; 2007; Fakas 2007; Fakas et al. 2006; 2007; 2008). Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η βιοχημική απόκριση των Ζυγομυκήτων *Cunninghamella echinulata* και *Mortierella isabellina* στην εμπορική γλυκόζη, εμπορική φρουκτόζη, εμπορική ζάχαρη και μελάσα. Σε κάθε περίπτωση, η αρχική συγκέντρωση της πηγής άνθρακα ήταν 60 g/L, ενώ το άζωτο συνιστούσε τον περιοριστικό παράγοντα της αύξησης ώστε να κατευθυνθεί ο κυτταρικός μεταβολισμός προς την σύνθεση μικροβιακού λίπους (λόγος C/N 200 moles/moles) (Moreton 1988; Ratledge 1994; 2005; Αγγελής 2007).

Ο μύκητας *Cunninghamella echinulata* παρουσίασε ικανοποιητική κυτταρική ανάπτυξη κατά την καλλιέργειά του στην εμπορική γλυκόζη, με μέγιστη βιομάζα 12.9 g/L, συσσωρεύοντας 3.8 g/L λίπος. Το συνολικό λίπος επί ξηράς ουσίας το

οποίο συσσωρεύτηκε κατά την καλλιέργεια στη γλυκόζη ήταν περί το 35-40% κ. β. Θα πρέπει να σημειωθεί επίσης ότι η καλλιέργεια στη γλυκόζη δεν συνοδεύτηκε από εξάντληση του σακχάρου στο μέσο της καλλιέργειας (σε συμφωνία με τους Gema et al. 2002) ενώ δεν παρατηρήθηκε και ανακατανάλωση του μικροβιακού λίπους κατά τη στάσιμη φάση του αυξητικού κύκλου, προφανώς λόγω του γεγονότος ότι πέρα από την έλλειψη αζώτου (συνθήκη ικανή και αναγκαία για τη *de novo* σύνθεση λίπους από σακχαρούχα υλικά – Ratledge 1994; 2005; Αγγελής 2007) υπήρχε και έλλειψη άλλου ή άλλων συστατικών (multiple limitation) η οποία προφανώς προκαλούσε αναστολή (repression) στο βιοχημικό μονοπάτι αποικοδόμησης των συσσωρευθέντων λιπιδίων (ενδο-κυτταρικές λιπάσες, ακυλ-SCoA οξειδάσες, ένζυμα του γλυοξολικού by-pass – Papanikolaou et al. 2004b). Κατά την αύξηση στη γλυκόζη παρατηρήθηκε και η μέγιστη παραγωγή γ-λινολενικού οξέος στην παρούσα μελέτη, ίση με 740 mg/L. Με βάση την βιβλιογραφία, η εν λόγω ποσότητα GLA είναι αρκετά υψηλή και μεγαλύτερη συγκρινόμενη με τα αποτελέσματα από τα στελέχη *R. arrizus* (400 mg/L – Kristofikova et al. 1991), *M. ramanniana* (437 mg/L- Hannson and Dostalek, 1988), καθώς επίσης και από στελέχη Ζυγομυκήτων όπως *Mucor mucedo* (373 mg/L – Certik et al. 1997). Ωστόσο, το στέλεχος *C. echinulata* CCRC 31840 παρήγαγε έως 964 mg/L μετά από αριστοποίηση των συνθηκών καλλιέργειας (Chen and Chang 1996), ενώ με επιπρόσθετη αριστοποίηση του εμβολίου, το ίδιο στέλεχος παρήγαγε 1349 mg/L, μετά την 5^η μέρα της καλλιέργειας (Chen and Chang, 1997). Θα πρέπει να σημειωθεί ότι ο ίδιος Ζυγομύκητας (*C. echinulata* ATHUM 4411), κατά την αύξηση του σε υδρολυμένα παραπροϊόντα τομάτας εμπλουτισμένα με εμπορική γλυκόζη (αρχική συγκέντρωση σακχάρων 100 g/L) παρήγαγε σημαντική ποσότητα λίπους (7.8 g/L λιπιδίων) και γ-λινολενικού οξέος (περί τα 800 mg/L) (Fakas et al. 2007). Μέχρι τη στιγμή αυτή, η πιο μεγάλη παραγωγή GLA ανά L καλλιέργειας έχει αναφερθεί για ένα μεταλλαγμένο (mutant) στέλεχος του μύκητα *Mortierella ramanniana*, το οποίο καλλιεργήθηκε σε ριδικό βιοαντιδραστήρα παράγοντας 5.5 g/L γ-λινολενικού οξέος (Hiruta et al. 1997).

Ο έτερος Ζυγομύκητας που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία, ο *Mortierella isabellina* αναπτύχθηκε εξίσου ικανοποιητικά στην εμπορική γλυκόζη, με μέγιστη βιομάζα 12.2 g/L και λίπος 9.85 g/L (συντελεστής απόδοσης παραγωγής

λίπους 0.74 g/g παραγόμενης βιομάζας). Και σε αυτή την περίπτωση, η μέγιστη παραγωγή γ-λινολενικού οξέος από τον *Mortierella isabellina* παρατηρήθηκε κατά την καλλιέργειά του στην εμπορική γλυκόζη, φτάνοντας τα 345 mg/L. Η μέγιστη παραγωγή λίπους που παρατηρήθηκε από το Ζυγομύκητα *Mortierella isabellina* (ήτοι 9.85 g/L) είναι ιδιαίτερος ικανοποιητική. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι ο ίδιος μύκητας παρήγαγε περί τα 18 g/L λίπους όταν καλλιεργήθηκε σε υποστρώματα υψηλής συγκέντρωσης γλυκόζης, ενώ συγκεντρώσεις λιπιδίων μεγαλύτερες των 10 g/L θεωρούνται ιδιαίτερα ικανοποιητικές στη βιβλιογραφία (Ratledge 1994). Στον πίνακα IV.1. εμφανίζονται συγκριτικά αποτελέσματα παραγωγής μικροβιακού λίπους από ελαιογόνους Ζυγομύκητες.

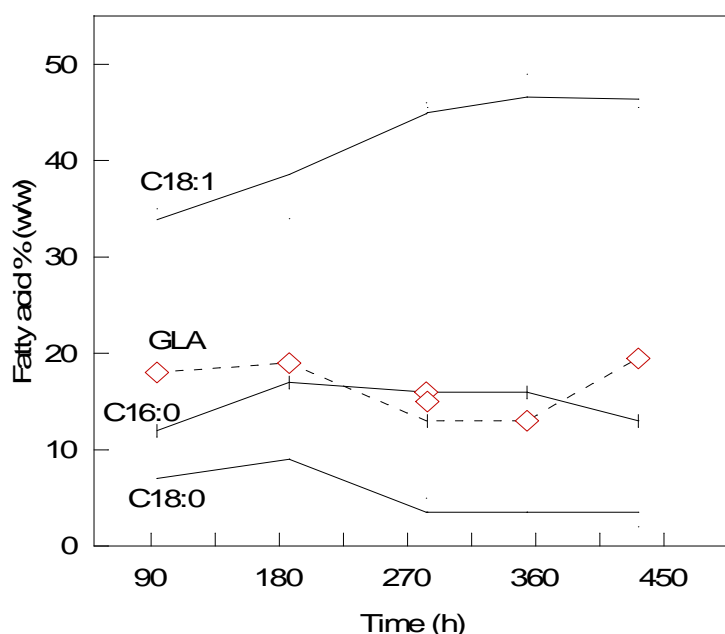
Πίνακας IV.1. Παραγωγή λίπους και γ-λινολενικού οξέος (GLA) από διάφορα στελέχη μυκήτων

Μύκητας	Είδος Ζύμωσης	Υπόστρωμα	L (g/l)	Y _{LX} (g/g)	GLA mg/l	Αναφορά
<i>M. circinelloides</i>	Batch	Glucose	4.5	0.73	216	Aggelis et al. 1988
<i>M. ramanianna</i>	Batch	Glucose	3.6	0.24	437	Hansson and Dostalek 1988
<i>M. rouxii</i>	Continuous	Glucose	1.0	0.07	324	Hansson et al. 1989
<i>C. echinulata</i>	Batch	Starch	8.0	0.27	964	Chen and Chang 1996
<i>M. mucedo</i>	Batch	Glucose/Oil	12.0	0.62	379	Certik et al. 1997
<i>C. echinulata</i>	Batch	Glucose/Oil	10.6	0.58	373	Certik et al. 1997
<i>C. echinulata</i>	Batch	Starch	11.5	0.30	1349	Chen and Liu 1997
<i>M. ramanniana</i>	Fed-batch	Glucose	31.3	0.50	5501	Hiruta et al. 1997
<i>M. circinelloides</i>	Fed-batch	Acetic acid	2.6	0.11	505	Immelman et al. 1997
<i>Z. moelleri</i>	Batch	Glucose	1.2	0.15	182	Kavadia et al. 2001
<i>C. echinulata</i>	Batch	Glucose	4.4	0.49	721	Gema et al. 2002
<i>M. isabellina</i>	Batch	Glucose	18.1	0.50	801	Papanikolaou et al. 2004a
<i>C. echinulata</i>	Batch	Tomato-waste	7.8	0.31	800	Fakas et al. 2007
<i>C. echinulata</i>	Batch	Glucose	3.8	0.29	740	Παρούσα μελέτη
<i>M. isabellina</i>	Batch	Glucose	9.85	0.74	345	Παρούσα μελέτη

Πρέπει να τονιστεί ότι το γ-λινολενικό οξύ αποτελεί φυλογενετικό χαρακτηριστικό για την τάξη των Mucorales, στην οποία ανήκουν και οι δύο μικροοργανισμοί που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη. Ωστόσο, για τους εν λόγω Ζυγομύκητες έχει παρατηρηθεί στην βιβλιογραφία ότι τα στελέχη που δύνανται να συσσωρεύσουν μεγάλες ποσότητες ενδοκυτταρικού λίπους, παράγουν σχετικά μικρές ποσότητες γ-λινολενικού οξέος, ενώ αντίστροφα τα στελέχη που συσσωρεύουν μικρές ποσότητες λίπους, παράγουν μεγάλες ποσότητες GLA (Chen and Chang, 1996; Certik and Shimizu 1999; Kavadia et al. 2001; Dyal et al. 2005). Το γεγονός αυτό πιθανόν να οφείλεται στην ανάγκη των μικροοργανισμών που παράγουν λίπος με χαμηλή συγκέντρωση γ-λινολενικού οξέος, να συσσωρεύουν μεγαλύτερες ποσότητες ενδοκυτταρικού λίπους προκειμένου να μπορούν να συνθέσουν την αναγκαία ποσότητα GLA για την ομαλή λειτουργία της κυτταρικής τους μεμβράνης (Aggelis et al 1990; Kavadia et al. 2001). Παρόλα ταύτα, τα στελέχη που είναι ικανά να παράγουν υψηλές ποσότητες λίπους μπορούν να αποδειχθούν χρήσιμα για την αξιοποίηση διαφόρων γεωργο-βιομηχανικών υπολειμμάτων με υψηλή συγκέντρωση σακχάρων, αφομοιώνοντας τα για την παραγωγή λιπιδίων σπανίως απαντώμενης σύστασης (PUFAs ή λίπος εξεζητημένης δομής τριγλυκεριδίων όπως το λίπος του κακάο), καθώς επίσης και για την βιομηχανία παραγωγής εναλλακτικού καυσίμου βιολογικής προελεύσεως (βιοντήζελ – biodiesel) (Αγγελής 2007; Παρανικόλαου 2008). Αναφορικά με την παρούσα μελέτη, όπως αναφέρθηκε και στα προηγούμενα ο Ζυγομύκητας *Mortierella isabellina* παρουσίασε πολύ μεγάλη συσσώρευση λιπιδίων τα οποία περιείχαν μικρά ποσά γ-λινολενικού οξέος. Δυνητικά συνεπώς ο μικροοργανισμός αυτός θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί στην αξιοποίηση υγρών αποβλήτων (waste-waters) πλουσίων σε γλυκόζη (π.χ. απόβλητα βιομηχανιών παρασκευής γλυκών, παγωτών κ.ά. τα οποία στην παρούσα φάση και ειδικά στην πατρίδα μας παράγονται σε τεράστια ποσά και οδεύουν χωρίς καμιά επεξεργασία σε σηπτικούς βόθρους) όπου ταυτοχρόνως θα μειωνόταν η ρυπαντική ισχύς του αποβλήτου και θα παραγόταν μικροβιακό λίπος (Παρανικόλαου et al. 2004a). Το λίπος αυτό θα μπορούσε να υποστεί καθαρισμό με τη μέθοδο των υπερκρίσιμων υγρών (Certik and Shimizu 1999; Ratledge 2005) προκειμένου να

συμπυκνωθεί και καθαριστεί το υψίστης σημασίας γ-λινολενικό οξύ, ενώ το υπόλοιπο λίπος θα μπορούσε να οδεύσει προς παραγωγή βιοντήζελ (Αγγελής 2007).

Κατά την περαιτέρω ανάλυση των λιπιδίων στον αέριο χρωματογράφο διαπιστώθηκε πως κατά την εκθετική αύξηση των μικροοργανισμών, το ποσοστό του γ-λινολενικού οξέος ήταν υψηλό. Ωστόσο στο τέλος της εκθετικής αύξησης των μικροοργανισμών το ποσοστό του GLA μειωνόταν σημαντικά, ώστε να ανέλθει πάλι σε υψηλά επίπεδα κατά την στάσιμη φάση του αυξητικού κύκλου. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι ενώ η συσσώρευση λίπους αποτελεί μια δευτερογενής μεταβολική διεργασία, η σύνθεση του GLA φαίνεται να χωρεί κατά την παραγωγή νέας βιομάζας (Σχήμα IV.1). Έτσι, κατά το στάδιο της εκθετικής αύξησης του μικροοργανισμού τελείται και η σύνθεση του γ-λινολενικού οξέος, αλλά κατά το τέλος της εκθετικής φάσης, όπου η βιομάζα τείνει να σταθεροποιηθεί, τελείται κυρίως η βιοσυσσώρευση του ενδοκυτταρικού λίπους που καθιστά μικρότερο το ποσοστό του GLA σε σχέση με τα υπόλοιπα λιπίδια (π.χ. παλμιτικό ή ελαϊκό οξύ).



Σχήμα IV. 1. Σύνθεση των λιπαρών οξέων του *Cunninghamella echinulata* κατά την καλλιέργειά του στην εμπορική γλυκόζη

Τα στελέχη *Cunninghamella echinulata* και *Mortierella isabellina* εμφάνισαν ικανοποιητική ανάπτυξη, κατά την καλλιέργειά τους στην εμπορική φρουκτόζη. Ο

μεν *Cunninghamella echinulata* παρήγαγε 16.7 g/L βιομάζα, εντός της οποίας συσσωρεύσε 3.6 g/L λίπος που περιείχε 473 mg/L GLA. Ο δε *Mortierella isabellina* παρήγαγε 12.1 g/L βιομάζα, με μέγιστη συσσωρευση λίπους 7.36 g/L και 110 mg/L γ-λινολενικού οξέος. Παρατηρείται στην παρούσα εργασία, συνεπώς, παρά το γεγονός της εξαιρετικής βιοχημικής ομοιότητας μεταξύ της φρουκτόζης και της γλυκόζης, αξιοσημείωτη διαφοροποίηση στο μεταβολισμό των συστατικών αυτών από τους δοθέντες μικροοργανισμούς. Σε ό,τι αφορά το μικροοργανισμό *C. echinulata* φάνηκε ότι υπήρξε μια μεταβολική μετάπτωση (shift) σε σχέση με την αύξηση στη γλυκόζη η οποία είχε ως απόρροια «κατεύθυνση» (direction) του μεταβολισμού προς τη σύνθεση ελεύθερης λίπους βιομάζας και όχι λίπους, προφανώς λόγω μειωμένης ταχύτητας εισόδου της φρουκτόζης εντός των μυκηλιακών δομών σε σχέση με τη γλυκόζη. Τούτο θα είχε ως αποτέλεσμα μειωμένο ενδοκυτταρικό λόγο C/N με συνέπεια μειωμένη σύνθεση λίπους (κυρίως ως ποσοστό % κ. β. λίπους επί ξηρού βάρους) σε σχέση με την αύξηση στη γλυκόζη. Η μειωμένη συσσωρευση λίπους (κυρίως ως ποσοστό % κ. β. λίπους επί ξηρού βάρους) έχει δειχθεί ότι οφείλεται πέρα από την εξωκυτταρική διαθεσιμότητα σε άζωτο επίσης και στο ρυθμό κατανάλωσης του υποστρώματος από το μικροοργανισμό (Papanikolaou et al. 2007; Fakas 2007). Βεβαίως είναι αναντίρρητο ότι ο καθοριστικότερος παράγοντας που επηρεάζει την παραγωγή των μικροβιακών λιπιδίων είναι ο λόγος άνθρακας/άζωτο (C/N) του υποστρώματος καθόσον είναι γνωστό ότι η συσσωρευση μικροβιακών λιπιδίων προϋποθέτει υψηλό λόγο C/N και ότι η συσσωρευση αυξάνει με την αύξηση του λόγου C/N μέχρι μια άριστη τιμή πέραν της οποίας μειώνεται (Moreton 1988), όμως η παρούσα εργασία (όπως και άλλες της ερευνητικής μας ομάδας) δεικνύουν και το σημαντικό ρόλο του ρυθμού κατανάλωσης υποστρώματος στη σύνθεση λίπους. Θα πρέπει να σημειωθεί επίσης ότι και η σύσταση σε λιπαρά οξέα έδειξε αρκετές διαφοροποιήσεις κατά την αύξηση του μύκητα *C. echinulata* στη φρουκτόζη σε σχέση με τη γλυκόζη. Η θεωρία αναφέρει ότι πηγές άνθρακα, έστω και βιοχημικώς πάρα πολύ όμοιες μεταξύ τους, είναι δυνατόν να οδηγήσουν σε παραγωγή λιπιδίων με σχετικά διαφορετική σύσταση για τον αυτό μικροοργανισμό υπό τις αυτές συνθήκες καλλιέργειας (Dyal and Narine 2005; Αγγελής 2007; Papanikolaou et al. 2007). Σε ό,τι αφορά το μικροοργανισμό *M. isabellina* επίσης, δειχτηκε πέρα από κάθε αμφιβολία

ότι παρά το γεγονός ότι η φρουκτόζη είναι ικανοποιητικό υπόστρωμα για σύνθεση λίπους, υστερεί σαφώς σε σχέση με τη γλυκόζη, ενώ επίσης αντίστοιχα αποτελέσματα δείχνει για το παρόν στέλεχος και η βιβλιογραφία (πολύ καλύτερη συσσώρευση λίπους κατά την αύξηση στη γλυκόζη σε σχέση με την αύξηση στο άμυλο, πηκτίνη ή λακτόζη – Paranikolaou et al. 2007).

Εν τούτοις, στα πειράματα που διεξήχθησαν με την εμπορική ζάχαρη, ο *Cunninghamella echinulata* παρουσίασε ικανοποιητική κυτταρική ανάπτυξη, σε αντίθεση με τον *Mortierella isabellina*, ο οποίος δεν κατάφερε να παράγει τόσο αξιοσημείωτη βιομάζα, όσο και ενδοκυτταρικό λίπος. Πιο συγκεκριμένα, ο μεν *Cunninghamella echinulata* παρήγαγε 17.6 g/L βιομάζα με 3.1 g/L, ενώ ο *Mortierella isabellina* δεν παρήγαγε πάνω από 5.2 g/L βιομάζας με αμελητέα ποσότητα ενδοκυτταρικού λίπους (0.5 g/L). Όπως και σε σχέση με την παραγωγή λίπους από το μύκητα *C. echinulata* στη φρουκτόζη, η αύξηση στην εμπορική ζάχαρη έδωσε κατεύθυνση του κυτταρικού μεταβολισμού προς παραγωγή ελεύθερου λίπους υλικού και όχι κυτταρικών λιπιδίων (έτσι υπήρξε μεγάλη παραγωγή βιομάζας X και υψηλός συντελεστής απόδοσης $Y_{X/S}$, αμφότερα πολύ υψηλότερα σε σχέση με την αύξηση στη γλυκόζη). Η σύσταση σε λιπαρά οξέα των κυτταρικών λιπιδιακών αποθεμάτων εμφανίστηκε (φυσιολογικά) ενδιάμεση σε σχέση με την καλλιέργεια στη γλυκόζη και τη φρουκτόζη, ειδικά δοθέντος του γεγονότος ότι η σακχαρόζη υδρολύθηκε ταχύτατα από την εκκρινόμενη (αλλά και ενδεχομένως την ενδοκυτταρική) ιμβερτάση (βλ. Σχήμα III.1.3.1.α.) Όσον αφορά στην παραγωγή γ-λινολενικού οξέος στην εμπορική ζάχαρη, την μέγιστη ποσότητα παρήγαγε ο *Cunninghamella echinulata*, ήτοι 435 mg/L, ενώ όπως ήταν αναμενόμενο από την «φτωχή» ανάπτυξη του *Mortierella isabellina* στην σακχαρόζη, μόνο 32 mg/L παρήχθησαν από τον εν λόγω μικροοργανισμό. Προφανώς, η σακχαρόζη δεν αποτελεί κατάλληλο υπόστρωμα ανάπτυξης για τον *Mortierella isabellina*.

Κατά την διεξαγωγή των πειραμάτων στην εμπορική ζάχαρη, μελετήθηκε και η ενεργότητα του ενζύμου ιμβερτάση. Ως γνωστόν από την βιβλιογραφία, το ένζυμο ιμβερτάση μπορεί να βρεθεί τόσο εξωκυτταρικά, όσο και ενδοκυτταρικά, είτε στην κυτταρική μεμβράνη, είτε στο χυμοτόπιο των κυττάρων (Isla et al. 1999; Pessoni et al. 1999; Romero-Gomez et al. 2000; Hölker et al. 2004; Ng 2004). Στην παρούσα μελέτη,

επιχειρήθηκε η μέτρηση της εξωκυτταρικής ιμβερτάσης και για τους δύο μικροοργανισμούς. Ωστόσο, η ενεργότητα του ενζύμου μετρήθηκε μόνο στον μύκητα *Cunninghamella echinulata* και η μέγιστη τιμή της ήταν 0.5 U/ml, περίπου 40 h μετά τον εμβολιασμό.

Κύριοι παραγωγοί μικροοργανισμοί της ιμβερτάσης θεωρούνται οι ζύμες του γένους *Saccharomyces sp.* και *Candida sp.*, καθώς επίσης και μύκητες του γένους *Aspergillus sp.* Ειδικότερα, όσον αφορά στους μύκητες, το βέλτιστο είδος καλλιέργειας για την παραγωγή της ιμβερτάσης είναι η ζύμωση σε στέρεα υποστρώματα (solid-state fermentation), αφού οι μικροοργανισμοί αυτοί παράγουν την ιμβερτάση κυρίως ενδοκυτταρικά και αυτού του είδους η καλλιέργεια ευνοεί την υψηλή παραγωγή βιομάζας (Dworschack et al. 1960; Rubio and Maldonado, 1995; Ng 2004; Hölker et al. 2004). Προφανώς και στην παρούσα μελέτη, ένα ποσοστό ενδοκυτταρικής ιμβερτάσης παρήχθη, έτσι ώστε να καλύψει τις μεταβολικές ανάγκες των μικροοργανισμών.

Πίνακας IV.2. Παραγωγή ιμβερτάσης από διάφορους μικροοργανισμούς.

Μικροοργανισμός	Είδος καλλιέργειας	Είδος ιμβερτάσης	U/mL Ιμβερτάσης	Βιβλιογραφική Αναφορά
<i>Aspergillus niger</i>	Βυθού	Ενδοκυτταρική	2.85	Rubio et al. 1995
<i>Aspergillus niger</i>	Στέρεας φάσης	Ενδοκυτταρική	4.48	Gomez et al. 2000
	Βυθού		1.28	
<i>Cladosporium herbarum</i>	Βυθού	Εξωκυτταρική	0.16	Skowronek et al. 2003
<i>Penicillium janczewskii</i>	Βυθού	Ενδοκυτταρική	0.5	Rubio et al. 2002
<i>Cunninghamella echinulata</i>	Βυθού	Εξωκυτταρική	0.5	Παρούσα μελέτη

Επιπλέον, και οι δύο μικροοργανισμοί αναπτόχθηκαν επαρκώς κατά την καλλιέργειά τους στην μελάσα. Είναι αξιοσημείωτο το γεγονός ότι στην βιβλιογραφία, παραδόξως, αναφέρονται λίγες μελέτες σχετικά με την αξιοποίηση της μελάσας ως υπόστρωμα για την παραγωγή ενδοκυτταρικού λίπους, κυρίως από την ελαιογόνο ζύμη *Rhodotorula glutinis* (Alvarez et al. 1992; Johnson et al. 1995), ενώ με βάση τον έλεγχο ο οποίος έγινε στη διεθνή βιβλιογραφία, η παρούσα εργασία είναι η πρώτη που σχετίζεται με παραγωγή PUFAs υψηλής διατροφικής και φαρμακευτικής σημασίας από το γεωργικό αυτό υποπροϊόν (μελάσα). Ο μύκητας *Cunninghamella*

echinulata παρήγαγε 12.1 g/L βιομάζα, συσσωρεύοντας 3.8 g/L λίπος με 490 mg/L γ-λινολενικού οξέος, ενώ ο *Mortierella isabellina* παρήγαγε 11.3 g/L βιομάζας με 4.8 g/L λίπος και 168 mg/L γ-λινολενικού οξέος.

Είναι γεγονός ότι η μελάσα περιέχει ένα μεγάλο ποσοστό σακχαρόζης. Ωστόσο, η εξίσου σημαντική περιεκτικότητά της σε ελεύθερη γλυκόζη (περίπου 50% των ολικών σακχάρων), έδωσε τη δυνατότητα στον μύκητα *Mortierella isabellina* να αναπτυχθεί ικανοποιητικά. Και σε αυτή την περίπτωση, έγινε προσπάθεια για την μέτρηση της εξωκυτταρικής ιμβερτάσης, χωρίς όμως να βρεθούν αξιοσημείωτες ποσότητες του ενζύμου. Εν τούτοις, η μείωση τόσο των ολικών σακχάρων, όσο και της ελεύθερης γλυκόζης σε ένα μεγαλύτερο βαθμό, δεικνύουν ότι στον μεταβολισμό της σακχαρόζης έλαβε χώρα κυρίως η ενδοκυτταρική ιμβερτάση, αλλά και ότι προφανώς οι δύο μικροοργανισμοί προτίμησαν ως επί το πλείστον να μεταβολίσουν τον μονοσακχαρίτη που υπήρχε στο υπόστρωμα (δηλαδή την γλυκόζη) και δευτερευόντως τον δισακχαρίτη σακχαρόζη.

Ακόμη, άξιος λόγου είναι ο αποχρωματισμός του υποστρώματος της μελάσας από τον μύκητα *Cunninghamella echinulata* κατά 75%. Το σκούρο χρώμα της μελάσας οφείλεται κυρίως στην περιεκτικότητά της σε μελανοΐδινες (προϊόντα μη ενζυμικής αντίδρασης Maillard κατά την επεξεργασία των τεύτλων και των ζαχαροκάλαμων, απ' όπου προέρχεται η μελάσα), καθώς επίσης και σε διάφορες φαινολικές και θειώδεις ενώσεις. Ως εκ τούτου, η απόρριψη της στον εδαφικό και υδροφόρο ορίζοντα τη καθιστά παράγοντα τοξικότητας και βαρύτατης ρύπανσης του περιβάλλοντος. Επομένως, η χρησιμοποίηση της ως υπόστρωμα ανάπτυξης και η βιοεξυγίανση της αποτελεί σημαντικό κεφάλαιο στην αξιοποίηση των υπολειμμάτων γεωργο-βιομηχανιών τροφίμων από τη βιοτεχνολογία. Ο δε αποχρωματισμός της μελάσας οφείλεται τόσο στην δυνατότητα διάσπασης μορίων όπως οι μελανοΐδινες και τα φαινολικά συστατικά, όσο και στην δυνατότητα προσρόφησης των μορίων αυτών από την κυτταρική μεμβράνη των μικροοργανισμών. Φαίνεται μάλιστα ότι, ο μηχανισμός προσρόφησης των χρωστικών αυτών ουσιών συμβάλλει σε ένα ποσοστό 10-30% στον ολικό αποχρωματισμό του θρεπτικού μέσου.

Στον αποχρωματισμό της μελάσας συμβάλλουν και στελέχη των μυκήτων *Phanerochaete chrysosporium* και *Trametes versicolor*, τα οποία διαθέτουν ένζυμα όπως

υπεροξειδάσες του μαγγανίου και της λιγνίνης, υπεύθυνα για την διάσπαση των μορίων της λιγνίνης και της κυτταρίνης, με αποτέλεσμα την μείωση του σκούρου χρώματος της μελάσας έως και 82% (Dahiya et al. 2001; Raghukumar et al. 2004; Thakkar et al. 2006; Satyawali et al. 2008).

Σε κάθε περίπτωση, στην παρούσα εργασία και για τους δύο μύκητες (*M. isabellina* και *C. echinulata*), πραγματοποιήθηκε μεθυλίωση του ενδοκυτταρικού λίπους και περαιτέρω ανάλυση στον αέριο χρωματογράφο. Και για τους δύο μύκητες, κύριο λιπαρό οξύ ήταν το ελαϊκό (Δ^9 C18:1), και δευτερευόντως το παλμιτικό (C16:0), το λινελαϊκό (C18:2) και το γ-λινολενικό οξύ ($\Delta^{6,9,12}$ C18:3). Ο μύκητας *Cunninghamella echinulata* συσσωρεύσε έως 20% γ-λινολενικό οξύ, ενώ ο μύκητας *Mortierella isabellina* 3.5-4% GLA. Στην συνέχεια, πραγματοποιήθηκε κλασμάτωση των λιπιδίων του *Mortierella isabellina* κατά την πρόιμη στάσιμη φάση ανάπτυξης του μικροοργανισμού σε όλα τα υπό μελέτη υποστρώματα ανάπτυξης (καθώς τα κλάσματα των λιπιδίων για το στέλεχος *Cunninghamella echinulata* ATHUM 4411 της παρούσας εργασίας, έχουν μελετηθεί επισταμένως από τους Fakas et al. 2006), προκειμένου να διερευνηθεί η κατανομή των λιπαρών οξέων σε κάθε μία από της κλάσεις των λιπιδίων. Από την εν λόγω διεργασία, διαπιστώθηκε ότι σε κάθε περίπτωση το ποσοστό των ουδέτερων λιπιδίων αποτελούσε το 90-92% κ.β. επί των συνολικών λιπιδίων, με τα ποσοστά των κλασμάτων σφιγγολιπιδίων-γλυκολιπιδίων και φωσφολιπιδίων να είναι 6-7 % και 3-4% αντίστοιχα. Ακόμη, όσον αφορά το κλάσμα των φωσφολιπιδίων ήταν πιο ακόρεστο σε σχέση με υπόλοιπα δύο κλάσματα (ουδέτερα και σφιγγολιπίδια-γλυκολιπίδια), γεγονός που οφείλονταν στο υψηλότερο ποσοστό τόσο του ελαϊκού (Δ^9 C18:1) όσο και του λινελαϊκού οξέος ($\Delta^{9,12}$ C18:2) αλλά και του γ-λινολενικού οξέος ($\Delta^{6,9,12}$ C18:3) στο κλάσμα αυτό. Η παρατήρηση αυτή συνάδει με τα αποτελέσματα άλλων ερευνητών για την κατανομή των λιπιδίων στα επιμέρους κλάσματα λίπους σε στελέχη μυκήτων ανήκοντα στην κλάση των *Mucorales* (Fakas et al. 2006).

Πολλοί ελαιογόνοι μικροοργανισμοί, μετά την εξάντληση της πηγής άνθρακα (ή μετά από την εξάντληση της δυνάμενης προς κατανάλωση πηγής άνθρακα – βλ. Σχήματα I.2 και I.3), αποικοδομούν και καταναλώνουν τα συσσωρευμένα αποθεματικά λιπίδια προς παραγωγή ελεύθερης λίπους βιομάζας (Holdsworth and

Ratledge 1988; Aggelis and Sourdis 1997; Papanikolaou et al. 2001; Papanikolaou and Aggelis 2003; Fakas et al. 2007). Παρόλα αυτά, η έλλειψη κάποιων θρεπτικών συστατικών, όπως ο σίδηρος και το μαγνήσιο, από το μέσο καλλιέργειας μπορεί να καταστείλει την αποικοδόμηση των λιπιδίων (Papanikolaou et al. 2004b). Η βιοαποικοδόμηση των μικροβιακών λιπιδίων είναι μια διεργασία η οποία χωρεί ανεξαρτήτως της «προϊστορίας» του μέσου καλλιέργειας (ήτοι της πηγής άνθρακα η οποία χρησιμοποιήθηκε προκειμένου να λάβει χώρα η σύνθεση λιπιδίων), ενώ τούτη έχει προτυποποιηθεί με τη χρήση αριθμητικών προτύπων (Aggelis and Sourdis 1997; Papanikolaou and Aggelis 2003). Γενικώς στους ελαιογόνους μύκητες αποικοδομούνται εκλεκτικά τα τριγλυκερίδια (Fakas et al. 2007). Εκλεκτική αποδόμηση των τριγλυκεριδίων έχει αναφερθεί και στα ελαιογόνα βακτήρια του γένους *Rhodococcus* (Alvarez et al. 2000). Η αποικοδόμηση των τριγλυκεριδίων παρέχει στο μικροοργανισμό ενέργεια και άνθρακα που μπορεί να χρησιμοποιηθούν για την παραγωγή βιομάζας. Έτσι, τα λιπαρά οξέα που απελευθερώνονται κατά την υδρόλυση των τριγλυκεριδίων μπορούν να διοχετευτούν στη μεταβολική οδό της β-οξειδωσης προς παραγωγή ενέργειας ενώ ελεύθερη λίπους βιομάζα παράγεται επίσης. Στην παρούσα εργασία όταν οι συνθήκες το επέτρεπαν (απλός περιορισμός σε άζωτο και εξάλειψη των δυναμένων προς κατανάλωση σακχάρων – βλ. αύξηση *C. echinulata* και *M. isabellina* στη μελάσα) μη-αμελητέα ανακατανάλωση των κυτταρικών λιπιδίων πραγματοποιήθηκε στη στάσιμη φάση του αυξητικού κύκλου. Η απόδοση των λιπιδίων σε βιομάζα ήταν μικρότερη από το θεωρητικό μέγιστο 1/1.7 g/g (Ratledge 2005) αλλά πάντως ήταν κοντά στο 1.0 g/g (σε συμφωνία με τους Papanikolaou et al. 2004b; Fakas et al. 2007).

Η χρήση των γεωργικών και βιομηχανικών προϊόντων και παραπροϊόντων ως υποστρωμάτων για την παραγωγή μικροβιακών προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον λόγω της αλματώδους αύξησης της Γεωργικής Παραγωγής και διότι τα διάφορα παραπροϊόντα αυτά παράγονται σε πολύ μεγάλες ποσότητες, ενώ η διαχείρισή τους αποτελεί δυσεπίλυτο πρόβλημα για τη βιομηχανία (Peters 2006). Παρά το μεγάλο αριθμό μελετών που έχει εμφανιστεί στη διεθνή βιβλιογραφία σχετικά με την αξιοποίηση των γεωργο-βιομηχανικών παραπροϊόντων, το ερευνητικό ενδιαφέρον γύρω απ' τα ζητήματα της

βιομετατροπής τους συνεχίζεται αμείωτο (Peters 2006). Η βιομετατροπή γεωργο-βιομηχανικών προϊόντων και παραπροϊόντων σε λιπίδια φαρμακευτικού και διατροφικού ενδιαφέροντος είναι Τεχνολογία Μέγιστης Αιχμής με εξαιρετική οικονομική σημασία: 1 kg λιπαρής ύλης του φυτού *Oenothera biennis* (με GLA 8-10% κ. β. επί της λιπαρής μάζας) κοστολογείται περί τα 40 US \$. Μπορεί να γίνει εύκολα κατανοητή συνεπώς η τεράστια σημασία την οποία μπορεί να έχουν οι Ζυγομύκητες για την αξιοποίηση και βιοεξυγίανση των διαφόρων σακχαρούχων αποβλήτων με την ταυτόχρονη παραγωγή λίπους σχετικά πλούσιου σε GLA για την Οικονομία και το Περιβάλλον.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. AFNOR. 1984. Recueil des normes francaises des corps gras, grains oléagineux et produits dérives. In : Association Fraincaise pour Normalisation. Paris, p. 95
2. Aggelis, G., Pina, M., Graille, J., 1990. Localisation de l'acide gamma linoléique dans les myceliums et les spores chez deux Mucorales. *Oléagineux* 45, 229-232.
3. Aggelis, G., Ratomahenina, R., Arnaud, A., Galzy, P., Martin-Privat, P., Perraud, J.P., Pina, M., Graille, J., 1988. Étude de l'influence des conditions de culture sur la teneur en acide gamma linoléique de souches de *Mucor*. *Oléagineux* 43, 311-317.
4. Alvarez, H., R. Kalscheuer and A. Steinbuchel (2000). Accumulation and mobilization of storage lipids by *Rhodococcus opacus* PD630 and *Rhodococcus ruber* NCIMB40126. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 54: 303-307.
5. Bajpai, P.K., Bajpai, P., Ward, O.P., 1991. Optimization of production of docosahexaenoic acid (DHA) by *Thraustochytrium aureum* ATCC 34304. *J Am Oil Chem Soc* 68, 509-514.
6. Botha, A., Kock, J.L.F., Coetzee, D.J., Botes, P.J., 1997. Physiological properties and fatty acid composition in *Mucor circinelloides f. circinelloides*. *Antonie van Leeuwenhoek* 71, 201-206.
7. Certik, M., Berhan S.S., Sajbidor, J. 1993. Lipid Production and fatty acid composition of selected strains belonging to *Mucorales*. *Acta Biotechol.* 13, 193-196
8. Certik, M., Shimizu, S. 1999. Biosynthesis and Regulation of Microbial Polyunsaturated Fatty Acids Production. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 87, 1-14
9. Chandra, R., Bharagava, N.R., Rai, V. 2007. Melanoidins as major in sugarcane molasses based distillery effluent and its degradation. *Bioresource Technology*.
10. Chen, C.H., Liu T.M. 1997. Inoculum effects on the production of γ -linolenic acid by the shake culture of *Cunninghamella echinulata* CCRC 31840. *Enzyme and Microbial Technology* 21, 137-142

11. Chen, H.C., Chang C.C. 1996. Production of γ -linolenic acid by the fungus *Cunninghamella echinulata* CCRC 31840. *Biotechnol. Prog.* 12, 338-341
12. Dahiya, J., Singh, D., Nigam, P. 2001. Decolourisation of synthetic nad spentwash melanoidins using the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* JAG-40. *Bioresource Technology* 78, 95-98
13. Das, U.N. 1999. Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids 61 (3), 157-163
14. Dubois, M., Gilles, D.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., Smith, F. 1956. Colorimetric method for the determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry* 28, 350-356
15. Dyal, S.D., Narine S.S. 2005. Implications for the use of *Mortierella* fungi in the industrial production of essential fatty acids. *Food Research International* 38, 445-467
16. Fakas, S., Certik, M., Papanikolaou, S., Aggelis, G., Komaitis, M., Galyotou-Panayotou, M. 2007. γ -Linolenic acid production by *Cunninghamella echinulata* growing on complex organic nitrogen sources. *Bioresource Technology*.
17. Fakas, S., Galiotou-Panayotou, M., Papanikolaou, S., Komaitis, M., Aggelis, G. 2007. Compositional shifts in lipid fractions during turnover in *Cunninghamella echinulata*. *Enzyme and Microbial Technology* 40, 1321-1327
18. Fakas, S., Papanikolaou, S., Galiotou-Panayotou, M., Komaitis, M., Aggelis, G. 2006. Lipids of *Cunninghamella echinulata* with emphasis to γ -linolenic acid distribution among lipid classes. *Applied Microbiology and Biotechnology* 73, 676-683
19. Folch, J., Lees, M., Sloane-Stanley G. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem* 199, 833-841
20. Fu, Y., Virar, T. 2001. Fungal decolorization of dye wastewaters: a review. *Bioresource Technology* 79, 251-262
21. Gema, H., Kavadia, A., Dimou, D., Tsagou, V., Komaitis, M., Aggelis, G. 2002. Production of γ -linolenic acid by *Cunninghamella echinulata* cultivated on glucose and orange peel. *Applied Microbiology and Biotechnology* 58, 303-3

22. Hanson, L., Dostalek, M., 1988. Effect of culture conditions on mycelian growth and production of γ -linolenic acid by the fungus *Mortierella ramanniana*. *Appl Microbiol Biotechnol* 28, 240-246.
23. Hansson, L., Dostalek, M., Sörenby, B., 1989. Production of γ -linolenic acid by the fungus *Mucor rouxii* in fed-batch and continuous culture. *Appl Microbiol Biotechnol* 31, 223-227.
24. Hiruta, O., Yamamura, K., Takebe, H., Futamura, T., Inuma, K., Tanaka, H., 1997. Application of Maxblend fermentor for microbial processes. *J Ferment Bioeng* 83, 79-86.
25. Hölker, U., Höfer, M., Lenz, J. 2004. Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology* 64, 175-186
26. Horrobin, D.F. 1992. Nutritional and medical importance of gamma-linolenic acid. *Prog. Lipid Res.* 31, 163-194
27. Hrelia, S., Pession, A., Buda, R., Lorenzini, A., Horrobin, D.F., Biagi, P.L., Bordoni, A. 1999. Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids 60, 235-241
28. Jiang, W.G., Richard, B.P., Horrobin, D.F. 1988. *Clinical Reviews in Oncology/Hematology* 27, 179-209
29. Johnson, V.W., Singh, M., Saini, V.S., Adhikari, D.K., Sista, V., Yadav, N.K. 1995. Utilization of molasses for the production of faat by an oleaginous yeast, *Rhodotorula glutinis* IIP-30. *Journal of Industrial Microbiology* 14, 1-4
30. Kavadia, A., Komaitis, M., Chevalot, I., Blanchard, F., Marc, I., & Aggelis, G. 2001. Lipid and gamma-linolenic acid accumulation in strains of *Zygomycetes* growing on glucose. *Journal of the America Oil Chemists Society* 78, 341-346
31. Kendrick, A., Ratledge, C., 1992. Lipids of selected moulds grown for production of n-3 and n-6 polyunsaturated acids. *Lipids* 27, 15-20.
32. Kennedy, M.J., Reader, S.L., Davies, R.J. 1993. Fatty acid production characteristics of fungi with particular emphasis on gamma linolenic acid production. *Biotechnology and Bioengineering* 42, 625-634

33. Kristofikova, L., Rosenberg, M., Vlnova, A., Sajbidor, J., Certik, M., 1991. Selection of *Rhizopus* strains for L(+)-lactic acid and gamma-linolenic acid production. *Folia Microbiol* 36, 451-455.
34. Latge, J., De Bievre, C. 1980. Lipid composition of *Entomophthora obscura*. Hall & Dunn. *Journal of General Microbiology* 121, 151-158
35. Lehninger, A.L., Nelson, D.L. & Cox, M.M. 1993. Principles of biochemistry (2nd Edition). New York, NY: Worth
36. Lindberg, A.M., Hansson, L. 1991. Production of γ -linolenic acid by the fungus *Mucor rouxii* on cheap nitrogen and carbon sources. *Applied Microbiology and Biotechnology* 36, 26-28
37. Losel, D. (1989). Fungal lipids. In *Microbial lipids*, Ratledge, C. and Wilkinson, S. G., Eds. London, Academic Press. Vol. 1: 699-794.
38. Menendez, J.A., del Mar Barbacid, M., Montero, S., Sevilla, E., Escrich, E., Solanas, M., Cortes-Funes, H., Colomer, R. 2001. *European Journal of Cancer* 37, 402-413
39. Mengeaud, V., Nano, J.L., Fournel, S., Rampla, P. 1992. Prostaglandins, Luekotrienes and Essential Fatty Acids 47, 313-319
40. Miller, G. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry* 31, 426-428
41. Moreton, R. S. (1988). Physiology of lipid accumulation. In *Single cell oil*, Moreton, R. S., Ed. Harlow, Longmans: 11-27.
42. Muira, G., Ferrara, F., Delise, M., Fabieth, F., Bocca, A. 1997. Evaluation of the fatty acid profiles of two fairy shrimp species, *Branchipus pasai* Cottarelli, 1969 and *Chirocephalus kerkyrensis* Pesta, 1936 (Crustacea Anostraca) fed different diets. *Hydrobiologia* 359, 229-235
43. Nano, J.L., Nobili, C., Girard-Pipau, F., Rampla, P. 2003. Effects of fatty acids on the growth of caco-2 cells. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 69, 207-215
44. Papanikoalou, S., Chevalot, I., Komaitis, M., Aggelis, G., Marc, I. 2001. kinetic profile of the cellular lipid composition in an oleaginous *Yarrowia lipolytica* capable of

producing a cocoa-butter substitute from industrial fats. *Antoine van Leeuwenhoek* 80, 215-224

45. Papanikoalou, S., Muniglia, L., Chevalot, I., Aggelis, G., Marc, I. 2003. Accumulation of a cocoa-butter-like lipid by *Yarrowia lipolytica* cultivated on agro-industrial residues. *Current Microbiology* 46, 124-130

46. Papanikolaou, S., Aggelis, G., 2002. Lipid production by *Yarrowia lipolytica* growing on industrial glycerol in a single-stage continuous culture. *Bioresour Technol* 82, 43-49.

47. Papanikolaou, S., and Aggelis, G. Modelling lipid accumulation and degradation in *Yarrowia lipolytica* cultivated on industrial fats. *Current Microbiology*, 2003, 46, 398-402, IF=1.075

48. Papanikolaou, S., Chevalot, I., Komaitis, M., Marc, I., Aggelis, G. 2002a. Single Cell Oil (SCO) production by *Yarrowia lipolytica* growing on an industrial derivative of animal fat in batch cultures. *Applied Microbiology and Biotechnology* 58, 308-312

49. Papanikolaou, S., Galiotou-Panayotou, M., Fakas, S., Komaitis, M., and Aggelis, G. Lipid production by oleaginous *Mucorales* cultivated on renewable carbon sources. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 2007, 109, 1060-1070,

50. Papanikolaou, S., Komaitis, M., Aggelis, G. 2003. Single cell oil (SCO) production by *Mortierella isabellina* grown on high-sugar content media. *Bioresource Technology* 95, 287-291

51. Papanikolaou, S., Sarantou, S., Komaitis, M., Aggelis, G. 2004. Repression of reserve lipid turnover in *Cunninghamella echinulata* and *Mortierella isabellina* cultivated in multiple-limited media. *Journal of Applied Microbiology* 97, 867-875

52. Peters D. 2007. Raw Materials. *Advanced Biochemistry Engineering and Biotechnology* 105, 1-30

53. Poonawalla, F.M., Patel, K.L., Iyengar, R.S. 1965. Invertase Production by *Penicillium chrysogenum* and other Fungi in submerged fermentation. *Applied Microbiology* 13, 749-754

54. Ratledge, C. 1994. In: *Technological advances in improved and alternative sources of lipids*; London: Blackie academic and professional, 235-291

55. Ratledge, C. 2002. Regulation of lipid accumulation in oleaginous microorganisms. *Biochemical Society*, 1047-1050
56. Ratledge, C. 2004. Fatty acid biosynthesis in microorganisms being used for Single Cell Oil production. *Biochimie* 86, 807-815
57. Ratledge, C., 1992. Tailor made oils and fats - Possibilities for microbial oils. *Revue Française des Corps Gras* 39, 325-332.
58. Ratledge, C., 1994. Yeasts, moulds, algae and bacteria as sources of lipids. In: Kamel, B.S., Kakuda, Y. (Eds.), *Technological advances in improved and alternative sources of lipids*. Blackie academic and professional, London, pp 235-291.
59. Ratledge, C., Bjørn, K. 2001. *Basic Biotechnology*. Second edition. Cambridge, New York
60. Ratledge, C., Boulton, C.A. 1985. In: *Comprehensive biotechnology, the principles, applications and regulations of biotechnology in industry, agriculture and medicine*; Pergamon Press, Oxford, New York, Toronto, Sydney, Frankfurt. 983-1003
61. Ratledge, C., Wynn, J. 2002. The biochemistry and molecular biology of lipid accumulation in oleaginous microorganisms. *Adv. Appl Microbiol* 51, 1-51
62. Ratledge, C., Wynn, J.P. 2006. Microbial production of oils and fats. In: *Food Biotechnology*. Second Edition. Taylor & Fancis, p. 460-481
63. Romero-Gomez, S.J., Augur, C., Viniegra-Gonzalez, G. 2000. Invertase production by *Aspergillus niger* in submerged and solid-state fermentation. *Biotechnology letters* 22, 1255-1258
64. Roux, M.P., Kock, J.L.F., Botha, A., du Preez, J.C., Wells, G.V., Botes, P.J. 1994. *Mucor*-a source of cocoa butter and gamma-linolenic acid. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 10, 417-422
65. Roynette, E.C., Calder, P.C., Dupertuis, Y.M., Pichard, C. 2004. n-3 Polyunsaturated fatty acids and colon cancer prevention. *Clinical nutrition* 23, 139-151
66. Rubio M.C., Maldonado M.C. 1995. Purification and characterization of invertase from *Aspergillus niger*. *Current Microbiology* 31, 80-83
67. Rubio, M.C., Navarro, A.R. 2006. Regulation of invertase synthesis in *Aspergillus niger*. *Enzyme and Microbial Technology* 39, 601-606

68. Sajbidor, J., Certik, M., Dobronova, S., 1988. Influence of different carbon sources on growth, lipid content and fatty acid composition in four strains belonging to *Mucorales*. *Biotechnol Lett* 10, 347-350.
69. Sajbidor, J., Certik, M., Dobronova, S. 1988. Influence of different carbon sources on growth, lipid content and fatty acids composition in four strains belonging to *Mucorales*. *Biotechnology Letters* 10, 347-350
70. Shimizu, S., Akimoto, K., Kawashima, H., Shinmen, Y., Yamada, H., 1989. Production of diomo-gamma-linolenic acid by *Mortierella alpina* 1S-4. *J Am Oil Chem Soc* 66, 237-241.
71. Stredansky, M., Conti, E., Stredanska, S., Zanetti, F. 2000. γ -Linolenic acid production with *Thamnidium elegans* by solid-state fermentation on apple pomace. *Bioresource Technology* 73, 41-45
72. Tapiero, H., Nguyen, Ba G., Couvreur, P., Tew, K.D. 2002. Polyunsaturated fatty acids (PUFA) and eicosanoids in human health and pathologies. *Biomed Pharmacotherapy* 56, 215-222
73. Van Beelen, V., Roeleveld, J., Mooibroek, H., Sijtsma, L., Bino, R.J., Bosch, D., Rietjens M.C.M., Alink, G.M. 2007. A comparative study on the effect of algal and fish oil on viability and cell proliferation of caco-2 cells. *Food and Chemical Toxicology* 45, 716-724
74. Ykema, A., Verbree, E.C., Verwoert, I.I., van der Linden, K.H., Nijkamp, H.J.L. and Smit, H. L. 1990. Lipid production of revertants of ufa mutants from the oleaginous yeast *Apiotrichum curvatum*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 33, 176-182
75. Αγγελής 2007. Μικροβιολογία και Μικροβιακή Τεχνολογία. Εκδόσεις Σταμούλη.
76. Immelman, M., Du Preez, J.C., Kilian, S.G., 1997. Effect of C:N ratio on gamma-linolenic acid production by *Mucor circinelloides* grown on acetic acid. *System Appl Microbiol* 20, 158-164.