

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

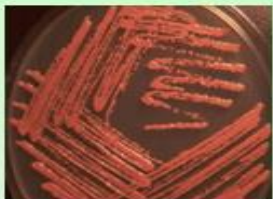
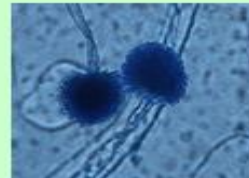
Τμήμα: Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου

Εργαστήρια : Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων & Μηχανικής Τροφίμων

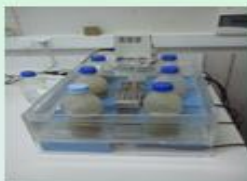
Π.Μ.Σ. : Επιστήμη και Τεχνολογία Τροφίμων και Διατροφή του Ανθρώπου

Κατεύθυνση: Βιοδιεργασίες Τροφίμων & Βιοδιυλιστήρια

Μεταπτυχιακή Διατριβή



ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΟΥ ΛΙΠΟΥΣ ΑΠΟ ΑΠΟΒΛΗΤΑ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ



Μεταπτυχιακός Φοιτητής:

Αργύριος Γ. Σκιαδαρέσης

Εξεταστική Επιτροπή:

Αποστόλης Κουτίνας- Επιβλέπων Καθηγητής

Σεραφείμ Παπανικολάου

Ιωάννης Κούκος

ΑΘΗΝΑ, 2014



ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

Τμήμα: Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου

Εργαστήρια : Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων
& Μηχανικής Τροφίμων

Π.Μ.Σ. : Επιστήμη και Τεχνολογία Τροφίμων και Διατροφή του Ανθρώπου

Κατεύθυνση: Βιοδιεργασίες Τροφίμων & Βιοδιυλιστήρια

Μεταπτυχιακή Διατριβή

Τίτλος: Βελτιστοποίηση Παραγωγής Μικροβιακού Λίπους από Απόβλητα Βιομηχανίας Τροφίμων

Μεταπτυχιακός Φοιτητής:

Αργύριος Γ. Σκιαδαρέσης

Εξεταστική Επιτροπή:

Αποστόλης Κουτίνας- Επιβλέπων Καθηγητής

Σεραφείμ Παπανικολάου

Ιωάννης Κούκος

ΑΘΗΝΑ, 2014

Μεταπτυχιακή Διατριβή

Τίτλος: Βελτιστοποίηση Παραγωγής Μικροβιακού Λίπους από Απόβλητα Βιομηχανίας Τροφίμων

Μεταπτυχιακός Φοιτητής:

Αργύριος Γ. Σκιαδαρέσης

Εξεταστική Επιτροπή:

Αποστόλης Κουτίνας- Επιβλέπων Καθηγητής

Σεραφείμ Παπανικολάου

Ιωάννης Κούκος

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Αντικείμενο της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη και βελτιστοποίηση της παραγωγής μικροβιακού λίπους από απόβλητα της βιομηχανίας τροφίμων. Τα μικροβιακά λιπίδια μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην παραγωγή προσθέτων σε τρόφιμα υψηλής διατροφικής, φαρμακευτικά σκευάσματα και στην παραγωγή βιοντίζελ. Η παραγωγή μικροβιακού λίπους βασίστηκε στην αξιοποίηση του στερεού αμυλοπρωτεϊνούχου αποβλήτου "Άνθος Ορύζης" από την βιομηχανία Τροφίμων ΓΙΩΤΗΣ ΑΕ. Το αμυλοπρωτεϊνούχο απόβλητο μέσω ενζυμικής υδρόλυσης μετατράπηκε σε θρεπτικό υπόστρωμα για την βιοτεχνολογική παραγωγή μικροβιακών λιπιδίων. Στην ενζυμική υδρόλυση χρησιμοποιήθηκαν ακατέργαστα ένζυμα (αμυλολυτικά και πρωτεολυτικά) τα οποία παρήχθησαν κατά την διάρκεια ζύμωσης στερεής κατάστασης από τον μύκητα *Aspergillus awamori* αξιοποιώντας ως υπόστρωμα το πίτυρο σίτου. Μετά τις 48 h ζύμωσης στερεάς κατάστασης, τα εναπομείναντα στερεά προστέθηκαν σε υδατικό εναιώρημα του αποβλήτου, προς ενζυμική υδρόλυση αυτού. Μετά από 24 h υδρόλυσης, συλλέχθηκε το υδρόλυμα άνευ στερεών και χρησιμοποιήθηκε ως υπόστρωμα σε καλλιέργειες υγρής κατάστασης με τον ελαιογόνο ζυμομύκητα *Rhodosporidium toruloides* προς παραγωγή μικροβιακών λιπιδίων.

Κατά την διάρκεια της ζύμωσης υγρής φάσης προσδιορίσαμε συγκεντρώσεις: α) γλυκόζης, β) ελεύθερου αζώτου αμινοξέων και πεπτιδίων, γ) ανόργανου Φωσφόρου, δ) ολικού ξηρού βάρους-Βιομάζας, ε) ολικών ενδοκυτταρικών μικροβιακών λιπιδίων. Επίσης, κατά την ενζυμική υδρόλυση προσδιορίσαμε συγκεντρώσεις: α) γλυκόζης και β) ελεύθερου αζώτου αμινοξέων και πεπτιδίων.

Κατά την ενζυμική υδρόλυση είδαμε μέγιστη συγκέντρωση γλυκόζης(170 g/L) και ελεύθερου αζώτου αμινοξέων & πεπτιδίων(800 mg/L) στο υδρόλυμα, μετά από 24 h υδρόλυσης του αποβλήτου Άνθους Ορύζης με αρχική συγκέντρωση 234 g/L.

Κατά τις ζυμώσεις υγρή φάσης του ελαιογόνου ζυμομύκητα *Rhodosporidium toruloides* παρατηρήσαμε την μέγιστη συγκέντρωση ενδοκυτταρικών μικροβιακών λιπιδίων (35.8 g/L) στις 168 h ημισυνεχούς καλλιέργειας, λαμβάνοντας απόδοση βιομάζας σε λίπος 57.4% (w/w), με αρχικές συγκεντρώσεις γλυκόζης 62.21 g/L και FAN 294.34 mg/L στο θρεπτικό μέσο. Ο μέγιστος ειδικός ρυθμός αύξησης(μ_{max}) των κυττάρων υπολογίστηκε σε 0.453 h^{-1} κατά την ασυνεχή καλλιέργεια των κυττάρων, για τις ίδιες αρχικές συγκεντρώσεις γλυκόζης και FAN στο θρεπτικό μέσο. Επιπροσθέτως, καταγράψαμε μέγιστη συγκέντρωση βιομάζας (64.40 g/L) στις 168 h ημισυνεχούς καλλιέργειας, λαμβάνοντας απόδοση βιομάζας σε λίπος 41.6% (w/w), με αρχικές συγκεντρώσεις γλυκόζης 58.06 g/L και FAN 491.77 mg/L στο θρεπτικό μέσο.

Τέλος, δημιουργήσαμε μαθηματικό μοντέλο για τα αποτελέσματα των ζυμώσεων υγρής κατάστασης, διακρίνοντας δύο στάδια: την μικροβιακή αύξηση και την λιποσυσσώρευση.

Επιστημονική Περιοχή Διατριβής

Μελέτη σύνθεσης μικροβιακών λιπιδίων από ελαιογόνους ζυμομύκητες αξιοποιώντας απόβλητα βιομηχανίας τροφίμων και βελτιστοποίηση παραγωγής μικροβιακού λίπους.

Λέξεις Κλειδιά: Μικροβιακά Λιπίδια, Απόβλητα Βιομηχανίας Τροφίμων, Μοντελοποίηση.

ABSTRACT

Aim of the current study was to research and optimize microbial oil production of from food industry wastes. Microbial lipids can be used for the production of additives in high nutritional value foods, medicines and biodiesel. Single Cell Oil(SCO) production was based on the exploitation of a solid starchy-protein waste from the food industry JOTIS SA. The waste was converted into nutrient medium for microbial oil production by enzymatic hydrolysis. For the enzymatic hydrolysis were used crude enzymes (proteolytic and amylolytic) which were produced during solid state fermentation by the fungus *Aspergillus awamori*, utilizing the wheat bran as substrate. After the solid-state fermentation (48 h), the remaining solids were added to an aqueous suspension of the starchy-protein waste for enzymatic hydrolysis of the waste. After 24 h of hydrolysis, the hydrolysate was collected free of solids and was used as a medium for applying various liquid-state fermentations with oleaginous yeast *Rhodosporidium toruloides* for producing microbial lipids.

During the liquid state fermentation samplings and analyses were applied at regular intervals in order to determine the concentration of: a) glucose, b) free amino nitrogen concentration, c) inorganic phosphorus, d) Total dry weight(Biomass) and e) Total intracellular microbial lipids concentration. Also, during the enzymatic hydrolysis samplings and analyses were applied at regular intervals in order to determine the concentration of: a) glucose and b) free amino nitrogen concentration.

During the enzymatic hydrolysis maximum concentration of glucose (170 g/L) and free amino nitrogen (800 mg/L) were achieved after 24 h of hydrolysis of 234 g/L waste. While, the amylolytic and proteolytic enzymes which were used in this specific hydrolysis were produced by 48 h solid state fermentation of the fungus *Aspergillus awamori* on wheat bran.

During the several liquid state fermentations maximum concentration of Single Cell Oil (35.8 g/L) was achieved at 168 h of fed-batch culture from the yeast *Rhodosporidium toruloides*, giving lipids yield of 57.4% (w/w), with initial concentrations of glucose 62.21 g/L and FAN 294.34 mg/L in the culture medium. The maximum specific growth rate (μ_{max}) of the cells was calculated at 0.453 h^{-1} during the batch culture, for the same initial concentrations of FAN and glucose in the medium. Moreover, maximum biomass concentration (64.40 g/L) was achieved at 168 h of the fed batch culture, giving lipids yield of 41.6% (w/w), with initial concentrations of glucose 58.06 g/L and FAN 491.77 mg/L in the culture substrate.

Finally, we have created mathematical model for our experimental results of the liquid state fermentations, distinguishing two stages: microbial growth and lipids accumulation.

Thesis Scientific Area

Study of Microbial Lipid production from oleaginous yeasts utilizing food industry wastes and optimization of single cell oil production.

Keywords: Microbial Lipids, Food Industry Wastes, Modeling

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε στα εργαστήρια «Μικροβιολογίας & Βιοτεχνολογίας Τροφίμων» και «Μηχανικής Τροφίμων» του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, στα πλαίσια του Π.Μ.Σ. « Επιστήμη και Τεχνολογία Τροφίμων και Διατροφή του Ανθρώπου». Επιθυμώ να ευχαριστήσω θερμότατα τους κυρίους Κουτίνα Αποστόλη (επιβλέπων της παρούσας μελέτης), Παπανικολάου Σεραφείμ και Κούκο Ιωάννη, τόσο για την ανάθεση του συγκεκριμένου θέματος ως θέμα μεταπτυχιακής μου μελέτης, όσο και για την πολύτιμη & ακούραστη επιστημονική συμβολή τους. Θέλω να ευχαριστήσω την υποψήφια διδάκτορα Τσάκωνα Σοφία για την αδιάκοπη πρακτική, επιστημονική και ηθική υποστήριξη της στα πλαίσια της συγκεκριμένης μελέτης. Ευχαριστώ τις κυρίες Καλαντζή Ουρανία, Προξενιά Νίκη καθώς και όλους τους διδακτορικούς & μεταδιδακτορικούς φοιτητές των προαναφερθέντων εργαστηρίων για την συμβολή & υποστήριξη τους κατά την διάρκεια της παρούσα μελέτης.

Ευχαριστώ θερμότατα την οικογένεια μου για την κατανόηση, την υποστήριξη και την συμπαράσταση της καθ' όλη την διάρκεια διεξαγωγής αυτής της μελέτης.

Αφιερωμένο,

*Στους λατρεμένους μου γονείς Γεράσιμο & Λιάνα για την
αδιάκοπη στήριξη τους κατά τη διάρκεια των σπουδών μου.*

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	4
ABSTRACT	5
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	6
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	8

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Σκοπός της παρούσας μελέτης	10
1.2. Συμβολή μικροοργανισμών στην Τεχνολογία Αειφόρου Ανάπτυξης	
1.2.1. Εισαγωγή	11
1.2.2. Μύκητας <i>Aspergillus awamori</i>	12
1.2.3. Ελαιογόνοι Μικροοργανισμοί & Μικροβιακό Λίπος	13
1.2.3.1. Βιοχημεία Συσσώρευσης Μικροβιακού Λίπους	16
1.2.3.2. Ζυμομύκητας <i>Rhodosporidium toruloides</i>	21
1.3. Αξιοποιήσιμα Απόβλητα	
1.3.1. Πίτυρο Σίτου	23
1.3.2. Άνθος Ορύζης	25

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. Ζύμωση Στερεάς Φάσης	29
2.1.1. Παρασκευή Εμβολίου	29
2.1.2. Εμβολιασμός & Ζύμωση Στερεάς Φάσεως	31
2.2. Ενζυμική Υδρόλυση	
2.2.1. Ενζυμική Υδρόλυση	33
2.2.2. Προσδιορισμός Γλυκόζης - Μέθοδος Δινιτροσαλικυλικού οξέος(DNS)	36
2.2.3. Προσδιορισμός Ελεύθερου Αζώτου Αμινοξέων & Πεπτιδίων(FAN)	
- Μέθοδος Νινυδρίνης	40
2.3. Ζύμωση Υγρή Φάσης	
2.3.1. Προετοιμασία & Εμβολιασμός Βιοαντιδραστήρα	45
2.3.2. Δειγματοληψία	51
2.3.3. Προσδιορισμός Ολικού Ξηρού Βάρους(TDW)	52

2.3.4. Προσδιορισμός Ολικού Ενδοκυτταρικού Μικροβιακού Λίπους(TL)	54
2.3.5. Προσδιορισμού Ανόργανου Φωσφόρου(IP)	56
2.3.6. Ασυνεχής και Ημισυνεχής καλλιέργεια	60
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ- ΣΥΖΗΤΗΣΗ	
3.1. Ζύμωση Στερεάς φάσης του μύκητα <i>Aspergillus awamori</i> σε Πίτυρο Σίτου & Ενζυμική Υδρόλυση του Άνθους Ορύζης	63
3.2. Ζύμωση Υγρή Φάσης της ζύμης <i>Rhodosporidium toruloides</i> σε υδρόλυμα Άνθους Ορύζης	67
3.2.1. 1 ^ο Πείραμα- Ασυνεχής Καλλιέργεια	69
3.2.2. 1 ^ο Πείραμα- Ημισυνεχής Τροφοδοτούμενη Καλλιέργεια	72
3.2.3. 2 ^ο Πείραμα- Ασυνεχής Καλλιέργεια	75
3.2.4. 2 ^ο Πείραμα- Ημισυνεχής Τροφοδοτούμενη Καλλιέργεια	78
3.2.5. 3 ^ο Πείραμα- Ασυνεχής Καλλιέργεια	81
3.2.6. 3 ^ο Πείραμα- Ημισυνεχής Τροφοδοτούμενη Καλλιέργεια	84
3.2.7. 4 ^ο Πείραμα- Ασυνεχής Καλλιέργεια	87
3.2.8. 4 ^ο Πείραμα- Ημισυνεχής Τροφοδοτούμενη Καλλιέργεια	90
3.2.9. 5 ^ο Πείραμα- Ασυνεχής Καλλιέργεια	93
3.2.10. 5 ^ο Πείραμα- Ημισυνεχής Τροφοδοτούμενη Καλλιέργεια	96
3.3. Συζήτηση	99
4. ΜΟΝΤΕΛΟΠΟΙΗΣΗ	
4.1. Εισαγωγή	109
4.2. Μικροβιακή Ανάπτυξη	110
4.3. Συσσώρευση Μικροβιακού Λίπους	116
5. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	121
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	126
6.1 Διεθνής	126
6.2 Ελληνική	137

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Η παρούσα μελέτη επικεντρώθηκε, στην δυνατότητα παραγωγής μικροβιακού λίπους αξιοποιώντας αποκλειστικά και μόνο ανανεώσιμες πρώτες ύλες. Όπως παραπροϊόντα & απόβλητα βιομηχανίας τροφίμων, αντικαθιστώντας εμπορικά συνθετικά θρεπτικά μέσα. Τα τελευταία χρόνια παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον η χρήση βιομηχανικών αποβλήτων και παραπροϊόντων ως θρεπτικά μέσα για την παραγωγή προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας. Η αλματώδης ανάπτυξη όλων των παραγωγικών τομέων, αύξησε εκθετικά τον όγκο όλων των παραπροϊόντων και αποβλήτων, με αποτέλεσμα η διαχείριση τους να αποτελεί δυσεπίλυτο πρόβλημα (Peters, 2007).

Αξιοσημείωτο είναι ότι ορισμένα παραπροϊόντα βιομηχανιών τροφίμων δύνανται να αξιοποιηθούν για την παραγωγή μικροβιακού λίπους από ελαιογόνους μικροοργανισμούς. Το λίπος αυτό δύναται να χρησιμοποιηθεί σε βιομηχανική κλίμακα για την παραγωγή προσθέτων υψηλής διατροφικής αξίας, συμπληρωμάτων διατροφής, καθώς και φαρμακευτικών συσκευασμάτων. Επιπροσθέτως, τα μικροβιακά λιπίδια μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την παραγωγή καυσίμου βιολογικής προέλευσης (biodiesel), αξιοποιώντας απόβλητα & παραπροϊόντα. Εφαρμογή με μεγάλη οικολογική και οικονομική σημασία (Αγγελής, 2007; Koutinas et al., 2007; Papanikolaou et al., 2007; Ratledge and Cohen, 2008; Cheirslip and Louhasakul, 2013).

Σκοπός της εργασίας μας είναι η βελτιστοποίηση της παραγωγής μικροβιακών λιπιδίων από υποστρώματα τα οποία αποτελούν παραπροϊόντα βιομηχανίας βρεφικών τροφών. Στα πλαίσια της παρούσας μελέτης, αρχικά ο μύκητας *Aspergillus awamori* αναπτύχθηκε σε πύτυρο σίτου, μέσω ζύμωσης στερεάς κατάστασης, προς παραγωγή ακατέργαστων αμυλολυτικών και πρωτεολυτικών ενζύμων (Koutinas 2001;2006; Negi and Banerjee, 2010;).

Ακολούθως, η υδρόλυση του αλευρούχου αποβλήτου Άνθος Ορύζης της βιομηχανίας παιδικών τροφών ΓΙΩΤΗΣ ΑΕ πραγματοποιήθηκε με τα παραγόμενα ακατέργαστα ένζυμα (Koutinas et al., 2001;2007; Kong et al., 2007). Το εν λόγω απόβλητο είναι πλούσιο σε άμυλο, πρωτεΐνες και ιχνοστοιχεία. Στόχος της υδρόλυσης του αποβλήτου ήταν η υδρόλυση του αμύλου και των πρωτεϊνών για την δημιουργία υδρολύματος, που περιέχει γλυκόζη και ελεύθερο άζωτο αμινοξέων & πεπτιδίων, στοιχεία απαραίτητα για την μικροβιακή ανάπτυξη.

Το παραγόμενο υδρόλυμα χρησιμοποιήθηκε ως θρεπτικό μέσο για την καλλιέργεια της ελαιογόνου ζύμης *Rhodospiridium toruloides*, σε αερόβια ασυνεχής και ημι-συνεχής ζύμωση υγρής φάσης, σε αναδεδωμένο βιοαντιδραστήρα προς παραγωγή μικροβιακών λιπιδίων (Li et al., 2006;2007; Wu et al., 2010;2011; Wang et al., 2012). Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, κλειδί για τη παραγωγή μικροβιακού λίπους είναι ο περιορισμός του αζώτου στο θρεπτικό μέσο της καλλιέργειας, δίδοντας αυξημένες τιμές για τον λόγο Άνθρακα/Αζώτου (C/N) (Ratledge, 1988; 2004; Papanikolaou et al.,2001; Papanikolaou and Aggelis, 2002;2011;).

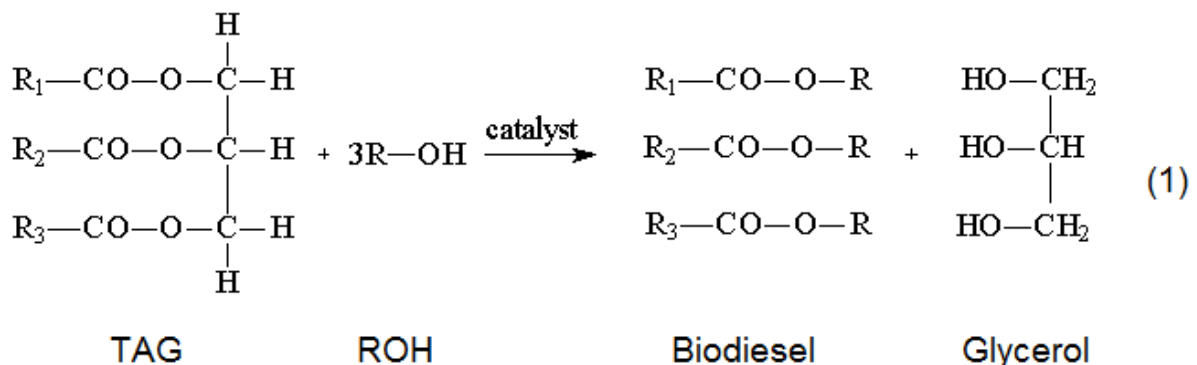
Στη παρούσα μελέτη πραγματοποιήσαμε ζυμώσεις υγρής φάσης με ποικίλες τιμές για τον αρχικό λόγο C/N του θρεπτικού μέσου, αναζητώντας το βέλτιστο για την παραγωγή μικροβιακού λίπους. Τέλος, τα αποτελέσματα από τις ζυμώσεις, αξιοποιήθηκαν στην ανάπτυξη πειραματικού μαθηματικού μοντέλου με σκοπό τη βελτιστοποίηση της παραγωγής μικροβιακού λίπους από τα κύτταρα ζύμης *Rhodospiridium toruloides*.

1.2. ΣΥΜΒΟΛΗ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ ΣΤΗΝ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΑΕΙΦΟΡΟΥ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ

1.2.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Με τη χρήση μικροοργανισμών στην επεξεργασία αποβλήτων, παραπροϊόντων & υπολειμμάτων αγροτο-βιομηχανιών επιτυγχάνεται η μείωση ρύπανσης του περιβάλλοντος και ταυτόχρονα παραγωγή προϊόντων προστιθέμενης αξίας. Συγκεκριμένα, τα απόβλητα και παραπροϊόντα άμεσα ή έμμεσα (μετά από επεξεργασία) χρησιμοποιούνται ως υπόστρωμα για την ανάπτυξη & καλλιέργεια διαφόρων μικροοργανισμών, με σκοπό την παραγωγή και εκμετάλλευση των μεταβολικών τους προϊόντων. Όπως το μικροβιακό λίπος (Single cell oil), η μικροβιακή πρωτεΐνη (Single Cell Protein), τα οργανικά οξέα του κύκλου του Krebs (π.χ. κιτρικό οξύ), οι διαλύτες μικροβιακής προέλευσης (π.χ. ακετόνη, βουτανόλη), η αιθανόλη βιολογικής προέλευσης, το γαλακτικό οξύ και ένζυμα.

Επίσης, τα λιπίδια μικροβιακής προέλευσης με την προσθήκη αλκοόλης μπορούν να μετασχηματιστούν σε αλκυλοεστέρες και γλυκερόλη, παρουσία καταλύτη. Η αντίδραση αυτή ονομάζεται μετεστεροποίηση και απεικονίζεται ακολούθως στην αντίδραση (1) (Ma and Hanna, 1999). Το μίγμα μόνο- αλκυλοεστέρων που παράγεται είναι καύσιμο βιολογικής προέλευσης και ονομάζεται βιοκαύσιμο (βιοντίζελ, Biodiesel).



Επίσης, άλλη μια μέθοδος για την αξιοποίηση των αποβλήτων, μέσω μικροοργανισμών είναι η θερμόφιλη βιοαποικοδόμηση, μέσω της οποίας παράγονται εδαφοβελτιωτικά, ενώ είναι γνωστή ως κομποστοποίηση (Sundberg et al., 2013; Korcic et al, 2014). Μελέτες δείχνουν ότι απόβλητα από την βιομηχανία τροφίμων δύναται να χρησιμοποιηθούν ως υπόστρωμα για την ανάπτυξη εδώδιμων μανιταριών, κλασικό παράδειγμα είναι τα απόβλητα ελαιουργείων (Mansour–Benamar et al, 2014). Τα τελευταία χρόνια έρευνες διεξάγονται για την εφαρμογή της ζύμωσης στερεής φάσης στην αξιοποίηση των αποβλήτων από την βιομηχανίας τροφίμων, με κύριο παράδειγμα την επεξεργασία των φλουδιών πατάτας για την παραγωγή ενζύμων (Santos et al, 2012).

1.2.2. ΜΥΚΗΤΑΣ *Aspergillus awamori*

Το γένος του μύκητα *Aspergillus spp.* αναγνωρίστηκε σαν μικροοργανισμός το 1729 από το Micheli. Περιλαμβάνει περισσότερα από 180 αναγνωρισμένα είδη, τα οποία απαρτίζουν ένα πολύ σημαντικό γένος νηματοειδών ασκομυκήτων. Οι ασκομύκητες αποτελούν μια υποδιαίρεση ανώτερων μυκήτων, κύριο χαρακτηριστικό των οποίων είναι η παραγωγή ασκών. Δηλαδή σποριαγγείων ασκόμορφου σχήματος, μέσα στους οποίους παράγονται τα απλοειδή ασκοσπόρια, τα οποία είναι αποτέλεσμα μείωσης. Τα ασκοσπόρια είναι συνήθως οκτώ σε αριθμό και μπορεί να έχουν διάφορα σχήματα (σφαιρικά, ωειδή ή επιμήκη νηματώδη), μετά το σχηματισμό τους αποβάλλονται στον αέρα με δύναμη από την κορυφή του ασκού. Πολλά από αυτά είναι εφοδιασμένα με διάφορα εξαρτήματα που ευνοούν την προσκόλλησή τους πάνω σε υποστρώματα και την καλύτερη διάδοσή τους.

Ανάμεσα σε αυτά τα είδη, περιέχονται και κάποιοι παθογόνοι μικροοργανισμοί για τον άνθρωπο όπως ο μύκητας *Aspergillus fumigatus* (Ward et al., 2005;Curty et al., 2014). Αντιθέτως τα περισσότερα είδη του γένους είναι χρήσιμοι μικροοργανισμοί στη φύση για την αποικοδόμηση των πολυσακχαριτών φυτικής προέλευσης (de Vries et al., 2000; de Vries, 2003). Επιπροσθέτως, το γένος *Aspergillus* περιλαμβάνει είδη τα οποία έχουν μεγάλη σημασία σε βιομηχανικής κλίμακας παραγωγή εξωκυτταρικών ενζύμων (van Kuyk et al., 2000;Nutan et al., 2002; Fawole and Odunfa, 2003; Wang et al., 2003;RaviKumar et al., 2004). Τα είδη του γένους *Aspergillus spp.* είναι σημαντικοί μικροοργανισμοί στη βιομηχανία παραγωγής ζυμούμενων τροφίμων, παράγουν μια μεγάλη ποικιλία αμυλασών και πρωτεασών(Petersen et al ., 1999; MacKenzie et al., 2000).

Τα αμυλολυτικά ένζυμα (α-αμυλάση E.C. 3.2.1.1, β - αμυλάση E.C. 3.2.1.2 & γλυκοαμυλάση E.C. 3.2.1.3) και οι πρωτεάσες(όξινης και αλκαλικές) συγκαταλέγονται ανάμεσα στα σημαντικότερα ένζυμα βιομηχανικού ενδιαφέροντος. Λόγω των εφαρμογών τους σε τομείς όπως η ζυθοποιία, φαρμακευτική βιομηχανία, βιομηχανία τροφίμων αλλά και βιοεπεξεργασία αποβλήτων (Pandey et al., 2000). Στις μέρες μας κρίνεται ως επιτακτική ανάγκη η παραγωγή των προαναφερόμενων ενζύμων μέσω ζύμωσης σε βιομηχανική κλίμακα, προς κάλυψη των συνεχώς αυξανόμενων απαιτήσεων.



Εικόνα. 1 *Aspergillus awamori*

(Πηγή: <http://www.bio.nite.go.jp>, Ημ. Προσ.:10/02/2014)

Το είδος *Aspergillus awamori* έχει τη δυνατότητα για την παραγωγή εξωκυτταρικών αμυλασών και πρωτεασών σε βιομηχανικό επίπεδο με βάση την διεθνή βιβλιογραφία (Pandey et al., 1999; Koutinas et al., 2001; Yamamoto et al., 2005; Negi and Banerjee, 2006; Prakasham et al., 2006; Koutinas et al., 2006; Negi and Banerjee, 2009; Wang et al., 2009; Negi and Banerjee, 2010; Negi et al., 2011). Το συγκεκριμένο είδος έχει χαρακτηριστεί ως μη τοξινογόνο & μη παθογόνο και χρησιμοποιείται για αρκετά χρόνια στην παραγωγή τροφίμων (Cui, et al., 1998).

Στην παρούσα μελέτη, ο μύκητας *Aspergillus awamori* αναπτύχθηκε σε πίτυρο σίτου μέσω ζύμωσης στερεάς κατάστασης, σε θερμοκρασία 30 °C προς παραγωγή αμυλολυτικών και πρωτεολυτικών ενζύμων (Adolph et al., 1996; Koutinas et al., 2001; Bertolin, et al., 2003). Όλες οι πειραματικές παράμετροι για τη ζύμωση στερεάς κατάστασης αναφέρονται στην αντίστοιχη παράγραφο του κεφαλαίου « 2. Υλικά και μέθοδοι ».

Η ζύμωση στερεής κατάστασης πραγματοποιήθηκε σε κωνικές φιάλες, για την παραγωγή ακατέργαστων ενζύμων (αμυλάσες και πρωτεάσες), που απαιτούνται για την υδρόλυση του κυρίου απόβλητου μας (Άνθος Ορύζης). Με την συγκεκριμένη διαδικασία αποφύγαμε την αγορά εμπορικών ενζύμων, ενώ ταυτόχρονα αξιοποιήσαμε και το πίτυρο σίτου.

1.2.3. ΕΛΑΙΟΓΟΝΟΙ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ & ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΟ ΛΙΠΟΣ

Στην φύση εντοπίζονται ορισμένοι μικροοργανισμοί οι οποίοι έχουν τη δυνατότητα να παράγουν λίπος, ενδοκυτταρικά. Συγκεκριμένα, ως ελαιογόνοι μικροοργανισμοί ορίζονται οι μικροοργανισμοί εκείνοι, οι οποίοι αναπτυσσόμενοι σε συγκεκριμένες συνθήκες περιβάλλοντος, δύνανται να συσσωρεύσουν ενδοκυτταρικό λίπος, σε ποσοστό μεγαλύτερο από 20% (w/w) επί της ξηράς ουσίας (Papanikolaou and Aggelis, 2011; Ageitos et al., 2011).

Σύμφωνα με την βιβλιογραφία, ορισμένοι μικροοργανισμοί είναι ικανοί να συσσωρεύσουν λίπος έως 70- 80%(w/w) επί της ξηράς ουσίας (Ratlledge, 2002; Ageitos et al., 2011). Ιστορικές πηγές αναφέρουν την χρησιμοποίηση των ελαιογόνων μικροοργανισμών (oleaginous ή oil-bearing microorganisms) προς παραγωγή λίπους από τον δεύτερο παγκόσμιο πόλεμο. Η λεπτομερής μελέτη αυτών των κυττάρων έχει πραγματοποιηθεί τα τελευταία χρόνια με βάση την βιβλιογραφία (Aggelis et al., 1988;1990;Ratlledge, 1994; 2002;2004; Ratlledge and Cohen, 2008; Certik and Shimizu, 1999; Αγγελής, 2007; Papanikolaou et al., 2007; Papanikolaou and Aggelis, 2011; Ageitos et al., 2011).

Η παραγωγή μικροβιακών λιπιδίων παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον, καθώς αποτελεί πηγή για την παραγωγή σημαντικών λιπαρών οξέων τα οποία δεν απαντώνται συχνά στη φύση. Το εν λόγω λίπος, δύνανται να περιέχει υψηλές ποσότητες πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (PUFAs) σπουδαίας διατροφικής και φαρμακευτικής σημασίας. Αυτά τα λιπαρά οξέα χρησιμοποιούνται στην κλινική διατροφή και ως πρώτες ύλες για την παρασκευή ειδικών τροφών και καλλυντικών (Ratlledge, 1994; Αγγελής, 2007). Ενδιαφέρον είναι το γ-λινολενικό οξύ (GLA, ^{Δ6,9,12} C18:3), ένα λιπαρό οξύ που κυρίως παράγεται ως μεταβολικό προϊόν από τους ελαιογόνους ζυγομύκητες (Aggelis et al., 1988;1990; Ratlledge, 1994; 2002; Αγγελής, 2007; Fakas et al., 2008). Το γ-λινολενικό οξύ παρουσιάζει ενδιαφέρον λόγω των αντικαρκινικών και αντιφλεγμονώδων ιδιοτήτων που έχει βρεθεί ότι περιέχει (Certik and Shimizu, 1999). Σημαντικό είναι να αναφέρουμε ότι το μικροβιακό λίπος συνίσταται κυρίως

από τριγλυκερίδια, τα οποία αντιπροσωπεύουν το 55-80%(w/w) του συνολικού κυτταρικού λίπους (Paranikolaou et al., 2001).

Στην παραγωγή μικροβιακού λίπους η χρήση ετερότροφων μικροφυκών παρουσιάζει ενδιαφέρον, διότι το ενδοκυτταρικό λίπος που συσσωρεύουν είναι πλούσιο σε ω-3 και ω-6 λιπαρά οξέα. Τα ετερότροφα μικροφύκη έχουν προκαλέσει το ενδιαφέρον των ερευνητών ως μια εναλλακτική πηγή απαραίτητων λιπαρών οξέων κατάλληλων προς βρώση (Αγγελής, 2007). Η σύνθεση του μικροβιακού λίπους αποτελεί κυρίως αποτέλεσμα γενετικών και περιβαλλοντικών παραγόντων για κάθε μικροοργανισμό (Ratlledge, 2004).

Ένας από τους σημαντικούς λόγους ενδιαφέροντος για τα μικροβιακά λιπίδια έγκειται στην δυνατότητα τους να αποκαταστήσουν φυτικά ή ζωικά λίπη εξεζητημένης σύστασης και δομής. Δηλαδή έλαια πλούσια σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα σπανίως απαντώμενα στην φύση ή λίπη εξεζητημένης δομής τριγλυκεριδίων όπως το λίπος του κακάο (Paranikolaou, et al., 2002;2003). Από τις αρχές της δεκαετίας του 1990 παρήχθει σε βιομηχανική κλίμακα μικροβιακό λίπος που προσομοιάζε με αυτό του λίπους του κακάο, κατά την καλλιέργεια ελαιοπαραγωγών ζυμών του είδους *Apiotrichum curvatum* στο τυρόγαλα (Ykema et al., 1988; Ratledge, 1994).

Τα γένη των ζυμών *Yarrowia spp.*, *Cryptococcus spp.*, *Candida spp.*, *Rhodotorula spp.*, *Rhodosporidium spp.*, *Trichosporon spp.* και *Lipomyces spp.* έχουν χαρακτηριστεί ως τυπικά ελαιογόνα γένη (Ageitos et al., 2011). Η δυνατότητα παραγωγής λιπιδίων σε βιομηχανική κλίμακα χρησιμοποιώντας ελαιογόνες ζύμες έχει μελετηθεί από αρκετούς ερευνητές (Turcotte and Kosaric, 1988;1989; Jacob, 1992; Ratledge, 2004; Angerbauer et al. 2008; Li et al. 2008; Xu et al., 2012). Τα μικροβιακά λιπίδια έχουν βιομηχανικό ενδιαφέρον, λόγω των βιοχημικών και φυσικοχημικών ιδιοτήτων τους.

Θα πρέπει να τονίσουμε ότι οι ελαιογόνες ζύμες παράγουν λίπος, με την μορφή τριγλυκεριδίων, πλούσιων σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (Paranikolaou et al., 2001). Επίσης, δύναται να συσσωρεύουν λίπος μέχρι και 80%(w/w) κατά βάρος, επί της ξηρής μάζας τους (Picataggio and Smittle, 1979; Boulton and Ratledge, 1984; Pan et al., 2009). Έρευνες αναφέρουν ότι ελαιογόνες ζύμες μπορούν να παράγουν λιπίδια από διαφορετικές πηγές αζώτου, ακόμα και από λιπίδια που βρίσκονται στο μέσο ανάπτυξης (Iassonova et al., 2008; Katre et al., 2012).

Τόσο οι περιβαλλοντικές ανησυχίες όσο και η αλματώδη μείωση των διαθέσιμων ορυκτών καυσίμων λόγω της έντονης χρήσης και της συνεχόμενης εξόρυξης μας οδηγούν στην αναζήτηση καινοτόμων πηγών ενέργειας. Έρευνες αναφέρουν ότι με βάση την ετήσια παγκόσμια κατανάλωση καυσίμων, το παγκόσμιο απόθεμα αργού πετρελαίου θα διαρκέσει για τα επόμενα 40-50 χρόνια (Vasudeban and Briggs, 2008). Οι ελαιογόνες ζύμες μπορούν να συμβάλουν στην αιεφόρο λύση αυτού του προβλήματος, μέσω παραγωγής βιοκαυσίμου (Biodiesel) από μικροβιακά λιπίδια. Υποκαθιστώντας την παρούσα παραγωγή βιοντίζελ, η οποία γίνεται από φυτικά και ζωικά λίπη. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι η παγκόσμια αγορά βιοντίζελ εκτιμάται στα 37 δισεκατομμύρια βαρέλια μέχρι το 2016 (Li et al. 2008).

Οι ελαιογόνες ζύμες παρουσιάζουν αρκετά πλεονεκτήματα για την παραγωγή μικροβιακών λιπιδίων συγκριτικά με άλλες πηγές παραγωγής λιπιδίων. Συγκεκριμένα, ο χρόνος διπλασιασμού τους είναι λιγότερο από μία ώρα, επηρεάζονται πολύ λιγότερο από τον καιρό και τις κλιματικές αλλαγές σε σχέση με τα φυτά. Επίσης, οι καλλιέργειες τους είναι πιο εύκολα προσαρμόσιμες σε όγκους βιομηχανικής κλίμακας σε σχέση με αυτή των μικρο-άλγεων (Li et al., 2008).

Σε ορισμένα είδη ελαιογόνων ζυμών έχει αναφερθεί ότι η συσσώρευση του μικροβιακού λίπους πιθανότατα να ξεπερνάει το 80%(w/w) επί της ξηράς μάζας, ενώ έχουν την ικανότητα να παράγουν διαφορετικά λιπίδια από διάφορες πηγές άνθρακα ή από λιπίδια τα οποία είναι παρόντα στο θρεπτικό μέσο της καλλιέργειας (Papanikolaou et al., 2001; Ageitos et al., 2011). Οι ελαιογόνες ζύμες είναι ικανές να ποικίλουν την σύσταση των λιπιδίων που δύναται να παράγουν, μέσω αντικατάσταση των λιπαρών οξέων στα τριγλυκερίδια. Λόγω της μεγάλης γκάμας μικροοργανισμών και συνθηκών ανάπτυξης, οι ελαιογόνες ζύμες μπορεί να φανούν χρήσιμες στην παραγωγή μικροβιακών τριγλυκεριδίων, επιφανειοδραστικών ουσιών μικροβιακής προέλευσης (βιο-επιφανειοδραστικές ουσίες, bio surfactants) και πολυακόρεστων λιπαρών οξέων.

Με τον όρο επιφανειοδραστικές ουσίες(surfactants) ονομάζονται οι ενώσεις που προκαλούν μείωση της επιφανειακής τάσης ανάμεσα σε δύο υγρές επιφάνειες ή ανάμεσα σε μια υγρή και μια στερεή επιφάνεια. Οι επιφανειοδραστικές ουσίες (τασιενεργά, surfactants) είναι συνήθως οργανικές ενώσεις που είναι αμφιφιλικές, δηλαδή περιέχουν τόσο υδρόφοβες ομάδες (στις ουρές τους) και υδρόφιλες ομάδες (στις κεφαλές τους). Στην περίπτωση μας τα λιπαρά οξέα δύναται να χρησιμοποιηθούν ως επιφανειοδραστικές ουσίες διότι περιέχουν ένα υδρόφιλο τμήμα που είναι η καρβοξυλική ομάδα (κεφαλή) και ένα υδρόφοβο τμήμα που είναι η αλειφατική αλυσίδα (ουρά) (Myers, 2006). Οι ουσίες αυτές μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε απορρυπαντικά, γαλακτωματοποιητές, παράγοντες αφρισμού(foam agents), παράγοντες διαβροχής(wetting agents) και προωθητές διασποράς(dispersants).

Από τα 600 είδη των ελαιογόνων ζυμών, μόνο 30 έχουν χαρακτηριστεί ικανά να συσσωρεύουν πάνω από 25% (w/w) μικρ. λίπος επί της ξηρής μάζας (Beoroulos et al., 2009). Συγκεκριμένα, σε αυτή την ομάδα των ελαιογόνων ζυμών ανήκουν τα ακόλουθα είδη: *Cryptococcus albidus*, *Lipomyces lipofera*, *Lipomyces starkeyi*, *Rhodospiridium toruloides*, *Rhodotorula glutinis*, *Trichosporon pullulan*, and *Yarrowia lipolytica* (Li et al. 2008).

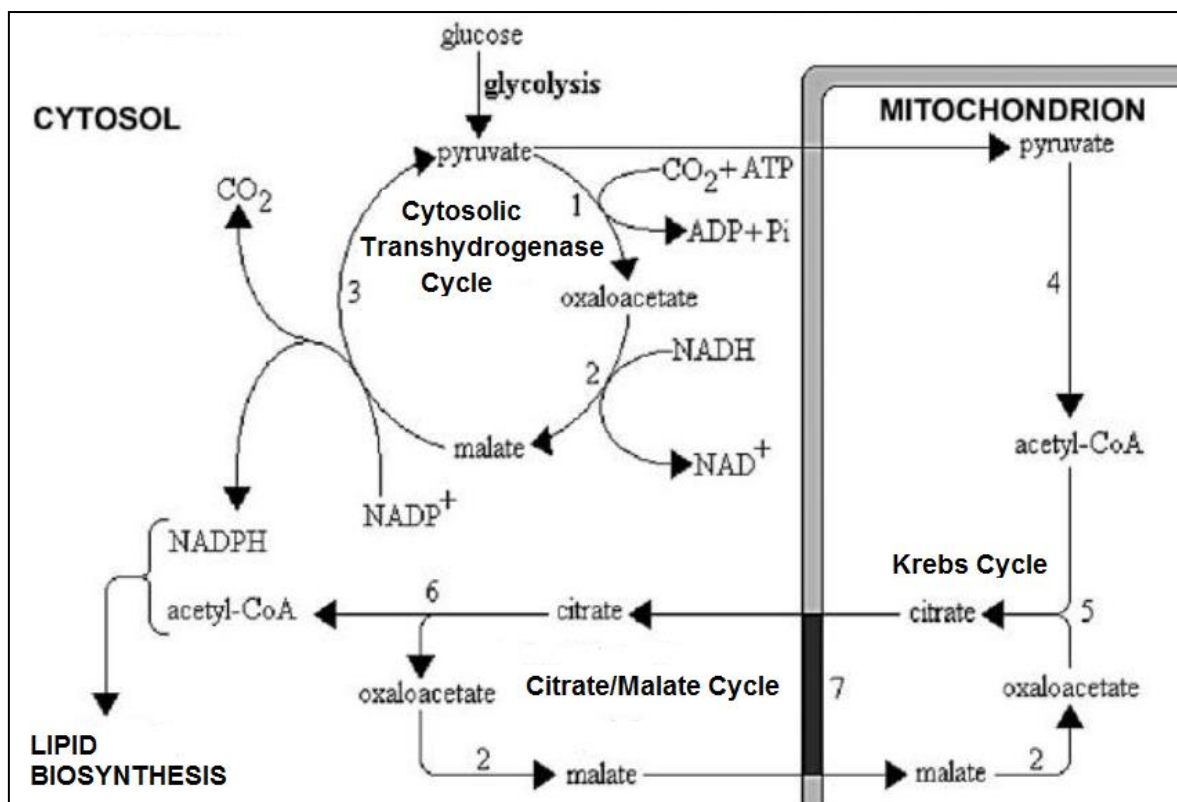
Επιπροσθέτως, έρευνες(Meng, et al., 2009; Ageitos et al., 2011) έδειξαν ότι υφίστανται ορισμένες ελαιογόνες ζύμες μέσω των οποίων είναι εφικτή η βιομηχανική παραγωγή μικροβιακού λίπους και ίσως θα μπορούσαν να χαρακτηριστούν ως πρόδρομοι παραγωγοί βιοκαυσίμου(biodiesel). Συγκεκριμένα, η ομάδα αυτή αποτελείται κυρίως από τις ακόλουθες ζύμες: *Cryptococcus curvatus*, *Lypomyces starkeyi*, *Rhodospiridium toruloides*, *Rhodospiridium glutinis* και *Yarrowia lipolytica*(Koutinas et al., 2014).

Με βάση την βιβλιογραφία, οι ζύμες αυτές έχουν την δυνατότητα να παράγουν κατά κανόνα σε αξιοποιήσιμες συγκεντρώσεις κυρίως τα ακόλουθα λιπαρά οξέα: μυριστικό οξύ (C14:0), παλμιτικό οξύ (C16:0), παλμιτολεϊκό οξύ (C16:1), στεαρικό οξύ (C18:0), ελαικό οξύ (C18:1), λινολενικό οξύ (C18:2) και α-λινολενικό οξύ (C18:3) (Li et al., 2007; Angerbauer et al., 2008; Ageitos et al., 2011;Papanikolaou and Aggelis, 2011; Zhao et al., 2011; Jin et al., 2013; Gen et al., 2014).

1.2.3.1. ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ ΣΥΣΣΩΡΕΥΣΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΟΥ ΛΙΠΟΥΣ

Η συσσώρευση του λίπους εντός των κυττάρων του ελαιογόνου μικροοργανισμού απαιτεί ως αναγκαία συνθήκη την καλλιέργεια του μικροοργανισμού σε περιβάλλον με περίσσεια πηγή άνθρακα και περιορισμό σε άζωτο. Όταν το άζωτο του θρεπτικού μέσου εξαντληθεί, οι ελαιογόνοι μικροοργανισμοί συνεχίζουν να αφομοιώνουν την πηγή άνθρακα (στην παρούσα μελέτη πηγή άνθρακα είναι η γλυκόζη), μετατρέποντας την σε τριγλυκερίδια, τα οποία συσσωρεύονται εντός των κυττάρων (Ratledge, 2004; Papanikolaou and Aggelis, 2011).

Ο χαρακτηρισμός ενός μικροοργανισμού ως ελαιογόνου οφείλεται σε δύο κυρίως παραμέτρους. Η πρώτη αφορά την δυνατότητα συνεχόμενης παραγωγής ακέτυλου συνενζύμου A (Acetyl-CoA) απευθείας στο κυτταρόπλασμα του κυττάρου, ενεργώντας ως προαπαιτούμενος προάγγελος για την σύνθεση των λιπαρών οξέων. Η δεύτερη αφορά την ικανότητα του μικροοργανισμού να παράγει επαρκείς ποσότητες NADPH, δηλαδή ενός βασικού αναγωγικού μέσου που συμμετέχει στο μηχανισμό βιοσύνθεσης των λιπαρών οξέων (Papanikolaou and Aggelis, 2011).



Εικόνα. 2 . Συνεισφορά του κύκλου του Krebs ,του κύκλου κιτρικού/μηλικού οξέος(citrate/malate cycle) στην παροχή ακέτυλου συνενζύμου A(Acetyl-CoA) και του κύκλου τρανσαυδρογενάσης(transhydrogenase cycle) παροχή NADPH στην διαδικασία γένεσης λίπους, σε 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.

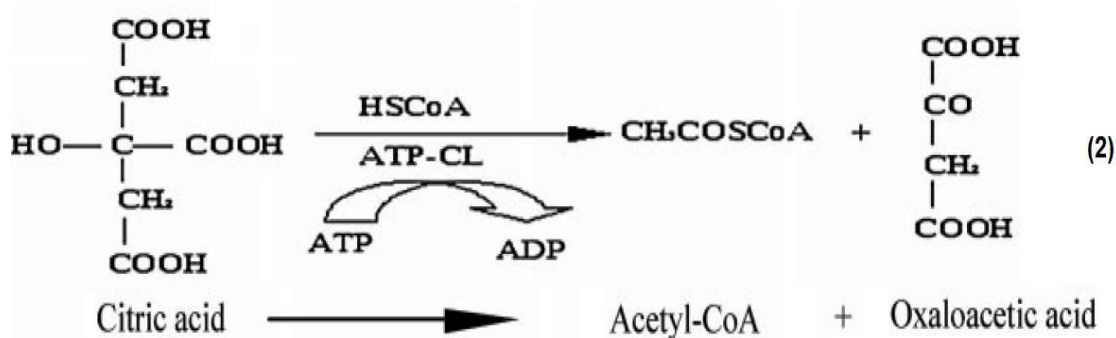
7. Τρανσλοκάση Κιτρικού/Μηλικό (citrate/malate translocase), ένζυμο υπεύθυνο για την λειτουργία του συστήματος μεταφοράς κιτρικού/ μηλικού οξέος μεταξύ μιτοχονδρίου - κυτταροπλάσματος . Ο κύκλος της τρανσαυδρογενάσης μπορεί να λειτουργεί ανεξάρτητα από την ροή άνθρακα (μιτοχονδριακού κιτρικού οξέος σε κυτοπλασματικό ακέτυλο συνενζύμου A) και παρέχοντας NADPH σε διαδικασίες βιοσύνθεσης, επιμήκυνσης αλειφατικών αλυσίδων και αποκορεσμού (desaturation) λιπαρών οξέων (Ratledge, 2004)

Το τελικό προϊόν της γλυκόλυσης είναι το πυροσταφυλικό οξύ, το οποίο μέσω της μιτοχονδριακής μεμβράνης εισέρχεται στο μιτοχόνδριο. Εκεί το ένζυμο αποκαρβοξυλάση του πυροσταφυλικού οξέος καταλύει τον σχηματισμό ακέτυλου συνενζύμου A (acetyl-CoA). Στη συνέχεια, το ακέτυλο συνένζυμο A (acetyl-CoA) εισέρχεται στο κύκλο του Krebs, σε ορισμένες περιπτώσεις έρευνες έδειξαν ότι δύναται να μεταφέρεται στο κυτταρόπλασμα προς εμπλουτισμό της βιοσύνθεσης των κυτταρικών λιπαρών οξέων (Paranikolaou and Aggelis, 2011).

Κατά την εξάντληση της πηγής αζώτου στο μέσο της καλλιέργειας, παρατηρείται διακοπή του κύκλου τους Krebs (Εικ. 2). Το φαινόμενο αυτό οφείλεται στην ενεργοποίηση του ενζύμου AMP - απαμινάση, η οποία καταλύει την διάσπαση του AMP σε IMP (Inosine MonoPhosphate) και ιόντα NH₄⁺. Έτσι επιτυγχάνεται ταχύτατη πτώση της συγκέντρωσης AMP και μείωση ενεργότητας του ενζύμου ισοκιτρική αφυδρογονάση (Ratledge, 1994, Paranikolaou and Aggelis, 2011), διότι ενεργοποιείται αλλοστερικά από την ενδοκυτταρική AMP. Το ένζυμο ισοκιτρική αφυδρογονάση είναι υπεύθυνο για τη μετατροπή του ισοκιτρικού οξέος σε α-κετογλουταρικό οξύ και κατά συνέπεια το ισοκιτρικό οξύ συσσωρεύεται εντός του μιτοχονδρίου. Το ισοκιτρικό οξύ βρίσκεται σε ισορροπία με το κιτρικό οξύ (αντίδραση η οποία καταλύεται από την ισοκιτρική ακοτινάση (isocitrate acotinase) (Paranikolaou and Aggelis, 2011).

Όταν η συγκέντρωση του κιτρικού οξέος στο εσωτερικό του μιτοχονδρίου υπερβεί μια κρίσιμη συγκέντρωση ανοχής, τότε εξέρχεται από το μιτοχόνδριο στο κυτταρόπλασμα μέσω του συστήματος μεταφοράς κιτρικού/μηλικού οξέος, σε ισορροπία (in exchange) με το μηλικό. Ο σχηματισμός του ακέτυλου – συνενζύμου A (acetyl-CoA) στους ελαιογόνους μικροοργανισμούς αποδίδεται από αρκετούς ερευνητές στην παρουσία του ενζύμου ATP-κιτρική λυάση (ACL), η οποία κατά κανόνα δεν εντοπίζεται στους μη ελαιογόνους μικροοργανισμούς (Ratledge, 2004; Αγγελής, 2007; Paranikolaou and Aggelis, 2011).

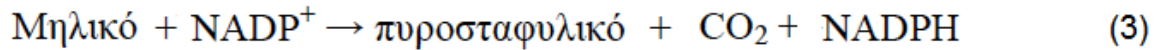
Έτσι το κιτρικό οξύ μέσω του ενζύμου ACL διασπάται σε ακέτυλο συνένζυμο A και οξαλοξικό οξύ. Όπως δίδεται στην παρακάτω αντίδραση (2) (Paranikolaou and Aggelis, 2011):



Όπως προαναφέραμε το NADPH είναι απαραίτητο για την βιοσύνθεση των λιπαρών οξέων και παρέχεται από τον ενδιάμεσο κυτταρικό μεταβολισμό [κύκλος της τρανσαφυδρογενάσης (transhydrogenase cycle)], όπως απεικονίζεται στην Εικόνα. 2 της παρούσης παραγράφου.

Πρέπει να αναφερθεί ότι εξίσου σημαντική είναι η συνεισφορά του μηλικού ενζύμου (malic enzyme) στην βιοσυσσώρευση του λίπους ως προμηθευτής NADPH, όπως παρουσιάζεται

τόσο στην ακόλουθη αντίδραση (3)(Papanikolaou and Aggelis, 2011), όσο και στην εικόνα 2. της παρούσης παραγράφου:



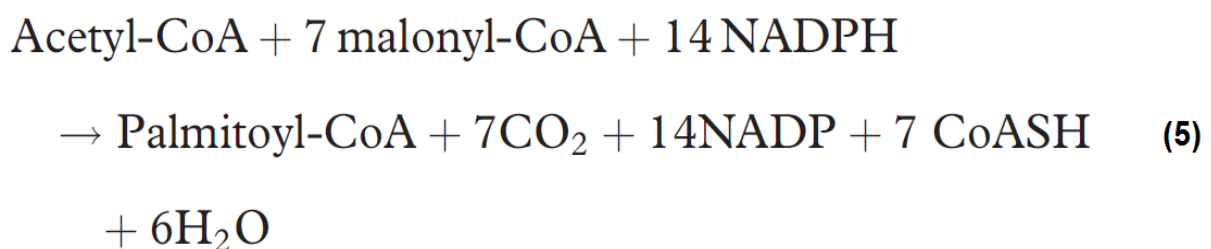
Το μηλικό ένζυμο πιθανότατα σχηματίζει ένα σταδιακό μεταβολικό σύμπλοκο το οποίο συνδυάζεται με την ATP-κιτρική λυάση και την συνθάση των λιπαρών οξέων, για την εξασφάλιση μια άμεσης διόδου επικοινωνίας κατά τη μετατροπή του ακέτυλου συνενζύμου A (acetyl-CoA) σε λιπαρά οξέα. Τα οποία εστεροποιούνται τελικώς με γλυκερόλη σε σταγονίδια λιπαρών οξέων (Ratledge, 2004).

Θα πρέπει να τονίσουμε, εάν το ένζυμο ATP-κιτρική λυάση απουσιάζει από έναν μικροοργανισμό ή είναι ανενεργό, η εξάντληση των αποθεμάτων αζώτου από το θρεπτικό μέσο της καλλιέργειας οδηγεί σε απέκκριση του παραγόμενου ενδοκυτταρικού κιτρικού οξέος εντός του κυτταροπλάσματος. Στην περίπτωση αυτή το κιτρικό οξύ είτε δύναται να εκκριθεί στο θρεπτικό μέσο της καλλιέργειας είτε μπορεί να προκαλέσει την παρεμπόδιση του ενζύμου 6-φώσφορο-φρουκτοκινάση, έχοντας ως αποτέλεσμα την συσσώρευση ενδοκυτταρικών πολυσακχαριτών με βάση την 6-φώσφορο -γλυκόζη. Επομένως, οι διεργασίες συσσώρευσης ενδοκυτταρικού λίπους και συσσώρευσης κιτρικού οξέος, κατά τα πρώτα στάδια τους θα μπορούσαμε να πούμε ότι είναι βιοχημικά ταυτόσημες.

Η πρώτη αντίδραση για την βιοσύνθεση των λιπαρών οξέων, αμέσως μετά την δημιουργία του ακέτυλου συνενζύμου A (Acetyl-CoA), καταλύεται από το ένζυμο καρβοξυλάση του ακέτυλου συνενζύμου A (Acetyl-CoA carboxylase). Το ένζυμο είναι εξαρτώμενο από την βιοτίνη και η συνολική αντίδραση δίδεται στην κάτω αντίδραση (4)(Papanikolaou and Aggelis, 2011):



Αυτή η αντίδραση θεωρείται ως το περιοριστικό στάδιο για την βιοσύνθεση των λιπαρών οξέων και ενεργοποιείται από την παρουσία του κιτρικού οξέος στο κυτταρόπλασμα των ελαιογόνων μικροοργανισμών. Αφού επιτευχθεί η παραγωγή του μηλονύλο συνενζύμου A (malonyl-CoA), η βιοσύνθεση των λιπαρών οξέων συνεχίζεται με την συμβολή πολλαπλού ενζυμικού συμπλέγματος. Το σύμπλεγμα ονομάζεται συνθετάση των λιπαρών οξέων (Fatty Acids Synthetase, FAS) και η συνολική αντίδραση(5) δίδεται ακολούθως (Papanikolaou and Aggelis, 2011):



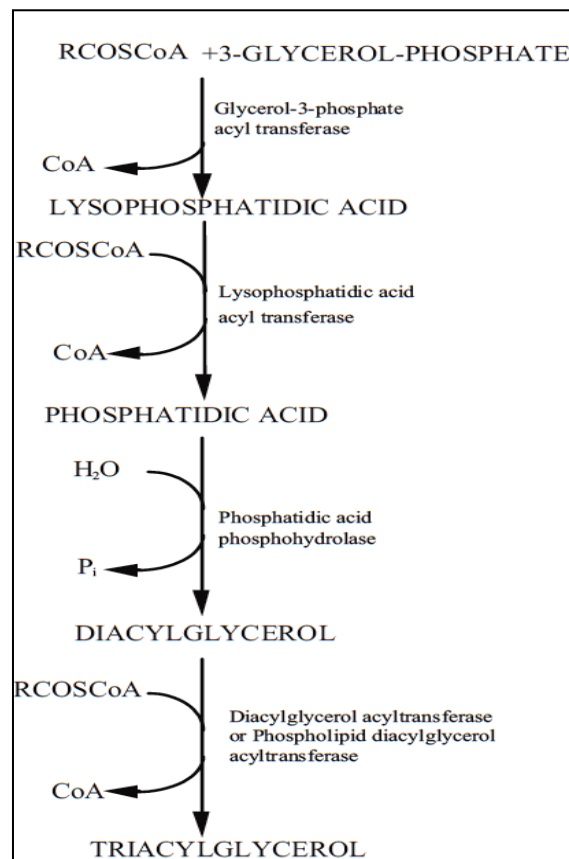
Γενικότερα, τα πολύ ενζυμικά συμπλέγματα της συνθετάσης των λιπαρών οξέων (Fatty Acids Synthetase, FAS) και της ATP-CL παρεμποδίζονται από την παρουσία εξωγενών

μεγάλων αλειφατικών αλυσίδων, όπως λιπαρών οξέων και n-αλκανίων, τα οποία μπορούν να εντοπιστούν στο θρεπτικό μέσο της καλλιέργειας (Papanikolaou and Aggelis, 2011).

Μετά τη βιοσύνθεση των εστέρων λιπαρού συνενζύμου A (Palmitoyl-CoA esters), διεξάγεται εστεροποίηση με γλυκερόλη με σκοπό την αποθήκευση λιπιδίων με την μορφή τριγλυκεριδίων (TAGs). Η σύνθεση διεξάγεται κυρίως από ένα μεταβολικό μονοπάτι το οποίο ονομάζεται ακυλίωση της α – φωσφορικής γλυκερόλης (α-glycerol phosphate acylation), το οποίο συνολικά αναπαριστάται στην παρακάτω εικόνα 3. και αναλύεται ακολούθως.

Στο πρώτο βήμα σύνθεσης των τριγλυκεριδίων, η 3- φωσφορική γλυκερόλη(G-3-P) ακυλιώνεται με το ένζυμο ακυλτρανφεράση (acyltransferase, GAT) στην θέση sn-1 προς σχηματισμό της 1-ακυλο-3-φωσφορική γλυκερόλης (λύσοφωσφατιδικό οξύ, lysophosphatidic acid- LPA). Κατόπιν, το λυσοφωσφατιδικό οξύ με την συμβολή του ενζύμου ακυλτρανφεράση του λυσοφωσφατιδικού οξέος(1-acyl-G-3-P acyltransferase, AGAT) ακυλιώνεται στην θέση sn-2 προς παραγωγή φωσφατιδικού οξέος(phosphatidic acid, PA). Ακολουθεί η αποφωσφορυλίωση (dephosphorylation) του φωσφατιδικού οξέος με το ένζυμο φωσφοροϋδρολάση του φωσφατιδικού οξέος (phosphatidic acid Phosphohydrolase, PAP) προς απελευθέρωση της δι-ακυλο-γλυκερόλης (DAG).

Στο τελικό βήμα, η δι-ακυλο-γλυκερόλη ακυλιώνεται είτε μέσω του ενζύμου ακυλτρανφεράση της δι-ακυλο-γλυκερόλης είτε μέσω του ενζύμου ακυλτρανφεράση της φωσφολιπιδιακής δι-ακυλο-γλυκερόλης προς παραγωγή τριγλυκεριδίων (TAGs) (Papanikolaou and Aggelis, 2011).

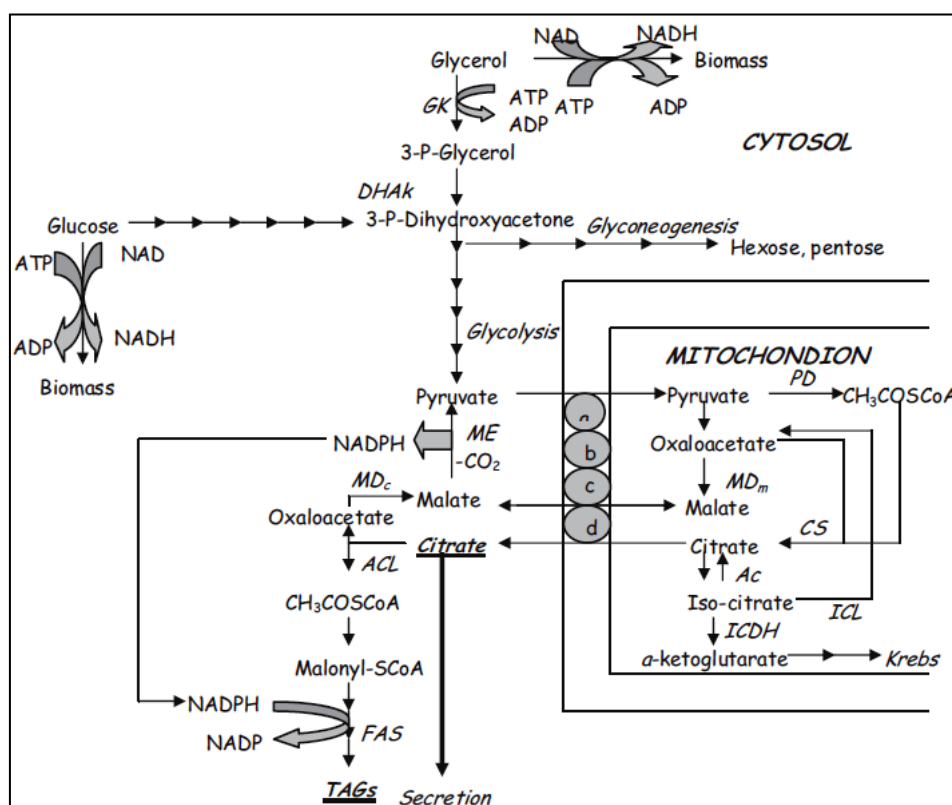


Εικόνα. 3 . Σχηματισμός ενδοκυτταρικών τρι-ακυλο-γλυκερολών μέσω ακυλίωσης της α- φωσφορο-γλυκερόλης (Ratledge, 1988;1997;)

Επίσης θα πρέπει να αναφέρουμε ότι το φωσφατιδικό οξύ δύναται να παραχθεί μέσω της δι-υδροξυ-φωσφορο ακετόνης (dihydroxyacetone-phosphate, DHAP). Η δι-υδροξυ-φωσφορο-ακετόνη ακυλιώνεται στην θέση sn-1 μέσω του ενζύμου ακυλτρανφεράση της DHAP (DHAPAT) προς παραγωγή της 1-ακυλο- δι-υδροξυ-φωσφορο ακετόνης(1-acyl-DHAP). Το προϊόν 1-ακυλο-DHAP ανάγεται μέσω του ενζύμου ρεδοουκτάση της DHAP(ADR) για να αποδώσει την 1-ακυλο-3-φωσφορο-γλυκερόλη. Η οποία με περαιτέρω ακυλίωση παράγει φωσφατιδικό οξύ(phosphatidic acid, PA), η συγκεκριμένη αντίδραση καταλύεται από το ένζυμο ακυλτρανφεράση του λυσοφωσφατιδικού οξέος(1-acyl-G-3-P acyltransferase, AGAT).

Στην περίπτωση των ελαιογόνων μικροοργανισμών, έχοντας υπόψη το βιοχημικό μονοπάτι της ακυλίωσης της α-φωσφορο-γλυκερόλης, η θέση sn-2 στην γλυκερόλη καταλαμβάνεται από ακόρεστα λιπαρά οξέα. Αυτό έχει ως συνέπεια, τα μικροβιακά λιπίδια να παράγουν τριγλυκερίδια (TAGs) παρόμοια δομής με τα τριγλυκερίδια φυτικής προέλευσης (Paranikolaou and Aggelis, 2011).

Τα κυριότερα στάδια βιοσυσσώρευσης λίπους(lipid accumulation) των ελαιογόνων μικροοργανισμών σε θρεπτικό μέσο με υψηλό λόγο C/N δίδονται στην κάτωθι εικόνα 4. (Ratledge 1988; Paranikolaou and Aggelis, 2009).



Εικόνα. 4 . Ενδιάμεσος μεταβολισμός ελαιογόνων μικροοργανισμών, (a-c) Σύστημα μεταφοράς πυροσταφυλικού οξέος από το κυταρόπλασμα στο μιτοχόνδριο και αντίθετως για το μηλικό, (d) Σύστημα μεταφοράς κιτρικού και μηλικού ανάμεσα σε κυταρόπλασμα και μιτοχόνδριο. Ένζυμα: Ac(ακοτινάση), ACC(καρβοξυλάση του ακέτυλου -CoA), ACL(ATP- κιτρική λύση), FAS(Συνθετάση λιπαρών οξέων), ICDH(ισοκιτρική αφυδρογονάση), MDc (μηλική αφυδρογονάση (κυτοπλασματική)), MDm(μηλική αφυδρογονάση (μιτοχονδριακή)), PD(πυροσταφυλική αφυδρογονάση), PFK(φωσφορική φρουκτο-κινάση), PK(πυροσταφυλική κινάση)(Ratledge 1988; Paranikolaou and Aggelis, 2009).

Με βάση όλα τα βιοχημικά μονοπάτια που έχουμε αναφέρει στην παρούσα μελέτη (η ενεργοποίηση των οποίων προκαλείται από τον υψηλό λόγο C/N στο θρεπτικό μέσο) οι μικροοργανισμοί κατηγοριοποιούνται σε αυτούς οι οποίοι δύνανται να συνθέσουν λίπος και σε αυτούς οι οποίοι συνθέτουν κιτρικό οξύ (Αγγελής, 2007; Papanikolaou and Aggelis, 2011).

Βασική εξαίρεση αποτελεί μια περίπτωση, κατά την οποία ο ίδιος μικροοργανισμός (συγκεκριμένα η ζύμη *Yarrowia lipolytica*) καλλιεργούμενη σε γλυκερόλη ως μοναδική πηγή άνθρακα, υπό συνθήκες που ευνοούσαν την σύνθεση του λίπους ή και την παραγωγή κιτρικού οξέος (δηλαδή καλλιέργεια με υψηλό λόγο C/N) παρήγαγε εξωκυτταρικά υψηλές ποσότητες κιτρικού οξέος (ζύμωση σε φιάλες). Όταν καλλιεργήθηκε σε βιοαντιδραστήρα συνεχούς καλλιέργειας με υψηλή ανάδευση και αερισμό, μας παρήγαγε υψηλές ποσότητες ενδοκυτταρικού λίπους (Papanikolaou et al., 2002, Papanikolaou and Aggelis, 2002).

1.2.3.2. ΖΥΜΟΜΥΚΗΤΑΣ *Rhodosporidium toruloides*

Ορισμένες ελαιογόνες ζύμες είναι ιδιαίτερα εύρωστες στη διαδικασία μετατροπής των σακχάρων σε μικροβιακά λιπίδια, όπως τριγλυκερίδια (TAGs) (Ratledge and Wynn, 2002). Διάφορα είδη ζυμών από το γένος *Rhodotorula* συχνά χρησιμοποιούνται για την αξιοποίηση ανανεώσιμων πηγών ενέργειας προς παραγωγή μικροβιακών λιπιδίων (Kosa and Ragauskas, 2011; Beoroulos et al., 2011). Η ζύμη *Rhodosporidium toruloides* (παιλιότερα γνωστή ως *Rhodotorula glutinis* ή *Rhodotorula gracilis*), είναι ένας μη παθογόνος μικροοργανισμός, που είναι ικανός να συσσωρεύει λιπίδια σε ποσοστό πάνω από 70%(w/w) επί της ξηράς ουσίας (Ratledge and Wynn, 2002; Li et al., 2007).



Εικόνα. 5 . Ελαιογόνος Ζύμη του γένους *Rhodotorula* spp.
(Πηγή: <http://www.bio-media.ca> , Ημ. Προσ:08/2/2014)

Ο ζυμομύκητας *Rhodosporidium toruloides* κατατάσσεται στην τάξη των Βασιδιομυκήτων (Akada et al., 1989; Zhu et al., 2012). Αρχικά είχε απομονωθεί από ξυλοπολτό κωνοφόρων δέντρων, εμφανίζει κόκκινο-ροζ χρώμα λόγω του ότι είναι πολύ καλός παραγωγός καροτενοειδών (Buzzini et al., 2007; Saenge et al., 2011).

Παράγει υψίστης βιοτεχνολογικής σημασίας ένζυμα όπως εστεράσες κεφαλοσπορίνων (cephalosporin esterases) (Politino et al., 1997) και υδρολάσες εποξειδίων (Botes, 1999). Πρέπει να σημειωθεί ότι η ζύμη *Rhodosporidium toruloides* έχει πολύ καλή ανθεκτικότητα σε παρεμποδιστικές ουσίες που δύνανται να εντοπισθούν σε υδρολύματα βιομάζας (Hu, et al., 2009).

Η συγκεκριμένη ζύμη έχει αποδειχτεί ικανή να αναπτύσσεται σε ένα μεγάλο εύρος υποστρωμάτων, συμπεριλαμβανομένου σακχάρων, αλλά όχι με περιορισμό σε αυτά. Μερικά από αυτά τα υποστρώματα είναι η γλυκόζη, η ξυλόζη, λιγνοκυτταρινούχα υδρολύματα και υδρολύματα με περίσσεια λάσπης (excess sludge hydrolysates) (Li et al., 2006; 2007; Xu et al., 2011; Huang et al., 2013).

Συνοπολογίζοντας όλα τα άνω, οι ερευνητές κατατάσσουν την παρούσα ελαιογόνο ζύμη ως ένα από τους μικροοργανισμούς με υψηλές βιοτεχνολογικές δυνατότητες στο τομέα της αειφόρου ανάπτυξης (Liu and Zhao, 2007; Kumari and Abraham, 2011; Zhu et al., 2012; Ling et al., 2013; Shen et al., 2013; Zhou et al., 2013; Gen et al., 2014).

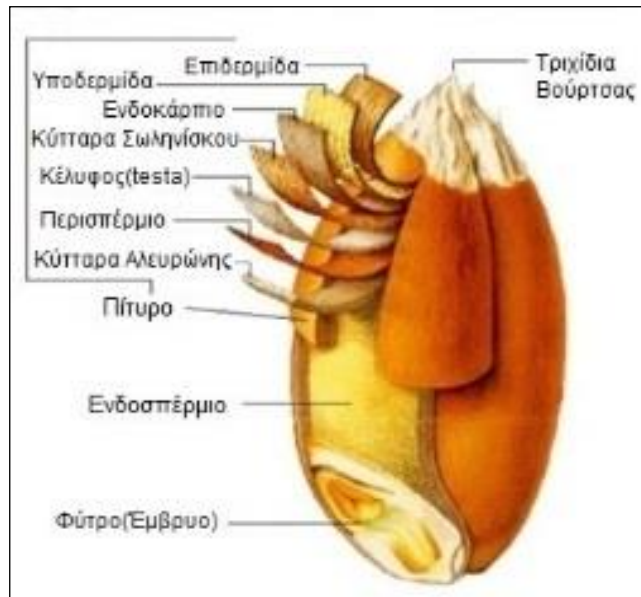
Ορισμένες μελέτες υποστηρίζουν ότι η παραγωγή ενδοκυτταρικών μικροβιακών λιπιδίων από το ζυμομύκητα *Rhodosporidium toruloides* ίσως να συνδέονται με το περιορισμό και άλλων θρεπτικών στοιχείων στο υπόστρωμα της καλλιέργειας, εκτός του αζώτου. Ειδικότερα, ο περιορισμός Φωσφόρου ή και θείου, έχουν προταθεί από ορισμένες ερευνητικές ομάδες, ως θετικοί παράγοντες για την συσσώρευση του ενδοκυτταρικού μικροβιακού λίπους στα κύτταρα της ζύμης *Rhodosporidium toruloides*, με βάση τις ακόλουθες εργασίες (Li et al., 2006; Wu et al., 2010; Wu et al., 2011).

Στην παρούσα μελέτη καλλιεργήσαμε την ελαιογόνο ζύμη *Rhodosporidium toruloides* σε υδρόλυμα Άνθους Ορύζης προς παραγωγή μικροβιακών λιπιδίων. Η υγρή καλλιέργεια της ζύμης πραγματοποιήθηκε σε βιοαντιδραστήρα 1.5 L, τόσο με ασυνεχής όσο και με ημισυνεχής λειτουργία. Η συνολική διαδικασία αναλύεται λεπτομερώς στο κεφάλαιο « 2. Υλικά και μέθοδοι ».

1.3. ΑΞΙΟΠΟΙΗΣΗΜΑ ΑΠΟΒΛΗΤΑ

1.3.1. ΠΙΤΥΡΟ ΣΙΤΟΥ

Το πίτυρο σίτου αποτελεί την εξωτερική επιδερμίδα στο σπόρο του σιταριού και αποτελεί παραπροϊόν της άλεσης του σιταριού, κατά την διαδικασία παραγωγής λευκού αλεύρου (Apprich et al., 2014).



Εικόνα. 6 . Σπόρος Σιταριού

(Πηγή : http://www.classofoods.com/page1_1.html , Ημ. Προσ:05/04/2014
<http://www.seedbiology.de/structure.asp> , Ημ. Προσ:08/04/2014)

Κατά την άλεση του σιταριού παραλαμβάνεται αλεύρο σε ποσοστό 73-77%(w/w) ανάλογα με την ποικιλία του σιταριού, τη διαδικασία άλεσης και τις συνθήκες καλλιέργειας (Elliott et al., 2002). Τα υπόλοιπα ρεύματα εξόδου της άλεσης αποτελούν το 23- 27%(w/w) και είναι παραπροϊόντα στα οποία περιλαμβάνονται πίτυρο σίτου, φύτρο και μέρη από το ενδοσπέρμιο. Το πιο σημαντικό κλάσμα από όλα τα άνω παραπροϊόντα είναι το πίτυρο, διότι κατέχει έως 25% του βάρους στο σπόρο του σιταριού (Neves et al., 2006).

Όμως, θα πρέπει να αναφερθεί ότι το κλάσμα του πίτυρου συνήθως περιέχει τμήματα του αμυλούχου ενδοσπέρμιου και του στρώματος της αλευρώνης. Καθώς δεν είναι δυνατόν να πετύχουμε πλήρη διαχωρισμό των εκάστοτε στρωμάτων που περιέχει ο σπόρος του σιταριού (Koutinas et al., 2006).

Το πίτυρο περιέχει διαιτητικές ίνες, πρωτεΐνες, άμυλο (ως επιμόλυνση από το αμυλούχο ενδοσπέρμιο), νερό και τέφρα. Επίσης, περιέχει σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις φαινολικά οξέα, φλαβονοειδή, λιγνάνες (διμερή κωνιφερυλικής αλκοόλης) (lignans) και φυτικό οξύ (Reisinger et al., 2013; Apprich et al., 2014; Pruckler et al., 2014).

Στο ακόλουθο πίνακα 1. δίδεται η τυπική σύσταση του πύτου σίτου με βάση δημοσιευμένες έρευνες, που αναφέρονται παραπλεύρως.

Πίνακας 1. Σύσταση Πύτου σίτου (Apprich et al., 2014).

Compound	Amount [%]	References
Water	12.1	(Roberts et al., 1985)
Protein	13.2–18.4	(Di Lena et al., 1997; Dornez et al., 2006)
Fat	3.5–3.9	(Babiker et al., 2009; Hemery et al., 2007)
Phytosterols	0.16–0.17	(Fardet, 2010; Hemery et al., 2007)
α -Linolenic acid	0.16	(Fardet, 2010)
Total carbohydrates	56.8	(Beaugrand, Crônier, Debeire, & Chabbert, 2004)
Starch	13.8–24.9	(Dornez et al., 2006; Hemery et al., 2007)
Cellulose	11.0	(Hemery et al., 2007)
Total arabinoxylans	10.9–26.0	(Dornez et al., 2006; Gebruers et al., 2008; Hemery et al., 2007)
Total β -glucan	2.1–2.5	(Li et al., 2006)
Phenolic acids	1.1	(Fardet, 2010)
Ferulic acid	0.02–1.5	(Anson et al., 2012; Hemery et al., 2007, 2010)
Phytic acid	4.2–5.4	(Fardet, 2010; Hemery et al., 2007)
Ash	3.4–8.1	(Babiker et al., 2009; Dornez et al., 2006; Fardet, 2010; Hemery et al., 2007)

Θεωρώντας ότι η κύρια ποσότητα σίτου που προορίζεται για ανθρώπινη κατανάλωση οδηγείται όλη κυρίως προς άλεση, τότε εκτιμάται ότι το πύτο που προκύπτει στο ρεύμα εξόδου της άλεσης ζυγίζει περίπου 150 εκατομμύρια τόνους ετησίως. Ενώ η τιμή του εκτιμάται περίπου σε 0.20- 0.25 \$/kg (<http://www.alibaba.com/showroom/price-of-wheat-bran.html>, Ημ. Προσ.:01/04/2014). Το πύτο χρησιμοποιείται σε ζωοτροφές, ενώ σε ορισμένες περιπτώσεις κάποιες ποσότητες χρησιμοποιούνται για ανθρώπινη κατανάλωση. Η χρήση του πύτου σίτου στην βιομηχανία τροφίμων έχει αυξηθεί ραγδαία την τελευταία δεκαετία, ως συστατικό κυρίως σε προϊόντα αρτοποιίας, σε είδη υγιεινής διατροφής και σε μίγματα δημητριακών (Pruckler et al., 2014).



Εικόνα. 7. Πύτο σιταριού

(Πηγή: <http://www.surajagro.com>, Ημ. Προσ.:13/2/2014)

Η βιοτεχνολογική αξιοποίηση του πύτουρου σίτου είναι μια πολλά υποσχόμενη μέθοδος. Έρευνες έχουν δείξει ότι το πύτυρο σίτου προωθεί την ανάπτυξη του μύκητα *Aspergillus awamori* (Adolph et al., 1996; Bertolin et al., 2003; Koutinas et al., 2006; Negi and Banerjee, 2010). Στην παρούσα εργασία αξιοποιήσαμε το πύτυρο, ως υπόστρωμα για την ανάπτυξη του μύκητα *Aspergillus awamori* σε ζύμωση στερεάς φάσης προς παραγωγή εξωκυτταρικών ενζύμων (αμυλασών και πρωτεασών), στηριζόμενοι στην διεθνή βιβλιογραφία (Pandey et al., 1999; Koutinas et al., 2001; Yamamoto et al., 2005; Negi and Banerjee, 2006; Prakasham et al., 2006; Koutinas et al., 2006; Negi and Banerjee, 2009; Wang et al., 2009; Negi and Banerjee, 2010; Negi et al., 2011).

1.3.2. ΑΝΘΟΣ ΟΡΥΖΗΣ

Το Άνθος Ορύζης είναι μια βρεφική τροφή (κρέμα) που παράγεται από την βιομηχανία τροφίμων ΓΙΩΤΗΣ ΑΕ. Είναι ένα άλευρο ορύζης από επιλεγμένες ποιότητες Ελληνικού ρυζιού, που περιέχει πληθώρα βιταμινών, πρεβιοτικών ινών και ιχνοστοιχείων. Η μέση ετήσια συνολική παραγωγή στερεών αποβλήτων στην βιομηχανία ΓΙΩΤΗΣ ΑΕ προέρχονται είτε από την παραγωγική διαδικασία, είτε αποτελούν επιστροφές από την αγορά, ενώ ανέρχονται περίπου σε 580 και 80 τόνους, αντίστοιχα.

Τα στερεά απόβλητα της βιομηχανίας ΓΙΩΤΗΣ ΑΕ διακρίνονται στις εξής κατηγορίες: α) Αλευρούχα υπολείμματα που έχουν υποστεί θερμική επεξεργασία, β) Διάφορα Αλευρούχα και Αμυλούχα απόβλητα που μπορεί να έχουν ή να μην έχουν υποστεί θερμική επεξεργασία, Γ) Υγρά προϊόντα με βάση το σιρόπι αμύλου ή άλλα σιρόπια και Δ) Διάφορα σοκολατοειδή.



Εικόνα. 8 . Βρεφική Κρέμα Άνθος Ορύζης
(Πηγή: [http:// http://www.giotis.gr](http://www.giotis.gr), Ημ. Προσ.:17/2/2014)

Οι ποσότητες του προϊόντος Άνθος Ορύζης που καταλήγουν στα απόβλητα της βιομηχανίας ανήκουν στην κατηγορία “ Αλευρούχα υπολείμματα που έχουν υποστεί θερμική επεξεργασία “. Η ετήσια παραγωγή του ρεύματος αυτού ανέρχεται περίπου στο 5% της ετήσιας παραγωγής στερεών αποβλήτων. Στην κατηγορία αυτή ανήκουν αποκλειστικά απόβλητα που προκύπτουν από την παραγωγή προϊόντων με βάση το ρυζάλευρο και έχουν υποστεί θερμική επεξεργασία. Στην παρούσα μελέτη, αξιοποιήσαμε ορισμένες ποσότητες Άνθους Ορύζης ως απόβλητο της βιομηχανίας ΓΙΩΤΗΣ ΑΕ προς παραγωγή μικροβιακών λιπιδίων.

Η μέση σύσταση του Άνθους ορύζης δίδεται στον ακόλουθο πίνακα 2., με βάση τα στοιχεία που αναγράφονται στην ετικέτα του προϊόντος, από την βιομηχανία ΓΙΩΤΗΣ ΑΕ. Ενώ, ακολούθως δίδεται σύσταση αλεύρων ρυζιού με βάση τη διεθνή βιβλιογραφία.

Πίνακας 2. Μέση Ανάλυση Άνθους Ορύζης
(Πηγή: ΓΙΩΤΗΣ ΑΕ, Ετικέτα Προϊόντος Άνθους Ορύζης, 22/02/2014)

ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ	Ανά 100g Αν. Ορύζης	ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ	Ανά 100g Αν. Ορύζης
Ενέργεια	389,5 kcal (1652.5 kJ)	Βιταμίνες	
Πρωτεΐνες	7,3 g	Βιταμίνη Α	420 µg
Υδατάνθρακες	86,1 g	Βιταμίνη D	5.5 µg
Σάκχαρα	1,3 g	Βιταμίνη C	30 mg
Σακχαρόζη	0,0 g	Βιταμίνη Β1	0.6 mg
Λιπαρά	1,1 g	Βιταμίνη Β2	0.5 mg
Κορεσμένα	0,4 g	Βιταμίνη Β6	0.4 mg
Εδώδιμες ίνες	3,0 g	Βιταμίνη Β12	0.5 µg
Πρεβιοτικές Ίνες	1,7 g	Βιταμίνη Ε	4,5 mg
Μέταλλα		Φολικό Οξύ	0.04 mg
Νάτριο	19,8 mg	Παντοθενικό Οξύ	0,8 mg
Ασβέστιο	8,4 mg	Νικοτιναμίδιο	3,0 mg
Σίδηρος	5,0 mg	Βιοτίνη	0,009 mg
Κάλιο	66,6 mg		
Μαγνήσιο	24,4 mg		
Χαλκός	0,15 mg		
Ψευδάργυρος	1,1 mg		
Μαγγάνιο	1,0 mg		
Ιώδιο	15,5 µg		

Πίνακας 3. Μέση σύσταση Αλεύρου Ρυζιού
(Πηγή: Puncha-arnon and Uttarap, 2013)

Chemical composition of rice flour	
Characteristics	Composition (% db)
	Rice flour
Protein (%)	6.22 ± 0.12
Lipid (%)	0.24 ± 0.01
Ash (%)	0.18 ± 0.01
Phosphorus (ppm)	102.60 ± 2.95
Amylose (%)	nd
Total starch (%)	84.66 ± 0.39
nd: not determined, db: dry basis	

Πίνακας 4. Μέση σύσταση Αλεύρου Ρυζιού
(Πηγή: Torbica et al., 2012)

Composition of rice flour (RF)	
Proteins, g/100 g dm	7.71
Ash, g/100 g dm	0.26
Starch, g/100 g dm	88.8
Fats, g/100 g dm	0.44
Sugars, g/100 g dm	0.27
dm – dry matter basis	

Όπως ήδη αναφέραμε το πύρινο σίτου αξιοποιήθηκε ως υπόστρωμα για την ανάπτυξη του μύκητα *Aspergillus awamori* με στόχο την εξωκυτταρική παραγωγή αμυλολυτικών και πρωτεολυτικών ενζύμων. Εν συνεχεία, με τα παραχθέντα ένζυμα (αμυλάσες και πρωτεάσες) υδρόλυσαμε το απόβλητο Άνθος Ορύζης, αποφεύγοντας την αγορά εμπορικών ενζύμων.

Η αξιοποίηση του Άνθους Ορύζης βασίστηκε στο γεγονός ότι είναι ένα απόβλητο πλούσιο σε άμυλο και πρωτεΐνες, με βάση το αλεύρο ρυζιού. Το συγκεκριμένο γεγονός επικυρώνεται από το πίνακα 2. με την ανάλυση του Άνθους Ορύζης από την παρασκευάστρια βιομηχανία, από τους πίνακες 3. & 4. και από την από την βιβλιογραφία (Torbica et al., 2012; de la Hera et al., 2013; Pancha-arnon and Uttarap, 2013; Teh et al., 2014;)

Με βάση το άμυλο του αποβλήτου μετά από την ενζυμική δράση των αμυλασών παραλάβαμε υδρόλυμα το οποίο περιείχε γλυκόζη. Ενώ με την δράση των πρωτεολυτικών ενζύμων πετύχαμε ενζυμική υδρόλυση των περιεχόμενων πρωτεϊνών και παραλαβή υδρόλυματος πλούσιου σε αμινοξέα και πεπτιδία. Έτσι η γλυκόζη θα αποτελέσει την κύρια πηγή άνθρακα, ενώ το ελεύθερο άζωτο αμινοξέων & πεπτιδίων τη κύρια πηγή οργανικού αζώτου για την ανάπτυξη της ελαιογόνου ζύμης *Rhodospiridium toruloides*. Θα πρέπει να αναφέρουμε ότι για την ανάπτυξη της ζύμης απαιτούνται και ιχνοστοιχεία, τα οποία σύμφωνα με τον πίνακα 2. εμπεριέχονται στον Ανθό Ορύζης.

Η χρήση του μύκητα *Aspergillus awamori* κρίθηκε απαραίτητη για την παραγωγή των αμυλασών και των πρωτεασών, προς υδρόλυση του Άνθους ορίζης. Δεδομένου του γεγονότος ότι τα κύτταρα της ζύμης *Rhodospiridium toruloides* δεν έχουν την δυνατότητα παραγωγής εξωκυτταρικών αμυλολυτικών (Gen et al., 2014). Με βάση τα προαναφερόμενα, θα πρέπει να τονίσουμε ότι δεν θα ήταν δυνατή η πλήρης αξιοποίηση του αποβλήτου “ Άνθος Ορύζης ” μόνο με την χρήση της ζύμης *Rhodospiridium toruloides*.

Όπως αναφέραμε και άνω το απόβλητο είχε υποστεί θερμική επεξεργασία, δηλαδή το αμυλούχο περιεχόμενο ήταν ήδη ζελατινοποιημένο. Ως ζελατινοποίηση αμύλου (Starch Gelatinization) ορίζεται η μη αντιστρεπτή διόγκωση των κόκκων του αμύλου με νερό κατά την θέρμανση του πάνω από μια κρίσιμη θερμοκρασία. Γενικότερα, το άμυλο έχει δομή μικρών ημισφαιρικών δομών που ονομάζονται κόκκοι και είναι πολυμερές της d-γλυκοπυρανόζης. Αποτελείται από αμυλόζη και αμυλοπηκτίνη. Στην αμυλόζη συναντάμε ευθύγραμμες αλυσίδες γλυκόζης συνδεδεμένες με δεσμούς α(1-4), ενώ στην αμυλοπηκτίνη έχουμε ευθύγραμμες και διακλαδιζόμενες αλυσίδες. Στα ευθύγραμμα τμήματα οι δεσμοί που σχηματίζονται ανάμεσα στις γλυκόζες είναι α(1-4,) ενώ στις διακλαδώσεις οι δεσμοί ανάμεσα στις γλυκόζες είναι α(1-6)(Bertoft, 2004).

Κατά την ζελατινοποίηση το άμυλο εμβαπτίζεται σε κρύο νερό (οι κόκκοι παραμένουν αδιάλυτοι), απορροφούν νερό μέχρι και 25% και διογκώνονται ελαφρά (9-20%). Με την αύξηση της θερμοκρασίας η δομή του κόκκου σταδιακά μειώνεται, μέχρι το σημείο ζελατινοποίησης. Στο σημείο αυτό παρατηρείται απώλεια της κρυσταλλικότητας, αύξηση του ιξώδους και ταχεία διόγκωση.

Με την συνέχιση της αύξησης της θερμοκρασίας έχουμε αύξησης της διόγκωσης και αύξηση του διαλυτού αμύλου. Στο τέλος οι κόκκοι αμύλου διαρρηγνύονται και η αμυλοπηκτίνη ρευστοποιείται. Η αμυλόζη κυρίως εξέρχεται από τους κόκκους, προκαλώντας μια απότομη αύξηση του ιξώδους του αιωρήματος και οι κόκκοι συγκολλούνται. Στο σημείο αυτό έχουμε σχηματισμό πήγματος (gel)(Van der Maarel et al., 2002).

Μετά την ζελατινοποίηση του αμύλου ακολουθεί η ενζυμική υδρόλυση. Στο πρώτο στάδιο της ενζυμικής υδρόλυσης του αμύλου έχουμε την υγροποίηση του αμύλου (Starch liquefaction), διαδικασία κατά την επιτυγχάνεται μέσω της δράση των ενζύμων α και β αμυλάσης.

Συγκεκριμένα, η α-αμυλάση διασπά ταχύτατα τις αλυσίδες του αμύλου σε τυχαία σημεία υδρολύοντας τους α-(1,4) γλυκοζιτικούς δεσμούς (Robyt, 2009; De Souza and de Oliveira, 2010). Ενώ, η β-αμυλάση είναι μια έξω- υδρολάση η οποία δεν δρα σε τυχαία σημεία, αλλά ενεργεί προς μια συγκεκριμένη κατεύθυνση. Ξεκινώντας από το μη-αναγωγικό άκρο της αλυσίδας, υδρολύοντας τους α-(1,4) γλυκοζιτικούς δεσμούς, προς σχηματισμό μορίων κυρίως μαλτόζης (διμερές γλυκόζης). Η δράση της σταματάει έως 3 γλυκοζιτικά κατάλοιπα μακριά από τον α-(1,6) γλυκοζιτικό δεσμό τον οποίο αδυνατεί να διασπάσει (Tanaka et al., 2002; Robyt, 2009).

Στο δεύτερο στάδιο της ενζυμικής υδρόλυσης του αμύλου έχουμε την σακχαροποίηση (Saccharification), διαδικασία κατά την οποία έχουμε δράση του ενζύμου γλυκοαμυλάση. Η γλυκοαμυλάση ή ισοαμυλάση είναι ένα ένζυμο που υδρολύει του α-(1,6) γλυκοζιτικούς δεσμούς (Horváthová et al., 2001; Robyt, 2009).

Στη πραγματικότητα κατά την ενζυμική υδρόλυση του αμυλούχου περιεχομένου του Άνθους Ορύζης τα στάδια της Υγροποίησης και Σακχαροποίησης δεν είναι διακριτά. Διότι τα ένζυμα συνυπάρχουν στο υγρό υδρόλυσης, δεν προστίθεται χρονικά. Στο τέλος της ενζυμικής υδρόλυσης του αμύλου στο υδρόλυμα μας, δύναται να έχουμε κυρίως μόρια γλυκόζης, αλλά και μαλτόζης. Ενώ η δράση των πρωτεασών επί των πρωτεϊνών του Άνθους ορύζης, λύει τις πρωτεΐνες προς απελευθέρωση αμινοξέων και πεπτιδίων.

Το υδρόλυμα που παρήχθει από την δράση των ενζύμων, αποτελεί το θρεπτικό μέσο για την ζύμωση. Στην ζύμωση υγρής φάσης με την ζύμη *Rhodosporidium toruloides* η γλυκόζη κυρίως αποτελεί την πηγή άνθρακα και το ελεύθερο άζωτο από τα αμινοξέα & τα πεπτιδία αποτελεί την πηγή οργανικού αζώτου. Για να πετύχουμε τις επιθυμητές αρχικές συγκεντρώσεις γλυκόζης και ελεύθερου αζώτου (αμινοξέων και πρωτεϊνών) θα εφαρμόσαμε τις κατάλληλες αραιώσεις επί του αρχικού υδρόλυματος που παράξαμε.

Όλες οι μέθοδοι και τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για την διεξαγωγή της υδρόλυσης και των ζυμώσεων στερεής & υγρής φάσης αναφέρονται αναλυτικά στο ακόλουθο κεφάλαιο «2. Υλικά και μέθοδοι».

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. ΖΥΜΩΣΗ ΣΤΕΡΕΑΣ ΦΑΣΗΣ

Η ζύμωση στερεής φάσης πραγματοποιήθηκε για την παραγωγή, ακατέργαστων αμυλολυτικών και πρωτεολυτικών ενζύμων, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για την ενζυμική υδρόλυση του αμυλούχου αποβλήτου “ Άνθος Ορύζης ”. Με τον τρόπο αυτό αποφύγαμε την αγορά εμπορικών ενζύμων, ενώ ταυτόχρονα αξιοποιήσαμε το πύτυρο σίτου, ως υπόστρωμα στην ζύμωση στερεής φάσης για την ανάπτυξη του στελέχους του μύκητα *Aspergillus awamori* 2B.361 U 2/1.

2.1.1. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΕΜΒΟΛΙΟΥ

Εισαγωγή

Στην προετοιμασία του εμβολίου για την ζύμωση στερεής φάσης χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος του μύκητα *Aspergillus awamori* 2B.361 U 2/1., το οποίο προμηθευτήκαμε από την τράπεζα μικροοργανισμών του εργαστηρίου μας. Το συγκεκριμένο στέλεχος ήταν αρχικά αποθηκευμένο σε μορφή σπορίων μέσα σε άμμο (silica gel) σε γυάλινο φιαλίδιο σε θερμοκρασία 4 °C (Koutinas et al., 2001). Ακολουθώντας, το στέλεχος ενυδατώθηκε, απομονώθηκε (μέσω της μεθόδου streaking) για να είμαστε σίγουροι ότι είναι καθαρό από επιμολύνσεις. Στην συνέχεια, αποθηκεύτηκε στους 4 °C σε δοκιμαστικούς σωλήνες με θρεπτικό μέσο το οποίο αποτελείται από 2 % (w/v) Άγαρ και 5 % (w/v) πύτυρο σίτου. Η ανανέωση του στελέχους πραγματοποιήθηκε ανά τακτά χρονικά διαστήματα, για να διατηρείται η ζωτικότητα του. Ειδικότερα, η ανανέωση του στελέχους πραγματοποιήθηκε πριν από κάθε εμβολιασμό.

Αναπτύξαμε το στέλεχος σε στερεό υπόστρωμα με τις ίδιες αναλογίες (2 %(w/v) Άγαρ και 5 %(w/v) πύτυρο σιταριού), σε κωνικές φιάλες των 250 mL, σε ανακινούμενο επωαστικό θάλαμο με ανάδευση 180 rpm με θερμοκρασία 30 °C. Σύμφωνα με έρευνες σε θερμοκρασία 30 °C ο μύκητας *Aspergillus awamori* παρουσιάζει την βέλτιστη ανάπτυξη (Astoreca et al., 2007).

Οι κωνικές φιάλες με τα σπόρια του μύκητα *Aspergillus awamori* 2B.361 U 2/1. που προέκυψαν μετά την επώαση, θα αποτελέσουν το εμβόλιο για την ζύμωση στερεάς φάσης.

Υλικά

2 Μικρές Κωνικές φιάλες των 50 mL & 8 Μεγάλες Κωνικές φιάλες 250 mL

Ογκομετρικός κύλινδρος των 25 mL , 50 mL & 500 mL

Απιονισμένο νερό

Tween 80(SIGMA ALDRICH, P1754)

Άγαρ(LAB, LAB168)

Πίτυρο σιταριού

Μικροβιολογικός Κρίκος

Φλόγιστρο

Θάλαμος Νηματικής Ροής (τύπου HOLTEN –TL2448)

2 δοκιμαστικοί σωλήνες με το στέλεχος *Aspergillus awamori* 2B.361 U 2/1

Συσκευή αποστείρωσης (Αυτόκαυστο, 121 °C για 20 min, 1.5 atm)

Υδρόφοβο Βαμβάκι

Ρυθμιζόμενη Μηχανική Πιπέτα (IKA Alpha vario) 100- 1000 µL & Tips του 1 mL

Ανακινούμενο επωαστικό θάλαμο (Shaker, ZHWY-211B ROCKING INCUBATOR, ZHICHENG)

Αλουμινόχαρτο

Αναδευτήρας τύπου Vortex

Ζυγός Ακριβείας (Santorius basic)

Πειραματική πορεία

Με ογκομετρικό κύλινδρο (25 mL) προσθέσαμε 10 mL απιονισμένου νερού σε κάθε μικρή κωνική φιάλη (50 mL) και 1- 2 σταγόνες Tween 80(0.01% v/v). Το Tween 80 χρησιμοποιείται ως προωθητής διασποράς(dispersive), για καλύτερη διασπορά των σπορίων του μύκητα.

Σε 300 mL απιονισμένου νερού προσθέτουμε 8 g Άγαρ και 20 g πίτυρο σιταριού. Το διάλυμα αναδεύτηκε, έπειτα με ογκομετρικό κύλινδρο(500 mL) συμπληρώθηκε μέχρι τελικού όγκου 400 mL. Έτσι, προέκυψε θρεπτικό μέσο με 2 %(w/v) Άγαρ και 5 %(w/v) πίτυρο σίτου. Με ογκομετρικό κύλινδρο (50 mL) προσθέσαμε 50 mL από το θρεπτικό μέσο σε κάθε μεγάλη κωνική φιάλη (250mL). Ακολούθως όλες οι κωνικές φιάλες (μεγάλες 250 mL και μικρές 25 mL) πωματίστηκαν με υδρόφοβο βαμβάκι & αλουμινόχαρτο. Όλες οι κωνικές φιάλες και μια θήκη με Tips του 1 mL οδηγήθηκαν προς αποστείρωση.

Αφού τα υλικά μας αποστειρώθηκαν, στην συνέχεια εργαστήκαμε σε θάλαμο νηματικής ροής, ασηπτικά. Σε κάθε δοκιμαστικό σωληνίσκο με *Aspergillus awamori* 2B.361 U 2/1 προσθέσαμε το περιεχόμενο από κάθε μικρή κωνική φιάλη (10 mL νερού + Tween 80). Με μικροβιολογικό κρίκο (ασηπτικά), ανακατεύουμε καλά, αιωρούμαι και διαλύουμε το μυκήλιο του σωληνίσκου στο υγρό που προσθέσαμε. Αναδεύουμε έντονα τους δοκιμαστικούς σωληνίσκους με αναδευτήρα τύπου Vortex και με τα αποστειρωμένα tips προσθέτουμε 1 mL από το υγρό εναιώρημα του σωληνίσκου σε κάθε μεγάλη κωνική φιάλη, (ασηπτικά). Έτσι για κάθε φιάλη η ποσότητα εμβολίου αντιστοιχεί σε 10^6 - 10^8 cfu (Koutinas et al., 2001).

Τέλος, όλες οι μεγάλες κωνικές φιάλες(250 mL) μεταφέρθηκαν για επώαση σε ανακινούμενο επωαστικό θάλαμο(Shaker), με θερμοκρασία 30 °C, 180 rpm για 5-6 ημέρες. Η σποριογονία του μύκητα θα δώσει σε όλη την επιφάνεια του υποστρώματος, σκούρο μαύρο χρώμα.

2.1.2. ΕΜΒΟΛΙΑΣΜΟΣ & ΖΥΜΩΣΗ ΣΤΕΡΕΑΣ ΦΑΣΗΣ

Εισαγωγή

Κατά την ζύμωση στερεάς φάσης εμβολιάσαμε & καλλιεργήσαμε το στέλεχος του μύκητα *Aspergillus awamori* 2B.361 U 2/1 σε πύτυρο σίτου. Στόχος μας είναι η παραγωγή ακατέργαστων αμυλασών & πρωτεασών, αξιοποιώντας το πύτυρο σίτου ως υπόστρωμα για την ανάπτυξη του στελέχους του μύκητα *Aspergillus awamori* 2B.361 U 2/1. Από την βιβλιογραφία αλλά και τη βιομηχανία τροφίμων ο μύκητας *Aspergillus awamori* είναι ευρέως γνωστός για την παραγωγή εξωκυτταρικών αμυλασών και πρωτεασών (Pandey et al., 1999; Koutinas et al., 2001; Yamamoto et al., 2005; Negi and Banerjee, 2006; Prakasham et al., 2006; Koutinas et al., 2006; Negi and Banerjee, 2009; Wang et al., 2009; Negi and Banerjee, 2010; Negi et al., 2011).

Υλικά

13 κωνικές φιάλες των 250 mL

Ρυθμιζόμενη Μηχανική Πιπέτα (IKA Alpha vario) 100- 1000 μ L

Tips του 1 mL

Υδροφοβο Βαμβάκι

Αλουμινόχαρτο

Ζυγός Ακριβείας (Santorius basic)

Πίτυρο σιταριού

Μικρές μπίλιες διασποράς(μικρά γυάλινα σφαιρίδια διαμέτρου 2mm)

1 μικρή κωνική φιάλη των 50 mL

Απιονισμένο νερό

Tween 80(SIGMA ALDRICH, P1754)

Θάλαμος Νηματικής Ροής (τύπου HOLTEN –TL2448)

Ογκομετρικός κύλινδρος των 250 mL

Ανακινούμενο επωαστικό θάλαμο (Shaker, ZHWY-211B ROCKING INCUBATOR, ZHICHENG)

Συσκευή αποστείρωσης (Αυτόκαυστο, 121 °C , 20 min, 1.5 atm)

Φλόγιστρο

1 κωνική φιάλη με το αναπτυγμένο στέλεχος *Aspergillus awamori* 2B.361 U 2/1(Εμβόλιο)

Πειραματική πορεία

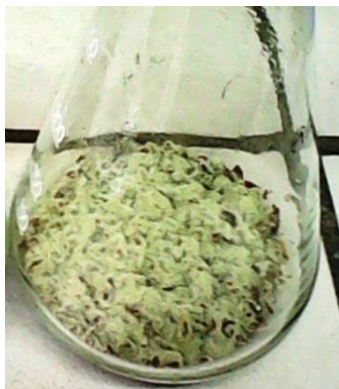
Ζυγίσαμε 5 g πύρου σίτου και τα προσθέσαμε σε μια κενή κωνική φιάλη(250 mL). Αυτή η διαδικασία έγινε συνολικά για 12 κωνικές φιάλες.

Μικρή ποσότητα από μπίλιες (μικρά γυάλινα σφαιρίδια διαμέτρου 2 mm) προστέθηκε σε μια μικρή κενή κωνική φιάλη(50 mL). Ογκομετρήσαμε 130 mL νερού και τα προσθέσαμε σε μια κωνική φιάλη(250 mL) μαζί με 4 σταγόνες Tween 80 (0.01% V/V). Ο γαλακτωματοποιητής συμβάλει στην επίτευξη διασποράς των σπορίων του μύκητα στο θρεπτικό μέσο κατά τον εμβολιασμό. Όλες οι φιάλες πωματίστηκαν με υδρόφοβο βαμβάκι & αλουμινοχαρτο. Ακολούθως όλες οι φιάλες και μια θήκη με Tips του 1 mL οδηγήθηκαν προς αποστείρωση.

Μετά την αποστείρωση, εμβολιάσαμε τις κωνικές φιάλες με τα σπόρια του μύκητα σε θάλαμο νηματικής ροής, ασηπτικά. Μετά την επώαση των κωνικών φιαλών με τα σπόρια του στελέχους *Aspergillus awamori* 2B.361 U 2/1(μέθοδο που ήδη αναφέραμε κατά την διαδικασία παρασκευής του εμβολίου σε προηγούμενη παράγραφο (2.1.1)), θα χρησιμοποιήσουμε μια από αυτές τις κωνικές φιάλες με τα σπόρια ως εμβόλιο για την ζύμωση στερεάς φάσης.

Έτσι, σε μια κωνική φιάλη με τα σπόρια του στελέχους *Aspergillus awamori* 2B.361 U 2/1(Εμβόλιο), ασηπτικά προσθέτουμε: α) τις μπίλιες από την μικρή κωνική φιάλη και β) τα 130 mL νερού από την μεγάλη κωνική φιάλη. Κατά την διάρκεια της προσθήκης των υλικών αναδεύουμε έντονα, για να αιωρήσουμε και να διαλύσουμε το μυκήλιο του στελέχους στο υγρό, με την βοήθεια αποστειρωμένων μικρών γυάλινων σφαιριδίων (μπίλιες). Το υγρό (εναιώρημα) στο τέλος της διαδικασίας θα έχει έντονο σκούρο μαύρο χρώμα λόγω των σπορίων του μύκητα που αιωρούνται σε αυτό. Ακολούθως, ασηπτικά με τα Tips του 1 mL προσθέτουμε 9 mL εμβολίου (εναιωρήματος) σε κάθε κωνική που περιέχει το πύρου. Αυτό έγινε για να πετύχουμε καλύτερη εξάπλωση του εμβολίου στο υπόστρωμα και ομοιόμορφη υγρασία, με τον τρόπο αυτό κάθε κωνική είχε 65% υγρασία (Wang et al., 2009). Με την προαναφερόμενη διαδικασία εμβολιάσαμε 12 κωνικές φιάλες.

Τέλος, οι εμβολιασμένες κωνικές φιάλες μεταφέρθηκαν για επώαση σε ανακινούμενο επωαστικό θάλαμο(Shaker), με θερμοκρασία 30 °C, 180 rpm για 48 ώρες. Μετά την επώαση το πύρου παίρνει ένα πράσινο χρώμα, όπως απεικονίζεται στην εικόνα 9 (ένδειξη της ανάπτυξης του μύκητα).



Εικόνα. 9 Ζύμωση στερεής φάσης μύκητα *Aspergillus awamori* σε πύρου σίτου
(Πηγή: Φωτογράφιση από το συγγραφέα, Εργ. Μικροβιολογίας & Βιοτεχνολογίας Τροφίμων, Γ.Π.Α.)

2.2. ENZYMIΚΗ ΥΔΡΟΛΥΣΗ

2.2.1. ENZYMIΚΗ ΥΔΡΟΛΥΣΗ

Εισαγωγή

Το στερεό υπόστρωμα της ζύμωσης (πίτυρο σίτου) που περιείχε την μυκητιακή μάζα(μετά την επώαση) προστέθηκε σε ένα υδατικό εναιώρημα που περιείχε ποσότητα αμυλούχου αποβλήτου (Άνθος Ορύζης). Έτσι, μέσω των ενζύμων που έχουν παραχθεί κατά την ζύμωση στερεής φάσης από το στέλεχος *Aspergillus awamori* 2B.361 U 2/1 (αμυλάσες και πρωτεάσες) θα γίνει ενζυμική υδρόλυση του Άνθους Ορύζης. Προς παραγωγή ενός θρεπτικού μέσου πλούσιου σε γλυκόζη και πηγές ελεύθερου αζώτου (αμινοξέα & πεπτιδία), συστατικά αναγκαία για την μικροβιακή ανάπτυξη και παραγωγή μικροβιακών λιπιδίων. Θα πρέπει να αναφερθεί ότι στο Άνθος Ορύζης περιέχονται και ιχνοστοιχεία.

Υλικά

Υδατόλουτρο

Μπουκάλια Duran 1 L & 500 mL

Μαγνήτες ανάδευσης

Μεταλλική σπάτουλα

Άνθος Ορύζης (Απόβλητο)

Ζυγός Ακριβείας (τριών δεκαδικών ψηφίων)

Απιονισμένο Νερό

Ογκομετρικός Κύλινδρος των 500 mL

Αλουμινόχαρτο, Υδροφοβο Βαμβάκι

Συσκευή αποστείρωσης (Αυτόκαυστο, 121 °C για 20 min, 1.5 atm)

Θάλαμος Νηματικής Ροής (τύπου HOLTEN –TL2448)

Συσκευή μέτρησης pH (τύπου Hanna)

Μπλέντερ κουζίνας

Διάλυμα Αιθανόλης 80% (v/v)

4 Κωνικές φιάλες από τη ζύμωση στερεάς φάσης(*Aspergillus awamori* με πίτυρο)

Φλόγιστρο

Τούλι

Πλαστικοί περιέκτες φυγοκέντρου (Falcon)

Φυγόκεντρος (τύπου Heraeus Sepatech Suprafuge 22)

Πειραματική πορεία

Αρχικά ζυγίσαμε 117 g Άνθους Ορύζης και τα προσθέτουμε σε μπουκάλι Duran (1 L). Εν συνέχεια, προσθέτουμε 500 mL απιονισμένου νερού σε διαφορετικό μπουκάλι Duran (500 mL). Και τα δύο μπουκάλια σφραγίστηκαν με βιδωτά καπάκια. Τα μπουκάλια Duran, μαγνήτες ανάδευσης και μια μεταλλική σπάτουλα οδηγήθηκαν προς αποστείρωση σε αυτόκαυστο. Οι μαγνήτες και η μεταλλική σπάτουλα τυλίχτηκαν σε αλουμινόχαρτο ξεχωριστά και μετά τοποθετήθηκαν στο αυτόκαυστο.

Αφού τα υλικά μας αποστειρώθηκαν, στην συνέχεια εργαστήκαμε σε θάλαμο νηματικής ροής, ασηπτικά. Αρχικά πλύναμε το Μπλέντερ κουζίνας με διάλυμα αιθανόλης 80% (v/v), υπό ασηπτικές συνθήκες (σε θάλαμο νηματικής ροής) προσθέτουμε μικρό όγκου(20- 30mL) από το αποστειρωμένο-απιονισμένο νερό(Duran 500 mL) σε κάθε κωνική φιάλη από τη ζύμωση στερεάς φάσης(*Aspergillus awamori* με πίτυρο). Με την αποστειρωμένη σπάτουλα ξύνουμε και διαλύουμε το στερεό υπόστρωμα της ζύμωσης (πίτυρο με τον ανεπτυγμένο μύκητα) στο νερό που προσθέσαμε στην κωνική. Η διαδικασία αυτή έγινε για 4 κωνικές φιάλες.

Το περιεχόμενο των τεσσάρων κωνικών φιαλών μεταφέρθηκε στο μπλέντερ κουζίνας και ομογενοποιήθηκε για 2 min, αφού αρχικά είχαμε πλύνει το μπλέντερ για αρκετή ώρα με διάλυμα αιθανόλης 80% (v/v). Το περιεχόμενο του μπλέντερ μεταφέρθηκε σε αποστειρωμένο μπουκάλι Duran(1 L), το οποίο περιείχε 117 g Άνθους Ορύζης, υπό ασηπτικές συνθήκες. Με βάση την προαναφερόμενη διαδικασία σε κάθε μπουκάλι Duran με 117 g Άνθος Ορύζης προστέθηκαν 4 κωνικές φιάλες από τη ζύμωση στερεάς κατάστασης.

Οι μπουκάλες Duran τοποθετήθηκαν σε υδατόλουτρο σε θερμοκρασία 55 °C. Επιλέχθηκε θερμοκρασία 55 °C διότι με βάση την βιβλιογραφία (Koutinas et al., 2006;Negi and Banerjee, 2009) κατά την ενζυμική υδρόλυση αμύλου σίτου και πρωτεΐνης σε θερμοκρασία 50 °C έχουμε την βέλτιστη πρωτεολυτική ενεργότητα. Ενώ σε θερμοκρασία 60 °C έχουμε βέλτιστη ενεργότητα για την γλυκοαμυλάση, έτσι επιλέξαμε μια ενδιάμεση τιμή θερμοκρασίας.

Αφήνουμε τα ένζυμα να δράσουν και μετά από 30 min παρατηρούμε ότι το περιεχόμενο της μπουκάλας Duran έχει όψη υδαρές (λόγω δράσης ενζύμων), ενώ αρχικά ήταν αμμώδες. Μόλις δούμε ότι όλο το περιεχόμενο της Duran έχει συγκεντρωθεί στο κάτω μέρος του μπουκαλιού (ένδειξη έναρξης δράσης των ενζύμων), ασηπτικά (με φλόγιστρο), συμπληρώνουμε τον όγκο εάν απαιτείται με αποστειρωμένο νερό μέχρι τελικού όγκου 500 mL. Έπειτα, προσθέτουμε 1 αποστειρωμένο μαγνήτη σε κάθε μπουκάλι Duran, ασηπτικά (με φλόγιστρο).

Τα μπουκάλια Duran οδηγούνται σε υδατόλουτρο, όπου αναδεύονται με την βοήθεια μαγνητικών αναδευτήρων, για 24 ώρες με θερμοκρασία υδατόλουτρου 55 °C. Πρέπει να αναφερθεί ότι η υδρόλυση πραγματοποιήθηκε με φυσικό μη ρυθμισμένο pH. Μετρήσαμε την τιμή pH τόσο στην αρχή του πειράματος όσο και στο τέλος (24 h), η οποία ήταν ίδια 5,5.

Τόσο μετά το πέρας της υδρόλυσης (24h) όσο και για κάθε δείγμα που λάβαμε κατά την διάρκεια της υδρόλυσης εφαρμόσαμε την ακόλουθη διαδικασία. Αρχικά φιλτράρισμα με διπλό τούλι για να απομακρυνθούν τα στερεά μεγάλης διαμέτρου και στη συνέχεια φυγοκέντρηση (10 min, 9000 rpm, 4 °C) δύο φορές, για την πλήρης απομάκρυνσης των στερεών.



Εικόνα 10. Ενζυμική Υδρόλυση Άνθους Ορύζης
(Πηγή: Φωτογράφιση από το συγγραφέα, Εργ. Μηχανικής Τροφίμων, Γ.Π.Α.)

Το υπερκείμενο υγρό που παραλήφθηκε είναι το υδρόλυμα που πρόκυψε από την υδρόλυση του Άνθους Ορύζης με την χρήση των ακατέργαστων ενζύμων που ήδη έχουμε αναφέρει στην παρούσα μελέτη. Στο τέλος της υδρόλυσης(24h) το υδρόλυμα αποθηκεύτηκε σε κατάψυξη μέχρι περαιτέρω επεξεργασίας, αφού προηγουμένως προσδιορίσαμε τις συγκεντρώσεις Γλυκόζης (g /L) και Ελεύθερου Αζώτου Αμινοξέων & Πεπτιδίων (Free Amino Nitrogen, FAN) (mg /L).

Για το προσδιορισμό της Γλυκόζης χρησιμοποιήσαμε την φωτομετρική μέθοδο του δινιτροσαλικυλικού οξέος (DNS), ενώ για το προσδιορισμό του Ελεύθερου Αζώτου Αμινοξέων & Πεπτιδίων(FAN, Free Amino Nitrogen) την φωτομετρική μέθοδο της Νινυδρίνης. Οι δύο προαναφερόμενες μέθοδοι θα αναλυθούν ακολούθως, στις παραγράφους 2.2.2. και 2.2.3.

Πρέπει να αναφέρουμε ότι κατά την διάρκεια της υδρόλυσης (ασηπτικά) συλλέξαμε ορισμένα δείγματα για να μελετήσουμε την κινητική της συγκέντρωσης της γλυκόζης και του ελεύθερου αζώτου αμινοξέων & πεπτιδίων (FAN) στο υδρόλυμα. Η συλλογή και η ανάλυση των δειγμάτων έγινε με την μεθοδολογία που αναφέρουμε στις άνω παραγράφους.

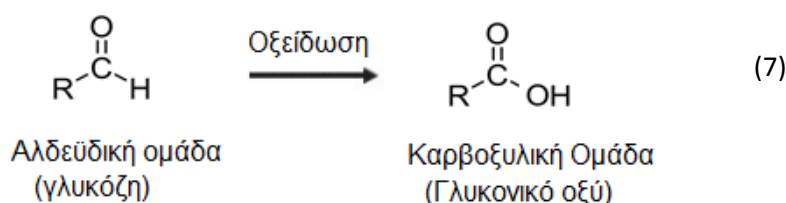
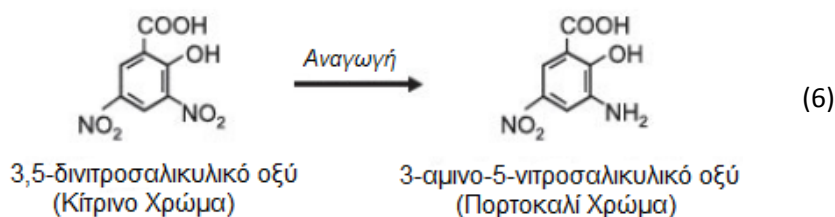
Θα πρέπει να αναφέρουμε, ότι προσπαθήσαμε να εφαρμόσουμε την υδρόλυση και με μεγαλύτερες συγκεντρώσεις από 234 g/L Άνθος Ορύζης. Όμως αυτό δεν ήταν δυνατό για τεχνικούς λόγους με την προαναφερόμενη μέθοδο, διότι δεν μπορούσαμε να αναδεύσουμε (ασηπτικά) τόσο πυκνό διάλυμα με τα διαθέσιμα μέσα.

2.2.2. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΓΛΥΚΟΖΗΣ - ΜΕΘΟΔΟΣ ΔΙΝΙΤΡΟΣΑΛΙΚΥΛΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ (DNS)

Εισαγωγή

Για τον προσδιορισμό της γλυκόζης χρησιμοποιήθηκε η Φωτομετρική μέθοδος του δινιτροσαλικυλικού οξέος (DNS) (Miller, 1959). Η συγκεκριμένη μέθοδος χρησιμοποιείται για το προσδιορισμό των αναγόντων σακχάρων. Ως ανάγοντα σάκχαρα, χαρακτηρίζονται τα σάκχαρα που εμφανίζουν μια ελεύθερη ημιακεταλική ομάδα στο ανωμερικό άτομο άνθρακα (σε προβολές σακχάρων κατά Haworth) (Kuszmarn, 2006). Η γλυκόζη είναι ένα ανάγον που υπάρχει μέσα στο υδρόλυμα μας και αποτελεί την κύρια πηγή άνθρακα.

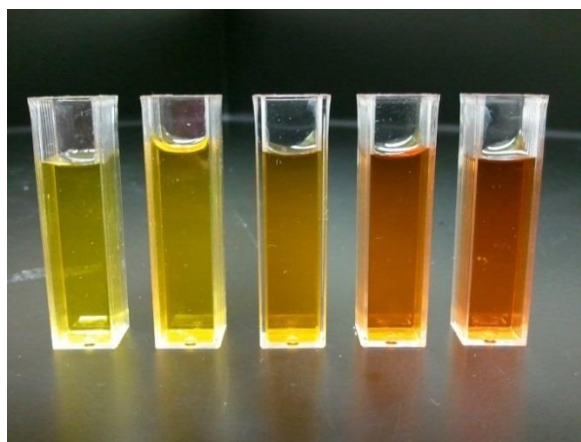
Η αλδεϋδική ομάδα της γλυκόζης ανάγει το 3,5-δινιτροσαλικυλικό οξύ προς 3-αμινο-5-νιτροσαλικυλικό οξύ, παρουσία καυστικού νατρίου, με βάση την ακόλουθη αντίδραση(6). Ταυτόχρονα έχουμε οξειδωση της γλυκόζης προς γλυκονικό οξύ, όπως δίδεται στην κάτωθι αντίδραση (7) (Kuszmarn, 2006). Το διάλυμα του 3,5-δινιτροσαλικυλικό οξέος φέρει κίτρινο χρώμα, ενώ στο τέλος της αντίδρασης (6) (Kuszmarn, 2006) το σχηματιζόμενο 3-αμινο-5-νιτροσαλικυλικό οξύ δίνει πορτοκαλί χρώμα στο διάλυμα.



Κατά την πορεία των αντιδράσεων απελευθερώνεται οξυγόνο, σε μορφή αερίου. Το διαλυμένο οξυγόνο μπορεί να εμποδίσει την οξειδωση της γλυκόζης, για αυτό το λόγο θειώδες (sulfite) προστίθεται στο αντιδραστήριο DNS για να απορροφήσει το διαλυμένο οξυγόνο. Πρέπει να σημειωθεί ότι το θειώδες (sulfite) δεν είναι απαραίτητο για την αντίδραση σχηματισμού χρώματος. Διαφορετικές εντάσεις πορτοκαλί χρώματος δύναται να παρατηρηθούν στο τέλος της αντίδρασης, ανάλογα με την συγκέντρωση και το είδος του ανάγοντος σακχάρου που θέλουμε να προσδιορίσουμε. Επομένως, είναι απαραίτητο να δημιουργηθούν καμπύλες αναφοράς με πρότυπα διαλύματα γνωστής συγκέντρωσης από το ανάγον σάκχαρο που επιθυμούμε να προσδιορίσουμε.

Ο σχηματισμός του 3-αμινο-5-νιτροσαλικυλικού οξέος στο τέλος της αντίδρασης, επηρεάζει καθοριστικά την απορρόφηση του διαλύματος κατά την φωτομέτρηση. Η μετρούμενη

απορρόφηση από το φωτόμετρο, σε μήκος κύματος 540 nm είναι ανάλογη με την συγκέντρωση του προσδιοριζόμενου ανάγοντος σακχάρου (Miller, 1959).



Εικόνα 11. Μέθοδος DNS- Ένταση χρώματος ανάλογη της συγκέντρωσης γλυκόζης (Πηγή: www.acs.org , Ημ. Προς.18/2/2014)

Υλικά

Δοκιμαστικοί σωλήνες

Αναδευτήρας (τύπου Vortex)

Ρυθμιζόμενη Μηχανική Πιπέτα (IKA Alpha vario) 100- 1000 μ L

Ρυθμιζόμενη Μηχανική Πιπέτα (LABMATE) 20- 200 μ L

Ρυθμιζόμενη Μηχανική Πιπέτα (Orange Scientific) 1- 5 mL

Tips

Υδατόλουτρο

Ογκομετρικός κύλινδρος 1000 mL

φωτόμετρο Διπλής Δέσμης (τύπου Hitachi U-2000 Spectrophotometer)

Κυψελίδες Φωτόμετρου (2 mL)

Χρονόμετρο

Απιονισμένο νερό

Αντιδραστήριο DNS:

- | | |
|--|---------|
| 1) 3,5-δινιτροσαλικυλικό οξύ (DNS) : | 10 g/L |
| 2) Τρυγικό καλιονάτριο (Potassium Sodium tartrate tetrahydrate): | 300 g/L |
| 3) Καυστικό Νάτριο 2 N : | 200 mL |

Πειραματική πορεία

Προετοιμασία αντιδραστηρίου DNS

Σε 500 mL απιονισμένου νερού προσθέτουμε 200 mL καυστικού νατρίου (2N) και εφαρμόζουμε ήπια θέρμανση στο διάλυμα. Ακολούθως, διαλύουμε αργά 10g 3,5-δινιτροσαλικυλικό οξύ (DNS). Έπειτα, προσθέτουμε αργά 300 g Τρυγικό καλιονάτριο και συμπληρώνουμε με απιονισμένο νερό μέχρι τελικού όγκου 1000 mL, με την βοήθεια ογκομετρικού κυλίνδρου. Στο τέλος το αντιδραστήριο DNS που παρασκευάσαμε συλλέγεται σε σκούρο γυάλινο περιέκτη (Miller, 1959).

Εφαρμογή μεθόδου

Σε δοκιμαστικό σωλήνα με 0.5 mL δείγμα, προστίθενται 0.5 mL αντιδραστηρίου DNS και εφαρμόζουμε ανάδευση με αναδευτήρα(Vortex). Για την παρασκευή του τυφλού δείγματος (μάρτυρα) ακολουθούμε ακριβώς την ίδια διαδικασία, όμως αντί για δείγμα χρησιμοποιούμε 0.5 mL απιονισμένου νερού.

Ακολούθως, οι δοκιμαστικοί σωλήνες μεταφέρονται σε υδατόλουτρο (100°C) για 5 min ακριβώς και αμέσως μετά ψύχονται σε λεκάνη με πάγο και νερό H₂O (20 °C) για 2 min. Έπειτα, προστίθενται 5 mL απιονισμένο H₂O σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα, ακολουθεί ανάδευση(Vortex) και μέτρηση της απορρόφησης στα 540 nm, με κυψελίδα των 2 mL.

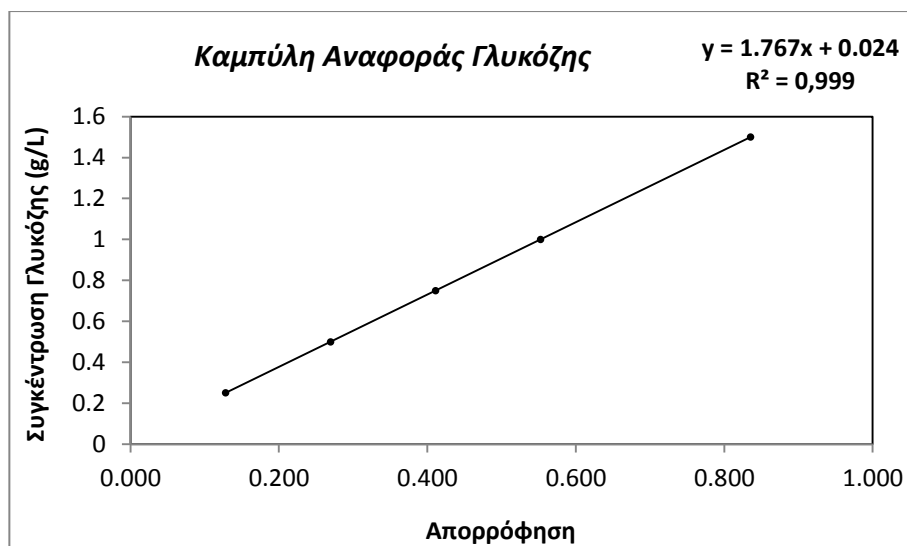
Η συγκέντρωση του δείγματος σε γλυκόζη υπολογίστηκε με βάση την χρήση της ακόλουθης καμπύλη αναφοράς που αναφέρεται στην παρακάτω έκφραση αποτελεσμάτων, εκφρασμένη σε g/L .

Όλες οι απορροφήσεις μετρήθηκαν με φασματοφωτόμετρο τύπου Hitachi U-2000 Spectrophotometer.

Έκφραση Αποτελεσμάτων

Καμπύλη Αναφοράς Γλυκόζης

Για να φτιάξουμε την καμπύλη αναφοράς της γλυκόζης, παρασκευάσαμε πρότυπα διαλύματα γλυκόζης με συγκεντρώσεις 0.25 g/L, 0.5 g/L, 0.75 g/L, 1 g/L και 1.5 g/L. Ακολουθήσαμε τη μέθοδο DNS για τα προαναφερόμενα πρότυπα διαλύματα γλυκόζης και με τις απορροφήσεις που παραλάβαμε από το φωτόμετρο φτιάξαμε την κάτωθι καμπύλη.



Γράφημα 1. Καμπύλη Αναφοράς Γλυκόζης- Μέθοδος DNS,
 • Πρότυπα διαλύματα γλυκόζης

Υπολογισμοί

Εφαρμόζοντας την μέθοδο DNS για τον προσδιορισμό της γλυκόζης, σε διαλύματα με τιμές συγκέντρωσης από 0,25 g/L έως και 1.5 g/L , θα παραλάβουμε μια τιμή απορρόφησης Abs. Από τον ακόλουθο τύπο (1) της καμπύλης αναφοράς μπορούμε να υπολογίσουμε την άγνωστη τιμή συγκέντρωσης, αντικαθιστώντας την μετρούμενη τιμή απορρόφησης.

$$C_{\text{γλυκόζης}} \text{ (g/L)} = (1.767 \times \text{Abs}) + 0.024, \quad R^2=0.999 \quad (1)$$

Όπου **Abs** είναι η απορρόφηση του διαλύματος που φωτομετρήθηκε

Εάν το δείγμα μας είναι πιο πυκνό, δηλαδή έχει συγκέντρωση γλυκόζης μεγαλύτερη από 1.5 g/L, τότε θα λαμβάνουμε τιμές απορρόφησης πολύ υψηλές. Στην περίπτωση αυτή αραιώνουμε το αρχικό μας δείγμα και ξαναεφαρμόζουμε την μέθοδο DNS με το αραιωμένο δείγμα. Έως ότου έρθουμε στο επιθυμητό εύρος απορροφήσεων(0.128- 0.835), με βάση την πρότυπη μας. Τότε ο τύπος(1) μετασχηματίζεται στον ακόλουθο τύπο (1α) ως εξής:

$$C_{\text{γλυκόζης}} \text{ (g/L)} = [(1.767 \times \text{Abs}) + 0.024] \times \text{Αραίωση} \quad (1\alpha)$$

Όπου,

Abs Απορρόφηση αραιωμένου διαλύματος που φωτομετρήθηκε

Αραίωση Αραίωση δείγματος π.χ. 1/ 100(σε 4950 μL νερού προσθέσαμε 50 μL δείγματος)

C_{γλυκόζης} Συγκέντρωση γλυκόζης δείγματος, g/L

Με βάση τον άνω τύπο 1α για Abs =0.4, Αραίωση =1/100, η συγκέντρωση γλυκόζης στο δείγμα δίδεται από τον κάτωθι υπολογισμό:

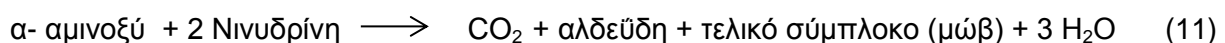
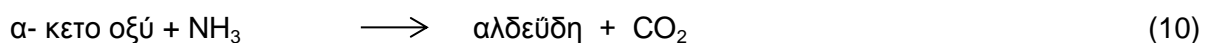
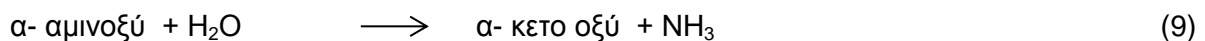
$$C_{\text{γλυκόζης}} \text{ (g/L)} = [(1.767 \times 0.400) + 0.024] \times 100 = 73.08 \text{ g Γλυκόζης/L}$$

2.2.3. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΛΕΥΘΕΡΟΥ ΑΖΩΤΟΥ ΑΜΙΝΟΞΕΩΝ & ΠΕΠΤΙΔΙΩΝ (FAN)- ΜΕΘΟΔΟΣ ΝΙΝΥΔΡΙΝΗΣ

Εισαγωγή

Χρησιμοποιήσαμε την φωτομετρική μέθοδο της Νινυδρίνης για τον προσδιορισμό του ελεύθερου αζώτου αμινοξέων & πεπτιδίων(FAN). Είναι μια αναλυτική φωτομετρική μέθοδος, με την οποία προσδιορίζουμε ποσοτικά το ελεύθερο άζωτο των αμινοξέων και πεπτιδίων μέσω της αντίδρασης της νινυδρίνης. Η μέθοδος της νινυδρίνης για το ποσοτικό προσδιορισμό των αμινοξέων παρουσιάστηκε στα τέλη του 1940. Χρησιμοποιείται με διάφορες παραλλαγές και βελτιώσεις, διότι δεν απαιτείται ακριβώς εξοπλισμός και επειδή θεωρείται κατάλληλη για αναλύσεις ρουτίνας μεγάλου αριθμού δειγμάτων(Moore et al.,1954; Rosen, 1957; Lie, 1973; Kolakowski, 2005; Sun, 2006).

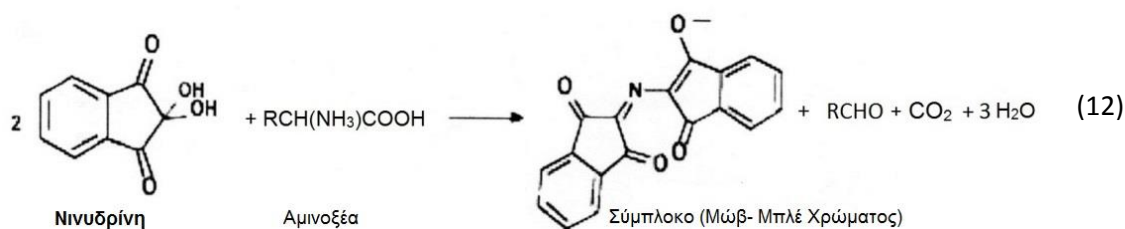
Τα αμινοξέα αποτελούν δομικές μονάδες των πεπτιδίων και πρωτεϊνών. Περιέχουν μια καρβοξυλική ομάδα και μια αμινομάδα, ενώ διαφέρουν ως προς την δομή των ομάδων R (αλειφατικές αλυσίδες) ή των πλευρικών αλυσίδων τους. Η νινυδρίνη χρησιμοποιείται ευρέως για την ανίχνευση των ελεύθερων α- αμινοξέων, αντιδράει με α-αμινικές ομάδες των πρωτεϊνών και τα ελεύθερα α-αμινοξέα, δίδοντας ένα σύμπλοκο με μπλε - μώβ χρώμα (χρωμοφόρες ομάδες), έπειτα από θέρμανση. Είναι μια από τις πιο ευαίσθητες μεθόδους των αμινοξέων, στην οποία δύνανται να συμμετάσχουν πρωτεΐνες, πεπτόνες, πεπτιδία, αμινοξέα, αμμωνία και άλλες ανώτερες αμίνες (Chawla, 2003). Οι παρακάτω αντιδράσεις (8), (9), (10) & (11)(Chawla, 2003)λαμβάνουν χώρα στην παρούσα μέθοδο:



Το πρώτο βήμα είναι μια οξειδοαναγωγική αντίδραση απαμίνωσης, η οποία απομακρύνει δύο υδρογόνα από το α- αμινοξύ. Παράλληλα, η νινυδρίνη ανάγεται και χάνει ένα άτομο οξυγόνου με το σχηματισμό ενός μορίου νερού. Ακολούθως, η αμινομάδα υδρολύεται γρήγορα για να σχηματίσει ένα α-κετο οξύ με την παραγωγή ενός μορίου αμμωνίας. Το α-κετο-οξύ στην συνέχεια υφίσταται μια αντίδραση αποκαρβοξυλίωσης υπό θερμαινόμενες συνθήκες, προς σχηματισμό μιας αλδεΐδης, η οποία έχει ένα λιγότερο άτομο άνθρακα από το αρχικό αμινοξύ. Στο στάδιο αυτό παράγεται και ένα άτομο διοξειδίου του άνθρακα.

Αυτά τα πρώτα στάδια αποσκοπούν στο σχηματισμό της αηγγμένης νινυδρίνης και της αμμωνίας που προαπαιτούνται για την ανάπτυξη του χρώματος όπως φαίνεται στην αντίδραση. Η νινυδρίνη της οποίας το αρχικό χρώμα είναι κίτρινο, αντιδρά με τα αμινοξέα και παράγει μώβ χρώμα, το οποίο ανιχνεύεται σε $\lambda = 570 \text{ nm}$ με την συγκεκριμένη μέθοδο(Moore et al.,1954; Rosen, 1957; Lie, 1973; Kolakowski, 2005; Sun, 2006).

Η ένταση του χρώματος που παράγεται είναι ανάλογη της συγκέντρωσης των αμινοξέων που περιέχονται στο δείγμα. Συνολικά η τελική αντίδραση της νινυδρίνης δίδεται από την ακόλουθη αντίδραση (12) (Kolakowski, 2005; Sun, 2006) ως εξής:



Η οξειδωτική απαμίνωση των αμινοξέων σε όξινο διάλυμα με νινυδρίνη οδηγεί στο σχηματισμό αμμωνίας και ανηγμένης νινυδρίνης. Η αμμωνία έπειτα συμπυκνώνεται με την ανηγμένη νινυδρίνη δημιουργώντας ένα σύμπλοκο (diketohydrindylidenediketohydrindamine, DYDA), το οποίο φέρει ένα χαρακτηριστικό μωβ χρώμα. Η αμμωνία σχηματίζει DYDA με νινυδρίνη μόνο με την παρουσία ενός αναγωγικού παράγοντα, ο οποίος είναι ικανός να σχηματίσει ανηγμένη νινυδρίνη.

Η μέθοδος της νινυδρίνης είναι γρήγορη και αρκετά ευαίσθητη, όμως εμφανίζει και ορισμένα μειονεκτήματα. Είναι χαρακτηριστικό ότι η κυστίνη δείχνει ότι μόνο το ήμισυ των αμινομάδων αντιδρούν, δεν σχηματίζει DYDA και παράγει ένα κίτρινο προϊόν παρόμοιο με αυτό που σχηματίζει η προλίνη. Η τρυπτοφάνη, επίσης παράγει ένα σαφώς ασθενέστερο χρώμα με το αντιδραστήριο της νινυδρίνης από ότι τα περισσότερα άλλα αμινοξέα (Kolakowski, 2005).

Η ένταση της αντίδρασης με τα πεπτίδια και τις πρωτεΐνες εξαρτάται από τον αριθμό των αμινοξέων που είναι διαθέσιμα. Είναι πολύ σημαντικό ότι οι άριστες συνθήκες για την αντίδραση είναι pH ≈ 5.5, θερμοκρασία 100 °C και χρόνο αντίδρασης 12 με 15 λεπτά. Η αντίδραση νινυδρίνης είναι μια από τις πιο συχνά χρησιμοποιούμενες για τον προσδιορισμό των ελεύθερων αμινοξέων σε μη πρωτεϊνούχα εκχυλίσματα ιστών (Kolakowski, 2005).

Υλικά

Αποθεματικό διάλυμα γλυκίνης (Glycine stock solution)

Πρότυπο διάλυμα γλυκίνης (Glycine standard solution)

Αντιδραστήριο χρώσης (Color Reagent)

Αντιδραστήριο αραίωσης (Dilution Reagent)

Δοκιμαστικοί σωλήνες

Αναδευτήρας (τύπου Vortex)

Ρυθμιζόμενη Μηχανική Πιπέτα (IKA Alpha vario) 100- 1000 μL

Ρυθμιζόμενη Μηχανική Πιπέτα (LABMATE) 20- 200 μL

Ρυθμιζόμενη Μηχανική Πιπέτα (Orange Scientific) 1- 5 mL

Υδατόλουτρο

Φωτόμετρο Διπλής Δέσμης (τύπου Hitachi U-2000 Spectrophotometer)

Κυψελίδες Φωτόμετρου (1.5 mL)

Χρονόμετρο

Απιονισμένο νερό

Ογκομετρικός κύλινδρος 1000 mL

Πειραματική πορεία

Παρασκευή Αποθεματικού διαλύματος γλυκίνης (Glycine Stock solution)

Σε 100 mL αποσταγμένου νερού διαλύονται 0,1072 g γλυκίνης και το διάλυμα αποθηκεύεται σε θερμοκρασία 4 °C.

Παρασκευή Πρότυπου διαλύματος γλυκίνης (Glycine Standard solution)

Το διάλυμα αυτό χρησιμοποιείται για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης. Έτσι, 1 mL από το αποθεματικό διάλυμα γλυκίνης διαλύεται σε 50 mL απιονισμένο νερό προκειμένου να επιτευχθεί τελική συγκέντρωση 4 mg FAN /L.

Παρασκευή Αντιδραστηρίου χρώσης (Color Reagent)

Για την παρασκευή του αντιδραστηρίου χρώσης χρησιμοποιούνται: Α) 49,71 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, Β) 5 g νινυδρίνη, Γ) 3 g φρουκτόζη, Δ) 60 g KH_2PO_4 . Προσθέτω τα άνω αντιδραστήρια (Α, Β & Γ) σε 1 L εκτός από το KH_2PO_4 . Έπειτα, προστίθεται το KH_2PO_4 παράλληλα με τη ρύθμιση του pH το οποίο πρέπει να κυμαίνεται από 6.6 – 6.8. Το διάλυμα αποθηκεύεται εν συνεχεία σε σκούρο μπουκάλι σε θερμοκρασία 4 °C, ενώ κρίνεται σκόπιμος έλεγχος και η διόρθωση της τιμής pH ανά τακτά χρονικά διαστήματα με την προσθήκη κατάλληλης ποσότητας KH_2PO_4 .

Αντιδραστήριο αραιώσης (Dilution Reagent)

Για το αντιδραστήριο αυτό 2 g KIO_3 (Potassium Iodate) διαλύονται σε 500 mL απιονισμένο νερό και στη συνέχεια προστίθεται 384 mL καθαρής αιθανόλης. Το διάλυμα μεταφέρεται σε ογκομετρικό κύλινδρο 1000 mL και συμπληρώνεται με νερό μέχρι τελικού όγκου 1000 mL. Ακολούθως αναδεύεται και φυλάσσεται σε ψυγείο, όχι κατάψυξη.

Εφαρμογή μεθόδου

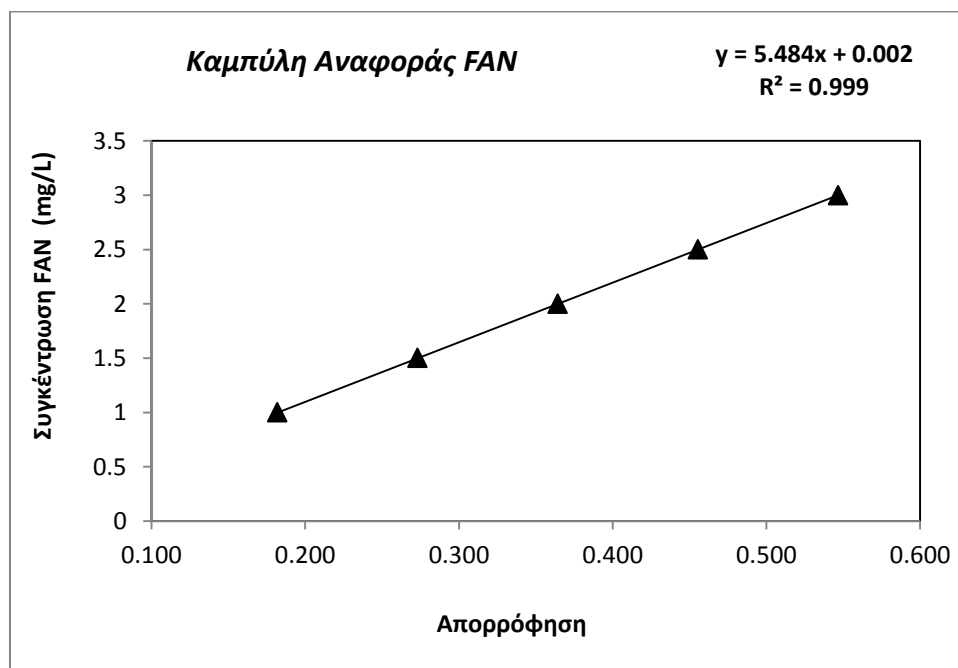
Σε δοκιμαστικό σωλήνα προστίθεται 1 mL δείγματος, 0,5 mL αντιδραστηρίου χρώσης (Color Reagent) και εφαρμόζουμε ανάδευση με αναδευτήρα(Vortex). Για την παρασκευή του τυφλού δείγματος (μάρτυρα) ακολουθούμε ακριβώς την ίδια διαδικασία, όμως αντί για δείγμα χρησιμοποιούμε 1 mL απιονισμένου νερού. Έπειτα, οι δοκιμαστικοί σωλήνες μεταφέρονται σε υδατόλουτρο (100 °C) για 16 min ακριβώς & αμέσως μετά ψύχονται σε λεκάνη με πάγο και νερό H₂O (20 °C) για 20 min ακριβώς.

Ακολούθως, σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα προστίθενται 2,5 mL αντιδραστηρίου αραιώσης και εφαρμόζουμε ανάδευση με αναδευτήρα(Vortex) για 20 sec ακριβώς. Εν συνεχεία, γίνεται μέτρηση της απορρόφησης στα 570 nm, με κυψελίδα (1.5 mL)(Lie, 1973).

Έκφραση Αποτελεσμάτων

Καμπύλη Αναφοράς

Για να φτιάξουμε την καμπύλη αναφοράς, παρασκευάσαμε πρότυπα διαλύματα γλυκίνης με συγκεντρώσεις 1 mg FAN/L, 1.5 mg FAN /L, 2 mg FAN /L, 2.5 mg FAN /L και 3 mg FAN /L από το πρότυπο διάλυμα γλυκίνης με αραιώσεις. Ακολουθήσαμε τη παρούσα μέθοδο για τα προαναφερόμενα πρότυπα διαλύματα γλυκίνης και με τις απορροφήσεις που παραλάβαμε φτιάξαμε την κάτωθι καμπύλη:



Γράφημα 2. Καμπύλη Αναφοράς FAN ▲ Πρότυπα διαλύματα FAN

Υπολογισμοί

Εφαρμόζοντας την μέθοδο για τον προσδιορισμό του ελεύθερου αζώτου αμινοξέων και πεπτιδίων(FAN), σε διαλύματα με τιμές συγκέντρωσης από 1 mg FAN/L έως και 3 mg FAN/L θα παραλάβουμε μια τιμή απορρόφησης **Abs**. Από τον ακόλουθο τύπο (2) της καμπύλης αναφοράς μπορούμε να υπολογίσουμε την άγνωστη τιμή συγκέντρωσης, γνωρίζοντας την αντίστοιχη τιμή απορρόφησης, με βάση την παρούσα μέθοδο.

$$\text{FAN (mg/L)} = (5.484 \times \text{Abs}) + 0.002, R^2=0.999 \quad (2)$$

Όπου,

Abs Απορρόφηση του διαλύματος που φωτομετρήθηκε

FAN Συγκέντρωση Ελεύθερου Αζώτου Αμινοξέων & Πεπτιδίων διαλύματος, mg/L

Εάν το δείγμα μας είναι πιο πυκνό, δηλαδή έχει συγκέντρωση μεγαλύτερη από 3 mg FAN/L, τότε θα λαμβάνουμε τιμές απορρόφησης πολύ υψηλές. Στην περίπτωση αυτή αραιώνουμε το αρχικό μας δείγμα και ξαναεφαρμόζουμε την ίδια μέθοδο με αραιωμένο δείγμα. Έως ότου έρθουμε στο επιθυμητό εύρος απορροφήσεων(0.182-0.547), με βάση την πρότυπη μας. Τότε ο τύπος (2) μετασχηματίζεται στο τύπο (2α) ως εξής:

$$\text{FAN (mg/L)} = [(5,484 \times \text{Abs}) + 0,002] \times \text{Αραίωση} \quad (2\alpha)$$

Όπου,

Abs Απορρόφηση αραιωμένου διαλύματος που φωτομετρήθηκε

FAN Συγκέντρωση Ελεύθερου Αζώτου Αμινοξέων & Πεπτιδίων δείγματος, mg/L

π.χ. Για Αραίωση δείγματος 1/ 200, δηλαδή σε 4975 μL απιονισμένου νερού προσθέσαμε 25 μL δείγματος, με βάση την παρούσα μέθοδο λάβαμε Abs = 0.250 στο φωτόμετρο

Τότε η συγκέντρωση του διαλύματος σε ελεύθερου αζώτου αμινοξέων και πεπτιδίων(FAN) με βάση την παρούσα μέθοδο δίδεται από τον κάτωθι υπολογισμό:

$$C_{\text{FAN}} \text{ (mg/L)} = [(5,484 \times 0.250) + 0.002] \times 200 = 274.6 \text{ mg FAN/L}$$



Εικόνα 12. Μέθοδος Νινυδρίνης- Ένταση χρώματος ανάλογη της συγκέντρωσης Ελεύθερου αζώτου αμινοξέων & Πεπτιδίων (Πηγή: www.acs.org ημ. Προσ. 19/2/2014)

2.3. ΖΥΜΩΣΗ ΥΓΡΗΣ ΦΑΣΗΣ

2.3.1 ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ & ΕΜΒΟΛΙΑΣΜΟΣ ΒΙΟΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΑ

Εισαγωγή

Από την ενζυμική υδρόλυση του Άνθους Ορύζης παρήχθει υδρόλυμα πλούσιο σε πηγές άνθρακα & αζώτου συστατικά απαραίτητα για την μικροβιακή ανάπτυξη και παραγωγή μικροβιακών λιπιδίων. Το υδρόλυμα χρησιμοποιήθηκε ως υπόστρωμα για ζύμωση υγρής φάσης σε βιοαντιδραστήρα ενεργού όγκου 1.5 L. Προς ανάπτυξη του στελέχους της ελαιογόνου ζύμης *Rhodospiridium toruloides* DSM 4444, έχοντας ως στόχο την παραγωγή μικροβιακών λιπιδίων (Li et al., 2007; Wu et al., 2010; Wang et al., 2012). Οι ζυμώσεις που πραγματοποιήσαμε στο βιοαντιδραστήρα ήταν αρχικά ασυνεχής καλλιέργειας (batch) και ακολούθως ημισυνεχούς τροφοδοτούμενης (fed-batch).

Πρέπει να τονίσουμε ότι στην παρούσα μελέτη το υδρόλυμα που χρησιμοποιήθηκε ως θρεπτικό μέσο για την ζύμωση υγρής φάσης, δεν αποστειρώθηκε σε αυτόκαυστο. Αντιθέτως, οδηγήθηκε προς φιλτράρισμα (ασηπτικά) δύο φορές πριν εισέρθει στο βιοαντιδραστήρα. Τα φίλτρα είχαν πορώδες 0,2 μm μέσω των οποίων κατακρατήθηκαν τα υπάρχοντα κύτταρα του υδρολύματος. Ο βιοαντιδραστήρας πριν την είσοδο του θρεπτικού μέσου αποστειρώθηκε σε αυτόκαυστο μαζί με όλα τα περιφερειακά του δίκτυα.

Αρχικά, πριν από κάθε ζύμωση επαληθεύσαμε τις συγκεντρώσεις γλυκόζης και ελεύθερου αζώτου (αμινοξέων & πεπτιδίων) στο υδρόλυμα που είχαμε παραλάβει από την ενζυμική υδρόλυση (με βάση τις μεθόδους DNS και Νινυδρίνης που ήδη αναφέραμε αναλυτικά στις παραγράφους 2.2.3 & 2.2.2.). Εν συνεχεία, μέσω αραιώσεων του υδρολύματος προβήκαμε τις αρχικές επιθυμητές συγκεντρώσεις γλυκόζης και ελεύθερου αζώτου (αμινοξέων & πεπτιδίων) για το θρεπτικό μέσο της καλλιέργειας. Έπειτα, το θρεπτικό μέσο οδηγήθηκε προς διπλό φιλτράρισμα με φίλτρα πορώδους 0,2 μm για την απομάκρυνση όλων των υπαρχόντων κυττάρων, όπως προαναφέραμε.

Υλικά

Απιονισμένο νερό

Ηλεκτρική περιστροφική αντλία (Gilson- Miniplus 3)

Φίλτρα πορώδους 0,2 μm (Whatman, Polycap TC)

Ελαστικοί σωληνίσκοι διαμέτρου 3-5 mm υψηλής πίεσεως ($P \leq 4.1$ bar)

Βιοαντιδραστήρας ενεργού όγκου 1.5 L & Μονάδα Ελέγχου (New Brunswick Scientific)

Πλαστικοί περιέκτες φυγοκέντρου (Falcon)

Φυγόκεντρος (τύπου Heraeus Sepatech Suprafuge 22)

Ογκομετρικοί κύλινδροι των 1000 mL, 250 mL & 50 mL

Αυτόκαυστο(121 °C, 20 min, 1.5 atm)

Υδροφοβο βαμβάκι & Αλουμινόχαρτο

Πεπτόνη(Peptone Bacteriological, BIOLIFE)

Εκχύλισμα Ζύμης(Yeast Extract, LAB)

Εμπορική D- Γλυκόζη 95% καθαρότητας (Dextrose , Allied Signal-Riedel-deHaen)

Κωνικές φιάλες των 250 mL

Άγαρ(LAB, LAB168)

Malt Extract(LAB)

Δοκιμαστικοί σωλήνες με βιδωτό καπάκι

Μικροβιολογικός κρίκος

Ρυθμιζόμενη Μηχανική Πιπέτα (Orange Scientific) 1- 5 mL , tips

Θάλαμος Νηματικής Ροής (τύπου HOLTEN –TL2448)

Δοκιμαστικός σωλήνας με το στέλεχος *Rhodosporidium toruloides* DSM4444 (αναπτυγμένο σε Malt άγαρ) (Πηγή: *Εργαστήριο Μικροβιολογίας & Βιοτεχνολογίας Τροφίμων- Γ.Π.Α.*)

Φλόγιστρο

Επωαστικός κλίβανος

Ανακινούμενο επωαστικό θάλαμο (Shaker, ZHWY-211B ROCKING INCUBATOR, ZHICHENG)

Μπουκάλια Duran (1L)

Μικροσκόπιο

Πειραματική πορεία

Μέρα 1^η

Παρασκευάσαμε διάλυμα 60 mL Malt με την ακόλουθη σύνθεση: Α) 1% (w/v) Εκχύλισμα Ζύμης(Yeast Extract), Β) 0.5% (w/v) Πεπτόνη και Γ) 1% (w/v) Εμπορική D-Γλυκόζη καθαρότητας 95%, Δ) 1% (w/v) Malt Extract και Ε) 2.5 % (w/v) Άγαρ.

Προσθέσαμε 6 mL διαλύματος Malt σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα μέσω μηχανικής πιπέτας, η ίδια διαδικασία έγινε για 10 δοκιμαστικούς σωλήνες. Στην συνέχεια οι 10 δοκιμαστικοί σωλήνες οδηγήθηκαν προς αποστείρωση σε αυτόκαυστο, αφού πωματίστηκαν. Μετά την αποστείρωση οι δοκιμαστικοί σωλήνες με το Malt άγαρ στερεώθηκαν σε κεκλιμένη θέση μέχρι να σταθεροποιηθεί το θρεπτικό μέσο(Malt Άγαρ).

Ακολούθως, παρασκευάσαμε 150 mL διάλυμα YPD με την ακόλουθη σύνθεση: Α) 1% (w/v) Εκχύλισμα Ζύμης(Yeast Extract), Β) 1% (w/v) Πεπτόνη και Γ) 1% (w/v) Εμπορική D-Γλυκόζη καθαρότητας 95%.

Προσθέσαμε 50 mL διαλύματος YPD σε κάθε κωνική φιάλη (250 mL), αυτή η διαδικασία έγινε για 3 κωνικές φιάλες. Ακολούθως οι 3 φιάλες πωματίστηκαν με υδρόφοβο βαμβάκι & αλουμινόχαρτο και αποστειρώθηκαν σε αυτόκαυστο.

Αφού τα υλικά μας αποστειρώθηκαν, στην συνέχεια εργαστήκαμε σε θάλαμο νηματικής ροής (ασηπτικά). Μετά την αποστείρωση αφήσαμε τις αποστειρωμένες κωνικές φιάλες στο πάγκο του θαλάμου νηματικής ροής να έρθουν σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα με μικροβιολογικό κρίκο (το οποίο κάθε φορά πυρακτώναμε σε φλόγιστρο), ενοφθαλμίσαμε από το δοκιμαστικό σωλήνα με το στέλεχος *Rhodosporidium toruloides* DSM 4444 μία κρική σε κάθε αποστειρωμένη κωνική φιάλη με το θρεπτικό μέσο (YPD).

Ταυτόχρονα, πραγματοποιήσαμε ανανέωση των κυττάρων του στελέχους *Rhodosporidium toruloides* DSM 4444 σε 2 αποστειρωμένους δοκιμαστικούς σωλήνες με Malt άγαρ (που παρασκευάσαμε προηγουμένως) με την ίδια τεχνική. Οι δοκιμαστικοί σωλήνες επώαστηκαν σε κλίβανο με θερμοκρασία 28 °C για 24 h και μετά την επώαση τους αποθηκεύτηκαν σε τράπεζα με θερμοκρασία 4 °C.

Οι εμβολιασμένες κωνικές φιάλες με το στέλεχος *Rhodosporidium toruloides* DSM 4444 μεταφέρθηκαν για επώαση σε ανακινούμενο επωαστικό θάλαμο (Shaker) με θερμοκρασία 28 °C, 180 rpm για 24 h (Akada et al., 1989). Το αποθηκευμένο υδρόλυμα από την ενζυμική υδρόλυση αποψύχθηκε σε ψυγείο (2- 4 °C), καθώς μετά την παραγωγή του είχε αποθηκευτεί σε κατάψυξη. Για να είμαστε σίγουροι για την απομάκρυνση των στερεών συστατικών, το υδρόλυμα οδηγήθηκε προς φυγοκέντρηση (4 °C, 9000 rpm, 10 min).

Επαναλάβαμε τον προσδιορισμό της γλυκόζης και ελεύθερου αζώτου (αμινοξέων & πεπτιδίων) στο υδρόλυμα (με βάση τις μεθόδους DNS και Νινυδρίνης που ήδη αναφέραμε αναλυτικά στις παραγράφους 2.2.3 & 2.2.2.) για να επαληθεύσουμε τις τιμές που είχαμε προσδιορίσει στο τέλος της ενζυμικής υδρόλυσης, σε προηγούμενο στάδιο.

Έχοντας υπόψη μας τα ακόλουθα με βάση το εγχειρίδιο χρήσης του βιοαντιδραστήρα:

A) Ο τελικός ενεργός όγκος του υγρού ζύμωσης στο βιοαντιδραστήρα δεν θα πρέπει να ξεπερνάει το 1.5 L .

B) Ο αντιδραστήρας για τεχνικούς λόγους θα πρέπει να περιέχει τουλάχιστον 1 L κατά το στάδιο της αποστείρωσης.

Μέσω ισοζυγίων για γλυκόζη & FAN, προσδιορίσαμε τον όγκο υδρολύματος που θα πρέπει να χρησιμοποιήσουμε από το αρχικό υδρόλυμα για να φτάσουμε στις αρχικές επιθυμητές συγκεντρώσεις γλυκόζης & FAN στο υγρό της καλλιέργειας.

Ακολούθως, χρησιμοποιήσαμε την κάτωθι συνδεσμολογία για να φιλτράρουμε το υδρόλυμα για την απομάκρυνση πιθανών κυττάρων. Ένα μπουκάλι Duran (1L) συνδέθηκε σε σειρά με φίλτρο πορώδους 0,2 μm (Whatman, Polycap TC) μέσω ελαστικών σωληνίσκων υψηλής πίεσης. Τόσο από το υδρόλυμα μέχρι το φίλτρο, όσο και από το φίλτρο μέχρι το πώμα της μπουκάλας Duran. Η συγκεκριμένη συνδεσμολογία κατασκευάστηκε σε δύο αντίγραφα (A,B), τα οποία οδηγήθηκαν προς αποστείρωση σε αυτόκαυστο. Αφού, προηγουμένως τυλίχτηκαν οι άκρες τους με αλουμινόχαρτο.

Μετά την αποστείρωση, ο όγκος του υδρολύματος (που υπολογίσαμε μέσω ισοζυγίων ότι απαιτείται να προστεθεί στο βιοαντιδραστήρα) φιλτραρίστηκε με το πρώτο αντίγραφο Α της προαναφερόμενης αποστειρωμένης συνδεσμολογίας, με την βοήθεια ηλεκτρικής περιστροφικής αντλίας (Gilson- Miniplus 3). Εν συνεχεία, το ήδη φιλτραρισμένο υδρόλυμα

υπέστη και δεύτερο φιλτράρισμα, με την ίδια διαδικασία, με το αντίγραφο Β της προαναφερόμενης αποστειρωμένης συνδεσμολογίας.

Τελικά το υδρόλυμα μετά από τα δύο φιλτραρίσματα (ασηπτικά), συλλέγεται στο τελευταίο αποστειρωμένο Duran και αποθηκεύεται σφραγισμένο στο ψυγείο (4 °C). Όλη η άνω διαδικασία πραγματοποιήθηκε υπό ασηπτικές συνθήκες, στο τέλος της διαδικασίας τα δίκτυα και τα φίλτρα πλύθηκαν με καυτό νερό. Η χρήση φίλτρων και όχι αυτόκαυστου για την αποστείρωση του υδρόλυματος έγινε για την αποφυγή καραμελοποίησης των σακχάρων, καταστροφής των ιχνοστοιχείων και μετουσίωσης πρωτεϊνικών συστατικών του υδρόλυματος.



Εικόνα 13. Διπλό φιλτράρισμα υδρόλυματος με φίλτρα 0,2 μm
(Πηγή: Φωτογράφιση από το συγγραφέα, Εργ. Βιοτεχνολογίας & Μικροβιολογίας Τροφίμων, Γ.Π.Α.)

Στο βιοαντιδραστήρα αρχικώς προσθέσαμε 1000 mL απιονισμένου νερού για τις τεχνικές ανάγκες της αποστείρωσης, που προαναφέραμε. Διότι με βάση τον εγχειρίδιο του αντιδραστήρα θα πρέπει τα αισθητήρια pH και DO(Διαλυμένου Οξυγόνου) να βρίσκονται εντός διαλύματος κατά την διάρκεια της αποστείρωσης. Τοποθετήσαμε το όργανο μέτρησης pH στο αντιδραστήρα το οποίο προηγουμένως είχαμε βαθμονομήσει (calibration) με πρότυπα διαλύματα pH 4 & 7 σε θερμοκρασία δωματίου, σύμφωνα με το εγχειρίδιο. Ενώ, ταυτόχρονα τοποθετήθηκε αισθητήριο μέτρησης διαλυμένου οξυγόνου(Dissolved oxygen, DO), που βαθμονομήθηκε μετά την αποστείρωση του αντιδραστήρα, σε ακόλουθο στάδιο.

Παρασκευάσαμε διαλύματα καυστικού καλίου (KOH) 5M και θεικού οξέος H₂SO₄ 10%(v/v) μέσω των οποίων θα ρυθμίζεται η τιμή του pH σταθερή(6.0 ± 0,2) στην υγρή καλλιέργεια κατά την πορεία της ζύμωσης. Η προσθήκη των διαλυμάτων οξέος και βάσης γίνεται μέσω περιφερειακού δικτύου σωληνίσκων, αντλίας, κωνικών φιαλών συλλογής και ρυθμίζεται από την μονάδα ελέγχου του βιοαντιδραστήρα.

Η είσοδο του αέρα στο βιοαντιδραστήρα γίνεται μέσω συμπιεστή. Πριν την είσοδο του αέρα στο αντιδραστήρα τοποθετήθηκε φίλτρο 0,2 μm για αποφυγή επιμολύνσεων, ομοίως και στην έξοδο. Η ροή του αέρα στην είσοδο του αντιδραστήρα θα ρυθμιστεί με ρυθμιστή ροής (ροόμετρο) σταθερή σε 1,5 νm, σε επόμενο στάδιο. Επίσης τοποθετήσαμε 3 αναμονές (εναλλακτικές εισόδου), μια για την είσοδο του θρεπτικού υλικού (φιλτραρισμένο υδρόλυμα) στο βιοαντιδραστήρα, μετά την αποστείρωση, αλλά και για οτιδήποτε άλλο χρειαστεί.

Ο αντιδραστήρας οδηγήθηκε προς αποστείρωση σε αυτόκαυστο, μαζί με όλα τα περιφερειακά δίκτυα και τις σωληνώσεις. Όλοι οι χειρισμοί πραγματοποιήθηκαν με βάση το εγχειρίδιο χρήσης του κατασκευαστή, προς εξάλειψη των πειραματικών σφαλμάτων. Όλα τα ευαίσθητα τμήματα και άκρες δικτύων καλύφθηκαν με βαμβάκι και αλουμινόχαρτο.

Μετά την αποστείρωση αφήσαμε το βιοαντιδραστήρα να έρθει σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθως, συνδέσαμε το αισθητήριο ανάγνωσης διαλυμένου οξυγόνου και το μοτέρ περιστροφής του αναδευτήρα(impeller) με την μονάδα ελέγχου. Για την ομαλή λειτουργία του αισθητήριου ανάγνωσης διαλυμένου οξυγόνου, ο κατασκευαστής προτείνει ο βιοαντιδραστήρας να παραμείνει στην παρούσα κατάσταση υπό ήπια ανάδευση(150 rpm) για τουλάχιστον 8 ώρες.

Μέρα 2^η

Μετά την επώαση του εμβολίου στις κωνικές φιάλες (μετά από 24h), ελέγχουμε εάν το εμβόλιο (στέλεχος *Rhodospiridium toruloides* DSM 4444) είναι καθαρό και αναπτυγμένο. Για να ελέγξουμε εάν το εμβόλιο είναι καθαρό (χωρίς επιμολύνσεις) κάναμε μικροβιολογικό παρασκεύασμα και χρώση Gram. Ασηπτικά, εντός θαλάμου νηματικής ροής, με μικροβιολογικό κρίκο λαμβάνουμε 1 κρικιά από την κωνική φιάλη με το εμβόλιο και την εξαπλώνουμε σε αντικειμενοφόρο πλάκα, προς παρατήρηση στο μικροσκόπιο. Ακολούθως κάναμε και χρώση Gram(Holt et al., 1994; Αγγελής, 2007) στο παρασκεύασμα για να διασφαλίσουμε για την καθαρότητα του.

Ο βαθμός ανάπτυξης του εμβολίου ελέγχθηκε με την μέτρηση της οπτικής πυκνότητας (OD, Optical Density), σε μήκος κύματος $\lambda = 600\text{nm}$. Το κριτήριο μας ήταν να λαμβάνουμε τιμές απορρόφησης από 1.8- 2.0, για να χαρακτηρίσουμε το εμβόλιο ως επαρκώς ανεπτυγμένο στηριζόμενοι στη βιβλιογραφία (Akada et al., 1989; Li et al., 2007; Yang et al., 2008; Wiebe et al., 2012; Sitepu et al., 2013; Gen et al., 2014).

Αφού βεβαιωθήκαμε ότι το εμβόλιο είναι καθαρό και αναπτυγμένο προχωρήσαμε στο εμβολιασμό. Εάν δεν ικανοποιούνται οι προαναφερόμενες συνθήκες, τότε ελέγχουμε και τις άλλες δύο κωνικές φιάλες. Στην περίπτωση που και οι άλλες δύο κωνικές φιάλες εμβολίου δεν πληρούν τις άνω συνθήκες τότε επαναλαμβάνουμε ξανά την διαδικασία παρασκευής του εμβολίου. Στην δική μας περίπτωση το εμβόλιο ήταν καθαρό και ανεπτυγμένο επαρκώς.

Για το εμβολιασμό χρησιμοποιήσαμε μια κωνική φιάλη με 50 mL εμβόλιο. Όμως είχαμε παρασκευάσει συνολικά 3 φιάλες για να έχουμε δύο εναλλακτικές λύσεις σε περίπτωση επιμόλυνσης ή μη ανάπτυξης. Ο εμβολιασμός είναι 50 mL εμβολίου σε τελικό όγκο υγρού ζύμωσης 1500 mL, δηλαδή 3,3% (v/v) εμβόλιο στην μηδενική ώρα καλλιέργειας.

Θα πρέπει να υπενθυμίσουμε ότι αρχικά βάλαμε 1 L απιονισμένου νερού στο ζυμωτήρα, ως απαίτηση του κατασκευαστή (με βάση το εγχειρίδιο χρήσης) για να οδηγήσουμε το βιοαντιδραστήρα προς αποστείρωση. Με βάση τους υπολογισμούς μας (ισοζύγια) υπάρχει περίπτωση να απαιτείται η έξοδος νερού από το βιοαντιδραστήρα (μετά την αποστείρωση και πριν την είσοδο του υδρολύματος) για συγκεκριμένο μικρό όγκο, για να πετύχουμε τις επιθυμητές αρχικές συγκεντρώσεις γλυκόζης και FAN.

Στην περίπτωση αυτή συνδέουμε στο αντιδραστήρα αποστειρωμένο ελαστικό σωλήνα και μέσω της περιστροφική αντλίας αφαιρούμε τον όγκο ύδατος που απαιτείται, για να προβούμε

στις επιθυμητές αρχικές συγκεντρώσεις γλυκόζης & FAN με βάση την μετέπειτα προσθήκη υπολογισμένου όγκου υδρολύματος. Για την μέτρηση του όγκου του ύδατος που αφαιρούμε η άκρη του ελαστικού σωληνίσκου καταλήγει σε ογκομετρικό κύλινδρο, ενώ έχουμε υπολογίσει ότι ο όγκος του υγρού που κατακρατείται στο σωληνίσκο (δίκτυο) είναι περίπου 5 mL.

Στην συνέχεια συνδέουμε στον αντιδραστήρα το θερμόμετρο στην ειδική οπή με ταυτόχρονη προσθήκη γλυκερόλης (για πιο άμεση μεταφορά της θερμότητας). Το υδρόλυμα (θρεπτικό μέσο) που προηγουμένως είχε φιλτραριστεί δύο φορές, εισάγεται στο βιοαντιδραστήρα μέσω αποστειρωμένου ελαστικού σωλήνα με την βοήθεια της περιστροφική αντλίας. Αμέσως μετά, συνδέουμε το πεχάμετρο με το καλώδιο της μονάδας ελέγχου και ενεργοποιούμε τις αντλίες προσθήκης διαλυμάτων καυστικού καλίου (KOH) 5M και θεικού οξέος H_2SO_4 10%(v/v) μέσω των οποίων θα ρυθμιστεί η τιμή του pH σταθερή ($6.0 \pm 0,2$).

Συνδέουμε το μανδύα θέρμανσης περιμετρικά του αντιδραστήρα για να διατηρείται η θερμοκρασία στα επιθυμητά επίπεδα. Ανοίγουμε την παροχή του αέρα για τον βιοαντιδραστήρα και ρυθμίζουμε την ροή του αέρα στα 1,5 vvm ($V_{air}/V_{broth}/min$) Βαθμονομούμε το όργανο μέτρησης (αισθητήρας) διαλυτού οξυγόνου (Dissolved Oxygen), μέσω της διαδικασίας που αναφέρει το εγχειρίδιο του κατασκευαστή.

Στην συνέχεια ρυθμίζουμε όλες τις απαραίτητες παραμέτρους για την ζύμωση στο κέντρο ελέγχου του βιοαντιδραστήρα. Δηλαδή θερμοκρασία $27^\circ C$, pH $6.0 \pm 0,2$, DO 20% και ανάδευση 150-500 rpm (εξαρτώμενη από την τιμή DO). Η επιθυμητή θερμοκρασία καλλιέργειας στο βιοαντιδραστήρα είναι $28^\circ C$ για την παραγωγή μικροβιακών λιπιδίων με την παρούσα ζύμη και η τιμή pH 6.0 με βάση τη σχετική βιβλιογραφία (Akada et al., 1989; Wang et al., 2012; Siteru et al., 2013; Gen et al., 2014).

Όμως επειδή στο αντιδραστήρα είχαμε σύστημα μόνο θέρμανσης (και όχι σύστημα ψύξης) & συνυπολογίζοντας ότι η θερμοκρασία του χώρου ήταν πάνω από $24-26^\circ C$, είδαμε ότι ρυθμίζοντας την θερμοκρασία του βιοαντιδραστήρα στους $27^\circ C$ πετυχαίναμε πραγματική θερμοκρασία καλλιέργειας $27.8-28^\circ C$. Δηλαδή τιμές θερμοκρασίας σχεδόν $28^\circ C$. Αντιθέτως όταν ρυθμίσαμε την θερμοκρασία του βιοαντιδραστήρα στους $28^\circ C$ είδαμε ότι η πραγματική θερμοκρασία καλλιέργειας ήταν πολύ πάνω από $28^\circ C$, περίπου στους $29,5^\circ C$ κάτι που δεν θέλαμε. Οι άνω τιμές της θερμοκρασίας και pH επαληθεύτηκαν και με μετρήσεις σε δείγματα, με εξωτερικό θερμόμετρο και όργανο μέτρησης pH.

Η ανάδευση είναι συσχετισμένη αυτόματα (με λογισμικό) και ανάλογη με την συγκέντρωση διαλυμένου οξυγόνου στο υγρό της ζύμωσης. Αφού δούμε στο πίνακα ελέγχου ότι όλες οι ενδείξεις από τα αισθητήρια που προαναφέραμε είναι εντός των επιθυμητών ορίων και ελέγχουμε την ομαλή λειτουργία όλων των δικτύων, τότε προχωρούμε στον εμβολιασμό του βιοαντιδραστήρα.

Ακολουθως, μεταφέρουμε την κωνική φιάλη με το εμβόλιο εντός του θαλάμου νηματικής ροής. Ασηπτικά, με φλόγιστρο συνδέουμε ένα αποστειρωμένο ελαστικό σωληνίσκο στο εσωτερικό της κωνικής φιάλης και πωματίζουμε την κωνική φιάλη του εμβολίου με το προϋπάρχον βαμβάκι. Η άλλη άκρη του σωληνίσκου είναι ήδη καλυμμένη με αλουμινόχαρτο από την αποστείρωση. Μεταφέρουμε την κωνική πλησίον του βιοαντιδραστήρα και συνδέουμε τον ελαστικό σωληνίσκο στο βιοαντιδραστήρα, υπό ασηπτικές συνθήκες (φλόγιστρο).

Το περιεχόμενο της κωνικής φιάλης (κύτταρα Ζύμης) μεταφέρεται στο εσωτερικό του βιοαντιδραστήρα από το ελαστικό σωληνίσκο με την βοήθεια ηλεκτρικής περιστροφικής αντλίας, υπό ασηπτικές συνθήκες. Ενώ η κωνική με το εμβόλιο αναδεύεται έντονα για να μην μείνουν κύτταρα προσκολλημένα στο πυθμένα της κωνικής φιάλης. Ο εμβολιασμός όπως ήδη εξηγήσαμε είναι 3,3% (v/v) εμβόλιο, δηλαδή προσθήκη 50 mL εμβολίου σε τελικό όγκο υγρού ζύμωσης 1500 mL.

Μόλις ολοκληρωθεί ο εμβολιασμός του βιοαντιδραστήρα παίρνουμε δείγμα με αποστειρωμένη σύριγγα με διαδικασία που αναλύεται παρακάτω. Το δείγμα αυτό αποτελεί το μηδενικό σημείο(0 h) της ζύμωσης μας.



Εικόνα 14. Ζύμωση Υγρής Φάσης με την ελαιογόνο Ζύμη *Rhodosporidium toruloides* σε Βιοαντιδραστήρα (Πηγή: Φωτογράφιση από το συγγραφέα, Εργ. Βιοτεχνολογίας & Μικροβιολογίας Τροφίμων, Γ.Π.Α.)

2.3.2. ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑ

Εισαγωγή

Από το υγρό της ζύμωσης του βιοαντιδραστήρα παραλάβαμε δείγμα καλλιέργειας, με την βοήθεια αποστειρωμένη σύριγγας. Αρχικά παραλαμβάνουμε μικρό όγκο υγρού ζύμωσης (2-3 mL), τον οποίο απορρίπτουμε (απόρριμμα). Αυτό γίνεται για να αποβάλουμε τον όγκο υγρού που μπορεί να βρίσκεται στις σωληνώσεις του βιοαντιδραστήρα από προηγούμενη δειγματοληψία (προς αποφυγή σφαλμάτων). Ακολούθως, παραλαμβάνουμε δείγμα από το βιοαντιδραστήρα με αποστειρωμένη σύριγγα και αμέσως (ασηπτικά) ελέγχουμε την καθαρότητα της δείγματος με παρασκεύασμα στο μικροσκόπιο και με χρώση Gram.

Όλα τα απορρίμματα συλλέγονται σε ένα δοχείο και για κάθε δειγματοληψία μετράται και σημειώνεται ο όγκος του εκάστοτε απορρίμματος. Έτσι, τόσο για κάθε δειγματοληψία όσο και συνολικά στο τέλος της ζύμωσης γνωρίζουμε τον όγκο των απορριμμάτων στη καλλιέργεια.

Κατά κανόνα, για την δειγματοληψία του μηδενικού σημείου (0h) δεν απαιτείται η παραλαβή απορρίμματος πριν την συλλογή δείγματος.

Υλικά

Αποστειρωμένες σύριγγες 10- 20 mL

Ογκομετρικός κύλινδρος 10- 20 mL

Αιθανόλη 80% (v/v)

Γάντια χεριών

Απορροφητικό χαρτί

Πειραματική πορεία

Με αποστειρωμένη σύριγγα λαμβάνουμε 2- 3 mL από το υγρό της ζύμωσης του βιοαντιδραστήρα, η ποσότητα αυτή απορρίπτεται αμέσως (απόρριμμα). Ακολούθως, με καινούρια αποστειρωμένη σύριγγα παραλαμβάνουμε δείγμα από το υγρό ζύμωσης όγκου 4- 6 mL , του οποίου ο όγκος μετράται ακριβώς με ογκομετρικό κύλινδρο.

2.3.3 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΟΛΙΚΟΥ ΞΗΡΟΥ ΒΑΡΟΥΣ (TDW)

Εισαγωγή

Από το υγρό της ζύμωσης του βιοαντιδραστήρα παραλάβαμε δείγμα καλλιέργειας, όπως ήδη περιγράψαμε κατά την διαδικασία της δειγματοληψίας. Το δείγμα αφού ογκομετρήθηκε, φυγοκεντρήθηκε και μετά την φυγοκέντρηση παραλάβαμε τα κύτταρα (ίζημα). Το υπερκείμενο διάλυμα και το ίζημα (βιομάζα) διατηρήθηκαν ξεχωριστά. Το βάρος του ιζήματος προσδιορίστηκε μετά από ξήρανση και ζύγιση (σταθμική μέθοδος) (Papanikolaou & Aggelis, 2001; Wu et al., 2011; Wang et al., 2012). Ενώ το υπερκείμενο διατηρείται για περαιτέρω αναλύσεις, όπως προσδιορισμός γλυκόζης(DNS), προσδιορισμός ελεύθερου αζώτου αμινοξέων- πεπτιδίων(FAN) και ανόργανου φωσφόρου (IP).

Υλικά

Πλαστικοί περιέκτες φυγοκέντρου (Falcon)

Φυγόκεντρος (τύπου Heraeus Sepatech Suprafuge 22)

Γυάλινα φιαλίδια (τύπου Mc Cartney)

Ξηραντήρας HERAEUS (Τύπου TA1)

Ογκομετρικός κύλινδρος 10 mL

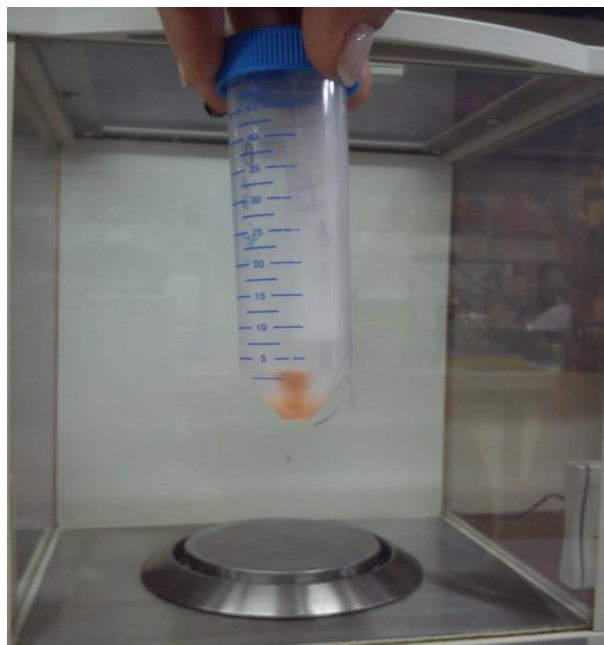
Ζυγός ακριβείας τύπου Sartorius basic(4 δεκαδικών ψηφίων)

Πειραματική πορεία

Μετά την δειγματοληψία, το δείγμα της καλλιέργειας μετρήθηκε με ογκομετρικό κύλινδρο, για την ακριβή μέτρηση του όγκου δείγματος (**V**), συνήθως παραλαμβάνουμε 4- 6 mL δείγματος. Ακολούθως, το δείγμα φυγοκεντρήθηκε σε φυγόκεντρο τύπου Heraeus Sepatech Suprafuge 22 (4 °C, 9000 rpm, 10 min), με την βοήθεια πλαστικών περιεκτών (τύπου Falcon).

Διατηρήσαμε το υπερκείμενο από την πρώτη φυγοκέντρηση από το οποίο θα προσδιορίσουμε:

- Συγκέντρωση της γλυκόζης με την φωτομετρική μέθοδο DNS, την οποία ήδη αναλύσαμε στην Παράγραφο 2.2.2. (Προσδιορισμός Γλυκόζης - Μέθοδος DNS)
- Συγκέντρωση του Ελεύθερου Αζώτου Αμινοξέων- Πεπτιδίων (FAN) με την φωτομετρική μέθοδο της Νινυδρίνης, την οποία ήδη αναλύσαμε στην Παράγραφο 2.2.3. (Προσδιορισμός Ελεύθερου Αζώτου Αμινοξέων & Πεπτιδίων(FAN)- Μέθοδος Νινυδρίνης)
- Συγκέντρωση του ανόργανου φωσφόρου (IP) με φωτομετρική μέθοδο, την οποία θα αναλύσαμε στην Παράγραφο 2.3.5. (Προσδιορισμού Ανόργανου Φωσφόρου (IP))



Εικόνα 15. Βιομάζα (ίζημα) *Rhodosporidium toruloides* μετά από φυγοκέντρηση
(Πηγή: Φωτογράφιση από το συγγραφέα, Εργ. Βιοτεχνολογίας & Μικροβιολογίας Τροφίμων, Γ.Π.Α.)

Στην συνέχεια κάναμε έκπλυση των κυττάρων με απιονισμένο νερό και δεύτερη φυγοκέντρηση. Μετά την 2^η φυγοκέντρηση έγινε πάλι έκπλυση των κυττάρων με απιονισμένο νερό και 3^η φυγοκέντρηση, έως ότου διαυγάσει τελείως το υπερκείμενο υγρό (νερό) από την τελευταία φυγοκέντρηση. Διότι θέλαμε να διατηρήσουμε μόνο τα κύτταρα και όχι εξωκυτταρικούς μεταβολίτες που δύναται να είναι προσκολλημένοι σε αυτά.

Στη συνέχεια, η βιομάζα (ίζημα) μεταφέρεται σε προ ζυγισμένο γυάλινο φιαλίδιο βάρους **M₀** και τοποθετείται στον Ξηραντήρα HERAEUS προς ξήρανση (130-150°C) μέχρι σταθερού βάρους, κατά κανόνα για περίπου 24 h. Μετά την ολοκλήρωση της ξήρανσης, αφού το φιαλίδιο έρθει σε θερμοκρασία δωματίου, το φιαλίδιο με την ξηρή βιομάζα ζυγίστηκε σε ζυγό ακριβείας, με τελικό βάρος **M** (Paranikolaou et al., 2001; Paranikolaou & Aggelis, 2002; Wu et al., 2011; Wang et al., 2012).

Έκφραση Αποτελεσμάτων

Το Ολικό Ξηρό Βάρος (Βιομάζα)(Total Dry Weight, TDW) εκφρασμένη σε g/L δίδεται από τον κάτωθι τύπο (3), με βάση την παρούσα μέθοδο:

$$TDW \text{ (g/L)} = [(M - M_0) \times 1000] / V \quad (3)$$

Όπου,

TDW	Συγκέντρωση Ολικού Ξηρού Βάρους (Βιομάζας) δείγματος,	g/L
M ₀	Βάρος κενού προ ζυγισμένο γυάλινου φιαλιδίου βάρους πριν τη ξήρανση,	g
M	Βάρος γυάλινου φιαλιδίου βάρους μετά την ξήρανση,	g
V	Όγκος δείγματος,	mL

2.3.4. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΟΛΙΚΟΥ ΕΝΔΟΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΟΥ ΛΙΠΟΥΣ(TL)

Εισαγωγή

Ο προσδιορισμός του ολικού ενδοκυτταρικού μικροβιακού λίπους (TL) στα κύτταρα των ελαιογόνων ζυμών (βιομάζας), γίνεται με την προσθήκη ποσότητας μικρού όγκου (λίγα mL) μίγματος διαλυτών χλωροφορμίου (CHCl₃)- μεθανόλης (CH₃OH) σε αναλογία 2:1 (Folch et al., 1957; Paranikolaou et al., 2001; Paranikolaou et al., 2002; Wiebe et al., 2012)

Με το συγκεκριμένο μίγμα διαλυτών επιτυγχάνεται διάρρηξη των κυττάρων και η εκχύλιση του συνολικού ενδοκυτταρικού μικροβιακού λίπους(Total Intracellular Lipids, TL), ήτοι τόσο τα αποθηκευτικά όσο και τα δομικά λιπίδια. Κατόπιν η βιομάζα μαζί με το μίγμα διαλυτών υφίστατο διήθηση, για την κατακράτηση των στερεών. Το διήθημα συλλέγεται σε προ ζυγισμένη φιάλη εξάτμισης, δηλαδή το διάλυμα των διαλυτών μέσα στο οποίο έχουν εκχυλιστεί τα μικροβιακά λιπίδια. Ακολουθεί εξάτμιση του μίγματος διαλυτών χλωροφορμίου - μεθανόλης σε περιστροφικό εξατμιστήρα(rotary evaporator) και στην φιάλη εξάτμισης παραμένει το μικροβιακό λίπος.

Υλικά

Μίγμα διαλυτών Χλωροφορμίου - Μεθανόλης σε αναλογία 2:1(Διάλυμα Folch)

Μεταλλική σπάτουλα ξυσίματος (Ξύστρο)

Περιστροφικός Εξατμιστήρας Buchi B-480(Rotary Evaporator)

Γυάλινες Φιάλες Εξάτμισης

Γυάλινο Χωνί Διήθησης

Διηθητικό Χαρτί

Ζυγός Ακριβείας(4 δεκαδικών ψηφίων)

Γυάλινοι περιέκτες μικρού όγκου (μπιζού)

Ελαστικά καπάκια περιεκτών μπιζού

Μεμβράνη παραφίνης- Parafilm

Πειραματική πορεία

Μετά την ολοκλήρωση του προσδιορισμού της βιομάζας που περιγράψαμε στην προηγούμενη μέθοδο, το φιαλίδιο(Mc Cartney) με την ξηρή βιομάζα (μετά το τέλος της ξήρασης) διατηρείται. Προς υπενθύμιση, αναφέρουμε ότι ο όγκος του δείγματος από το οποίο προσδιορίσαμε την βιομάζα συμβολίζεται με **V** και είχε μετρηθεί με ογκομετρικό κύλινδρο. Συνήθως, ως όγκο δείγματος λαμβάνουμε 4- 6 mL.

Στο συγκεκριμένο φιαλίδιο προσθέτουμε μικρό όγκο διαλύματος Folch 4-5 mL ώστε να καλυφτεί το $\frac{1}{4}$ της υπάρχουσας ξηρής βιομάζας. Με την βοήθεια μιας μεταλλικής σπάτουλας (ξύστρο) ξύνουμε καλά και επαναδιαλύουμε την ξηρή βιομάζα στο διάλυμα Folch.

Αφού διαλύσουμε όλη την βιομάζα στο διάλυμα Folch, συμπληρώνουμε το φιαλίδιο με διάλυμα Folch περίπου μέχρι τα $\frac{3}{4}$ του όγκου του φιαλιδίου (για να αποφύγουμε την υπερχειλίση και κατά συνέπεια την απώλεια λιπιδίων). Έπειτα, κλείνουμε το φιαλίδιο με καπάκι και το διατηρούμε σε σκοτεινό μέρος για 4 ημέρες τουλάχιστον. Όστε να λάβει χώρα πλήρως η διάρρηξη των κυττάρων, η εκχύλιση του μικροβιακού λίπους και να αποφευχθεί η οξειδωση των λιπαρών οξέων του ενδοκυτταρικού λίπους (λόγω έλλειψης φωτός).

Αφού περάσει το χρονικό διάστημα των 4 ημερών προζυγίζουμε μια κενή γυάλινη φιάλη εξάτμισης σε ζυγό ακριβείας, στην οποία αρχικά έχουμε σημειώσει στοιχεία σχετικά με το δείγμα μας (σήμανση). Το βάρος που καταγράψαμε από την κενή γυάλινη φιάλη εξάτμισης συμβολίζεται με **L₀**. Ακολούθως, όλο το περιεχόμενο του φιαλιδίου, διηθείται με την βοήθεια χωνιού και διηθητικού χαρτιού (ηθμού).

Το διήθημα συλλέγεται μέσα στην προ ζυγισμένη κενή φιάλη εξάτμισης και οδηγείται σε περιστροφικό εξατμιστήρα, στο οποίο η θερμοκρασία του υδατόλουτρου κυμαίνεται από 50-60 °C. Μετά το τέλος της εξάτμισης, η φιάλη εξάτμισης ζυγίζεται σε ζυγό ακριβείας, αφού πρώτα έρθει σε θερμοκρασία δωματίου. Το βάρος της φιάλης που ζυγίσαμε μετά την

εξάτμιση των διαλυτών συμβολίζεται με **L**(Papanikolaou et al., 2001; Papanikolaou & Aggelis, 2002;Jin et al., 2012; Wu et al., 2011; Wang et al., 2012).

Το περιεχόμενο της φιάλης εξάτμισης με την βοήθεια μικρού όγκου δ/ματοςLi Folch επαναδιαλύεται και συλλέγεται σε γυάλινους περιέκτες μικρού όγκου (μπιζού). Το οποίο φυλάσσεται στην κατάψυξη για περαιτέρω αναλύσεις του προφίλ των λιπαρών οξέων που απαρτίζουν το μικροβιακό λίπος, το οποίο παράξαμε κατά την ζύμωση

Έκφραση Αποτελεσμάτων

Με βάση την παρούσα μέθοδο η συγκέντρωση ενδοκυτταρικών μικροβιακών λιπιδίων(TL) στα δείγμα μας εκφρασμένη σε g/L δίδεται από τον κάτωθι τύπο (4):

$$TL \text{ (g/L)} = [(L - L_0) \times 1000] / V \quad (4)$$

Όπου,

TL	Συγκέντρωση Ολικού ενδοκυτταρικού μικροβιακού λίπους δείγματος,	g/L
L ₀	Βάρος κενής προ ζυγισμένης γυάλινης φιάλης εξάτμισης,	g
L	Βάρος γυάλινης φιάλης εξάτμισης (στο τέλος της εξάτμισης),	g
V	Όγκος δείγματος (που ογκομετρήσαμε για το προσδιορισμό της βιομάζας),	mL

2.3.5. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΝΟΡΓΑΝΟΥ ΦΩΣΦΟΡΟΥ (IP)

Εισαγωγή

Αρκετές χρωματομετρικές μέθοδοι έχουν προταθεί για τον προσδιορισμό του Ανόργανου Φώσφορου(IP), στις οποίες κοινή συνιστώσα είναι η αναγωγή του φωσφορομολυβδαινικού οξέος με άμεσο στόχο την ανάπτυξη μπλε χρώματος. Στις μεθόδους αυτές η ένταση του μπλε χρώματος είναι ανάλογη της συγκέντρωσης του ανόργανου φώσφορου(Fiske and Subarrow, 1925; King, 1932; Laurence, 1940; Koenig and Johnson, 1942; Herbet et al., 1971). Στην δική μας περίπτωση το Υπερχλωρικό οξύ (King, 1932), προστίθεται για την διευκόλυνση της καταστροφή της οργανικής ουσίας. Ο φώσφορος με το μολυβδαινικό αμμώνιο σχηματίζουν ένα σύμπλοκο (φωσφορο-μολυβδαινικό οξύ), το οποίο ανάγεται από το Ασκορβικό οξύ δίδοντας του μπλέ χρώμα. Γεγονός που θεωρείται αναγκαίο για τον προσδιορισμό του συνολικού ανόργανου φωσφόρου (Laurence, 1940; Chen et al., 1956; Herbet et al., 1971).

Υλικά

Δοκιμαστικοί σωλήνες

Αναδευτήρας (τύπου Vortex)

Ρυθμιζόμενη Μηχανική Πιπέτα (IKA Alpha vario) 100- 1000 μL

Ρυθμιζόμενη Μηχανική Πιπέτα (LABMATE) 20- 200 μL

Φωτόμετρο Διπλής Δέσμης (τύπου Hitachi U-2000 Spectrophotometer)

Κυψελίδες Φωτόμετρου (1.5 mL)

Χρονόμετρο

Απιονισμένο νερό

Διάλυμα Υπερχλωρικού οξέος 70% (v/v) (Perchloric acid)

Διάλυμα Ασκορβικού οξέος 1% (v/v) (Ascorbic acid)

Διάλυμα Μολυβδαινικού Αμμωνίου 5% (w/v) (Ammonium Molybdate)

Ζυγός Ακριβείας(4 δεκαδικών ψηφίων)

Ογκομετρική Φιάλη 100 mL & 250 mL

Πειραματική πορεία

Παρασκευή Αποθεματικού διαλύματος Δισόξινου Φωσφορικού Καλίου (Potassium dihydrogen phosphate, KH_2PO_4)

Ποσότητα 1,0967 g Δισόξινου Φωσφορικού καλίου (KH_2PO_4) ζυγίστηκε σε ζυγό ακριβείας και προστέθηκε σε 100 mL απιονισμένου νερού. Το διάλυμα μεταφέρθηκε σε ογκομετρική φιάλη των 250 mL και συμπληρώσαμε με απιονισμένο νερό μέχρι την χαραγή. Έτσι, παρασκευάσαμε αποθεματικό διάλυμα με συγκέντρωση 1 mg P/ mL (Laurence, 1940; Chen et al., 1956).

Παρασκευή Πρότυπου διαλύματος Ανόργανου Φωσφόρου(Inorganic Phosphorus , IP)

Το διάλυμα αυτό χρησιμοποιείται για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης. Έτσι, 1 mL από το αποθεματικό διάλυμα Δισόξινου Φωσφορικού καλίου(KH_2PO_4) προστίθεται σε 99 mL απιονισμένου νερού. Έτσι, επιτεύχθηκε διάλυμα με τελικό όγκο 100 mL και τελική συγκέντρωση 10 mg IP /L. Με την βοήθεια αραιώσεων παρασκευάσαμε πρότυπα διαλύματα 2 mg IP /L , 4 mg IP /L , 6 mg IP /L , 7 mg IP /L και 8 mg IP /L .

Εφαρμογή Μεθόδου

Η παρούσα μέθοδος χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό του ανόργανου Φώσφορου (IP) στο υγρό της καλλιέργειας, από το υπερκείμενο που προέκυψε και διατηρήθηκε από την 1η φυγοκέντρηση μετά την δειγματοληψία όπως αναφέρεται την παράγραφο 2.3.3.

Σε δοκιμαστικό σωλήνα προστίθεται 100 μL αρχικού δείγματος και 4900 μL απιονισμένου νερού, δηλαδή εφαρμόσαμε αραίωση 1/50 στο αρχικό μας δείγμα. Διότι γνωρίζαμε ότι τα δείγματα μας είναι πολύ πιο πυκνά, από ότι τα πρότυπα διαλύματα ανόργανου φωσφόρου που είχαμε στην διάθεση μας. Ενώ, για την παρασκευή του τυφλού δείγματος (μάρτυρα) ακολουθούμε ακριβώς την ίδια διαδικασία, όμως αντί για δείγμα χρησιμοποιούμε 100 μL απιονισμένου νερού, στην ουσία χρήση συνολικά 5000 μL νερού (τυφλό δείγμα).

Σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα προστίθεται 400 μL διαλύματος Υπερχλωρικού οξέος 70% (v/v) (Perchloric acid) και εφαρμόζουμε ανάδευση με αναδευτήρα(Vortex) για 10 sec ακριβώς. Ακολούθως, σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα προστίθεται 300 μL διαλύματος Ασκορβικού οξέος 1% (v/v) (Ascorbic acid) και εφαρμόζουμε ανάδευση με αναδευτήρα(Vortex) για 10 sec ακριβώς.

Έπειτα, σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα προστίθεται 400 μL διαλύματος Μολυβδαινικού Αμμωνίου 5% (w/v)(Ammonium Molybdate) και εφαρμόζουμε ανάδευση με αναδευτήρα (Vortex) για 10 sec ακριβώς. Αφήνουμε τους δοκιμαστικούς σωλήνες για 10 min να αναπτύξουν χρώμα. Ακολούθως, γίνεται μέτρηση της απορρόφησης στα 730 nm με φωτόμετρο Διπλής Δέσμης (τύπου Hitachi U-2000 Spectrophotometer) με κυψελίδα 1.5 mL (Fiske and Subarrow, 1925; King, 1932; Laurence, 1940; Chen et al., 1956; Herbet et al., 1971).

Έκφραση Αποτελεσμάτων

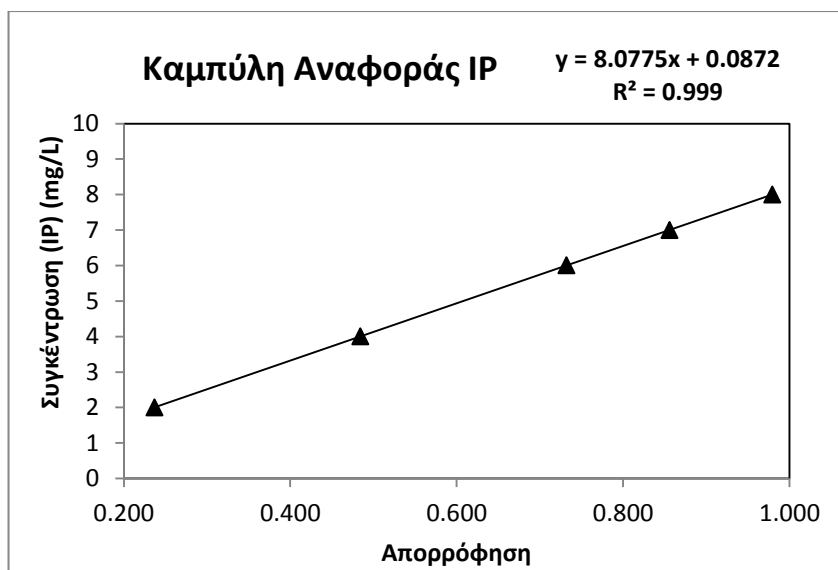
Για να φτιάξουμε την καμπύλη αναφοράς, χρησιμοποιήσαμε τα πρότυπα διαλύματα 2 mg IP /L, 4 mg IP /L, 6 mg IP /L, 7 mg IP /L και 8 mg IP /L. Ακολουθήσαμε τη παρούσα μέθοδο προσδιορισμού του Ανόργανου Φώσφορου (IP) για τα προαναφερόμενα πρότυπα διαλύματα IP, με την διαφορά ότι δεν τα αραιώσαμε, όπως αρχικώς κάναμε με τα δείγματα.

Δηλαδή για τα πρότυπα διαλύματα χρησιμοποιήσαμε 5 mL από το καθένα και εφαρμόσαμε την μέθοδο. Ενώ στα δείγματα γνωρίζοντας ότι είναι πολύ πιο πυκνά από ότι τα πρότυπα, αρχικά εφαρμόσαμε αραίωση 1/ 50(όπως προαναφέραμε). Έτσι σε δοκιμαστικό σωλήνα προστίθεται 100 μL αρχικού δείγματος και 4900 μL απιονισμένου νερού, τελικός όγκος αραιωμένου δείγματος 5 mL.

Με τις απορροφήσεις που παραλάβαμε από το φωτόμετρο για τα πρότυπα διαλύματα Ανόργανου Φώσφορου (IP) φτιάξαμε την ακόλουθη καμπύλη.

Υπολογισμοί

Εφαρμόζοντας την μέθοδο για τον προσδιορισμό Ανόργανου Φώσφορου (IP), στα πρότυπα διαλύματα με τιμές συγκέντρωσης από 2 mg IP /L έως και 8 mg IP /L , παραλάβαμε τιμές απορρόφησης που συμβολίσουμε ως **Abs** και φαίνονται στην ακόλουθη καμπύλη αναφοράς.



Γράφημα 3. Καμπύλη Αναφοράς IP ▲ Πρότυπα διαλύματα IP

Με βάση την καμπύλη αναφοράς των προτύπων διαλυμάτων προέκυψε ο ακόλουθος τύπος (5):

$$IP \text{ (mg/L)} = (8.0775 \times Abs) + 0.0872, R^2=0.999 \quad (5)$$

Όπου

Abs Απορρόφηση διαλύματος που φωτομετρήθηκε

IP Συγκέντρωση Ανόργανου Φωσφόρου διαλύματος, mg/L

Επειδή όπως προαναφέραμε γνωρίζαμε ότι τα δείγματα ήταν πιο πυκνά από τα πρότυπα διαλύματα, αραιώσαμε από την αρχή τα δείγματα με αραιώση 1/50 (Σε δοκιμαστικό σωλήνα προστίθεται 100 μL αρχικού δείγματος και 4900 μL απιονισμένου νερού). Έτσι πετύχαμε τα αραιωμένα δείγματα να έχουν συγκεντρώσεις IP μέσα στο επιθυμητό εύρος 2-8 mg IP /L και επιθυμητές απορροφήσεις (0.237-0.980) με βάση την πρότυπη καμπύλη.

Τότε ο τύπος (5) μετασχηματίζεται στο κάτωθι τύπο (5α) ως εξής:

$$IP \text{ (mg/L)} = [(8.0775 \times Abs) + 0.0872] \times \text{Αραιώση} \quad (5\alpha)$$

Όπου

Abs Απορρόφηση αραιωμένου διαλύματος που φωτομετρήθηκε

IP Συγκέντρωση Ανόργανου Φωσφόρου δείγματος, mg/L

πχ. Για αραιώση δείγματος 1/50 (100μL δείγμα + 4900 μL Νερό) και Abs = 0.340

$$IP \text{ (mg/L)} = [(8.0775 \times 0.340) + 0.0872] \times 50 = 141.7 \text{ mg /L}$$

2.3.6. ΑΣΥΝΕΧΗΣ ΚΑΙ ΗΜΙΣΥΝΕΧΗΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ

Στα πλαίσια της παρούσας μελέτης πραγματοποιήσαμε ζυμώσεις τόσο ασυνεχής (Batch culture) όσο και ημισυνεχής (Fed-batch culture) τροφοδοτούμενης καλλιέργειας. Στις ασυνεχείς καλλιέργειες χρησιμοποιήσαμε ως υπόστρωμα το υδρόλυμα του Άνθους Ορύζης, εμβολιάσαμε τον βιοαντιδραστήρα και παρακολουθήσαμε την κινητική της ζύμωσης με βάση τις αναλύσεις που εφαρμόσαμε σε κάθε δείγμα (όπως έχουμε ήδη αναφέρει).

Στις ημισυνεχείς τροφοδοτούμενες καλλιέργειες, αρχικά ακολουθήσαμε την ίδια διαδικασία με τις ασυνεχείς καλλιέργειες. Εν συνεχεία, με βάση τις συγκεντρώσεις της γλυκόζης για την καλλιέργεια μας, προσθέτουμε (ασηπτικά) ορισμένο όγκο αποστειρωμένου διαλύματος εμπορικής γλυκόζης (καθαρότητας 95%). Όταν κατά κανόνα καταγράφαμε συγκεντρώσεις γλυκόζης μικρότερες ή ίσες με 15 g/L στην καλλιέργεια μας.

Αυτή η διαδικασία προσθήκης θρεπτικού μέσου είναι διεθνώς γνωστή με τον όρο Fed. Ακολουθώντας, με βάση την συγκέντρωση γλυκόζης που προσδιορίζαμε σε επόμενα χρονικά σημεία εφαρμόζουμε πάλι την ίδια τεχνική. Σε κάθε περίπτωση, πριν και μετά την τεχνική Fed λαμβάνουμε δείγμα για να προσδιορίσουμε την συγκέντρωση γλυκόζης.

Τεχνική Fed

Υλικά

Απιονισμένο νερό

Ποτήρι ζέσεως

Ογκομετρικός κύλινδρος

Μαγνητικός Αναδευτήρας

Μαγνήτης

Φιάλες Αναεροβίωσης

Ειδικό σφραγιστικό εργαλείο (για τις φιάλες αναεροβίωσης)

Ζυγός Ακριβείας (3 δεκαδικών ψηφίων)

Αποστειρωμένες σύριγγες 20 mL , 40 mL & 10 mL

Αυτόκαυστο (121 °C, 20 min, 1.5 atm)

Εμπορική D- Γλυκόζη 95% καθαρότητας (Dextrose , Allied Signal-Riedel-deHaen)

Φλόγιστρο

Διάλυμα Αιθανόλης 80%(V/V)

Γάντια χεριών

Πειραματική πορεία

Παρασκευή Αποστειρωμένου Πυκνού Διαλύματος Γλυκόζης 700 g/L

Προσθέτουμε σε ένα ποτήρι ζέσεως 60 mL απιονισμένο νερό και ένα μικρό μαγνήτη ανάδευσης. Με την βοήθεια μαγνητικού αναδευτήρα αναδεύουμε, σταδιακά και σιγά σιγά προσθέτουμε 73.7 g γλυκόζης(95%), προς αποφυγή σχηματισμού συσσωματωμάτων. Στο διάλυμα εφαρμόζουμε ελαφριά θέρμανση μέχρις ότου διαυγάσει.

Μεταφέρουμε το διάλυμα σε ογκομετρικό κύλινδρο και συμπληρώνουμε μέχρι τελικού όγκου 100 mL. Το διάλυμα μεταφέρεται σε φιάλες αναεροβίωσης, πωματίζονται με ελαστικό καπάκι (septum) και σφραγίζονται με ειδικό σφραγιστικό εργαλείο. Εν συνεχεία, οδηγούνται για αποστείρωση σε αυτόκαυστο. Μετά την αποστείρωση αφήνουμε τις φιάλες αναεροβίωσης να επανέλθουν σε θερμοκρασία δωματίου.

Όπως προαναφέραμε για να εφαρμόσουμε την τεχνική Fed γνωρίζουμε ότι η συγκέντρωση της γλυκόζης στην καλλιέργεια μας είναι σε χαμηλά επίπεδα. Επομένως γνωρίζουμε την τρέχουσα χαμηλή συγκέντρωση γλυκόζης (G_b) και τον όγκο της καλλιέργειας (V_b) πριν εφαρμόσουμε την τεχνική Fed. Επίσης, ξέρουμε ότι το πυκνό διάλυμα που έχουμε παρασκευάσει έχει συγκέντρωση γλυκόζης 700 g/L (G_s).

Ενώ, μετά την προσθήκη γλυκόζης στην καλλιέργεια δεν θέλουμε η συγκέντρωση της γλυκόζης (G_F) να ξεπεράσει τα 55- 60 g/L. Χρησιμοποιούμε υψηλές συγκεντρώσεις στο πυκνό διάλυμα γλυκόζης με το οποίο κάνουμε Fed, για να προσθέτουμε όσο το δυνατό μικρότερο όγκο στην καλλιέργεια.

Με βάση τα άνω προκύπτει ο ακόλουθος τύπος (6) από το ισοζύγιο γλυκόζης κατά την τεχνική Fed. Με το οποίο μπορούμε να υπολογίσουμε τον όγκο (V_s) από το πυκνό διάλυμα γλυκόζης, που πρέπει να προσθέσουμε στην καλλιέργεια για να ανεβάσουμε την συγκέντρωση της γλυκόζης στα επιθυμητά επίπεδα (G_F).

$$(G_b * V_b) + (G_s * V_s) = [(V_b + V_s) * G_F] \quad (6)$$

Όπου

G_b	συγκέντρωση γλυκόζης στη καλλιέργεια πριν το Fed,	g/L
V_b	όγκος της καλλιέργειας πριν το Fed,	L
G_s	συγκέντρωση γλυκόζης του πυκνού διαλύματος,	g/L
V_s	όγκος του πυκνού διαλύματος γλυκόζης που προστίθεται κατά το Fed στη καλλιέργεια,	L
G_F	συγκέντρωση γλυκόζης στη καλλιέργεια μετά το Fed,	g/L

Π.χ. για $G_b = 15$ g Γλυκόζης/L, $V_b = 1,4$ L , $G_s = 700$ g Γλυκόζης/L και $G_F = 55$ g Γλυκόζης/L με βάση τον άνω τύπο (6) $V_s = 0.089$ L ~ 89 mL πυκνού διαλύματος Γλυκόζης

Με αποστειρωμένη σύριγγα προσθέτουμε στον ζυμωτήρα το όγκο πυκνού διαλύματος γλυκόζης(V_s) που απαιτείται για να φέρουμε την συγκέντρωση γλυκόζης στα επιθυμητά επίπεδα(G_F). Η διεύθυνση της σύριγγας στον βιοαντιδραστήρα για την τεχνική Fed γίνεται από ελαστικό septum, ασηπτικά. Επίσης για την τήρηση των ασηπτικών συνθηκών χρησιμοποιούμε γάντια, ενώ χειριζόμαστε φλόγιστρο και αιθανόλη.

Πριν την προσθήκη γλυκόζης στη καλλιέργεια και μετά παίρνουμε δείγματα για να προσδιορίσουμε τις ανάλογες συγκεντρώσεις γλυκόζης. Επίσης, κάθε φορά χρησιμοποιούμε αποστειρωμένη σύριγγα προς αποφυγή επιμολύνσεων. Τα δείγματα που συλλέγουμε κατά την τεχνική Fed ελέγχονται για την καθαρότητα της καλλιέργειας σε μικροσκόπιο ως νωπό δείγμα, αλλά και με χρώση Gram(όπως όλα τα υπόλοιπα δείγματα).

Δεν εφαρμόζουμε προθήκη υδρολύματος κατά την τεχνική Fed, διότι το υδρόλυμα περιέχει εκτός από την γλυκόζη και ελεύθερο άζωτο (αμινοξέων και πεπτιδίων). Εμείς όπως ήδη εξηγήσαμε αναλυτικά σε προηγούμενο κεφάλαιο επιθυμούμε να καλλιεργήσουμε τα κύτταρα της ζύμης σε υπόστρωμα με περιορισμό για το άζωτο. Για τους προαναφερόμενους λόγους κάνουμε Fed μόνο με προσθήκη εμπορικής γλυκόζης, γνωστής καθαρότητας 95%, για την προσθήκη μόνο πηγής άνθρακα στην ζύμωση, διατηρώντας υψηλό τον λόγο άνθρακα αζώτου(C/N) στο θρεπτικό μέσο της καλλιέργειας.

Ο όρος Fed στην Ελληνική γλώσσα πιθανότατα να μπορούσε να αποδοθεί ελεύθερα ως προσθήκη θρεπτικού μέσου ή υποστρώματος στην καλλιέργεια. Στην συγκεκριμένη μελέτη θα ήταν δόκιμο για την παρούσα σειρά πειραμάτων ο όρος Fed να μεταφράζεται ως «Προσθήκη Εμπορικής Γλυκόζης».

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ- ΣΥΖΗΤΗΣΗ

3.1. ΖΥΜΩΣΗ ΣΤΕΡΕΑΣ ΦΑΣΗΣ ΤΟΥ ΜΥΚΗΤΑ *Aspergillus awamori* ΣΕ ΠΙΤΥΡΟ ΣΙΤΟΥ & ΕΝΖΥΜΙΚΗ ΥΔΡΟΛΥΣΗ ΑΝΘΟΥΣ ΟΡΥΖΗΣ

Η ζύμωση στερεής κατάστασης πραγματοποιήθηκε με σκοπό την παραγωγή αμυλολυτικών και πρωτεολυτικών ενζύμων από το μύκητα *Aspergillus awamori*, κατά την καλλιέργεια του σε πίτυρο σίτου. Τα ακατέργαστα ένζυμα που παρήχθησαν χρησιμοποιήθηκαν για την υδρόλυση του αμυλοπρωτεϊνούχου αποβλήτου " Άνθος Ορύζης ", με σκοπό την μετατροπή του αποβλήτου σε θρεπτικό μέσο για την παραγωγή μικροβιακού λίπους.

Η ζύμωση στερεής φάσης διήρκησε 48 ώρες, αποτελούμενη από καλλιέργεια του μύκητα *Aspergillus awamori* σε τριάντα δύο κωνικές φιάλες. Μετά το πέρας της ζύμωσης, στις κωνικές φιάλες προστέθηκε νερό (ασηπτικά), με αποτέλεσμα την δημιουργία εναιωρήματος των στερεών υπολειμμάτων της ζύμωσης. Με τον όρο στερεά υπολείμματα ζύμωσης ορίζουμε το μίγμα πίτυρου σίτου, κυττάρων του μύκητα και μεταβολικών προϊόντων που υπάρχουν στην καλλιέργεια μετά το πέρας της ζύμωσης.

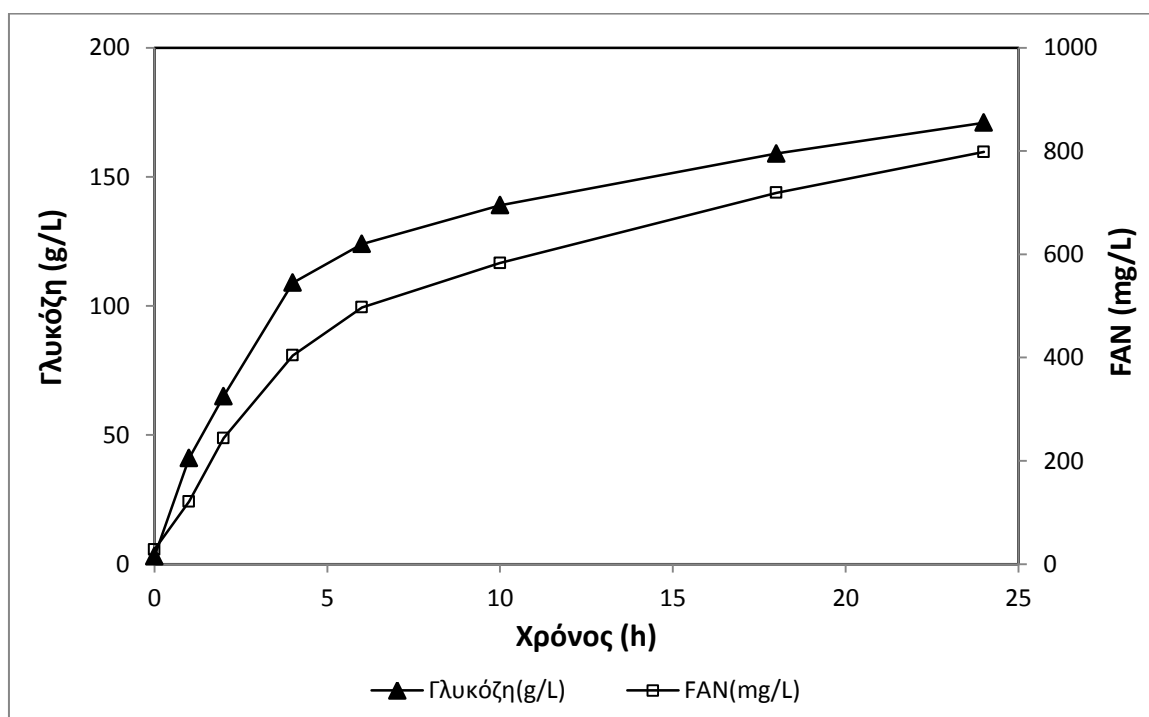
Με την δημιουργία του προαναφερόμενου εναιωρήματος, το μεγαλύτερο μέρος των παραχθέντων αμυλασών και πρωτεασών αποκολλάται από υπόλοιπα στερεά τη ζύμωσης και μεταφέρεται στην υγρή φάση. Υπενθυμίζουμε ότι τα ένζυμα παράγονται από το μύκητα εξωκυτταρικά. Όμως, είναι πιθανό ένα μέρος των ενζύμων να παραμένει προσκολλημένο στα στερεά του εναιωρήματος. Για το λόγο αυτό, η παραλαβή των ενζύμων και η χρησιμοποίησή τους στην υδρόλυση του Άνθους Ορύζης έγινε χωρίς την απομάκρυνση των στερεών της ζύμωσης από το εναιώρημα. Με στόχο την αξιοποίηση του συνόλου των παραχθέντων ενζύμων. Οι τεχνικές για την ζύμωση στερεής κατάστασης και την υδρόλυση του Άνθους Ορύζης αναφέρθηκαν αναλυτικά στις προηγούμενες παραγράφους 2.1. & 2.2 .



Εικόνα. 16 Καλλιέργεια στερεής φάσης μύκητα *Aspergillus awamori* σε πίτυρο σίτου, για 48 h στους 28 °C (Πηγή: Φωτογράφιση από το συγγραφέα, Εργ. Μικροβιολογίας & Βιοτεχνολογίας Τροφίμων, Γ.Π.Α.)

Στην άνω εικόνα 16. απεικονίζονται κωνικές φιάλες μετά την ολοκλήρωση της ζύμωσης στερεάς φάσεως (48h), σε θερμοκρασία καλλιέργειας 28 °C μέσα σε ανακινούμενο επωαστικό θάλαμο(shaker). Παρατηρούμε ότι το πύργο έχει πάρει ένα πράσινο χρώμα γεγονός που οφείλεται στην ανάπτυξη του μύκητα.

Ακολούθως, η υδρόλυση του αποβλήτου Άνθους Ορύζης σε συγκέντρωση 234 g/L έλαβε χώρα έξι φορές. Κάθε μια από τις οποίες διήρκεσε 24 ώρες, σε φυσικό μη ρυθμισμένο pH 5.5, εντός υδατόλουτρου θερμοκρασίας 55 °C. Μετρήσαμε την τιμή pH τόσο στην αρχή της υδρόλυσης όσο και στο τέλος (24 h), η οποία ήταν ίδια 5.5. Όπως προαναφέραμε η παραλαβή των ενζύμων και η χρησιμοποίησή τους στην υδρόλυση του Άνθους Ορύζης έγινε χωρίς την απομάκρυνση των στερεών της ζύμωσης στερεάς κατάστασης. Έτσι αξιοποιήσαμε τόσο τα ένζυμα που είχαν περάσει στην υγρή φάση, όσο και τα ένζυμα που πιθανότατα να παρέμειναν προσκολλημένα στα στερεά της ζύμωσης.



Γράφημα 4. Κινητική Συγκεντρώσεων Γλυκόζης και FAN κατά την υδρόλυση Άνθους Ορύζης, χωρίς απομάκρυνση των στερεών της ζύμωσης στερεής κατάστασης. Παράμετροι υδρόλυσης: θερμοκρασία 55 °C, διάρκεια 24h, με φυσική μη ρυθμισμένη τιμή pH 5.5(σταθερή) και συγκέντρωση Άνθους Ορύζης 234 g/L. Τα δεδομένα του γραφήματος είναι διαθέσιμα στο πίνακα Π.5.1. του παραρτήματος.

Στο άνω γράφημα 4. παρατηρούμε την αύξηση των συγκεντρώσεων γλυκόζης και ελεύθερου αζώτου αμινοξέων & πεπτιδίων(FAN) κατά την υδρόλυση του Άνθους Ορύζης. Γεγονός που μας υποδεικνύει ότι ο μύκητας *Aspergillus awamori* κατά την διάρκεια της ζύμωσης στερεής κατάστασης(48h), όπως αυτή διεξήχθη στα πλαίσια της παρούσης μελέτης (βλ. κεφ. 2.1.), παράγει τόσο αμυλάσες όσο και πρωτεάσες.

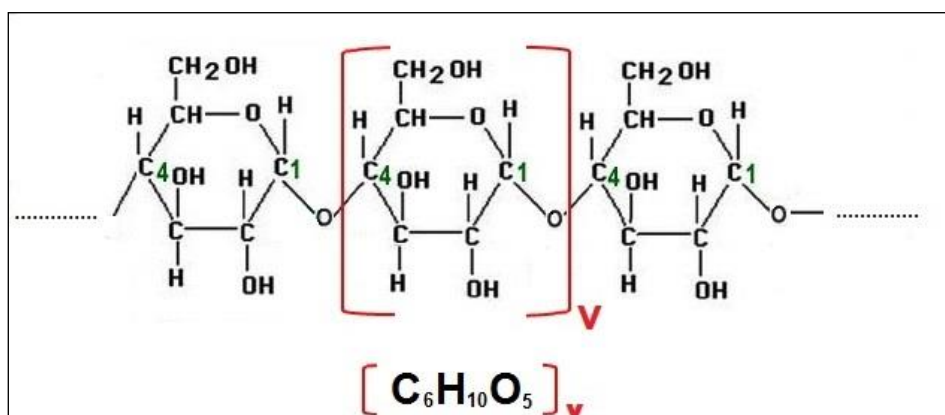
Επιπροσθέτως, βλέπουμε ότι κατά τις πρώτες ώρες πραγματοποιείται η υδρόλυση του μεγαλύτερου μέρους του αμυλούχου περιεχόμενου του αποβλήτου προς σχηματισμό

γλυκόζης, αποτέλεσμα που συμφωνεί με την βιβλιογραφία (Fujii and Kawamura, 1985; Koutinas et al., 2001; Li et al., 2004).

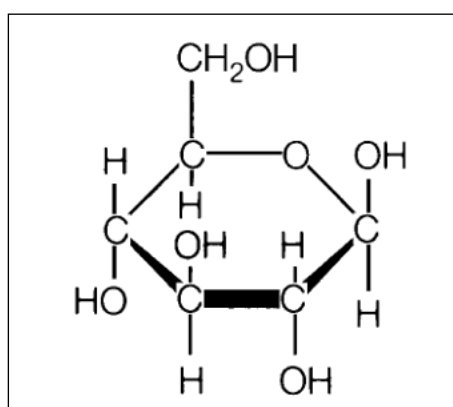
Αντίστοιχα, η δράση των πρωτεασών επί του πρωτεϊνικού περιεχομένου αποδίδει το κύριο μέρος του ελεύθερου αζώτου αμινοξέων & πεπτιδίων (FAN) κατά τις αρχικές ώρες της υδρόλυσης, όπως αναφέρεται και στη βιβλιογραφία (Koutinas et al., 2006; Kong et al., 2007).

Στα πειράματα μας κατά την υδρόλυση από 234 g/L Άνθους Ορύζης μετά από 24 h πετύχαμε μέγιστη συγκέντρωση γλυκόζης 170 g/L και τελική συγκέντρωση FAN 800 mg/L. Με βάση τόσο την ετικέτα του Άνθους Ορύζης (ως προϊόν) όσο και στην διαθέσιμη βιβλιογραφία (Torbica et al., 2012; Pancha-arnon and Uttarap, 2013) για άλευρα ορύζης, συμπεράναμε ότι η περιεκτικότητα σε άμυλο ορύζης στον Ανθό Ορύζης κυμαίνεται περίπου στο 84%(w/w).

Το άμυλο είναι ένα πολυμερές γλυκόζης, η δομή της γλυκόζης ως μονομέρες αμύλου δίδεται στην ακόλουθη εικόνα 17. Ενώ μετά την υδρόλυση του αμύλου απελευθερώνεται γλυκόζη με την δομή που απεικονίζεται στην εικόνα 18.



Εικόνα 17. Δομή γλυκόζης ως μονομέρες αμύλου, $C_6H_{10}O_5$
(Πηγή: <http://www.chemistryland.com>, Ημ. Προσ:18/4/2014)

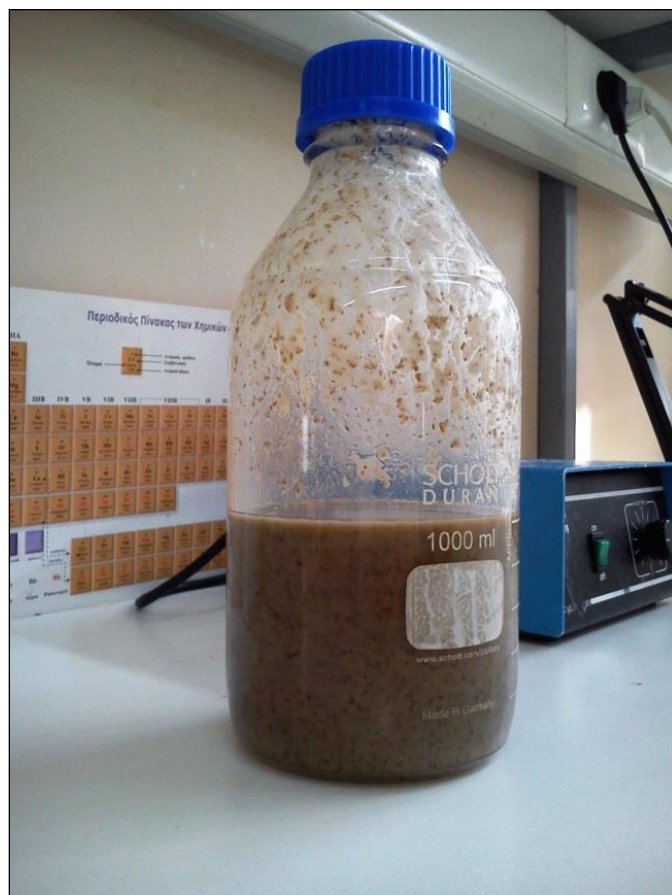


Εικόνα 18. Δομή ελεύθερης γλυκόζης, $C_6H_{12}O_6$
(Πηγή: <http://science.marshall.edu>, Ημ. Προσ:19/4/2014)

Το μοριακό βάρος της γλυκόζης ως μονομερές αμύλου ($C_6H_{10}O_5$) είναι 162 g, ενώ το μοριακό βάρος της ελεύθερης γλυκόζης ($C_6H_{12}O_6$) που προκύπτει μετά την υδρόλυση του αμύλου είναι 180 g. Έτσι προκύπτει ότι κατά την υδρόλυση, 1 g αμύλου αποδίδει περίπου 1,11 g γλυκόζης.

Συνοψίζοντας, στην υδρόλυση χρησιμοποιήσαμε 234 g/L Άνθους Ορύζης, με περιεκτικότητα σε άμυλο ορύζης 84%(w/w). Ουσιαστικά το απόβλητο που υδρολύσαμε είχε συγκέντρωση αμύλου ορύζης 196.6 g/L. Όπως δείξαμε κατά την υδρόλυση του αμύλου, 1 g αμύλου αποδίδει περίπου 1,11 g γλυκόζης. Άρα από τα 196.6 g/L άμυλο ορύζης μετά την υδρόλυση θεωρητικά έπρεπε να λάβουμε τελική συγκέντρωση γλυκόζης 218.4 g/L. Έτσι ίσως να είχαμε πετύχει 100% απόδοση σε γλυκόζη, γεγονός πάρα πολύ δύσκολο.

Στα πειράματα μας από το γράφημα 4. της παρούσης παραγράφου είδαμε ότι η συγκέντρωση γλυκόζης μετά από 24 h υδρόλυσης ήταν 170 g/L. Συνεπώς στα πειράματα υδρόλυσης του Άνθους Ορύζης, πετύχαμε 77.8% απόδοση σε γλυκόζη μέσω υδρόλυσης του αμύλου ορύζης.



Εικόνα. 19 Υδρόλυμα Άνθους Ορύζης, μετά από 24h υδρόλυσης(χωρίς την απομάκρυνση των στερεών)
(Πηγή: Φωτογράφιση από το συγγραφέα, Εργ. Μικροβιολογίας & Βιοτεχνολογίας Τροφίμων, Γ.Π.Α.)

3.2. ΖΥΜΩΣΗ ΥΓΡΗΣ ΦΑΣΗΣ ΤΗΣ ΖΥΜΗΣ *Rhodosporidium toruloides* ΣΕ ΥΔΡΟΛΥΜΑ ΑΝΘΟΥΣ ΟΡΥΖΗΣ

Μετά την ενζυμική υδρόλυση του στερεού αποβλήτου Άνθος Ορύζης, πραγματοποιήσαμε ζυμώσεις υγρή φάσης με τον ελαιογόνο ζυμομύκητα *Rhodosporidium toruloides* προς παραγωγή μικροβιακών λιπιδίων. Θα πρέπει να υπενθυμίζουμε ότι η ενζυμική υδρόλυση του αμυλοπρωτεϊνούχου αποβλήτου Άνθος Ορύζης, έγινε με την βοήθεια αμυλασών & πρωτεασών, που παρήχθησαν από το μύκητα *Aspergillus awamori* κατά την ζύμωση στερεής φάσης.

Στις ζυμώσεις υγρής κατάστασης ως θρεπτικό μέσο χρησιμοποιήθηκε το υδρόλυμα του Άνθους Ορύζης. Από την δράση των αμυλασών επί του αμυλούχου περιεχομένου του αποβλήτου παρήχθει κυρίως γλυκόζη, ενώ η δράση των πρωτεασών επί των πρωτεϊνών του Άνθους Ορύζης μας απέδωσε αμινοξέα & ολιγοπεπτίδια. Τελικώς, το υδρόλυμα ως πηγή άνθρακα περιείχε κυρίως γλυκόζη, ενώ ως πηγή ελεύθερου αζώτου τα αμινοξέα και ολιγοπεπτίδια.

Οι συγκεντρώσεις γλυκόζης στην καλλιέργεια μας προσδιορίστηκαν με βάση την φασματοφωτομετρική μέθοδο του δινιτροσαλικυλικού οξέος (DNS), που αναφέρθηκε αναλυτικώς στην παράγραφο 2.2.2. Ενώ, η φωτομετρική μέθοδο της Νινυδρίνης χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό του ελεύθερου αζώτου των αμινοξέων και πεπτιδίων, η οποία αναλύεται στην παράγραφο 2.2.3.

Οι μέθοδοι προσδιορισμού των συγκεντρώσεων ολικού ξηρού βάρους(TDW), ολικού ενδοκυτταρικού μικροβιακού λίπους(TL) αλλά και όλη η μεθοδολογία για την εφαρμογή των ζυμώσεων υγρής φάσης αναλύονται στην παράγραφο « 2.3. Ζύμωση Υγρή Φάσης ». Από το προσδιορισμό των συγκεντρώσεων ολικού ξηρού βάρους(**TDW**) και ολικού ενδοκυτταρικού μικροβιακού λίπους(**TL**), μπορούμε να υπολογίσουμε την συγκέντρωση Ξηρού βάρους άνευ λίπους (Residual Dry Weight, **RDW**) εκφρασμένη σε g/L , με βάση το κάτω τύπο 7.:

$$RDW_{(g/L)} = TDW_{(g/L)} - TL_{(g/L)} \quad (7)$$

Θα πρέπει να αναφέρουμε ότι οι τιμές διαλυμένου οξυγόνου % (Dissolved Oxygen %, DO%) των αποτελεσμάτων μας προσδιορίστηκαν, μέσω αισθητήριου του βιοαντιδραστήρα. Οι τιμή DO% δίδεται στο πίνακα ελέγχου του βιοαντιδραστήρα και εκφράζει τον % βαθμό κορεσμού της καλλιέργειας σε διαλυτό οξυγόνο. Ο υπολογισμός του διαλυτού οξυγόνου (DO %) σε υδατικά διαλύματα προκύπτει από τον κάτωθι τύπο 8. (Gray, 2005):

$$DO \% = [C_L / C_L^*] \times 100 \quad (8)$$

Όπου,

C_L τρέχουσα συγκέντρωση διαλυτού οξυγόνου στη καλλιέργεια, mg O₂/L

C_L^* συγκέντρωση κορεσμού: μέγιστη συγκέντρωση διαλυτού οξυγόνου στη καλλιέργεια, mg O₂/L [κατά κανόνα περίπου 7.5- 7.8 mg O₂/L σε υδατικά διαλύματα σε 25 °C & 1 atm (Akid, 2004; Gray, 2005;Ibanez et al., 2007)]

Σκοπός των πειραμάτων μας ήταν να εφαρμόσουμε ζυμώσεις υγρής κατάστασης με διαφορετικούς αρχικούς λόγους Άνθρακα/ Αζώτου (C/N) στο θρεπτικό μέσο της καλλιέργειας μας. Για να μελετήσουμε τις επιπτώσεις που έχει η μεταβολή του λόγου Άνθρακα/ Αζώτου (C/N) στην παραγωγή ενδοκυτταρικού μικροβιακού λίπους από τα κύτταρα της ζύμης *Rhodospiridium toruloides*. Γνωρίζοντας από την βιβλιογραφία ότι ο περιορισμός του αζώτου στο μέσο την καλλιέργειας, αποτελεί προάγγελο για την έναρξη συσσώρευσης ενδοκυτταρικού μικροβιακού λίπους (Ratledge, 1988;2004;Papanikolaou et al., 2002; 2007; Αγγελής, 2007; Ageitos et al., 2011;Papanikolaou and Aggelis, 2011).

Έρευνες έδειξαν, ότι ο περιορισμός του φωσφόρου στο θρεπτικό μέσο της καλλιέργειας, πιθανότατα να προωθεί την συσσώρευση του ενδοκυτταρικού μικροβιακού λίπους στα κύτταρα της ζύμης *Rhodospiridium toruloides*(Li et al., 2006;Wu et al., 2010). Επίσης, μελέτες εξετάζουν τον περιορισμό του θείου στο θρεπτικό μέσο της καλλιέργειας, ως παράγοντα που δύναται να κατευθύνει τον μεταβολισμό των ελαιογόνων κυττάρων προς παραγωγή μικροβιακών λιπιδίων(Wu et al., 2011).

Στα πλαίσια της παρούσης μελέτης διερευνήσαμε την συγκεκριμένη βιοχημική συμπεριφορά για τα κύτταρα του ζυμομύκητα, προσδιορίζοντας τον ανόργανο φώσφορο στο θρεπτικό μέσο της καλλιέργειας μας κατά την ζύμωση. Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης του Ανόργανου Φωσφόρου (IP) στην καλλιέργεια μας, πραγματοποιήθηκε με βάση την μέθοδο που παραθέσαμε στην παράγραφο 2.3.5. Η διερεύνηση της συνεισφοράς του θείου ως ρυθμιστικό παράγοντα για την συσσώρευση ενδοκυτταρικών μικροβιακών λιπιδίων στα κύτταρα του ζυμομύκητα *Rhodospiridium toruloides*, δεν εξετάστηκε στη παρούσα μελέτη.

Σε κάθε σειρά πειραμάτων πραγματοποιήσαμε ζυμώσεις υγρής κατάστασης, αρχικά ασυνεχής καλλιέργειας και εν συνεχεία ημισυνεχής τροφοδοτούμενης. Ως θρεπτικό μέσο για όλες τις καλλιέργειες μας ορίζουμε το υδρόλυμα του Άνθους Ορύζης, στην κατάλληλη αραίωση για κάθε πείραμα. Η αρχική τιμή συγκέντρωσης της γλυκόζης στο θρεπτικό μέσο διατηρήθηκε μέσα ένα στενό εύρος τιμών 58 ± 4 g/L για όλες τις καλλιέργειες. Επιπροσθέτως, οι αρχικές τιμές της συγκέντρωσης FAN στο θρεπτικό μέσο κυμάνθηκαν από 219.76 mg/L ως 682.06 mg/L. Η αρχική σύσταση του θρεπτικού μέσου για τις πηγές άνθρακα & FAN καθώς και ο σχεδιασμός των πειραμάτων που εφαρμόσαμε στα πλαίσια της παρούσης εργασίας αποδίδονται στο κάτω πίνακα 5.

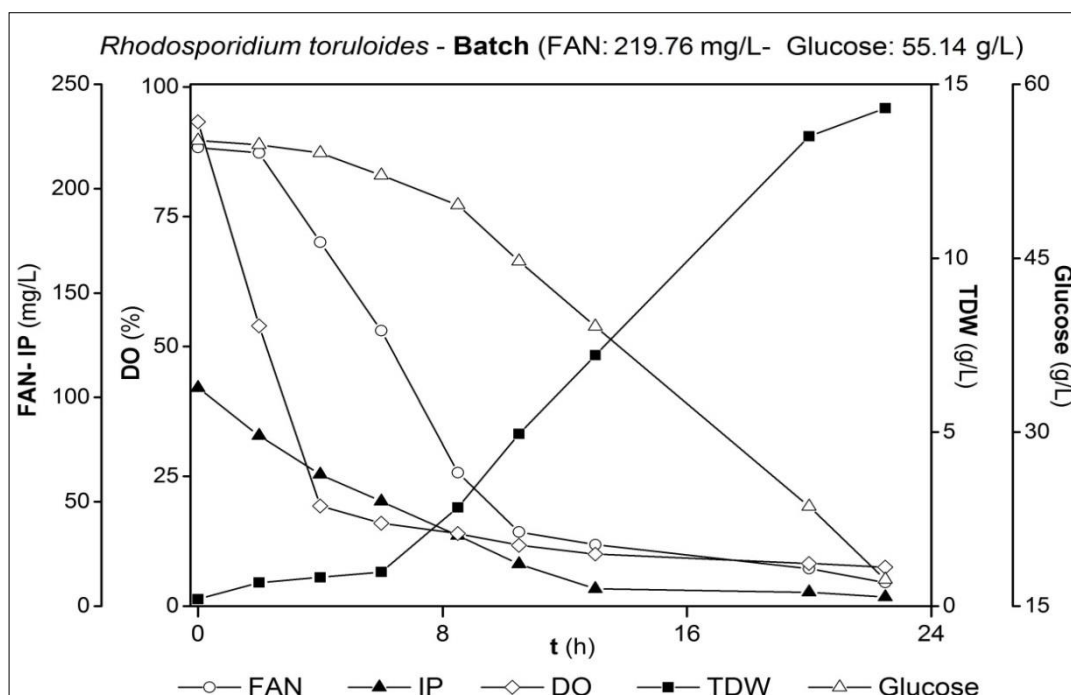
Πίνακας 5. Αρχική σύσταση θρεπτικού μέσου καλλιεργιών υγρής κατάστασης του ζυμομύκητα *Rhodospiridium toruloides*(Σε αναδευόμενο βιοαντιδραστήρα ενεργού όγκου 1.5L, με θερμοκρασία 28 °C, ρυθμιζόμενο pH 6.0 ± 0.2 , 20% διαλυτό οξυγόνο(DO%) και ανάδευση αυτόματα ρυθμιζόμενη με βάση το DO %)

Σειρά Πειραμάτων	C _{Glc} (g/L)	C _{FAN} (mg/L)	Ασυνεχής (Batch)	Ημισυνεχής (Fed-Batch)
1 ^η	55.14	219.76	+	+
2 ^η	62.21	294.34	+	+
3 ^η	55.76	397.52	+	+
4 ^η	58.06	491.77	+	+
5 ^η	54.35	682.06	+	+

C_{Glc} = Αρχική συγκέντρωση της γλυκόζης στο θρεπτικό μέσο της καλλιέργειας, g/L
C_{FAN} = Αρχική συγκέντρωση του Ελεύθερου αζώτου Αμινοξέων & Πεπτιδίων(FAN) στο θρεπτικό μέσο της καλλιέργειας, mg/L

3.2.1. 1^ο ΠΕΙΡΑΜΑ- ΑΣΥΝΕΧΗΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ

Ο ζυμομύκητας *Rhodosporidium toruloides* αναπτύχθηκε σε ασυνεχή(Batch) καλλιέργεια, σε θρεπτικό μέσο (υδρόλυμα Άνθους Ορύζης) με αρχική συγκέντρωση γλυκόζης 55.14 g/L και ελεύθερο άζωτο (αμινοξέων & πεπτιδίων)FAN 219.76 mg/L. Χρησιμοποιώντας αναδεδυμένο βιοαντιδραστήρα ενεργού όγκου 1.5 L, θερμοκρασία 28 °C, ρυθμιζόμενο pH 6.0 ± 02, 20% διαλυτό οξυγόνο (DO%) και ανάδευση αυτόματα ρυθμιζόμενη με βάση το DO %, με βάση την μεθοδολογία την παραγράφου 2.3 «Ζύμωση Υγρής Φάσης». Τα αποτελέσματα από την προαναφερόμενη καλλιέργεια της ζύμης απεικονίζονται στο κάτωθι διάγραμμα 5.



Γράφημα 5. Κινητική συγκεντρώσεων Ανόργανου Φωσφόρου(IP), Ελεύθερου Αζώτου Αμινοξέων & Πεπτιδίων(FAN), διαλυτού οξυγόνου(DO), Ολικού Ξηρού Βάρους-Βιομάζα (TDW) και Γλυκόζης(Glucose) κατά την ασυνεχής υγρή καλλιέργεια του ζυμομύκητα *Rhodosporidium toruloides* σε υδρόλυμα Άνθους Ορύζης με αρχική συγκέντρωση γλυκόζης 55.14 g/L και ελεύθερου αζώτου (αμινοξέων & πεπτιδίων) FAN 219.76 mg/L. Η ζύμωση έγινε σε αναδεδυμένο βιοαντιδραστήρα ενεργού όγκου 1.5 L, με θερμοκρασία 28 °C, ρυθμιζόμενο pH 6.0 ± 02, 20% διαλυτό οξυγόνο(DO%) και ανάδευση αυτόματα ρυθμιζόμενη με βάση το DO %. Τα πειραματικά δεδομένα του γραφήματος είναι διαθέσιμα στο **πίνακα Π.5.2.** του παραρτήματος.

Στην καλλιέργεια παρατηρούμε μια απότομη πτώση του διαλυτού οξυγόνου (DO%) τις πρώτες 4 ώρες. Συγκεκριμένα από 91.3% στο μηδενικό σημείο(0 h) έπεσε σε 20.1% μετά από 4 h και ακολούθως μειώθηκε ως 7.5% μέχρι τις 22.5 h της ζύμωσης. Η συγκέντρωση του Ανόργανου Φωσφόρου (IP) ακολουθεί μια σταθερά πτωτική πορεία από την αρχή της καλλιέργειας μέχρι τις 13 ώρες και ακολούθως βαίνει μειούμενη με πολύ βραδύ ρυθμό. Ειδικότερα, αρχικά είχαμε συγκέντρωση 104.52 mg/L IP, ενώ μέχρι τις 13 h προσδιορίσαμε 8.24 mg/L IP και εν συνεχεία 4.4 mg/L IP στις 22.5 h.

Αντιθέτως, η συγκέντρωση του FAN κατά τις δύο πρώτες ώρες παραμένει σχεδόν σταθερή, ακολούθως καταγράφεται μια απότομη μείωση ως τις 10.5 h και εν συνεχεία μειώνεται πολύ αργά. Συγκεκριμένα, αρχικώς είχαμε συγκέντρωση 219.76 mg/L FAN, η οποία μετά από 2 h ήταν σχεδόν αμετάβλητη 217.02 mg/L FAN, εν συνεχεία είδαμε ραγδαία μείωση για την συγκέντρωση FAN μέχρι τις 10.5 h όπου είχαμε FAN 35.5 mg/L. Για τις επόμενες ώρες η συγκέντρωση του FAN ελαττώνεται με πολύ βραδύ ρυθμό μέχρι 11.37 mg/L στις 22.5 h.

Η συγκέντρωση της γλυκόζης για τις πρώτες 4 h παραμένει σχεδόν σταθερή, στην συνέχεια μέχρι τις 8.5 h καταγράφουμε μια πολύ μικρή μείωση. Μετά τις 8.5 h είδαμε έντονη μείωση μέχρι τις 22,5 h της ζύμωσης. Αναλυτικότερα, αρχικά προσδιορίσαμε συγκέντρωση γλυκόζης 55.14 g/L, μετά από 4 h δεν παρατηρήσαμε σημαντική μεταβολή με τιμή 54.08 g/L. Μετά τις 4 h είδαμε μια μικρή μείωση στην συγκέντρωση της γλυκόζης μέχρι τις 8.5 h όπου η συγκέντρωση της γλυκόζης έφτασε τα 49.58 g/L. Στις επόμενες ώρες η συγκέντρωση της γλυκόζης ακολουθεί ένα αναμενόμενο ρυθμό μείωσης ως τις 22.5 h που είδαμε συγκέντρωση 17.3 g/L.

Η συγκέντρωση του Ολικού Ξηρού Βάρους (TDW) στην καλλιέργεια μας για τις πρώτες 6 h δεν ξεπέρασε τα 0.98 g/L, γεγονός που πιθανότατα οφείλεται στην φάση προσαρμογής των κυττάρων της ζύμης. Ακολούθως, η συγκέντρωση TDW καταγράφει μια εκθετική αύξηση μέχρι τις 13.5 h με τιμή 7.21 g/L, η οποία αποδίδεται στην εκθετική φάση ανάπτυξης των κυττάρων. Εν συνεχεία, η συγκέντρωση TDW συνεχίζει να αυξάνει με μικρότερο ρυθμό μέχρι τις 20 h όπου προσδιορίσαμε TDW 13.5 g/L, πιθανότατα λόγω εισόδου των κυττάρων στην επιβραδυνόμενη φάση ανάπτυξης.

Μετά τις 20 h η συγκέντρωση TDW βαίνει αυξανόμενη με πολύ αργό ρυθμό μέχρι τις 22.5 h, όπου καταγράψαμε TDW 14.31 g/L. Η συγκεκριμένη αύξηση με βραδύτερο ρυθμό σηματοδοτεί την είσοδο των κυττάρων στην στάσιμη φάση ανάπτυξης. Με βάση τα δεδομένα του πίνακα Π.5.1. του παραρτήματος, υπολογίσαμε τον συνολικό συντελεστή απόδοσης βιομάζας $Y_{x/s} = 0.422$ g/g, ο οποίος εκφράζει την μέση παραγόμενη βιομάζα ανά μονάδα υποστρώματος (γλυκόζης) (g/g) για την ασυνεχή καλλιέργεια.

Παρατηρώντας το άνω γράφημα 5., βλέπουμε ότι τα κύτταρα του ζυμομύκητα κατά την διάρκεια της λανθάνουσας φάσης στις πρώτες 6 h καταναλώνουν κυρίως το διαλυτό οξυγόνο (DO) & το ανόργανο φώσφορο (IP) της καλλιέργειας, ενώ μετά τις 2 h και το ελεύθερο άζωτο αμινοξέων & πεπτιδίων(FAN). Το φαινόμενο αυτό πιθανότατα να οφείλεται στις αυξημένες μεταβολικές ανάγκες που έχουν τα κύτταρα στην φάση προσαρμογής. Ενώ, η συγκέντρωση της γλυκόζης για τις πρώτες 6 h είναι σχεδόν σταθερή

Μετά τις 6 h τα κύτταρα μπαίνουν στην εκθετική φάση όπου εκεί προσδιορίσαμε 50.24 mg/L IP, 16.0% DO, 132.02 mg/L FAN & 52.14 g/L γλυκόζη. Στο σημείο 10.5 h βλέπουμε 20.15 mg/L IP, 11.7% DO, 35.50 mg/L FAN & 44.72 g/L γλυκόζη και στις 13.0 h είχαμε 8.24 mg/L IP, 10.0% DO, 29.47 mg/L FAN & 39.12 g/L γλυκόζη.

Από τις άνω μετρήσεις & στο γράφημα 5., εκτιμούμε ότι τα χαμηλά επίπεδα ανόργανου φωσφόρου (IP), του DO και του FAN οδηγούν στην διακοπή της εκθετικής φάσης των κυττάρων και μετάβαση αυτών στην επιβραδυνόμενη φάση. Πιθανότατα, τα επίπεδα τους στις 13.5 h δεν δύναται να κορέσουν τις μεταβολικές ανάγκες των κυττάρων για την παραμονή τους στην εκθετική φάση. Γεγονός, που τους καθίσταται περιοριστικούς παράγοντες την μικροβιακής αύξησης για την συγκεκριμένη καλλιέργεια.

Από το γράφημα 5. εκτιμήσαμε ότι τα κύτταρα εισέρχονται στην εκθετική φάση μετά τις 6 h και αναπτύσσονται εκθετικά ως τις 13.5 h. Για την εκθετική φάση των κυττάρων ισχύει ο

κάτωθι τύπος (9), μέσω του οποίου προκύπτει ο τύπος (10) με απλούς μαθηματικούς μετασχηματισμούς. Στην εκθετική φάση, η ανάπτυξη των κυττάρων δύναται να χαρακτηριστεί σχεδόν γραμμική, έτσι μπορούμε να χρησιμοποιήσουμε το κάτωθι τύπο (10) (Stanbury et al., 1995; Mosier and Ladisch, 2009) :

$$\frac{dX}{dt} = \mu X \quad (9)$$

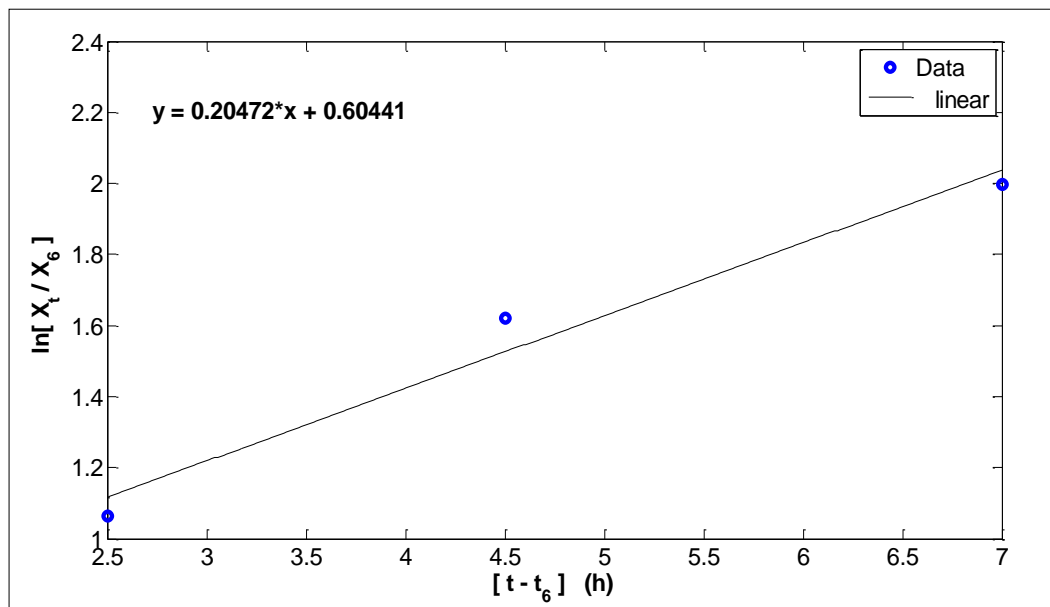
$$\ln X(t) = \ln X(o) + \mu t \quad (10)$$

Όπου,

X	συγκέντρωση της βιομάζας(TDW),	g/L
t	χρόνος ανάπτυξης των κυττάρων,	h
μ	ειδικός ρυθμός αύξησης των κυττάρων,	h^{-1}
X(t)	συγκέντρωση βιομάζας στο χρόνο t,	g/L
X(0)	αρχική συγκέντρωση βιομάζας,	g/L

Από τον τύπο (10) μέσω πράξεων προκύπτει ο κάτω τύπος (11), με το οποίο γραφικά εκτιμήσαμε το μ_{max} για την εκθετική φάση στο κάτω γράφημα 6. Το μ_{max} εκφράζει την μέγιστη παραγόμενη βιομάζα ανά μονάδα βιομάζας και ώρας (στην εκθετική φάση της καλλιέργειας).

$$\frac{\ln[X(t)/(X(o))]}{t} = \mu \quad (11)$$

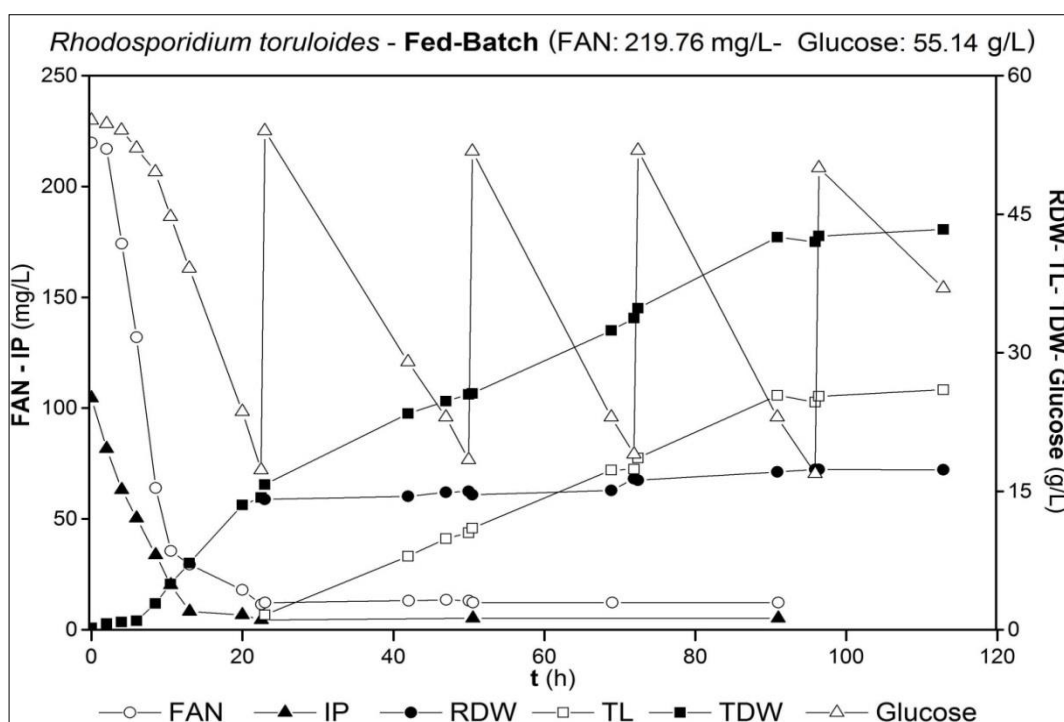


Γράφημα 6. Υπολογισμός μ_{max} (μέγιστου ειδικού ρυθμού αύξησης κυττάρων) κατά την εκθετική φάση της ασυνεχής υγρής καλλιέργεια του ζυμομύκητα *Rhodosporidium toruloides* σε υδρόλυμα Άνθους Ορύζης με αρχική συγκέντρωση γλυκόζης 55.14 g/L και FAN 219.76 mg/L. Με βάση το γράφημα 5. παρατηρούμε ότι μετά το σημείο 6 h αρχίζει η ανάπτυξη, θεωρούμε το σημείο 6 h ως βάση και υποθέτουμε εκθετική αύξηση στα σημεία 8.5 h, 10.5 h και 13.5 h. Γραφικά υπολογίσαμε το $\mu_{max} \approx 0.205 h^{-1}$ με βάση τον άνω τύπο (11).

3.2.2. 1^ο ΠΕΙΡΑΜΑ- ΗΜΙΣΥΝΕΧΗΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ

Τα κύτταρα του *Rhodosporidium toruloides* αναπτύχθηκαν σε ημισυνεχή τροφοδοτούμενη καλλιέργεια (Fed- Batch), μετά την ασυνεχή (Batch) καλλιέργεια τους στο υδρόλυμα Άνθους Ορύζης με αρχική συγκέντρωση γλυκόζης 55.14 g/L & ελεύθερο άζωτο (αμινοξέων & πεπτιδίων) FAN 219.76 mg/L που περιγράψαμε στην προηγούμενη παράγραφο 3.2.1.

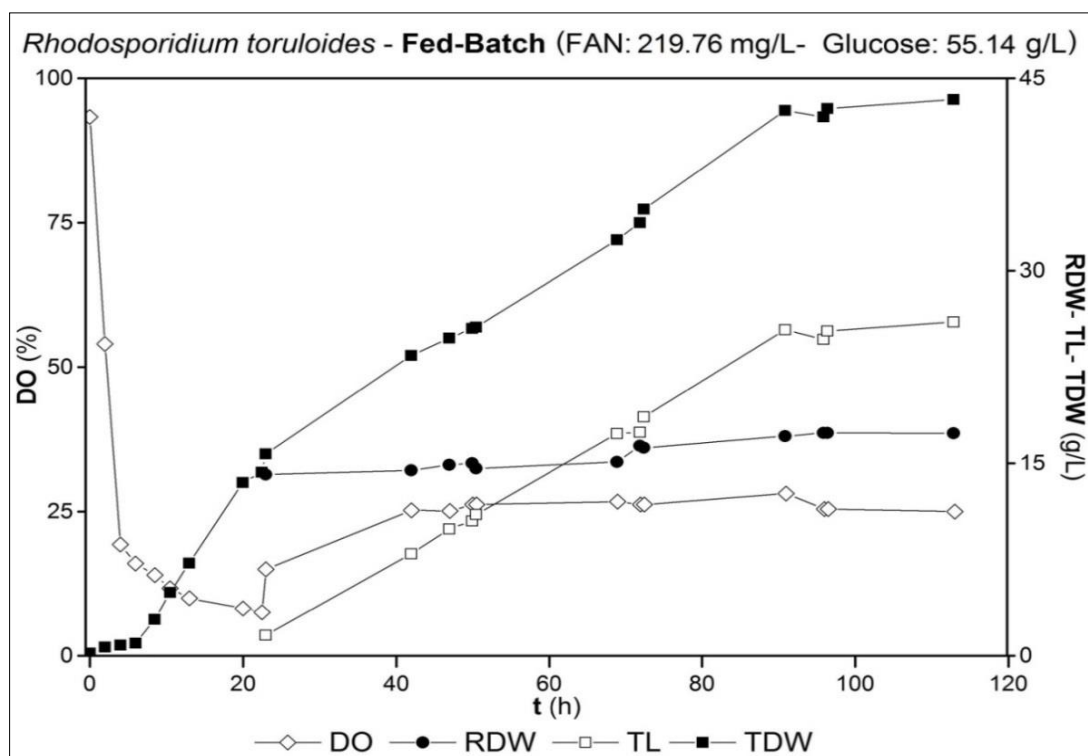
Για την ημισυνεχής τροφοδοτούμενη καλλιέργεια ως προσθήκη υποστρώματος (Τεχνηκή Fed) χρησιμοποιήθηκε προσθήκη εμπορικής γλυκόζης (95% καθαρότητας). Όλη η μεθοδολογία αναφέρεται αναλυτικά στην παράγραφο 2.3 «Ζύμωση Υγρής Φάσης». Τα αποτελέσματα της καλλιέργειας δίδονται στα κάτωθι γραφήματα 7. & 8, ενώ τα δεδομένα είναι διαθέσιμα στο πίνακα Π.5.2. του παραρτήματος.



Γράφημα 7. Κινητική συγκεντρώσεων Ελεύθερου Αζώτου Αμινοξέων & Πεπτιδίων (FAN), Ανόργανου Φωσφόρου (IP), Ολικού Ξηρού Βάρους άνευ Λίπους (RDW), Ολικού ενδοκυτταρικού μικροβιακού λίπους (TL), Ολικού Ξηρού Βάρους-Βιομάζα (TDW) και Γλυκόζης (Glucose) κατά την ασυνεχή & ημισυνεχή υγρή καλλιέργεια του ζυμομύκητα *Rhodosporidium toruloides* σε υδρόλυμα Άνθους Ορύζης με αρχική συγκέντρωση γλυκόζης 55.14 g/L και ελεύθερου αζώτου (αμινοξέων & πεπτιδίων) FAN 219.76 mg/L. Η ζύμωση έγινε σε αναδευόμενο βιοαντιδραστήρα ενεργού όγκου 1.5 L, με θερμοκρασία 28 °C, ρυθμιζόμενο pH 6.0 ± 0.2, 20% διαλυτό οξυγόνο (DO%) και ανάδευση αυτόματα ρυθμιζόμενη με βάση το DO %. Τα πειραματικά δεδομένα του γραφήματος είναι διαθέσιμα στο **πίνακα Π.5.2.** του παραρτήματος.

Από το γράφημα 6. παρατηρούμε ότι στην παρούσα ημισυνεχής τροφοδοτούμενη καλλιέργεια η συγκέντρωση της γλυκόζης κινήθηκε σε ένα εύρος τιμών από 54 g/L ως 16.9 g/L. Τόσο η συγκέντρωση του ελεύθερου αζώτου αμινοξέων & πεπτιδίων (FAN) όσο και του ανόργανου φώσφορου (IP) κατά την ημισυνεχή καλλιέργεια μετά τις 23 h παρέμειναν σχεδόν σταθερές και σε αρκετά χαμηλά επίπεδα. Αναλυτικά, κατά την διάρκεια της ημισυνεχούς καλλιέργειας (μετά τις 23 h) προσδιορίσαμε 12.68±0.52 mg/L FAN και 5.16±0.06 mg/L IP.

Η παραγωγή ενδοκυτταρικού μικροβιακού λίπους (TL) στο γράφημα 7., σηματοδοτείται με την ημισυνεχής προσθήκη γλυκόζης στην καλλιέργεια μετά τις 23 h, έχοντας ταυτόχρονα διατηρήσει πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις ελεύθερου αζώτου(FAN) και φωσφόρου (IP). Γεγονός που συμφωνεί πλήρως με την βιβλιογραφία, σχετικά με τον περιορισμό του αζώτου (Ratledge, 1988;2004;Papanikolaou et al., 2002; 2007; Αγγελής, 2007; Ageitos et al., 2011;Papanikolaou and Aggelis, 2011) και πιθανότατα του φωσφόρου(Wu et al., 2011) ως προάγγελοι παραγωγής μικροβιακού λίπους σε καλλιέργειες ελαιογόνων ζυμών.



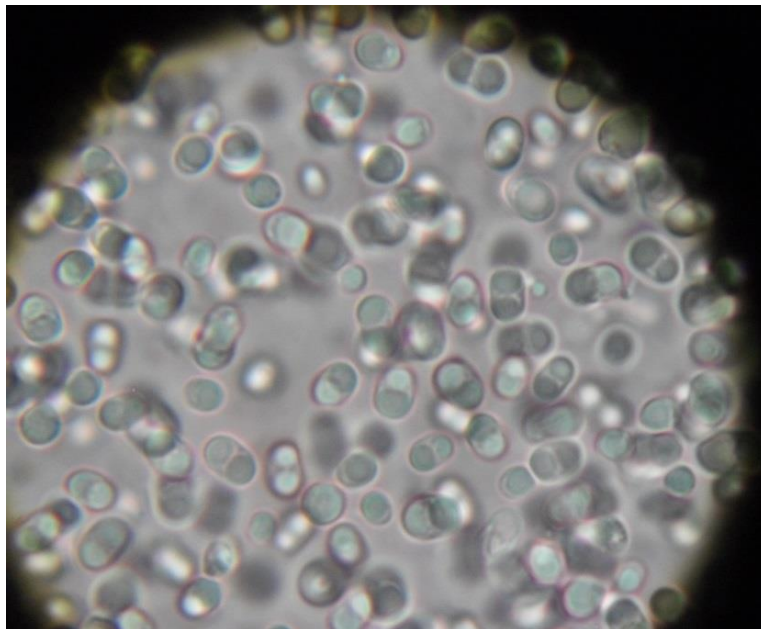
Γράφημα 8. Κινητική συγκεντρώσεων Διαλυτού οξυγόνου(DO), Ολικού Ξηρού Βάρους άνευ Λίπους(RDW), Ολικού ενδοκυτταρικού μικροβιακού λίπους(TL) και Ολικού Ξηρού Βάρους-Βιομάζα (TDW) κατά την ημισυνεχή υγρή καλλιέργεια του ζυμομύκητα *Rhodosporidium toruloides* σε υδρόλυμα Άνθους Ορύζης με αρχική συγκέντρωση γλυκόζης 55.14 g/L και ελεύθερου αζώτου (αμινοξέων & πεπτιδίων) FAN 219.76 mg/L. Η ζύμωση έγινε σε αναδευόμενο βιοαντιδραστήρα ενεργού όγκου 1.5 L, με θερμοκρασία 28 °C, ρυθμιζόμενο pH 6.0 ± 02, 20% διαλυτό οξυγόνο(DO%) και ανάδευση αυτόματα ρυθμιζόμενη με βάση το DO %. Τα πειραματικά δεδομένα του γραφήματος είναι διαθέσιμα στο **πίνακα Π.5.2.** του παραρτήματος.

Από το άνω γράφημα 8., αρχικά στην ασυνεχή καλλιέργεια όπως προαναφέραμε στην παράγραφο 3.2.1. είχαμε παρατηρήσει μια έντονη μείωση του διαλυτού οξυγόνου(DO%) ως τις πρώτες 4 h, όπου τα κύτταρα βρίσκονται στην λανθάνουσα φάση. Ενώ, μετά από 4 h και μειώθηκε ως 7.5% μέχρι το τέλος της ασυνεχούς καλλιέργειας (22.5 h). Κατά την ημισυνεχή καλλιέργεια (μετά τις 23 h) παρατηρήσαμε αύξηση της τιμής του διαλυτού οξυγόνου μέχρι σταθεροποίησης του στην τιμή περίπου 26.14± 0.91 DO%. Το γεγονός ίσως οφείλεται στις υψηλότερες μεταβολικές ανάγκες των κυττάρων κατά την φάση ανάπτυξης τους (ασυνεχής καλλιέργεια), συγκριτικά με την φάση συσσώρευση λίπους (ημισυνεχής καλλιέργεια) των κυττάρων.

Η παραγωγή μικροβιακού λίπους(TL) στην παρούσα καλλιέργεια προσδιορίστηκε μετά τις 23 h με συγκέντρωση 1.6 g/L TL, ενώ στις 113 h ημισυνεχούς ζύμωσης πετύχαμε 26 g/L TL. Η μέση ταχύτητα παραγωγής μικροβιακού λίπους ανά μονάδα όγκου (r_p'''') στην ημισυνεχή καλλιέργεια υπολογίστηκε από τα δεδομένα που αναφέραμε σε 0.271 g/(L h).

Ο συντελεστής απόδοσης παραγόμενου λίπους (TL) ανά μονάδα παραγόμενης βιομάζας(TDW), συμβολίζεται με $Y_{L/X}$ και στις 113 h είχε μέγιστη τιμή και ίση με 0.599 g/g. Η τιμή αυτή εκφράζει ότι στις 113 h η περιεκτικότητα των κυττάρων της ζύμης σε λίπος ήταν 60%. Ενώ ο συντελεστής απόδοσης παραγόμενου λίπους (TL) ανά μονάδα καταναλισκόμενης γλυκόζης(Glucose), συμβολίζεται με $Y_{L/s}$ και υπολογίστηκε ίσος με 0.204 g/g για την ημισυνεχή καλλιέργεια.

Στην κάτω εικόνα 20. παρουσιάζονται τα κύτταρα του ζυμομύκητα για την παρούσα καλλιέργεια κατά τις 113 h με την μέγιστη συγκέντρωση λίπους 26 g/L.

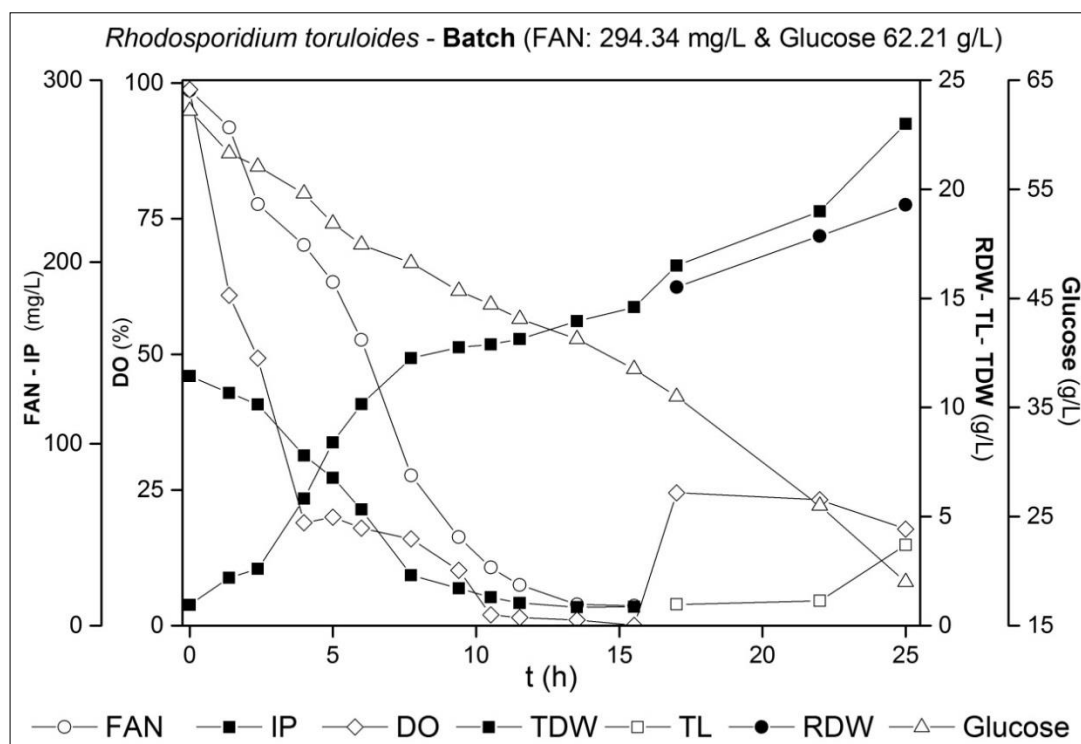


Εικόνα. 20 Μικροσκοπικό παρασκεύασμα κύτταρων ζυμομύκητα *Rhodosporidium toruloides*, μετά από 113 h καλλιέργειας με βιοαντιδραστήρα, σε Υδρόλυμα Ανθους Ορύζης προς παραγωγή μικροβιακού λίπους(TL) - 1^ο Πείραμα Ημισυνεχούς Καλλιέργειας, μέγιστη συγκέντρωση TL 26 g/L (Πηγή: Φωτογράφιση από το συγγραφέα, Εργ. Μικροβιολογίας & Βιοτεχνολογίας Τροφίμων, Γ.Π.Α.)

Από το γράφημα 8. της παρούσης παραγράφου και το πίνακα Π.5.2. του παραρτήματος, βλέπουμε ότι κατά την ημισυνεχή καλλιέργεια του ζυμομύκητα πετύχαμε μέγιστη συγκέντρωση ολικού ξηρού βάρους(TDW) 43.34 g/L. Ενώ, το Ξηρό Βάρος άνευ Λίπους(Residual Dry Weight, RDW) ή Βιομάζα άνευ Λίπους, κατά την διάρκεια της ημισυνεχούς καλλιέργειας (μετά τις 23 h) παίρνει μια σχεδόν σταθερή τιμή η οποία κυμαίνεται σένα εύρος τιμών 15.82 ± 1.26 g/L μέχρι τις 113 h. Αναλυτικότερα, στις 23 h είχαμε 14.41 g/L ενώ ως τις 113 h η μέγιστη συγκέντρωση RDW ήταν 17.34 g/L.

3.2.3. 2^ο ΠΕΙΡΑΜΑ- ΑΣΥΝΕΧΗΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ

Τα κύτταρα ζύμης *Rhodosporidium toruloides* αναπτύχθηκαν σε ασυνεχή(Batch) καλλιέργεια, σε θρεπτικό μέσο (υδρόλυμα Άνθους Ορύζης) με αρχική συγκέντρωση γλυκόζης 62.21 g/L και ελεύθερου αζώτου (αμινοξέων & πεπτιδίων) FAN 294.34 mg/L. Χρησιμοποιώντας αναδεδυμένο βιοαντιδραστήρα ενεργού όγκου 1.5 L, θερμοκρασία 28 °C, ρυθμιζόμενο pH 6.0 ± 02, 20% διαλυτό οξυγόνο (DO%) και ανάδευση αυτόματα ρυθμιζόμενη με βάση το DO %, με βάση την μεθοδολογία που δίδεται στην παράγραφο 2.3 «Ζύμωση Υγρής Φάσης». Τα αποτελέσματα από την προαναφερόμενη καλλιέργεια της ζύμης παρουσιάζονται στο κάτωθι διάγραμμα 9.



Γράφημα 9. Κινητική συγκεντρώσεων Ελεύθερου Αζώτου Αμινοξέων & Πεπτιδίων(FAN), Ανόργανου Φωσφόρου(IP), διαλυτού οξυγόνου(DO), Ολικού Ξηρού Βάρους-Βιομάζα (TDW), Ολικού Ξηρού Βάρους άνευ Λίπους(RDW), Ολικού ενδοκυτταρικού μικροβιακού λίπους(TL) και Γλυκόζης(Glucose) κατά την ασυνεχούς υγρή καλλιέργεια του ζυμομύκητα *Rhodosporidium toruloides* σε υδρόλυμα Άνθους Ορύζης με αρχική συγκέντρωση γλυκόζης 62.21 g/L και ελεύθερου αζώτου (αμινοξέων & πεπτιδίων) FAN 294.34 mg/L. Η ζύμωση έγινε σε αναδεδυμένο βιοαντιδραστήρα ενεργού όγκου 1.5 L, με θερμοκρασία 28 °C, ρυθμιζόμενο pH 6.0 ± 02, 20% διαλυτό οξυγόνο(DO%) και ανάδευση αυτόματα ρυθμιζόμενη με βάση το DO %. Τα πειραματικά δεδομένα του γραφήματος είναι διαθέσιμα στο **πίνακα Π.5.3.** του παραρτήματος.

Στο άνω γράφημα 9., καταγράφεται έντονη μείωση του διαλυτού οξυγόνου (DO%) τις πρώτες 4 ώρες. Αναλυτικότερα, από 98.8% στο μηδενικό σημείο (0 h) ελαττώθηκε σε 19.0% μετά από 4 h και ακολούθως μειώθηκε ως 0.1% μέχρι τις 15.5 h της ασυνεχούς καλλιέργειας. Ενώ, στις 17.0 h καταγράψαμε αύξηση του διαλυτού οξυγόνου και σταθεροποίηση του ως τις 25 h σε τιμές με εύρος 21.8±3.55 DO %.

Η συγκέντρωση του Ανόργανου Φωσφόρου (IP) ακολουθεί μια ομαλή καθοδική πορεία από την αρχή της καλλιέργειας μέχρι τις 7.73 h και εν συνεχεία ελαττώνεται με μικρότερο ρυθμό. Ειδικότερα, αρχικά βλέπουμε συγκέντρωση 137.44 mg/L IP, ενώ μέχρι τις 7.73 h προσδιορίσαμε 27.83 mg/L IP και εν συνεχεία 10.15 mg/L IP στις 15.52 h. Οι τιμές της συγκέντρωσης του FAN καταγράφουν μια ομαλή μείωση από την αρχή της καλλιέργειας ως τις 15.52 h. Συγκεκριμένα, στις 0 h προσδιορίσαμε 294.34 mg/L FAN και μέχρι τις 15.52 h η συγκέντρωση FAN είχε άγγιξε τα 11.7 mg/L FAN. Επιπροσθέτως, η συγκέντρωση της γλυκόζης μειώνεται καθόλη την διάρκεια της καλλιέργειας με τον ίδιο ρυθμό, αρχικά είδαμε συγκέντρωση γλυκόζης 62.21 g/L ενώ μέχρι τις 25 h είχε μειωθεί στα 19 g/L.

Το Ολικό Ξηρό Βάρος (TDW) στην καλλιέργεια μας για τις πρώτες 2 h δεν ξεπέρασε τα 2.5 g/L, γεγονός που πιθανότατα οφείλεται στην φάση προσαρμογής των κυττάρων της ζύμης. Ακολούθως, η συγκέντρωση TDW καταγράφει μια εκθετική αύξηση μέχρι τις 5 h με τιμή 8.4 g/L, η οποία αποδίδεται στην εκθετική φάση ανάπτυξης των κυττάρων. Εν συνεχεία, η συγκέντρωση TDW συνεχίζει να αυξάνει με μικρότερο ρυθμό μέχρι τις 6.0 h όπου προσδιορίσαμε TDW 10.16 g/L, πιθανότατα λόγω εισόδου των κυττάρων στην επιβραδυνόμενη φάση ανάπτυξης. Μετά τις 7.73 h η συγκέντρωση TDW βαίνει αυξανόμενη με πολύ αργό ρυθμό μέχρι τις 11.52 h, όπου καταγράψαμε TDW 13.14 g/L. Η συγκεκριμένη αύξηση με βραδύτερο ρυθμό πιθανόν να σηματοδοτεί την είσοδο των κυττάρων στην στάσιμη φάση ανάπτυξης.

Από το άνω γράφημα 9., παρατηρούμε ότι στην παρούσα ασυνεχή καλλιέργεια καταγράφεται παραγωγή ενδοκυτταρικού λίπους, με μέγιστη συγκέντρωση 3.7 g/L στις 25 h. Σε αντίθεση με την προηγούμενη ασυνεχή καλλιέργεια που αναλύσαμε στην παράγραφο 3.2.1., όπου δεν είχαμε καταγράψει παραγωγή μικροβιακών λιπιδίων. Το μέγιστο ξηρό βάρος άνευ λίπους (RDW) στην παρούσα καλλιέργεια προσδιορίστηκε στα 19.30 g/L και αντίστοιχα η μέγιστη συγκέντρωση βιομάζας (TDW) 23 g/L στις 25 h. Με βάση τα δεδομένα του πίνακα Π.5.3. του παραρτήματος, υπολογίσαμε τον συνολικό συντελεστή απόδοσης βιομάζας ως τις 25h $Y_{X/S} = 0.673$ g/g, ο οποίος εκφράζει την μέση παραγόμενη βιομάζα ανά μονάδα υποστρώματος (γλυκόζης) (g/g) για την ασυνεχή καλλιέργεια.

Επίσης, είδαμε ότι τα κύτταρα του ζυμομύκητα, κατά την διάρκεια της λανθάνουσας φάσης καταναλώνουν έως τις 4 h το 80.8 % του διαλυτού οξυγόνου (DO), 31.8% του ανόργανου φώσφορου (IP), 28.8% του FAN καθώς επίσης 12.2% της γλυκόζης από το υπόστρωμα της καλλιέργειας. Κατά την εκθετική φάση ανάπτυξης των κυττάρων έχουμε εξάντληση αρχικά της συγκέντρωσης του IP και εν συνεχεία του διαλυτού οξυγόνου με βραδύτερο ρυθμό. Ενώ, η συγκέντρωση του FAN εξαντλείται ταυτόχρονα με την είσοδο των κυττάρων στην στάσιμη φάση ανάπτυξης τους. Η κατανάλωση της γλυκόζης σε όλη την διάρκεια της καλλιέργειας εμφανίζει σταθερό ρυθμό αφομοίωσης από τα κύτταρα.

Εστιάζοντας, στις άνω παρατηρήσεις & στο γράφημα 9., εκτιμούμε ότι τα χαμηλά επίπεδα ανόργανου φωσφόρου (IP) και DO πιθανότατα οδηγούν στην διακοπή της εκθετικής φάσης ανάπτυξης των κυττάρων και μετάβασης αυτών στην επιβραδυνόμενη φάση. Αυτό οφείλεται στο ότι τα επίπεδα ανόργανου φωσφόρου (IP) και διαλυτού οξυγόνου DO στις 6 h τις καλλιέργειας δεν δύναται να κορέσουν τις μεταβολικές ανάγκες των κυττάρων για την παραμονή τους στην εκθετική φάση. Γεγονός, που καθίσταται τον ανόργανο φώσφορο (IP) και το % διαλυτό οξυγόνο DO περιοριστικούς παράγοντες την μικροβιακής για την συγκεκριμένη καλλιέργεια. Η συγκέντρωση του FAN ήταν 157.24 mg/L ως τις 6 h, ενώ εκτιμούμε ότι τα κύτταρα εξέρχονται από την εκθετική φάση νωρίτερα, με βάση το Γράφημα

9., έτσι πιστεύουμε ότι το FAN δεν αποτέλεσε περιοριστικό παράγοντα αύξησης των κυττάρων παρούσα καλλιέργεια.

Μετά τις 15.52 h παρατηρούμε μια σχετική αύξηση των επιπέδων του διαλυτού οξυγόνου της καλλιέργειας, γεγονός που πιθανότατα να οφείλεται στην μείωση του ρυθμού ανάπτυξης των κυττάρων, στηριζόμενοι στο άνω γράφημα 9. Το σημείο αυτό πιθανότατα να οριοθετεί την είσοδο των κυττάρων στην φάση λιποσυσσώρευσης, αφού στις 15.52 h προσδιορίσαμε 0.98 g/L μικροβιακού λίπους(TL).

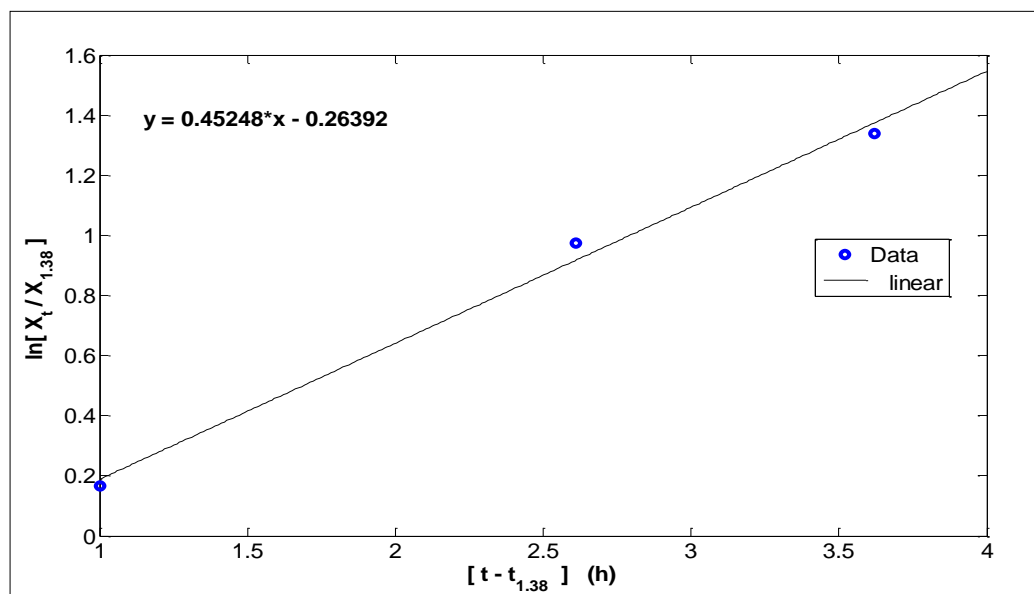
Στηριζόμενοι στο γράφημα 9., εκτιμήσαμε ότι τα κύτταρα εισέρχονται στην εκθετική φάση μετά τις 1.38 h και αναπτύσσονται εκθετικά ως τις 5 h. Στην εκθετική φάση, η ανάπτυξη των κυττάρων δύναται να χαρακτηριστεί σχεδόν γραμμική, γεγονός που μας επιτρέπει να χρησιμοποιήσουμε τους τύπους (9), (10) & (11)(Stanbury et al., 1995; Mosier and Ladisch, 2009) για το γραφικό προσδιορισμό του μέγιστου ειδικού ρυθμού αύξησης κυττάρων (μ_{max}) στο κάτω γράφημα 10. Όπως ήδη εξηγήσαμε εκτενώς στην παράγραφο 3.2.1. :

$$\frac{dX}{dt} = \mu X \quad (9)$$

$$\ln X(t) = \ln X(o) + \mu t \quad (10)$$

$$\frac{\ln[X(t)/X(o)]}{t} = \mu \quad (11)$$

Όπου, X : συγκέντρωση της βιομάζας(TDW) σε g/L , t : χρόνος ανάπτυξης των κυττάρων σε h,
 μ : ειδικός ρυθμός αύξησης των κυττάρων σε h^{-1} , $X_{(t)}$: συγκέντρωση βιομάζας σε g/L,
 $X_{(o)}$: αρχική συγκέντρωση βιομάζας σε g/L

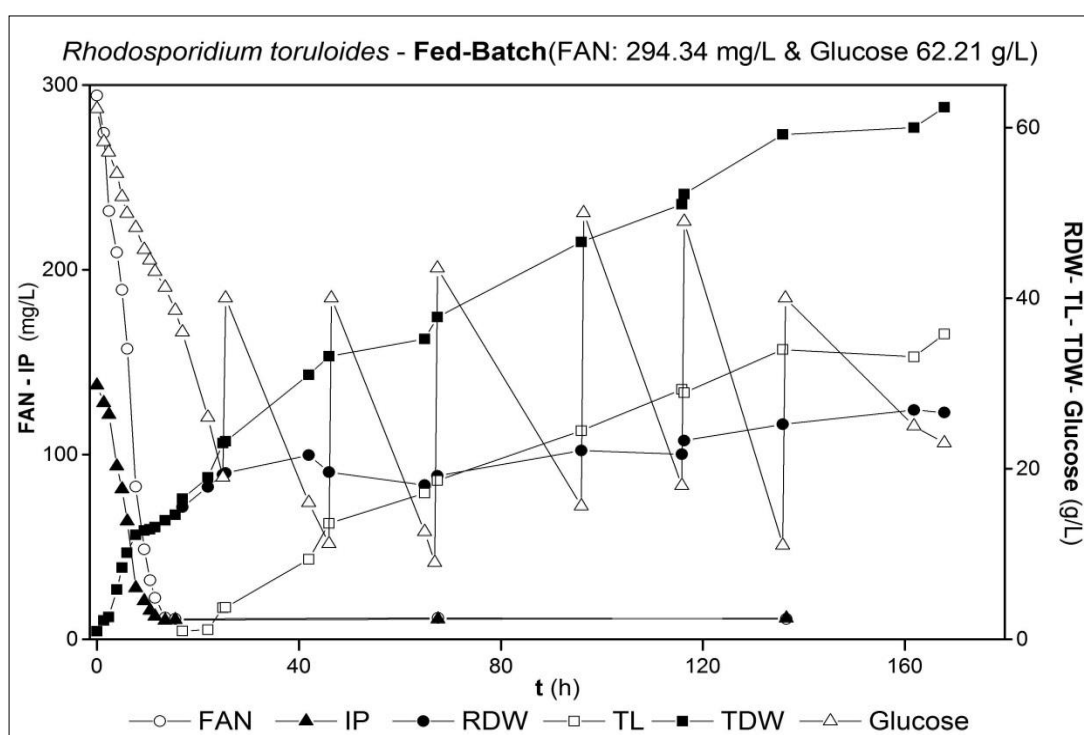


Γράφημα 10. Υπολογισμός μ_{max} (μέγιστου ειδικού ρυθμού αύξησης κυττάρων) κατά την εκθετική φάση της ασυνεχής υγρής καλλιέργεια του ζυμομύκητα *Rhodospiridium toruloides* σε υδρόλυμα Άνθους Ορύζης με αρχική συγκέντρωση γλυκόζης 62.21 g/L και ελεύθερου αζώτου (αμινοξέων & πεπτιδίων) FAN 294.34 mg/L. Από το γράφημα 9. εκτιμούμε ότι μετά το σημείο 1.38 h αρχίζει η ανάπτυξη, θεωρούμε το σημείο 1.38 h ως βάση και υποθέτουμε εκθετική αύξηση στα σημεία 2.38 h, 3.99 h και 5.0 h. Γραφικά υπολογίσαμε το $\mu_{max} \approx 0.453 h^{-1}$ με βάση τον άνω τύπο (11).

3.2.4. 2^ο ΠΕΙΡΑΜΑ- ΗΜΙΣΥΝΕΧΗΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ

Τα κύτταρα του *Rhodosporidium toruloides* αναπτύχθηκαν σε ημισυνεχή τροφοδοτούμενη καλλιέργεια (Fed- Batch), μετά την ασυνεχή (Batch) καλλιέργεια τους στο υδρόλυμα Άνθους Ορύζης με αρχική συγκέντρωση γλυκόζης 62.21 g/L & ελεύθερο άζωτο (αμινοξέων & πεπτιδίων) FAN 294.34 mg/L που αναλύσαμε στην άνω παράγραφο 3.2.3.

Για την ημισυνεχής τροφοδοτούμενη καλλιέργεια ως προσθήκη υποστρώματος (Τεχνική Fed) χρησιμοποιήθηκε προσθήκη εμπορικής γλυκόζης (95% καθαρότητας). Όλη η μεθοδολογία δίδεται λεπτομερώς στην παράγραφο 2.3 «Ζύμωση Υγρής Φάσης». Τα αποτελέσματα της καλλιέργειας παρουσιάζονται στα κάτωθι γραφήματα 11. & 12., ενώ τα δεδομένα είναι διαθέσιμα στο πίνακα Π.5.3. του παραρτήματος.

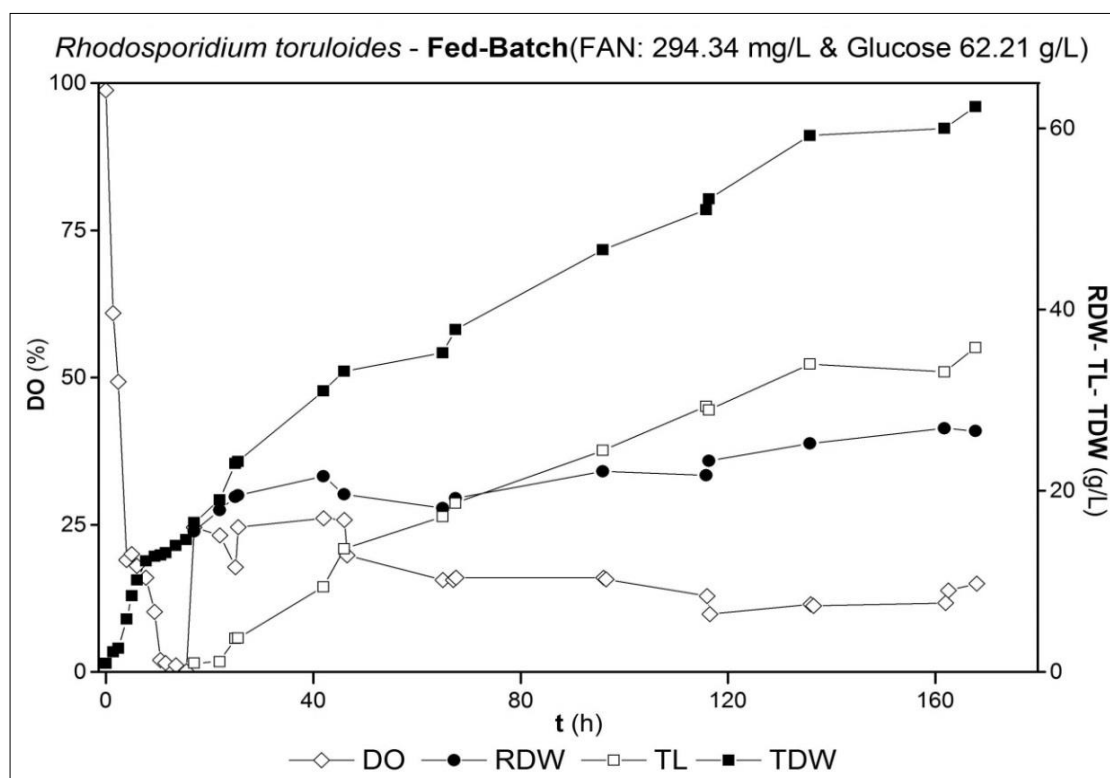


Γράφημα 11. Κινητική συγκεντρώσεων Ελεύθερου Αζώτου Αμινοξέων & Πεπτιδίων (FAN), Ανόργανου Φωσφόρου (IP), Ολικού Ξηρού Βάρους άνευ Λίπους (RDW), Ολικού ενδοκυτταρικού μικροβιακού λίπους (TL), Ολικού Ξηρού Βάρους-Βιομάζα (TDW) και Γλυκόζης (Glucose) κατά την ασυνεχή & ημισυνεχή υγρή καλλιέργεια του ζυμομύκητα *Rhodosporidium toruloides* σε υδρόλυμα Άνθους Ορύζης με αρχική συγκέντρωση γλυκόζης 62.21 g/L και ελεύθερου αζώτου (αμινοξέων & πεπτιδίων) FAN 294.34 mg/L. Η ζύμωση έγινε σε αναδεδυμένο βιοαντιδραστήρα ενεργού όγκου 1.5 L, με θερμοκρασία 28 °C, ρυθμιζόμενο pH 6.0 ± 0.2, 20% διαλυτό οξυγόνο (DO%) και ανάδευση αυτόματα ρυθμιζόμενη με βάση το DO %. Τα πειραματικά δεδομένα του γραφήματος είναι διαθέσιμα στο **πίνακα Π.5.3.** του παραρτήματος.

Από το γράφημα 11. βλέπουμε ότι στην ημισυνεχή καλλιέργεια η συγκέντρωση της γλυκόζης κινήθηκε σε ένα εύρος τιμών από 49 g/L ως 9 g/L. Οι τιμές των συγκεντρώσεων του ανόργανου φώσφορου (IP) και του ελεύθερου αζώτου αμινοξέων & πεπτιδίων (FAN) κατά την ημισυνεχή καλλιέργεια παρέμειναν σχεδόν αμετάβλητες και σε χαμηλά επίπεδα. Αναλυτικά, κατά την διάρκεια της ημισυνεχούς καλλιέργειας προσδιορίσαμε 11.29±0.33 mg/L FAN και 11.06±0.37 mg/L IP.

Η παραγωγή ενδοκυτταρικού μικροβιακού λίπους (TL) στο γράφημα 11., εντοπίζεται κατά τις 17 h ενώ ακόμη βρισκόμαστε στην ασυνεχή καλλιέργεια. Έτσι, στις 17 h καταγράψαμε 0.98 g/L μικροβιακού λίπους (TL), ενώ προσδιορίσαμε 11.07 mg/L FAN, 10.45 mg/L IP και ταυτόχρονα συγκέντρωση γλυκόζης 38.54 g/L.

Γενικότερα, κατά την παραγωγή μικροβιακού λίπους είχαμε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις IP & FAN, με ταυτόχρονη συγκέντρωση γλυκόζης 38.54 g/L. Γεγονός που πιθανότατα οδήγησε τα κύτταρα στην συσσώρευση μικροβιακού λίπους, με βάση την βιβλιογραφία, για το περιορισμό του αζώτου (Ratlidge, 1988;2004;Papanikolaou et al., 2002; 2007; Αγγελής, 2007; Ageitos et al., 2011;Papanikolaou and Aggelis, 2011) και του φωσφόρου(Wu et al., 2011) στο μέσο της καλλιέργειας.



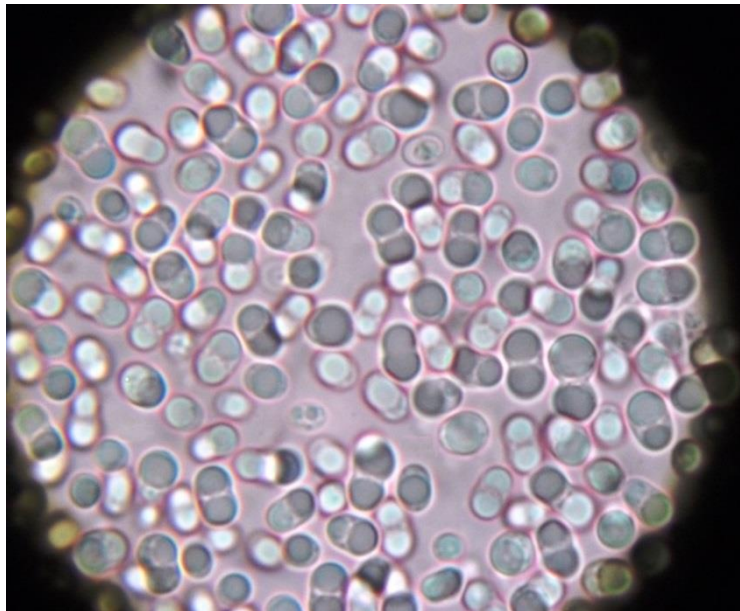
Γράφημα 12. Κινητική συγκεντρώσεων Διαλυτού οξυγόνου(DO), Ολικού Ξηρού Βάρους άνευ Λίπους(RDW), Ολικού ενδοκυτταρικού μικροβιακού λίπους(TL) και Ολικού Ξηρού Βάρους-Βιομάζα (TDW) κατά την ασυνεχή & ημισυνεχή υγρή καλλιέργεια του ζυμομύκητα *Rhodosporidium toruloides* σε υδρόλυμα Άνθους Ορύζης με αρχική συγκέντρωση γλυκόζης 62.21 g/L και ελεύθερου αζώτου (αμινοξέων & πεπτιδίων) FAN 294.34 mg/L. Η ζύμωση έγινε σε αναδεδυμένο βιοαντιδραστήρα ενεργού όγκου 1.5 L, με θερμοκρασία 28 °C, ρυθμιζόμενο pH 6.0 ± 0.2, 20% διαλυτό οξυγόνο(DO%) και ανάδευση αυτόματα ρυθμιζόμενη με βάση το DO %. Τα πειραματικά δεδομένα του γραφήματος είναι διαθέσιμα στο **πίνακα Π.5.3.** του παραρτήματος.

Από το άνω γράφημα 12., παρατηρήσαμε μια έντονη μείωση του διαλυτού οξυγόνου(DO%) ως τις πρώτες 4 h κατά την ασυνεχή καλλιέργεια, όπου τα κύτταρα βρίσκονται στην λανθάνουσα φάση. Μετά τις 4 h καταγράψαμε μείωση του DO με κατώτατη τιμή 0.1% στις 15.52 h και ως τις 25 h είδαμε άνοδο & σταθεροποίηση του DO σε τιμές 21.8±3.55 DO %. Ενώ, στην ημισυνεχή καλλιέργεια (μετά τις 25 h) παρατηρήσαμε ότι τα επίπεδα διαλυτού οξυγόνου παρέμειναν στο ίδιο εύρος τιμών ως τις 46.5 h, ενώ μετά τις 65 h οι τιμές του διαλυτού οξυγόνου κυμαίνονται σε 13.7±2.25 DO %.

Η απότομη μείωση του οξυγόνου αρχικά οφείλεται στις υψηλές μεταβολικές ανάγκες των κυττάρων κατά την φάση ανάπτυξης τους. Ενώ, με την μετάβαση των κυττάρων στην φάση λιποσυσσώρευσης, τα κύτταρα έχουν μικρότερες απαιτήσεις σε οξυγόνο, οπότε τα διαθέσιμα επίπεδα DO στην καλλιέργεια αυξάνονται.

Στην ημισυνεχή καλλιέργεια στις 25.5 h είδαμε αρχική συγκέντρωση 3.72 g/L TL, ενώ στις 168 h καλλιέργειας πετύχαμε 35.8 g/L TL. Η μέση ταχύτητα παραγωγής μικροβιακού λίπους ανά μονάδα όγκου (r_p''') από την ημισυνεχή καλλιέργεια, υπολογίστηκε από τα δεδομένα που αναφέραμε σε 0.23 g/(L h).

Ο συντελεστής απόδοσης παραγόμενου λίπους (TL) ανά μονάδα παραγόμενης βιομάζας(TDW), συμβολίζεται με $Y_{L/X}$ και στις 168 h είχε μέγιστη τιμή και ίση με 0.574 g/g. Η τιμή αυτή εκφράζει ότι στις 168 h η περιεκτικότητα των κυττάρων της ζύμης σε λίπος ήταν 57%. Ο συντελεστής απόδοσης παραγόμενου λίπους (TL) ανά μονάδα καταναλισκόμενης γλυκόζης(Glucose), συμβολίζεται με $Y_{L/S}$ και για την ημισυνεχή καλλιέργεια υπολογίστηκε σε 0.220 g/g. Στην κάτω εικόνα 21. παρουσιάζονται τα κύτταρα του ζυμομύκητα για την παρούσα καλλιέργεια κατά τις 168 h με την μέγιστη συγκέντρωση λίπους 35.8 g/L.

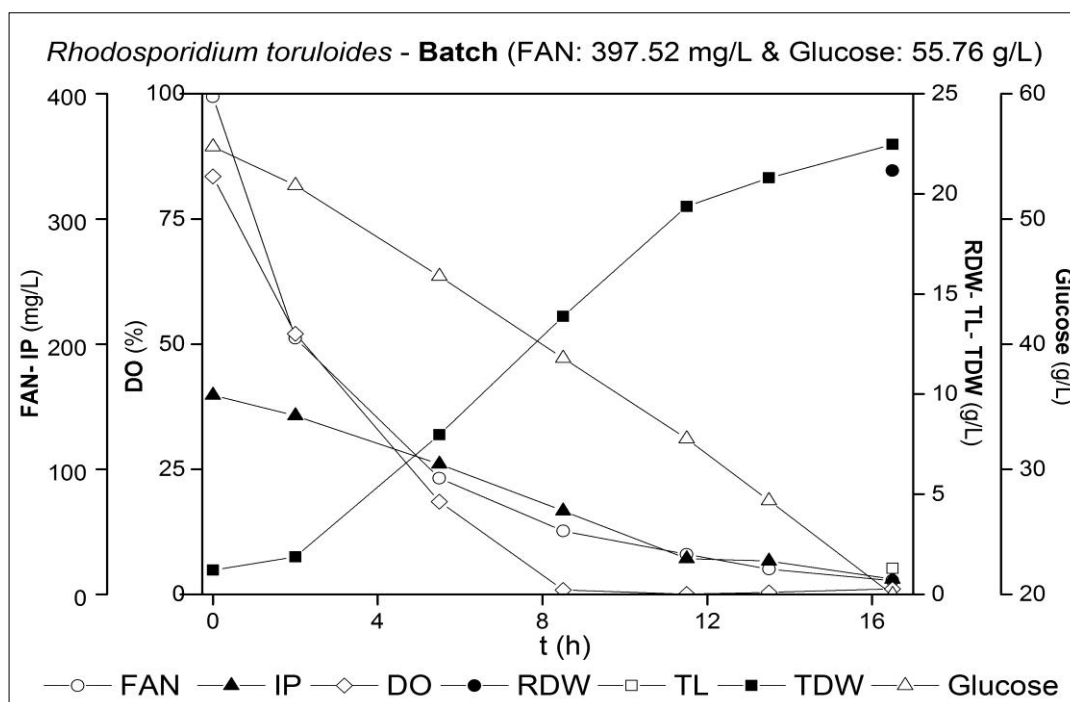


Εικόνα. 21 Μικροσκοπικό παρασκεύασμα κύτταρων ζυμομύκητα *Rhodosporidium toruloides*, μετά από 168 h καλλιέργειας με βιοαντιδραστήρα, σε Υδρόλυμα Άνθους Ορούζης προς παραγωγή μικροβιακού λίπους(TL) - 2^ο Πείραμα Ημισυνεχούς Καλλιέργειας, μέγιστη συγκέντρωση TL 35.8 g/L (Πηγή: Φωτογράφιση από το συγγραφέα, Εργ. Μικροβιολογίας & Βιοτεχνολογίας Τροφίμων, Γ.Π.Α.)

Από το γράφημα 12. και το πίνακα Π.5.3. του παραρτήματος, βλέπουμε ότι κατά την ημισυνεχή καλλιέργεια του ζυμομύκητα πετύχαμε μέγιστη συγκέντρωση ολικού ξηρού βάρους(TDW) 62.40 g/L. Ενώ, το Ξηρό Βάρος άνευ Λίπους(Residual Dry Weight, RDW) ή Βιομάζα άνευ Λίπους, κατά την διάρκεια της ημισυνεχούς καλλιέργειας (μετά τις 25 h) παίρνει μια σχεδόν σταθερή τιμή η οποία κυμαίνεται σένα εύρος τιμών 22.16 ± 3.04 g/L μέχρι τις 168 h. Αναλυτικότερα, στις 25 h είχαμε 19.50 g/L, ενώ ως τις 162 h η μέγιστη συγκέντρωση RDW ήταν 26.9 g/L.

3.2.5. 3^ο ΠΕΙΡΑΜΑ- ΑΣΥΝΕΧΗΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ

Τα κύτταρα ζύμης *Rhodospiridium toruloides* αναπύχθηκαν σε ασυνεχή(Batch) καλλιέργεια, σε θρεπτικό μέσο (υδρόλυμα Άνθους Ορύζης) με αρχική συγκέντρωση γλυκόζης 55.76 g/L και ελεύθερου αζώτου (αμινοξέων & πεπτιδίων) FAN 397.52 mg/L. Χρησιμοποιώντας αναδευόμενο βιοαντιδραστήρα ενεργού όγκου 1.5 L, θερμοκρασία 28 °C, ρυθμιζόμενο pH 6.0 ± 02, 20% διαλυτό οξυγόνο (DO%) και ανάδευση αυτόματα ρυθμιζόμενη με βάση το DO %, σύμφωνα με την μεθοδολογία που δίδεται στην παράγραφο 2.3 «Ζύμωση Υγρής Φάσης». Τα αποτελέσματα από την προαναφερόμενη καλλιέργεια της ζύμης παρουσιάζονται στο κάτωθι διάγραμμα 13.



Γράφημα 13. Κινητική συγκεντρώσεων Ελεύθερου Αζώτου Αμινοξέων & Πεπτιδίων(FAN), Ανόργανου Φωσφόρου(IP), διαλυτού οξυγόνου(DO), Ολικού Ξηρού Βάρους άνευ Λίπους(RDW), Ολικού ενδοκυτταρικού μικροβιακού λίπους(TL), Ολικού Ξηρού Βάρους-Βιομάζα (TDW) και Γλυκόζης(Glucose) κατά την ασυνεχής υγρή καλλιέργεια του ζυμομύκητα *Rhodospiridium toruloides* σε υδρόλυμα Άνθους Ορύζης με αρχική συγκέντρωση γλυκόζης 55.76 g/L και ελεύθερου αζώτου (αμινοξέων & πεπτιδίων) FAN 397.52 mg/L. Η ζύμωση έγινε σε αναδευόμενο βιοαντιδραστήρα ενεργού όγκου 1.5 L, με θερμοκρασία 28 °C, ρυθμιζόμενο pH 6.0 ± 02, 20% διαλυτό οξυγόνο(DO%) και ανάδευση αυτόματα ρυθμιζόμενη με βάση το DO %. Τα πειραματικά δεδομένα του γραφήματος είναι διαθέσιμα στο **πίνακα Π.5.4.** του παραρτήματος.

Από το άνω γράφημα 13., αρχικά βλέπουμε μια έντονη μείωση του διαλυτού οξυγόνου (DO %), η οποία μέχρι τις 8.5 h ώρες οδηγεί στην εξάντληση του από το θρεπτικό μέσο της καλλιέργειας. Συγκεκριμένα, από 83.5 % στο μηδενικό σημείο (0 h) ελαττώθηκε σε 52.1% μετά από 2 h και ακολούθως εξαντλήθηκε ως 0.9% μέχρι τις 8.5 h της ασυνεχούς καλλιέργειας. Ενώ, ως τις 16.0 h είδαμε ότι παρέμεινε σχεδόν σταθερό στα ίδια χαμηλά επίπεδα με τιμή 1.1 DO %.

Η συγκέντρωση Ανόργανου Φωσφόρου (IP) ακολουθεί ένα σταθερό ρυθμό κατανάλωσης από την αρχή της καλλιέργειας μέχρι τις 11.5 h και ακολούθως ελαττώνεται ελάχιστα. Αναλυτικότερα, αρχικά καταγράψαμε συγκέντρωση 159.25 mg IP/L, ενώ μέχρι τις 11.5 h μειώθηκε σε 28.64 mg/L IP και εν συνεχεία στις 16.5 h προσδιορίσαμε 12.30 mg/L IP.

Κατά τις πρώτες 2 h η συγκέντρωση του FAN καταγράφει μια γρήγορη μείωση, ενώ στην εκθετική φάση ανάπτυξης των κυττάρων μειώνεται ως τα 50.65 mg/L και ακολούθως ελαττώνεται αργά. Πιο αναλυτικά, στις 0 h προσδιορίσαμε 397.52 mg/L FAN και μετά από 2 h είχαμε 204.75 mg/L FAN. Ενώ, λόγω της εκθετικής φάσης ανάπτυξης των κυττάρων η συγκέντρωση του FAN πήρε την τιμή 50.65 mg/L, ενώ μέχρι τις 16.5 h ελαττώθηκε ως τα 11.17 mg/L FAN.

Το Ολικό Ξηρό Βάρος (TDW) στην καλλιέργεια μας για τις πρώτες 2 h δεν ξεπέρασε τα 1.88 g/L, λόγω της λανθάνουσας φάσης των κυττάρων. Ακολούθως, η συγκέντρωση TDW καταγράφει μια ραγδαία αύξηση μέχρι τις 8.5 h με τιμή 13.9 g/L, η οποία αποδίδεται στην εκθετική φάση ανάπτυξης. Εν συνεχεία, η συγκέντρωση TDW αυξάνει με μικρότερο ρυθμό μέχρι τις 11.5 h όπου προσδιορίσαμε TDW 19.37 g/L, πιθανότατα λόγω εισόδου των κυττάρων στην επιβραδυνόμενη φάση ανάπτυξης. Μετά τις 11.5 h η συγκέντρωση TDW βαίνει αυξανόμενη ελάχιστα μέχρι τις 16.50 h, όπου καταγράψαμε TDW 22.47 g/L. Η συγκεκριμένη αύξηση με βραδύτερο ρυθμό πιθανόν να σηματοδοτεί την είσοδο των κυττάρων στην στάσιμη φάση ανάπτυξης.

Στην παρούσα ασυνεχή καλλιέργεια καταγράφεται παραγωγή ενδοκυτταρικού λίπους, με συγκέντρωση 1.3 g/L στις 16.5 h. Ενώ, το μέγιστο ξηρό βάρος άνευ λίπους (RDW) στην παρούσα καλλιέργεια προσδιορίστηκε στα 21.17 g/L και αντίστοιχα η μέγιστη συγκέντρωση βιομάζας (TDW) 22.47 g/L στις 16.5 h. Με βάση τα δεδομένα του πίνακα Π.5.4. του παραρτήματος, υπολογίσαμε τον συνολικό συντελεστή απόδοσης βιομάζας ως τις 16.5 h $Y_{x/s} = 0.693$ g/g, ο οποίος εκφράζει την μέση παραγόμενη βιομάζα ανά μονάδα υποστρώματος (γλυκόζης) (g/g) για την ασυνεχή καλλιέργεια.

Η εκθετική φάση ανάπτυξης των κυττάρων οδήγησε σε εξάντληση του διαλυτού οξυγόνου (DO%) ως τις 8.5 h και ελάττωση των συγκεντρώσεων FAN & IP σε 50.65 mg/L FAN και 66.85 mg/L IP. Η αφομοίωση της γλυκόζης σε όλη την διάρκεια της καλλιέργειας βαίνει μειούμενη με σταθερό ρυθμό κατανάλωσης από τα κύτταρα.

Εκ των άνω επισημάνσεων και εστιάζοντας στο γράφημα 13. εκτιμούμε ότι η εξάντληση του διαλυτού DO και τα χαμηλά επίπεδα συγκεντρώσεων FAN & IP πιθανότατα οδηγούν στην διακοπή της εκθετικής φάσης ανάπτυξης των κυττάρων. Λόγω, μη κορεσμού των απαιτήσεων της εκθετικής φάσης σε DO, IP & FAN. Για το λόγο αυτό το διαλυτό οξυγόνο (DO), το ανόργανο φώσφορο (IP) και το ελεύθερο άζωτο (αμινοξέων και πεπτιδίων) εκτιμούμε ότι αποτελούν περιοριστικούς παράγοντες της μικροβιακής αύξησης για την συγκεκριμένη καλλιέργεια.

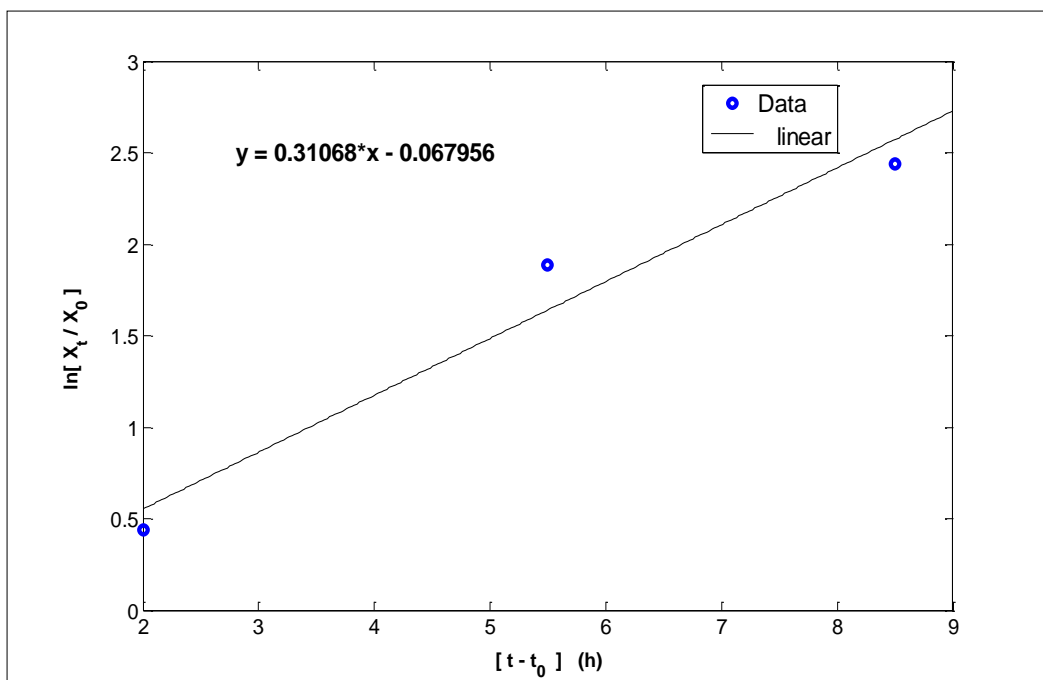
Στηριζόμενοι στο γράφημα 13. , εκτιμήσαμε ότι τα κύτταρα εισέρχονται στην εκθετική φάση μετά τις 2.0 h και αναπτύσσονται εκθετικά ως τις 8.5 h. Στην εκθετική φάση, η ανάπτυξη των κυττάρων δύναται να χαρακτηριστεί σχεδόν γραμμική, γεγονός που μας επιτρέπει να χρησιμοποιήσουμε τους κάτωθι τύπους (9), (10) & (11)(Stanbury et al., 1995; Mosier and Ladisch, 2009) για το γραφικό προσδιορισμό του μέγιστου ειδικού ρυθμού αύξησης κυττάρων (μ_{max}) στο κάτω γράφημα 14., όπως ήδη εξηγήσαμε στην παράγραφο 3.2.1. :

$$\frac{dX}{dt} = \mu X \quad (9)$$

$$\ln X(t) = \ln X(o) + \mu t \quad (10)$$

$$\frac{\ln[X(t)/(X(o))]}{t} = \mu \quad (11)$$

Όπου, X : συγκέντρωση της βιομάζας (TDW) σε g/L , t : χρόνος ανάπτυξης των κυττάρων σε h,
 μ : ειδικός ρυθμός αύξησης των κυττάρων σε h^{-1} , $X_{(t)}$: συγκέντρωση βιομάζας σε g/L,
 $X_{(0)}$: αρχική συγκέντρωση βιομάζας σε g/L

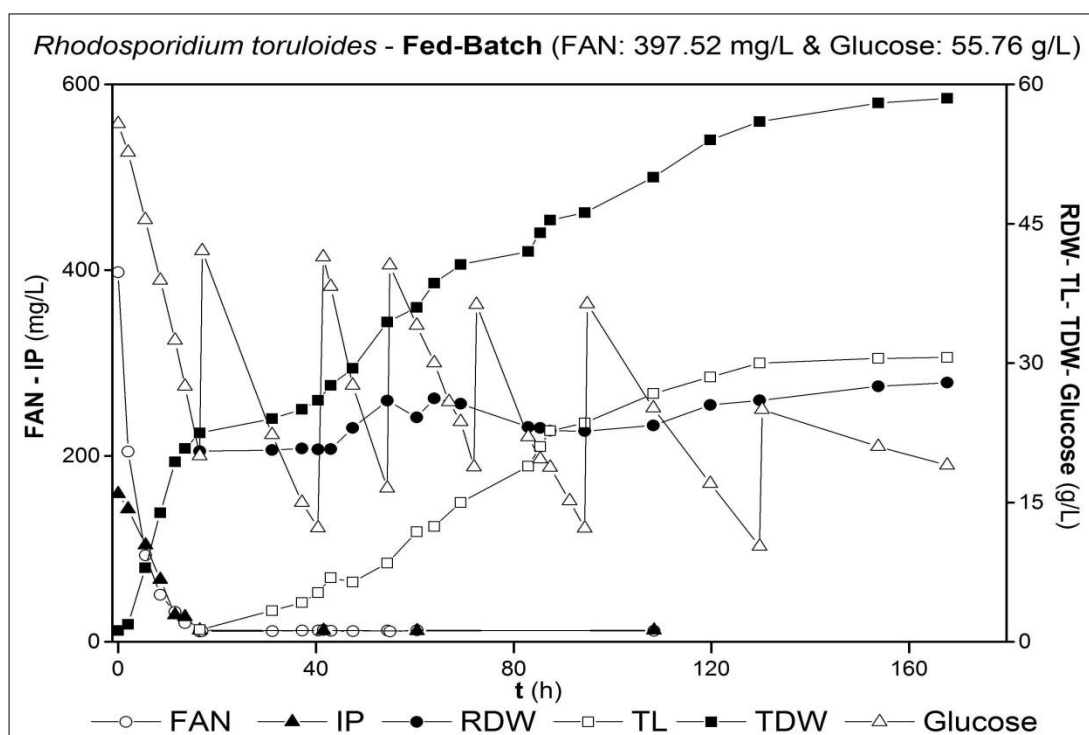


Γράφημα 14. Υπολογισμός μ_{max} (μέγιστου ειδικού ρυθμού αύξησης κυττάρων) κατά την εκθετική φάση της ασυνεχούς υγρής καλλιέργεια του ζυμομύκητα *Rhodosporidium toruloides* σε υδρόλυμα Άνθους Ορύζης με αρχική συγκέντρωση γλυκόζης 55.76 g/L και ελεύθερου αζώτου (αμινοξέων & πεπτιδίων) FAN 397.52 mg/L. Από το γράφημα 13. εκτιμούμε ότι μετά το μηδενικό αρχίζει η ανάπτυξη, θεωρούμε το σημείο 0 h ως βάση και υποθέτουμε εκθετική αύξηση στα σημεία 2.0 h, 5.5 h και 8.5 h. Γραφικά υπολογίσαμε το $\mu_{max} \approx 0,311 h^{-1}$ με βάση τον άνω τύπο (11).

3.2.6. 3^ο ΠΕΙΡΑΜΑ- ΗΜΙΣΥΝΕΧΗΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ

Τα κύτταρα του *Rhodosporidium toruloides* αναπτύχθηκαν σε ημισυνεχή τροφοδοτούμενη καλλιέργεια(Fed- Batch), μετά την ασυνεχή(Batch) καλλιέργεια τους στο υδρόλυμα Άνθους Ορύζης με αρχική συγκέντρωση γλυκόζης 55.76 g/L & ελεύθερο άζωτο (αμινοξέων & πεπτιδίων) FAN 397.52 mg/L που αναλύσαμε στην άνω παράγραφο 3.2.5.

Για την ημισυνεχή τροφοδοτούμενη καλλιέργεια ως προσθήκη υποστρώματος (Τεχνική Fed) χρησιμοποιήθηκε προσθήκη εμπορικής γλυκόζης(95% καθαρότητας). Όλη η μεθοδολογία δίδεται λεπτομερώς στην παράγραφο 2.3 «Ζύμωση Υγρής Φάσης». Τα αποτελέσματα της καλλιέργειας παρουσιάζονται στα κάτωθι γραφήματα 15. & 16., ενώ τα δεδομένα είναι διαθέσιμα στο πίνακα Π.5.4. του παραρτήματος.



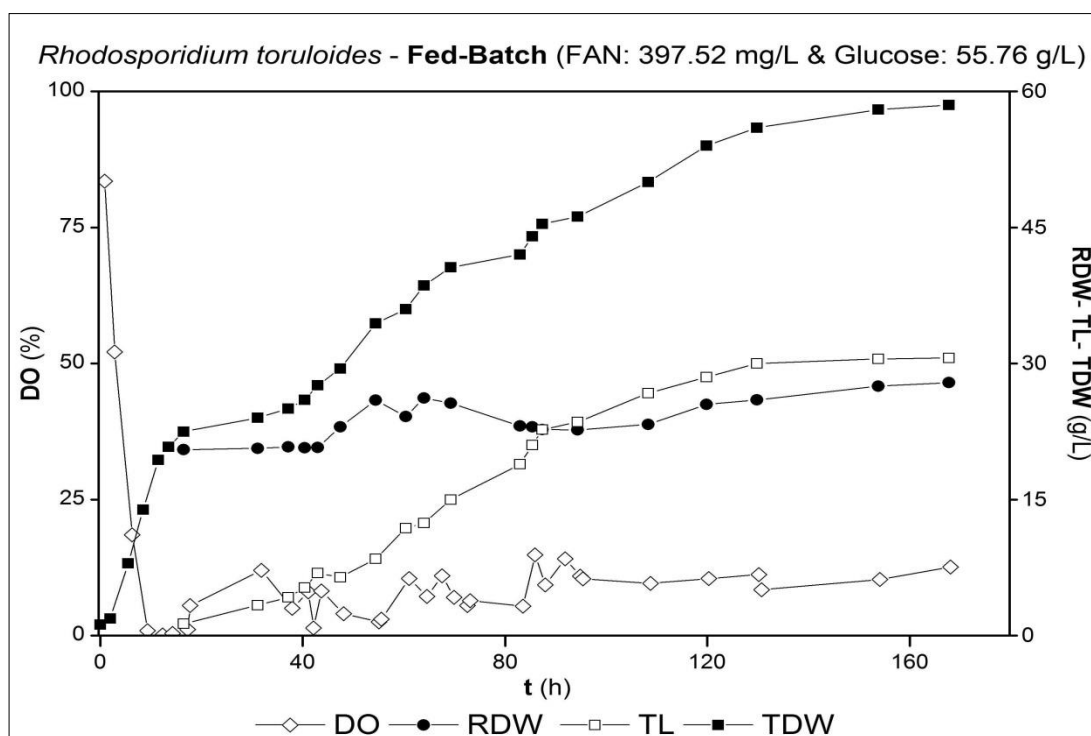
Γράφημα 15. Κινητική συγκεντρώσεων Ελεύθερου Αζώτου Αμινοξέων & Πεπτιδίων(FAN), Ανόργανου Φωσφόρου(IP), Ολικού Ξηρού Βάρους άνευ Λίπους(RDW), Ολικού ενδοκυτταρικού μικροβιακού λίπους(TL), Ολικού Ξηρού Βάρους-Βιομάζα (TDW) και Γλυκόζης(Glucose) κατά την ασυνεχή & ημισυνεχή υγρή καλλιέργεια του ζυμομύκητα *Rhodosporidium toruloides* σε υδρόλυμα Άνθους Ορύζης με αρχική συγκέντρωση γλυκόζης 55.76 g/L και ελεύθερου αζώτου (αμινοξέων & πεπτιδίων) FAN 397.52 mg/L. Η ζύμωση έγινε σε αναδεδυμένο βιοαντιδραστήρα ενεργού όγκου 1.5 L, με θερμοκρασία 28 °C, ρυθμιζόμενο pH 6.0 ± 0.2, 20% διαλυτό οξυγόνο(DO%) και ανάδευση αυτόματα ρυθμιζόμενη με βάση το DO %. Τα πειραματικά δεδομένα του γραφήματος είναι διαθέσιμα στο **πίνακα Π.5.4.** του παραρτήματος.

Η συγκέντρωση της γλυκόζης στην ημισυνεχή καλλιέργεια κινήθηκε σε ένα εύρος τιμών από 42.1 g/L ως 10.27 g/L με βάση το άνω γράφημα 15. Οι συγκεντρώσεις του ανόργανου φώσφορου(IP) και του ελεύθερου αζώτου αμινοξέων & πεπτιδίων (FAN) κατά την ημισυνεχή καλλιέργεια παρέμειναν σχεδόν αμετάβλητες και σε χαμηλά επίπεδα. Αναλυτικά, κατά την

διάρκεια της ημισυνεχούς καλλιέργειας προσδιορίσαμε 11.78 ± 0.57 mg/L FAN και 12.01 ± 0.29 mg/L IP.

Η παραγωγή ενδοκυτταρικού μικροβιακού λίπους (TL) στο γράφημα 15., παρατηρείται κατά τις 16.5 h, ενώ ακόμη βρισκόμαστε στην ασυνεχή καλλιέργεια. Πιο συγκεκριμένα, στις 16.5 h καταγράψαμε 1.3 g/L μικροβιακού λίπους (TL), ενώ προσδιορίσαμε 11.17 mg/L FAN, 12.30 mg/L IP και συγκέντρωση γλυκόζης 20.0 g/L.

Η σύνθεση μικροβιακών λιπιδίων στην συγκεκριμένη ημισυνεχή καλλιέργεια χαρακτηρίζεται από χαμηλές συγκεντρώσεις IP & FAN και συγκέντρωση γλυκόζης 20 g/L. Γεγονός που πιθανότατα ευθύνεται για την συσσώρευση μικροβιακού λίπους, λόγω περιορισμού του Αζώτου & Φωσφόρου στο θρεπτικό μέσο της καλλιέργειας σύμφωνα με την βιβλιογραφία (Ratledge, 1988;2004;Papanikolaou et al., 2002; 2007; Αγγελής, 2007; Ageitos et al., 2011;Papanikolaou and Aggelis, 2011;Wu et al., 2011).



Γράφημα 16. Κινητική συγκεντρώσεων Διαλυτού οξυγόνου(DO), Ολικού Ξηρού Βάρους άνευ Λίπους(RDW), Ολικού ενδοκυτταρικού μικροβιακού λίπους(TL) και Ολικού Ξηρού Βάρους-Βιομάζα (TDW) κατά την ασυνεχή & ημισυνεχή υγρή καλλιέργεια του ζυμομύκητα *Rhodosporidium toruloides* σε υδρόλυμα Άνθους Ορύζης με αρχική συγκέντρωση γλυκόζης 55.76 g/L και ελεύθερου αζώτου (αμινοξέων & πεπτιδίων) FAN 397.52 mg/L. Η ζύμωση έγινε σε αναδευόμενο βιοαντιδραστήρα ενεργού όγκου 1.5 L, με θερμοκρασία 28 °C, ρυθμιζόμενο pH 6.0 ± 0.2 , 20% διαλυτό οξυγόνο(DO%) και ανάδευση αυτόματα ρυθμιζόμενη με βάση το DO %. Τα πειραματικά δεδομένα του γραφήματος είναι διαθέσιμα στο **πίνακα Π.5.4.** του παραρτήματος.

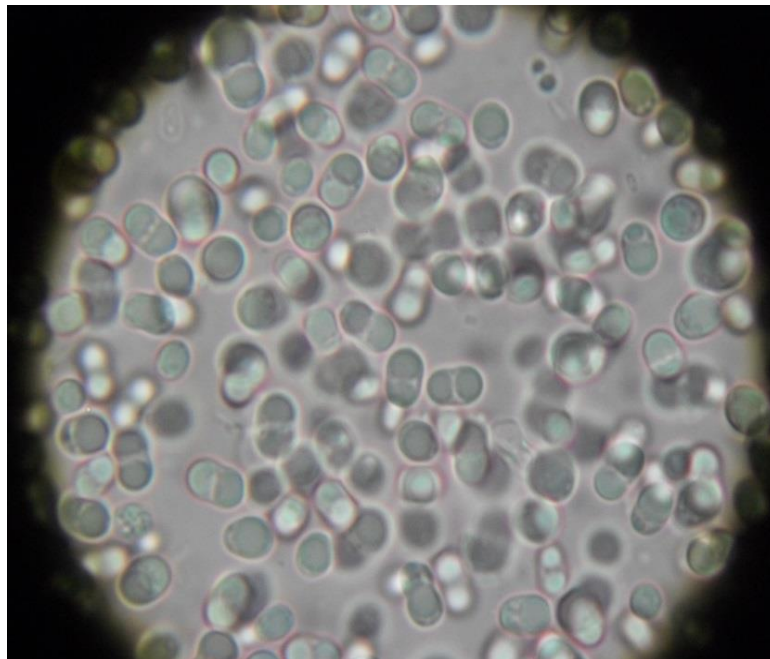
Από το άνω γράφημα 16., βλέπουμε ότι στις πρώτες 8.5 h κατά την ασυνεχή καλλιέργεια έχουμε μείωση του διαλυτού οξυγόνου(DO%) ως 0.9% και μέχρι τις 16.5 h παραμένει σε πολύ χαμηλά επίπεδα. Ενώ, μετά τις 16.5 h κατά την ημισυνεχή καλλιέργεια είδαμε ότι οι τιμές του διαλυτού οξυγόνου κινήθηκαν μέσα σε ένα εύρος τιμών $8.3 \pm 3.3\%$ DO. Η αρχική έντονη μείωση του διαλυτού οξυγόνου οφείλεται στις υψηλές μεταβολικές ανάγκες των κυττάρων κατά την ανάπτυξή τους. Ενώ, με την μετάβαση των κυττάρων στην φάση

λιποσυσσώρευσης, τα κύτταρα είχαν μικρότερες απαιτήσεις σε οξυγόνο, οπότε είδαμε μια μικρή αύξηση στα επίπεδα του διαθέσιμου διαλυτού οξυγόνου στην καλλιέργεια.

Στην ημισυνεχή καλλιέργεια στις 31.15 h είχαμε συγκέντρωση μικροβιακών λιπιδίων 3.36 g/L TL, ενώ στις 168 h καλλιέργειας πετύχαμε 30.6 g/L TL. Η μέση ταχύτητα παραγωγής μικροβιακού λίπους ανά μονάδα όγκου (r_p''') από την ημισυνεχή καλλιέργεια, υπολογίστηκε από τα δεδομένα που αναφέραμε σε 0,199 g/(L h).

Ο συντελεστής απόδοσης παραγόμενου λίπους (TL) ανά μονάδα παραγόμενης βιομάζας (TDW), συμβολίζεται με $Y_{L/X}$ και στις 168 h πήρε μέγιστη τιμή και ίση με 0.523 g/g. Η τιμή αυτή εκφράζει ότι στις 168 h η περιεκτικότητα των κυττάρων της ζύμης σε λίπος ήταν 52%. Ο συντελεστής απόδοσης παραγόμενου λίπους (TL) ανά μονάδα καταναλισκόμενης γλυκόζης (Glucose), συμβολίζεται με $Y_{L/S}$ και για την ημισυνεχή καλλιέργεια υπολογίστηκε σε 0.230 g/g.

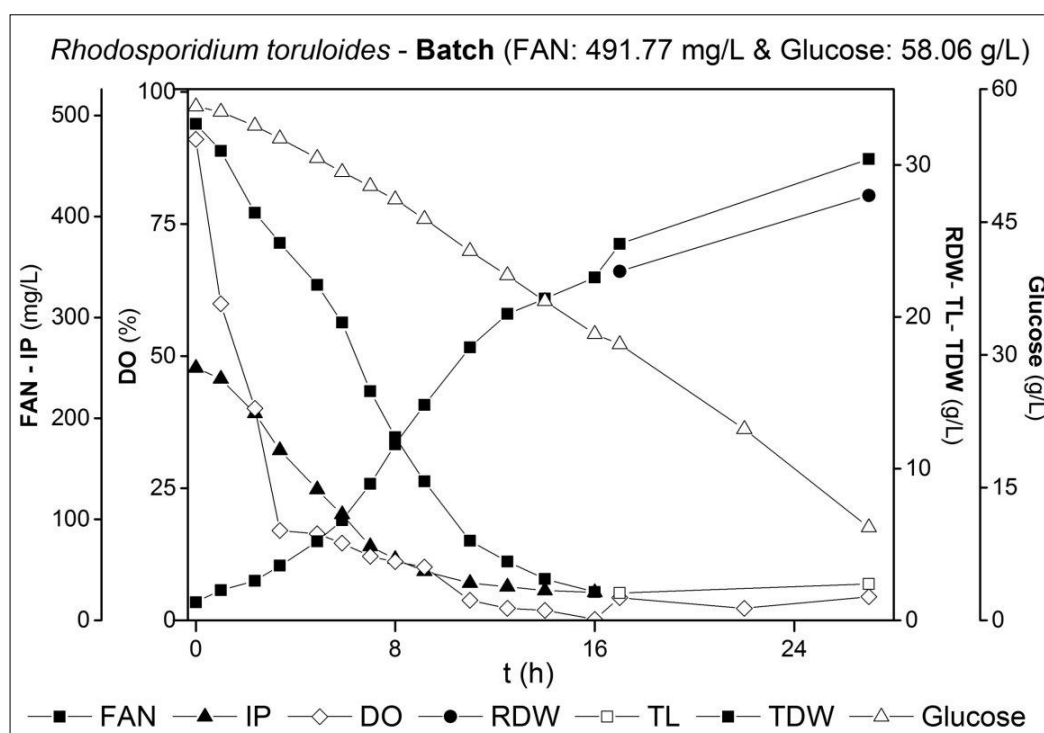
Κατά την ημισυνεχή καλλιέργεια πετύχαμε μέγιστη συγκέντρωση ολικού ξηρού βάρους (TDW) 58.50 g/L, ενώ η συγκέντρωση ξηρού βάρους άνευ λίπους (Residual Dry Weight, RDW) εμφανίζει σχεδόν σταθερή τιμή 23.86 ± 2.36 g/L μέχρι τις 168 h. Αναλυτικότερα, στις 31.15 h είχαμε 20.64 g/L RDW, ενώ στις 168 h είδαμε μέγιστη συγκέντρωση RDW ήταν 27.9 g/L. Στην ακόλουθη εικόνα 21. παρουσιάζονται τα κύτταρα του ζυμομύκητα για την παρούσα καλλιέργεια κατά τις 168 h με την μέγιστη συγκέντρωση λίπους 30.6 g/L.



Εικόνα. 22 Μικροσκοπικό παρασκεύασμα κύτταρων ζυμομύκητα *Rhodosporidium toruloides*, μετά από 168 h καλλιέργειας με βιοαντιδραστήρα, σε Υδρόλυμα Άνθους Ορύζης προς παραγωγή μικροβιακού λίπους (TL) - 3^ο Πείραμα Ημισυνεχούς Καλλιέργειας, μέγιστη συγκέντρωση TL 30.6 g/L (Πηγή: Φωτογράφιση από το συγγραφέα, Εργ. Μικροβιολογίας & Βιοτεχνολογίας Τροφίμων, Γ.Π.Α.)

3.2.7. 4^ο ΠΕΙΡΑΜΑ- ΑΣΥΝΕΧΗΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ

Τα κύτταρα της ζύμης *Rhodosporidium toruloides* αναπτύχθηκαν σε ασυνεχή (Batch) καλλιέργεια, σε θρεπτικό μέσο (υδρόλυμα Άνθους Ορύζης) με αρχική συγκέντρωση γλυκόζης 58.06 g/L και ελεύθερου αζώτου (αμινοξέων & πεπτιδίων) FAN 491.77 mg/L. Η καλλιέργεια έλαβε χώρα σε αναδευόμενο βιοαντιδραστήρα ενεργού όγκου 1.5 L, θερμοκρασία 28 °C, ρυθμιζόμενο pH 6.0 ± 02, 20% διαλυτό οξυγόνο (DO%) και ανάδευση αυτόματα ρυθμιζόμενη με βάση το DO %, με βάση την μεθοδολογία που αναλύσαμε στην παράγραφο 2.3 «Ζύμωση Υγρής Φάσης». Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο ακόλουθο διάγραμμα 17.



Γράφημα 17. Κινητική συγκεντρώσεων Ελεύθερου Αζώτου Αμινοξέων & Πεπτιδίων (FAN), Ανόργανου Φωσφόρου (IP), διαλυτού οξυγόνου (DO), Ολικού Ξηρού Βάρους άνευ Λίπους (RDW), Ολικού ενδοκυτταρικού μικροβιακού λίπους (TL), Ολικού Ξηρού Βάρους-Βιομάζα (TDW) και Γλυκόζης (Glucose) κατά την ασυνεχούς υγρή καλλιέργεια του ζυμομύκητα *Rhodosporidium toruloides* σε υδρόλυμα Άνθους Ορύζης με αρχική συγκέντρωση γλυκόζης 58.06 g/L και ελεύθερου αζώτου (αμινοξέων & πεπτιδίων) FAN 491.77 mg/L. Η ζύμωση έγινε σε αναδευόμενο βιοαντιδραστήρα ενεργού όγκου 1.5 L, με θερμοκρασία 28 °C, ρυθμιζόμενο pH 6.0 ± 02, 20% διαλυτό οξυγόνο (DO%) και ανάδευση αυτόματα ρυθμιζόμενη με βάση το DO %. Τα πειραματικά δεδομένα του γραφήματος είναι διαθέσιμα στο **πίνακα Π.5.5.** του παραρτήματος.

Στηριζόμενοι στο άνω γράφημα 17. αρχικά παρατηρούμε μια απότομη μείωση του διαλυτού οξυγόνου (DO %), ενώ εν συνεχεία βλέπουμε ότι βαίνει μειούμενο μέχρι εξάντλησης του. Ειδικότερα, από 91% DO στο μηδενικό σημείο (0 h) μειώθηκε σε 17.0 % μετά από 3.37 h και ακολούθως εξαντλήθηκε ως 0.2% μέχρι τις 16 h της ασυνεχούς καλλιέργειας. Έπειτα, είδαμε μια μικρή αύξηση του διαλυτού οξυγόνου (DO %) και σταθεροποίηση αυτού σε ένα εύρος τιμών 3.70±1.22 ως τις 27 h της καλλιέργειας.

Κατά τις πρώτες 2 h δεν καταγράψαμε σημαντική μεταβολή στην συγκέντρωση του ανόργανου φωσφόρου (IP), εν συνεχεία η συγκέντρωση IP παρουσιάζει έντονο ρυθμό ελάττωσης μέχρι τις 8 h και ακολούθως καταναλώνεται βραδύτερα μέχρι που σταθεροποιείται. Πιο αναλυτικά, αρχικά καταγράψαμε συγκέντρωση 250.12 mg/L IP, ενώ μέχρι τις 2 h η συγκέντρωση IP παρέμεινε σχεδόν σταθερή σε 239.22 mg/L IP. Ακολούθως, η συγκέντρωση IP ελαττώνεται με σταθερό ρυθμό ως τις 8 h όπου λαμβάνει τιμή 60.73 mg/L IP. Εν κατακλείδι, μέχρι τις 16 h η συγκέντρωση ανόργανου φωσφόρου (IP), στο θρεπτικό μέσο της καλλιέργειας σταθεροποιήθηκε στα 27.65 mg/L IP.

Η συγκέντρωση του FAN στην καλλιέργεια μας βαίνει μειούμενη από την αρχή ως τις 11h και ακολούθως σταθεροποιείται. Συγκεκριμένα, αρχικά προσδιορίσαμε συγκέντρωση 491.77 mg/L FAN και ως τις 11 h είδαμε μείωση σε 78.82 mg/L FAN. Ενώ, μέχρι τις 16 h η συγκέντρωση του FAN ελαττώθηκε με βραδύ ρυθμό ως τα 27.93 mg/L FAN.

Το Ολικό Ξηρό Βάρος (TDW) στην καλλιέργεια μας για την πρώτη ώρα δεν ξεπέρασε τα 2 g/L, λόγω της λανθάνουσας φάσης ανάπτυξης των κυττάρων. Ακολούθως, η συγκέντρωση TDW καταγράφει μια απότομη αύξηση μέχρι τις 8 h με τιμή 11.6 g/L, η οποία αποδίδεται στην εκθετική φάση ανάπτυξης. Έπειτα, η συγκέντρωση TDW αυξάνει με μικρότερο ρυθμό μέχρι τις 11 h όπου προσδιορίσαμε TDW 18 g/L, πιθανότατα λόγω εισόδου των κυττάρων στην επιβραδυνόμενη φάση ανάπτυξης. Μετά τις 11 h η συγκέντρωση TDW βαίνει αυξανόμενη ελάχιστα μέχρι τις 16 h, όπου είδαμε TDW 22.6 g/L. Η συγκεκριμένη αύξηση με βραδύτερο ρυθμό πιθανότατα να σηματοδοτεί την είσοδο των κυττάρων στην στάσιμη φάση ανάπτυξης.

Στην συγκεκριμένη ασυνεχή καλλιέργεια καταγράψαμε ενδοκυτταρικό μικροβιακό λίπος(TL) στις 17 h με συγκέντρωση 1.8 g/L, ενώ στις 27 h είδαμε 2.4 g/L. Το μέγιστο ξηρό βάρος άνευ λίπους (RDW) στην παρούσα καλλιέργεια προσδιορίστηκε στα 28 g/L και αντίστοιχα η μέγιστη συγκέντρωση βιομάζας(TDW) 30.4 g/L στις 27 h. Στηριζόμενοι στα δεδομένα του πίνακα Π.5.5. του παραρτήματος, υπολογίσαμε τον συνολικό συντελεστή απόδοσης βιομάζας ως τις 27 h $Y_{x/s} = 0.870$ g/g, ο οποίος εκφράζει την μέση παραγόμενη βιομάζα ανά μονάδα υποστρώματος (γλυκόζης) (g/g) για την ασυνεχή καλλιέργεια.

Η μικροβιακή ανάπτυξη των κυττάρων εκτιμούμε ότι οδήγησε σε έντονη μείωση του διαλυτού οξυγόνου (DO%) και ελάττωση της συγκέντρωσης IP ως τις 8 h με βάση το άνω γράφημα 17. Παρόλα αυτά πρέπει να αναφέρουμε ότι η μείωση στην συγκέντρωση του FAN δεν ήταν τόσο έντονη όσο στην συγκέντρωση IP, ίσως λόγω διαφορετικών απαιτήσεων κορεσμού και αρχικών συγκεντρώσεων. Ενώ, η συγκέντρωση γλυκόζης μας έδειξε μικρότερους ρυθμούς κατανάλωσης σε όλη την διάρκεια της καλλιέργειας.

Εκ των άνω παρατηρήσεων και εστιάζοντας στο γράφημα 17. θεωρούμε ότι τα χαμηλά επίπεδα διαλυτού οξυγόνου (DO) και συγκέντρωσης IP στις 8 h πιθανότατα οδηγούν στην διακοπή της εκθετικής φάσης ανάπτυξης των κυττάρων. Λόγω, μη κορεσμού των μεταβολικών απαιτήσεων των κυττάρων σε DO & IP για την εκθετική φάση. Αντιθέτως η συγκέντρωση του FAN μέχρι τις 8 h ήταν 181.37 mg/L με βάση το γράφημα 17, γεγονός που μας υποδεικνύει ότι η συγκέντρωση του FAN δεν ευθύνεται για την διακοπή της εκθετικής φάσης ανάπτυξης των κυττάρων.

Για το λόγο αυτό το διαλυτό οξυγόνο (DO%) και ο ανόργανος φώσφορος (IP) πιθανότατα αποτελούν κύριους περιοριστικούς παράγοντες για την μικροβιακή αύξηση στην συγκεκριμένη καλλιέργεια.

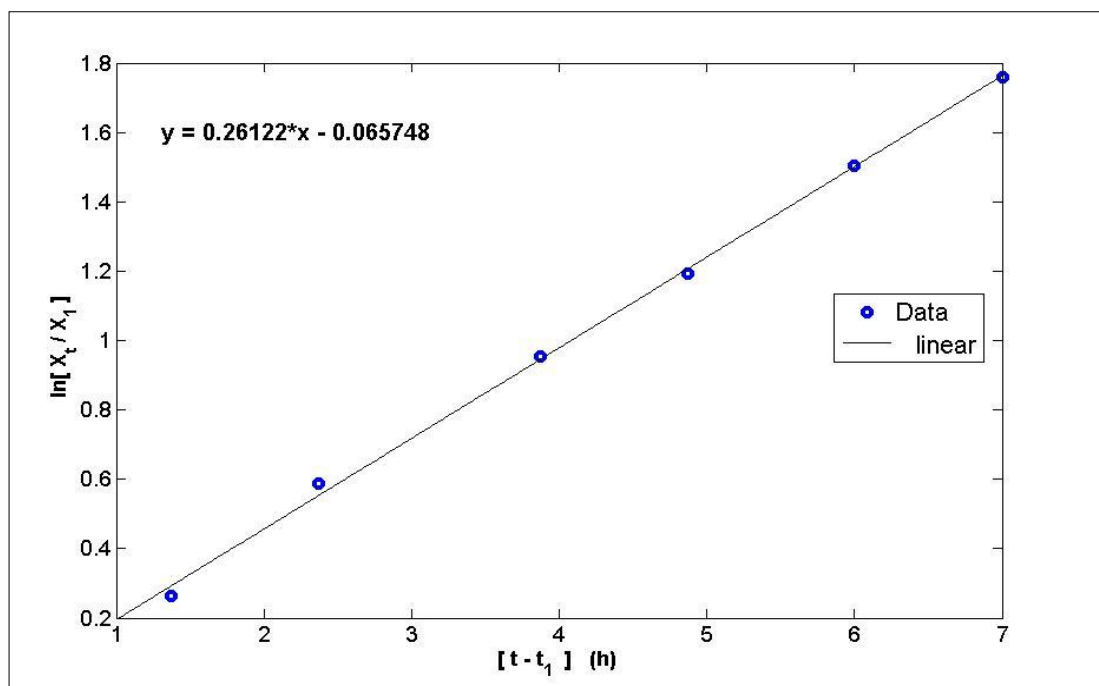
Στηριζόμενοι στο γράφημα 17. , εκτιμήσαμε ότι τα κύτταρα εισέρχονται στην εκθετική φάση μετά την 1 h και αναπτύσσονται εκθετικά ως τις 8 h. Στην εκθετική φάση, η ανάπτυξη των κυττάρων δύναται να χαρακτηριστεί σχεδόν γραμμική. Γεγονός που μας επιτρέπει να χρησιμοποιήσουμε τους ακόλουθους τύπους (9), (10) & (11)(Stanbury et al., 1995; Mosier and Ladisch, 2009) για το γραφικό προσδιορισμό του μέγιστου ειδικού ρυθμού αύξησης κυττάρων (μ_{max}) στο κάτωθι διάγραμμα 18., όπως ήδη αναφέραμε & αναλύσαμε στην παράγραφο 3.2.1. :

$$\frac{dX}{dt} = \mu X \quad (9)$$

$$\ln X(t) = \ln X(o) + \mu t \quad (10)$$

$$\frac{\ln[X(t)/(X(o))]}{t} = \mu \quad (11)$$

Όπου, X : συγκέντρωση της βιομάζας(TDW) σε g/L , t : χρόνος ανάπτυξης των κυττάρων σε h,
 μ : ειδικός ρυθμός αύξησης των κυττάρων σε h^{-1} , $X_{(t)}$: συγκέντρωση βιομάζας σε g/L,
 $X_{(o)}$: αρχική συγκέντρωση βιομάζας σε g/L

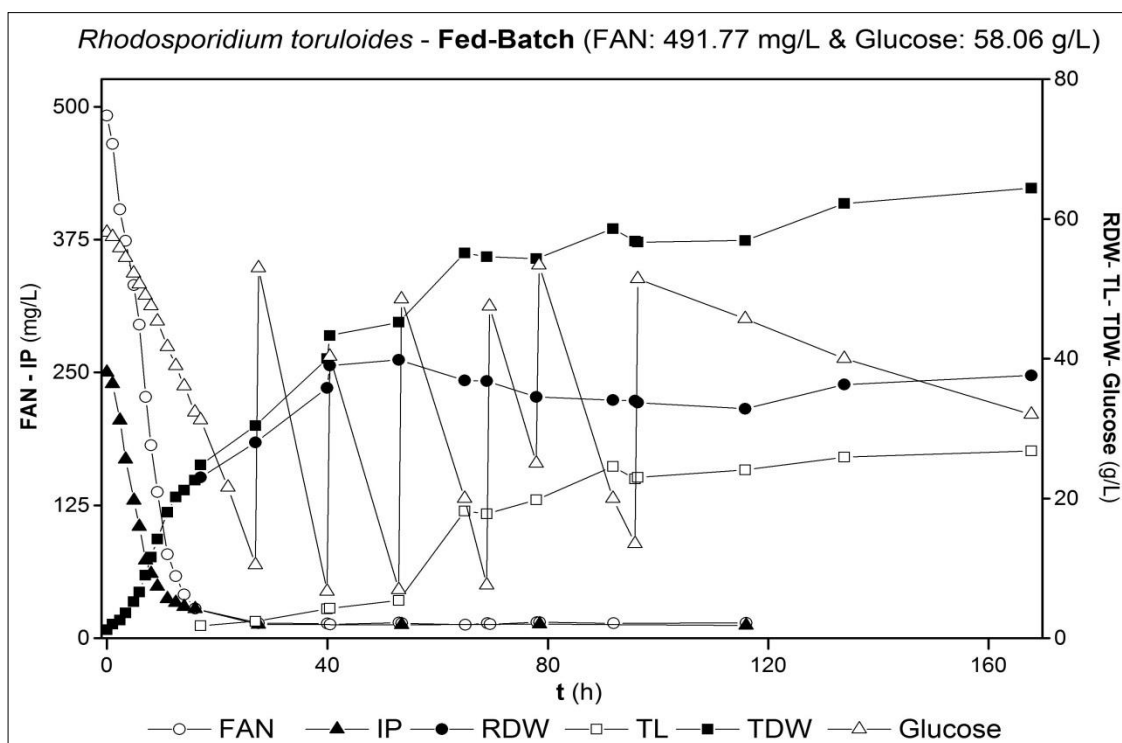


Γράφημα 18. Υπολογισμός μ_{max} (μέγιστου ειδικού ρυθμού αύξησης κυττάρων) κατά την εκθετική φάση της ασυνεχούς υγρής καλλιέργεια του ζυμομύκητα *Rhodosporidium toruloides* σε υδρόλυμα Άνθους Ορύζης με αρχική συγκέντρωση γλυκόζης 58.06 g/L και ελεύθερου αζώτου (αμινοξέων & πεπτιδίων) FAN 491.77 mg/L. Από το γράφημα 17. εκτιμούμε ότι μετά την 1 h αρχίζει η ανάπτυξη, θεωρούμε το σημείο 1 h ως βάση και υποθέτουμε εκθετική αύξηση στα σημεία 2.37 h, 3.37 h, 4.87 h, 5.87 h, 7.0 h και 8.0 h. Γραφικά υπολογίσαμε το $\mu_{max} \approx 0,261 h^{-1}$ με βάση τον άνω τύπο (11).

3.2.8. 4^ο ΠΕΙΡΑΜΑ- ΗΜΙΣΥΝΕΧΗΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ

Τα κύτταρα του *Rhodosporidium toruloides* αναπτύχθηκαν σε ημισυνεχή τροφοδοτούμενη καλλιέργεια(Fed- Batch), μετά την ασυνεχή(Batch) καλλιέργεια τους στο υδρόλυμα Άνθους Ορύζης με αρχική συγκέντρωση γλυκόζης 58.06 g/L & ελεύθερου αζώτου (αμινοξέων & πεπτιδίων) FAN 491.77 mg/L, όπως αναλύσαμε στην προηγούμενη παράγραφο 3.2.7.

Για την ημισυνεχή τροφοδοτούμενη καλλιέργεια ως προσθήκη υποστρώματος (Τεχνική Fed) χρησιμοποιήθηκε προσθήκη εμπορικής γλυκόζης (καθαρότητας 95%). Όλη η μεθοδολογία δίδεται λεπτομερώς στην παράγραφο 2.3 «Ζύμωση Υγρής Φάσης». Τα αποτελέσματα της καλλιέργειας παρουσιάζονται στα κάτωθι γραφήματα 19. & 20., ενώ τα δεδομένα είναι διαθέσιμα στο πίνακα Π.5.5. του παραρτήματος.

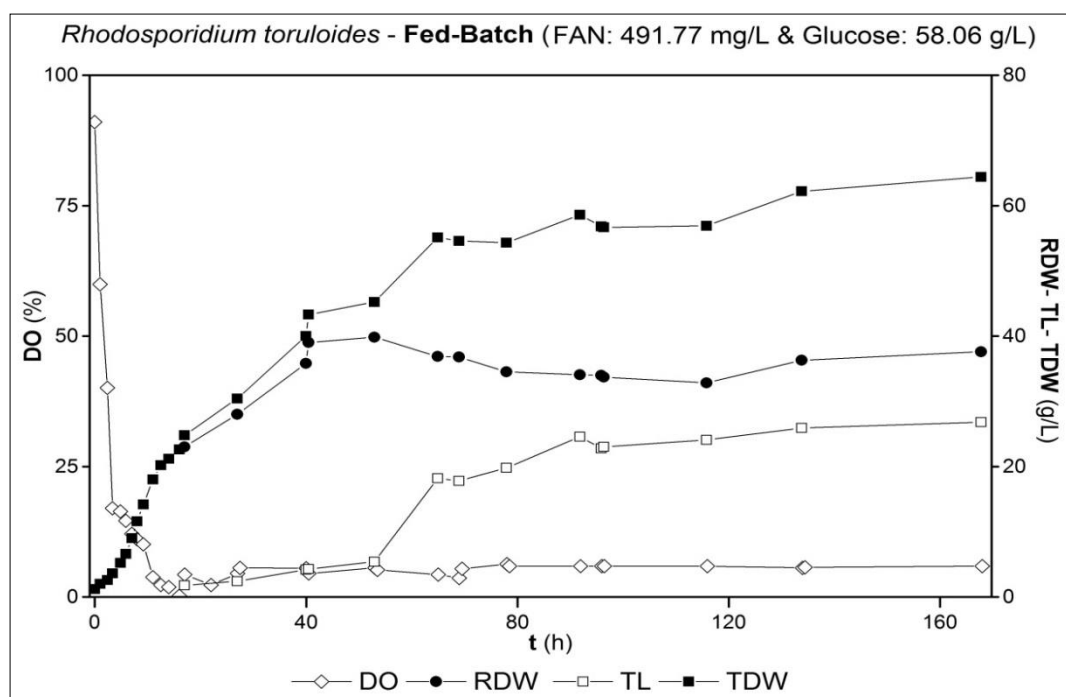


Γράφημα 19. Κινητική συγκεντρώσεων Ελεύθερου Αζώτου Αμινοξέων & Πεπτιδίων(FAN), Ανόργανου Φωσφόρου(IP), Ολικού Ξηρού Βάρους άνευ Λίπους(RDW), Ολικού ενδοκυτταρικού μικροβιακού λίπους(TL), Ολικού Ξηρού Βάρους-Βιομάζα (TDW) και Γλυκόζης(Glucose) κατά την ασυνεχή & ημισυνεχή υγρή καλλιέργεια του ζυμομύκητα *Rhodosporidium toruloides* σε υδρόλυμα Άνθους Ορύζης με αρχική συγκέντρωση γλυκόζης 58.06 g/L και ελεύθερου αζώτου (αμινοξέων & πεπτιδίων) FAN 491.77 mg/L. Η ζύμωση έγινε σε αναδεδυμένο βιοαντιδραστήρα ενεργού όγκου 1.5 L, με θερμοκρασία 28 °C, ρυθμιζόμενο pH 6.0 ± 02, 20% διαλυτό οξυγόνο(DO%) και ανάδευση αυτόματα ρυθμιζόμενη με βάση το DO %. Τα πειραματικά δεδομένα του γραφήματος είναι διαθέσιμα στο **πίνακα Π.5.5.** του παραρτήματος.

Η συγκέντρωση της γλυκόζης κατά την ημισυνεχή καλλιέργεια κινείται σε ένα εύρος τιμών από 53.4 g/L ως 6.7 g/L με βάση το άνω γράφημα 19. Οι συγκεντρώσεις του ανόργανου φώσφορου(IP) και του ελεύθερου αζώτου αμινοξέων & πεπτιδίων (FAN) κατά την ημισυνεχή καλλιέργεια παρέμειναν σχεδόν αμετάβλητες και σε χαμηλά επίπεδα. Αναλυτικά, κατά την διάρκεια της ημισυνεχούς καλλιέργειας προσδιορίσαμε 12.75±0.52 mg/L FAN και 14.01±0.76

mg/L IP. Επίσης, στις 17 h προσδιορίσαμε παραγωγή ενδοκυτταρικού μικροβιακού λίπους (TL), ενώ ακόμη βρισκόμαστε στην ασυνεχή καλλιέργεια. Πιο συγκεκριμένα, στις 17 h καταγράψαμε 1.8 g/L μικροβιακού λίπους (TL) και συγκέντρωση γλυκόζης 31.2 g/L. Ενώ στις 16 h είχαμε προσδιορίσει 27.93 mg/L FAN, 27.65 mg/L IP.

Από τις άνω παρατηρήσεις βλέπουμε ότι η σύνθεση μικροβιακών λιπιδίων στην συγκεκριμένη ημισυνεχή καλλιέργεια αρχεται με τον περιορισμό του αζώτου & Φωσφόρου στο θρεπτικό μέσο της καλλιέργειας. Σύμφωνα με την βιβλιογραφία (Ratledge, 1988;2004;Papanikolaou et al., 2002; 2007; Αγγελής, 2007; Ageitos et al., 2011;Papanikolaou and Aggelis, 2011;Wu et al., 2011).



Γράφημα 20. Κινητική συγκεντρώσεων Διαλυτού οξυγόνου(DO), Ολικού Ξηρού Βάρους άνευ Λίπους(RDW), Ολικού ενδοκυτταρικού μικροβιακού λίπους(TL) και Ολικού Ξηρού Βάρους-Βιομάζα (TDW) κατά την ασυνεχή & ημισυνεχή υγρή καλλιέργεια του ζυμομύκητα *Rhodosporidium toruloides* σε υδρόλυμα Άνθους Ορύζης με αρχική συγκέντρωση γλυκόζης 58.06 g/L και ελεύθερου αζώτου (αμινοξέων & πεπτιδίων) FAN 491.77 mg/L. Η ζύμωση έγινε σε αναδεδυμένο βιοαντιδραστήρα ενεργού όγκου 1.5 L, με θερμοκρασία 28 °C, ρυθμιζόμενο pH 6.0 ± 0.2, 20% διαλυτό οξυγόνο(DO%) και ανάδευση αυτόματα ρυθμιζόμενη με βάση το DO %. Τα πειραματικά δεδομένα του γραφήματος είναι διαθέσιμα στο **πίνακα Π.5.5.** του παραρτήματος.

Από το άνω γράφημα 20., βλέπουμε ότι στις πρώτες 3.37 h κατά την ασυνεχή καλλιέργεια έχουμε μείωση του διαλυτού οξυγόνου(DO%) ως 17% και εξάντληση των επιπέδων αυτού σε 0.2% DO μέχρι τις 16 h. Εν συνεχεία, στις 17 h είδαμε μια αύξηση των επιπέδων του διαλυτού οξυγόνου και σταθεροποίηση αυτού σε ένα εύρος τιμών τιμές 5.2±1.0% DO.

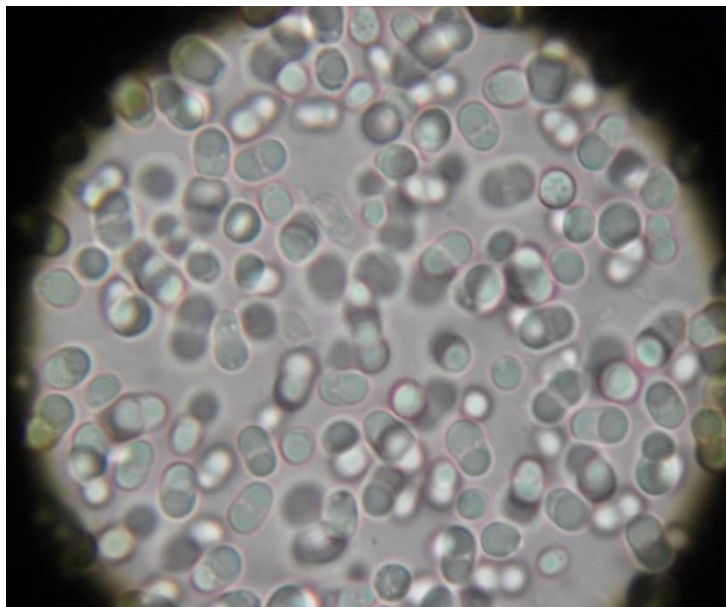
Η αρχική έντονη μείωση του διαλυτού οξυγόνου οφείλεται στις υψηλές μεταβολικές ανάγκες των κυττάρων κατά την μικροβιακή ανάπτυξής τους. Ενώ, με την μετάβαση των κυττάρων στην φάση λιποσυσσώρευσης, τα κύτταρα έχουν μικρότερες απαιτήσεις σε οξυγόνο, έτσι καταγράψαμε μια μικρή αύξηση στα επίπεδα του διαθέσιμου διαλυτού οξυγόνου στην καλλιέργεια.

Στην ημισυνεχή καλλιέργεια στις 40 h είχαμε συγκέντρωση 4.2 g/L TL, ενώ στις 168 h καλλιέργειας πετύχαμε 26.8 g/L TL. Η μέση ταχύτητα παραγωγής μικροβιακού λίπους ανά μονάδα όγκου (r_p''') από την ημισυνεχή καλλιέργεια, υπολογίστηκε από τα δεδομένα που αναφέραμε σε 0.176 g/(L h).

Ο συντελεστής απόδοσης παραγόμενου λίπους (TL) ανά μονάδα παραγόμενης βιομάζας (TDW), συμβολίζεται με $Y_{L/X}$ και στις 168 h πήρε μέγιστη τιμή και ίση με 0.416 g/g. Η τιμή αυτή εκφράζει ότι στις 168 h η περιεκτικότητα των κυττάρων της ζύμης σε λίπος ήταν 42 % (w/w). Ο συντελεστής απόδοσης παραγόμενου λίπους (TL) ανά μονάδα καταναλισκόμενης γλυκόζης (Glucose), συμβολίζεται με $Y_{L/S}$ και για την ημισυνεχή καλλιέργεια υπολογίστηκε σε 0.230 g/g.

Στην ακόλουθη εικόνα 23. απεικονίζονται τα κύτταρα του ζυμομύκητα για την παρούσα καλλιέργεια κατά τις 168 h με την μέγιστη συγκέντρωση λίπους 26.8 g/L.

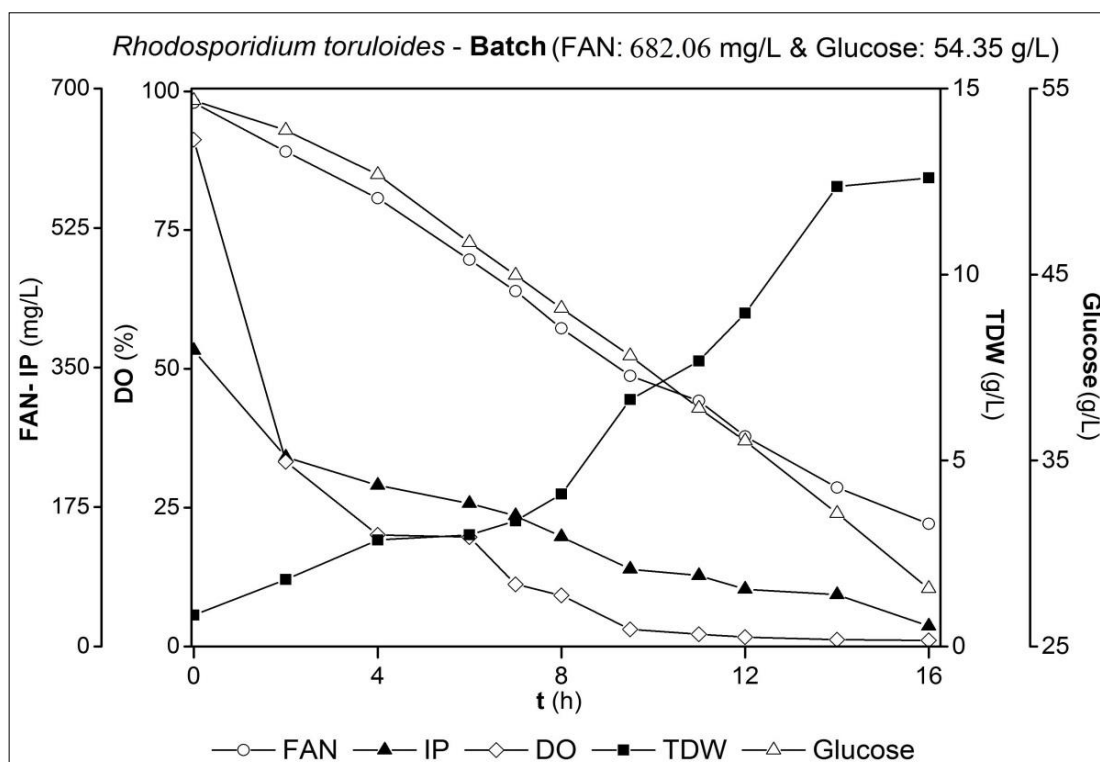
Κατά την ημισυνεχή καλλιέργεια πετύχαμε μέγιστη συγκέντρωση ολικού ξηρού βάρους (TDW) 64.4 g/L, ενώ η συγκέντρωση ξηρού βάρους άνευ λίπους (Residual Dry Weight, RDW) καθόλη την ημισυνεχή καλλιέργεια κινήθηκε σε ένα εύρος τιμών 35.94 ± 2.20 g/L. Αναλυτικότερα, στις 40 h προσδιορίσαμε 35.8 g/L RDW, ενώ στις 168 h είδαμε μέγιστη συγκέντρωση RDW ήταν 37.6 g/L.



Εικόνα. 23 Μικροσκοπικό παρασκεύασμα κύτταρων ζυμομύκητα *Rhodosporidium toruloides*, μετά από 168 h καλλιέργειας με βιοαντιδραστήρα, σε Υδρόλυμα Άνθους Ορύζης προς παραγωγή μικροβιακού λίπους (TL) - 4^ο Πείραμα Ημισυνεχούς Καλλιέργειας, μέγιστη συγκέντρωση TL 26.8 g/L (Πηγή: Φωτογράφιση από το συγγραφέα, Εργ. Μικροβιολογίας & Βιοτεχνολογίας Τροφίμων, Γ.Π.Α.)

3.2.9. 5^ο ΠΕΙΡΑΜΑ- ΑΣΥΝΕΧΗΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ

Τα κύτταρα της ζύμης *Rhodosporidium toruloides* αναπτύχθηκαν σε ασυνεχή (Batch) καλλιέργεια, σε θρεπτικό μέσο (υδρόλυμα Άνθους Ορύζης) με αρχική συγκέντρωση γλυκόζης 54.35 g/L και ελεύθερου αζώτου (αμινοξέων & πεπτιδίων) FAN 682.06 mg/L. Η καλλιέργεια έλαβε χώρα σε αναδευόμενο βιοαντιδραστήρα ενεργού όγκου 1.5 L, θερμοκρασία 28 °C, ρυθμιζόμενο pH 6.0 ± 0.2, 20% διαλυτό οξυγόνο (DO%) και ανάδευση αυτόματα ρυθμιζόμενη με βάση το DO %, με βάση την μεθοδολογία που αναλύσαμε στην παράγραφο 2.3 «Ζύμωση Υγρής Φάσης». Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο ακόλουθο διάγραμμα 21.



Γράφημα 21. Κινητική συγκεντρώσεων Ελεύθερου Αζώτου Αμινοξέων & Πεπτιδίων (FAN), Ανόργανου Φωσφόρου (IP), διαλυτού οξυγόνου (DO), Ολικού Ξηρού Βάρους-Βιομάζα (TDW) και Γλυκόζης (Glucose) κατά την ασυνεχώς υγρή καλλιέργεια του ζυμομύκητα *Rhodosporidium toruloides* σε υδρόλυμα Άνθους Ορύζης με αρχική συγκέντρωση γλυκόζης 54.35 g/L και ελεύθερου αζώτου (αμινοξέων & πεπτιδίων) FAN 682.06 mg/L. Η ζύμωση έγινε σε αναδευόμενο βιοαντιδραστήρα ενεργού όγκου 1.5 L, με θερμοκρασία 28 °C, ρυθμιζόμενο pH 6.0 ± 0.2, 20% διαλυτό οξυγόνο (DO%) και ανάδευση αυτόματα ρυθμιζόμενη με βάση το DO %. Τα πειραματικά δεδομένα του γραφήματος είναι διαθέσιμα στο **πίνακα Π.5.6.** του παραρτήματος.

Με βάση το άνω γράφημα 21. παρατηρούμε μια έντονη μείωση του διαλυτού οξυγόνου (DO%) από 91.3% στο μηδενικό σημείο σε 20.1% ως τις 4 h. Εν συνέχεια για τις επόμενες 2 h είδαμε μια σταθεροποίηση του DO σε 19.7 %. Μετά τις 6 h, καταγράψαμε σταδιακή μείωση των επιπέδων του διαλυτού οξυγόνου της καλλιέργειας μέχρι τις 12 h με τιμή 1.7%. Μετά τις 12 h τα επίπεδα του διαλυτού οξυγόνου σταθεροποιήθηκαν σε τιμές 1.3±0.3 %.

Κατά τις πρώτες 2 h καταγράψαμε έντονη μείωση στην συγκέντρωση του ανόργανου φωσφόρου (IP), αρχικά προσδιορίσαμε 371 mg/L IP ενώ στις 2 h είδαμε 237.44 mg/L IP. Μετά τις 2 h είδαμε κατανάλωση ανόργανου φωσφορού με ήπιο ρυθμό ως τις 7 h με τιμή 164.24 mg/L IP. Εν συνεχεία, παρατηρήσαμε αυξημένο ρυθμό ελάττωσης IP μέχρι τις 9.5 h με συγκέντρωση 96.89 mg/L IP. Ακολούθως, η συγκέντρωση ανόργανου φωσφόρου στην καλλιέργεια μας μειώνεται σταδιακά μέχρι τις 16 h σε 25.71 mg/L IP.

Η συγκέντρωση του FAN κατά τις πρώτες 4 h παρουσίασε ομαλό ρυθμό κατανάλωσης, συγκεκριμένα αρχικά προσδιορίσαμε 682.06 mg/L και ως στις 4 h είδαμε 562.51 mg/L. Ακολούθως, καταγράψαμε πιο έντονο ρυθμό μείωσης FAN μέχρι τις 16 h όπου πήρε τιμή 153 mg/L FAN.

Ομοίως, βλέπουμε ότι η συγκέντρωση της γλυκόζης καθόλη την καλλιέργεια βαίνει μειούμενη, με σχεδόν σταθερό ρυθμό κατανάλωσης ως τις 16 h. Συγκεκριμένα, στο μηδενικό σημείο προσδιορίσαμε 54.35 g/L γλυκόζης και ως τις 16 h είδαμε 28.11 g/L γλυκόζης. Από την συγκέντρωση της γλυκόζης στις 16 h, οδηγούμαστε στο συμπέρασμα ότι η γλυκόζη πιθανότατα δεν αποτελεί περιοριστικό παράγοντα για την παρούσα ασυνεχή καλλιέργεια.

Το Ολικό Ξηρό Βάρος (TDW) στην καλλιέργεια μας για τις πρώτες 4 h δεν ξεπέρασε τα 2.86 g/L, πιθανότατα λόγω της λανθάνουσας φάσης ανάπτυξης των κυττάρων. Ακολούθως, η συγκέντρωση TDW καταγράφει μια απότομη αύξηση μέχρι τις 14 h με τιμή 12.36 g/L, η οποία αποδίδεται στην εκθετική φάση ανάπτυξης. Έπειτα, η συγκέντρωση TDW αυξάνει με ελάχιστο ρυθμό μέχρι τις 16 h όπου προσδιορίσαμε TDW 12.6 g/L, πιθανότατα λόγω εισόδου των κυττάρων στην στάσιμη φάση ανάπτυξης.

Στηριζόμενοι στα δεδομένα του πίνακα Π.5.6. του παραρτήματος, υπολογίσαμε τον συνολικό συντελεστή απόδοσης βιομάζας ως τις 16 h $Y_{x/s} = 0.449$ g/g, ο οποίος εκφράζει την μέση παραγόμενη βιομάζα ανά μονάδα υποστρώματος (γλυκόζης) (g/g) για την ασυνεχή καλλιέργεια.

Η μικροβιακή ανάπτυξη των κυττάρων εκτιμούμε ότι οδήγησε σε εξάντληση του διαλυτού οξυγόνου (DO%) και ελάττωση της συγκέντρωσης ανόργανου φωσφόρου(IP) ως τις 14 h με βάση το άνω γράφημα 21. Στις 14 h προσδιορίσαμε συγκέντρωση 199.47 mg/L FAN και 32.15 g/L γλυκόζης, γεγονός που πιθανότατα μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η μικροβιακή αύξηση δεν σταμάτησε λόγω χαμηλών επιπέδων FAN ή γλυκόζης. Εκ των άνω και παρατηρώντας προσεκτικά το διάγραμμα 21 εκτιμούμε ότι το διαλυτό οξυγόνο (DO%) και ο ανόργανος φώσφορος (IP) πιθανότατα αποτελούν κύριους περιοριστικούς παράγοντες για την μικροβιακή αύξηση των κυττάρων στην παρούσα καλλιέργεια.

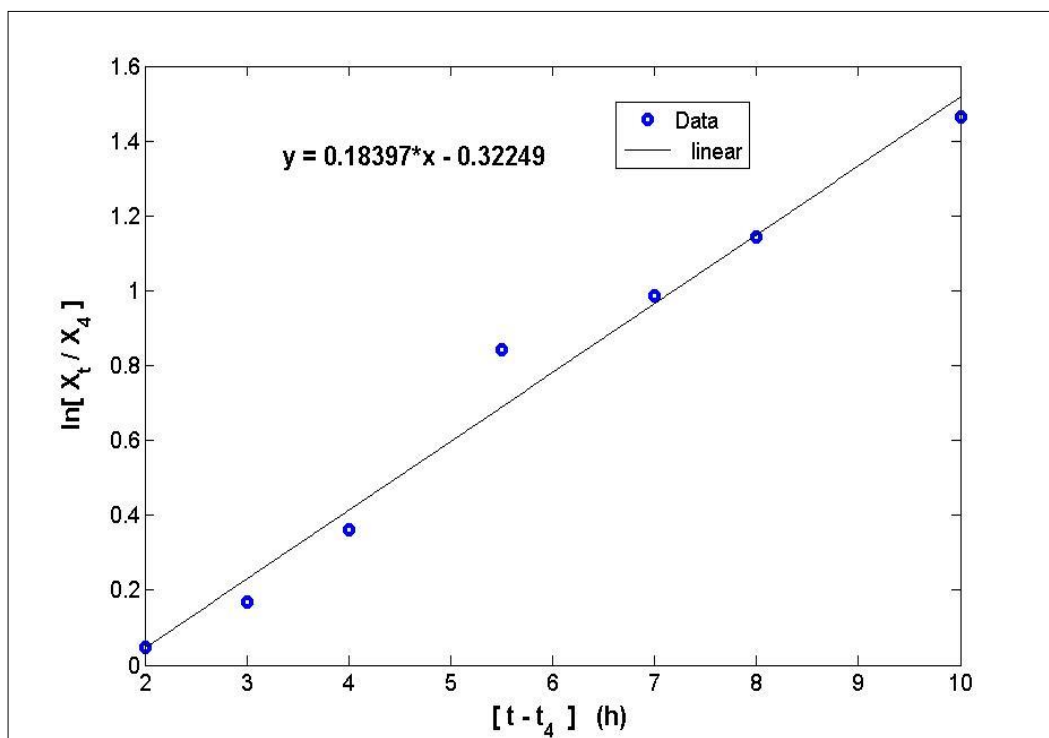
Στηριζόμενοι στο γράφημα 21. , εκτιμήσαμε ότι τα κύτταρα εισέρχονται στην εκθετική φάση μετά τις 4 h και αναπτύσσονται εκθετικά ως τις 14 h. Στην εκθετική φάση, η ανάπτυξη των κυττάρων δύναται να χαρακτηριστεί σχεδόν γραμμική. Γεγονός που μας επιτρέπει να χρησιμοποιήσουμε τους ακόλουθους τύπους (9), (10) & (11)(Stanbury et al., 1995; Mosier and Ladisch, 2009) για το γραφικό προσδιορισμό του μέγιστου ειδικού ρυθμού αύξησης κυττάρων (μ_{max}) στο ακόλουθο διάγραμμα 22., όπως ήδη αναφέραμε & αναλύσαμε στην παράγραφο 3.2.1. :

$$\frac{dX}{dt} = \mu X \quad (9)$$

$$\ln X(t) = \ln X(o) + \mu t \quad (10)$$

$$\frac{\ln[X(t)/X(o)]}{t} = \mu \quad (11)$$

Όπου, X : συγκέντρωση της βιομάζας(TDW) σε g/L , t : χρόνος ανάπτυξης των κυττάρων σε h,
 μ : ειδικός ρυθμός αύξησης των κυττάρων σε h⁻¹, $X_{(t)}$: συγκέντρωση βιομάζας σε g/L,
 $X_{(0)}$: αρχική συγκέντρωση βιομάζας σε g/L

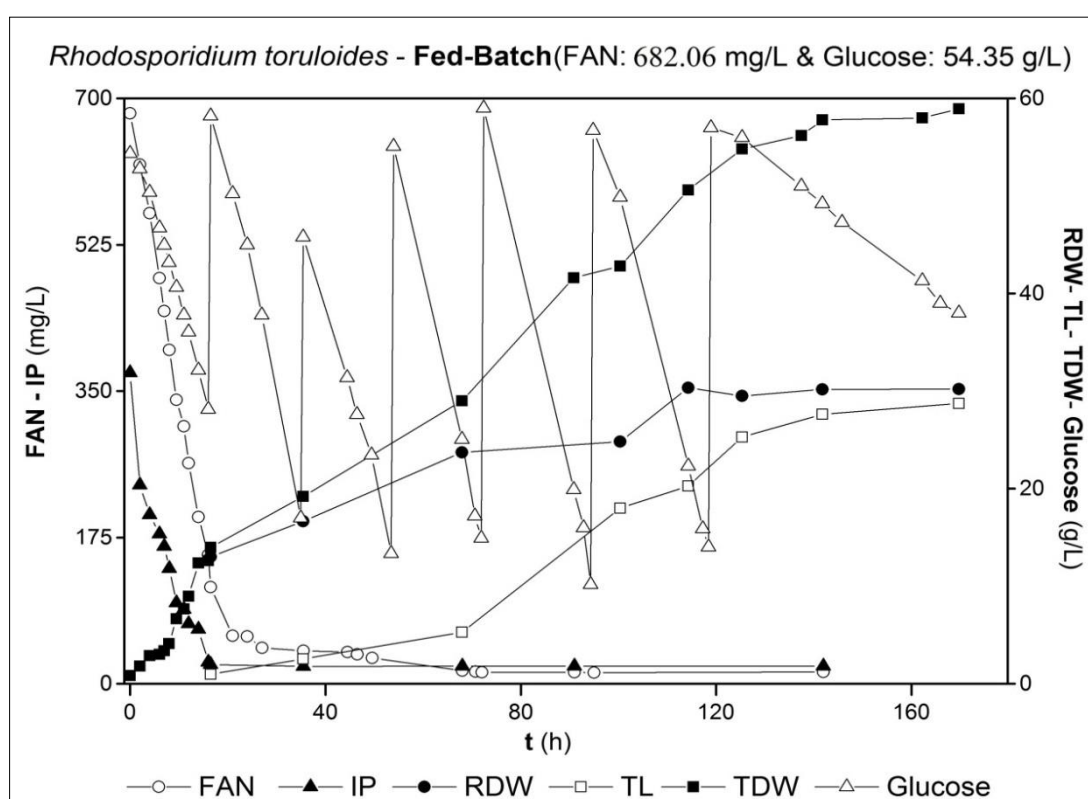


Γράφημα 22. Υπολογισμός μ_{max} (μέγιστου ειδικού ρυθμού αύξησης κυττάρων) κατά την εκθετική φάση της ασυνεχούς υγρής καλλιέργεια του ζυμομύκητα *Rhodospiridium toruloides* σε υδρόλυμα Άνθους Ορύζης με αρχική συγκέντρωση γλυκόζης 54.35 g/L και ελεύθερου αζώτου (αμινοξένων & πεπτιδίων) FAN 682.06 mg/L. Από το γράφημα 21. εκτιμούμε ότι μετά την 4 h αρχίζει η ανάπτυξη, θεωρούμε το σημείο 4 h ως βάση και υποθέτουμε εκθετική αύξηση στα σημεία 6 h, 7 h, 8 h, 9.5 h, 11 h, 12 h και 14 h. Γραφικά υπολογίσαμε το $\mu_{max} \approx 0,184 \text{ h}^{-1}$ με βάση τον άνω τύπο (11).

3.2.10. 5^ο ΠΕΙΡΑΜΑ- ΗΜΙΣΥΝΕΧΗΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ

Τα κύτταρα του *Rhodosporidium toruloides* αναπτύχθηκαν σε ημισυνεχή τροφοδοτούμενη καλλιέργεια(Fed- Batch), μετά την ασυνεχή(Batch) καλλιέργεια τους στο υδρόλυμα Άνθους Ορύζης με αρχική συγκέντρωση γλυκόζης 54.35 g/L & ελεύθερου αζώτου (αμινοξέων & πεπτιδίων) FAN 682.06 mg/L, όπως αναλύσαμε στην προηγούμενη παράγραφο 3.2.9.

Για την ημισυνεχή τροφοδοτούμενη καλλιέργεια ως προσθήκη υποστρώματος (Τεχνική Fed) χρησιμοποιήθηκε προσθήκη εμπορικής γλυκόζης (καθαρότητας 95%). Όλη η μεθοδολογία δίδεται λεπτομερώς στην παράγραφο 2.3 «Ζύμωση Υγρής Φάσης». Τα αποτελέσματα της καλλιέργειας παρουσιάζονται στα κάτωθι γραφήματα 23. & 24., ενώ τα δεδομένα είναι διαθέσιμα στο πίνακα Π.5.6. του παραρτήματος.



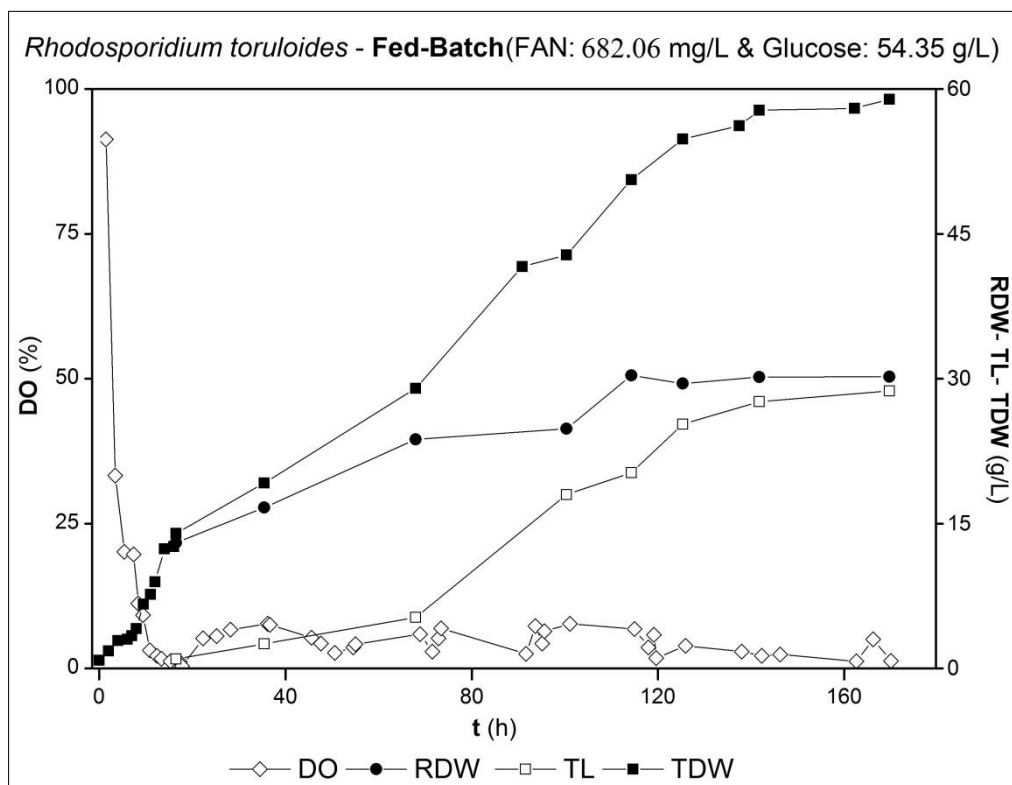
Γράφημα 23. Κινητική συγκεντρώσεων Ελεύθερου Αζώτου Αμινοξέων & Πεπτιδίων(FAN), Ανόργανου Φωσφόρου(IP), Ολικού Ξηρού Βάρους άνευ Λίπους(RDW), Ολικού ενδοκυτταρικού μικροβιακού λίπους(TL), Ολικού Ξηρού Βάρους-Βιομάζα (TDW) και Γλυκόζης(Glucose) κατά την ασυνεχή & ημισυνεχή υγρή καλλιέργεια του ζυμομύκητα *Rhodospiridium toruloides* σε υδρόλυμα Άνθους Ορύζης με αρχική συγκέντρωση γλυκόζης 54.35 g/L και ελεύθερου αζώτου (αμινοξέων & πεπτιδίων) FAN 682.06 mg/L. Η ζύμωση έγινε σε αναδεδυμένο βιοαντιδραστήρα ενεργού όγκου 1.5 L, με θερμοκρασία 28 °C, ρυθμιζόμενο pH 6.0 ± 02, 20% διαλυτό οξυγόνο(DO%) και ανάδευση αυτόματα ρυθμιζόμενη με βάση το DO %. Τα πειραματικά δεδομένα του γραφήματος είναι διαθέσιμα στο **πίνακα Π.5.6.** του παραρτήματος.

Η συγκέντρωση της γλυκόζης κατά την ημισυνεχή καλλιέργεια κινείται σε ένα εύρος τιμών από 59 g/L ως 35.64 g/L με βάση το άνω γράφημα 23. Οι συγκεντρώσεις του ανόργανου φωσφορού(IP) κατά την ημισυνεχή καλλιέργεια παρέμειναν σχεδόν αμετάβλητες, σε χαμηλά

επίπεδα και σε ένα στενό εύρος τιμών 21.34 ± 1.04 mg/L IP. Σε αντίθεση, στις 16.5 h καταγράψαμε συγκέντρωση του ελεύθερου αζώτου αμινοξέων & πεπτιδίων(FAN) 115.50 mg/L FAN η οποία ελαττώθηκε σε 15.73 mg/L FAN ως τις 68.03 h. Ακολούθως, η συγκέντρωση FAN σταθεροποιήθηκε σε ένα εύρος τιμών $14.20 \pm 0,86$ mg/L FAN.

Στις 16.5 h προσδιορίσαμε συγκέντρωση ενδοκυτταρικού μικροβιακού λίπους (TL) 0.98 g/L, ενώ μέχρι τις 68.03 h η συγκέντρωση των μικροβιακών λιπιδίων στην καλλιέργεια είχε φτάσει στα 5.28 g/L TL. Μετά τις 68.03 h είδαμε αύξηση των συγκεντρώσεων μικροβιακού λίπους μέχρι τις 170.02 h που είδαμε τη μέγιστη συγκέντρωση μικροβιακού λίπους(TL) στην καλλιέργεια με τιμή 28.74 g/L TL. Παρατηρούμε ότι η αύξηση των συγκεντρώσεων μικροβιακών λιπιδίων(TL) στην καλλιέργεια συμπίπτει με την εξάντληση του FAN θρεπτικό μέσο, δηλαδή μετά τις 68.03 h.

Γεγονός που είναι σύμφωνο με την βιβλιογραφία σχετικά με το περιορισμό τόσο του αζώτου και ίσως του φωσφόρου στο υπόστρωμα της καλλιέργειας, ως κλειδί για την συσσώρευση μικροβιακού λίπους στα ελαιογόνα κύτταρα(Ratledge, 1988;2004;Papanikolaou et al., 2002; 2007; Αγγελής, 2007; Ageitos et al., 2011;Papanikolaou and Aggelis, 2011;Wu et al., 2011).



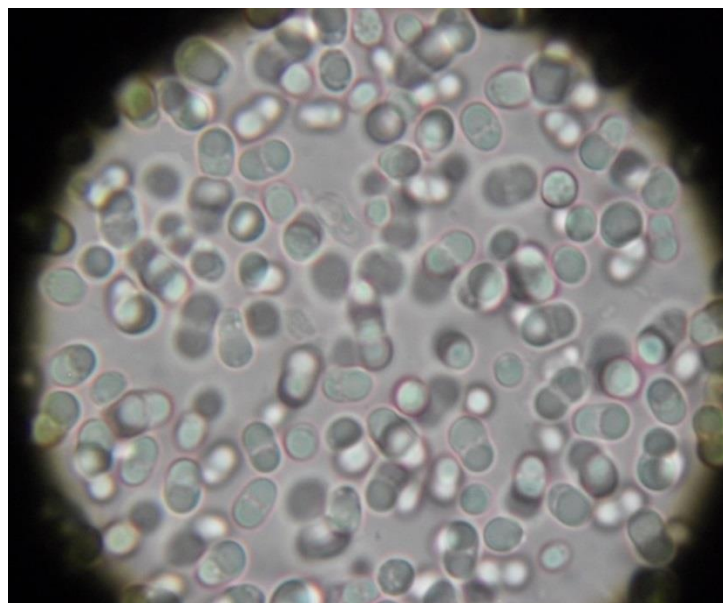
Γράφημα 24. Κινητική συγκεντρώσεων Διαλυτού οξυγόνου(DO), Ολικού Ξηρού Βάρους άνευ Λίπους(RDW), Ολικού ενδοκυτταρικού μικροβιακού λίπους(TL) και Ολικού Ξηρού Βάρους-Βιομάζα (TDW) κατά την ασυνεχή & ημισυνεχή υγρή καλλιέργεια του ζυμομύκητα *Rhodosporidium toruloides* σε υδρόλυμα Άνθους Ορύζης με αρχική συγκέντρωση γλυκόζης 54.35 g/L και ελεύθερου αζώτου (αμινοξέων & πεπτιδίων) FAN 682.06 mg/L. Η ζύμωση έγινε σε αναδεδυμένο βιοαντιδραστήρα ενεργού όγκου 1.5 L, με θερμοκρασία 28 °C, ρυθμιζόμενο pH 6.0 ± 02 , 20% διαλυτό οξυγόνο(DO%) και ανάδευση αυτόματα ρυθμιζόμενη με βάση το DO %. Τα πειραματικά δεδομένα του γραφήματος είναι διαθέσιμα στο **πίνακα Π.5.6.** του παραρτήματος.

Όπως αναφέραμε, στην ασυνεχή καλλιέργεια είδαμε μια έντονη μείωση του διαλυτού οξυγόνου ως τις 4 h. Εν συνέχεια για τις επόμενες 2 h είδαμε μια σταθεροποίηση του DO σε 19.7 %. Ακολούθως, καταγράψαμε σταδιακή μείωση των επιπέδων του διαλυτού οξυγόνου με τιμή 1.7%, μετά τις 12 h τα επίπεδα του διαλυτού οξυγόνου σταθεροποιήθηκαν σε τιμές 1.3 ± 0.3 %. Εν συνεχεία, μετά τις 16.5 h είδαμε άνοδο των τιμών του διαλυτού οξυγόνου στο μέσο της καλλιέργειας και σταθεροποίηση σε ένα εύρος τιμών 4.6 ± 1.8 % DO.

Η αρχική μείωση του διαλυτού οξυγόνου οφείλεται στις υψηλές μεταβολικές ανάγκες των κυττάρων κατά την μικροβιακή ανάπτυξή τους. Ενώ, με την μετάβαση των κυττάρων στην φάση λιποσυσσώρευσης, τα κύτταρα έχουν μικρότερες απαιτήσεις σε οξυγόνο, έτσι καταγράψαμε μια μικρή αύξηση στα επίπεδα του διαθέσιμου διαλυτού οξυγόνου στην καλλιέργεια.

Στην ημισυνεχή καλλιέργεια στις 16,5 h είχαμε συγκέντρωση 0,98 g/L TL, ενώ στις 170.02 h καλλιέργειας πετύχαμε 28.74 g/L TL. Η μέση ταχύτητα παραγωγής μικροβιακού λίπους ανά μονάδα όγκου (r_p) από την ημισυνεχή καλλιέργεια, υπολογίστηκε από τα δεδομένα που αναφέραμε σε 0,181 g/(L h). Ο συντελεστής απόδοσης παραγόμενου λίπους (TL) ανά μονάδα παραγόμενης βιομάζας (TDW), συμβολίζεται με $Y_{L/X}$ και στις 170 h πήρε μέγιστη τιμή και ίση με 0.487 g/g. Η τιμή αυτή εκφράζει ότι στις 170 h η περιεκτικότητα των κυττάρων της ζύμης σε λίπος ήταν 48.7 % (w/w). Ο συντελεστής απόδοσης παραγόμενου λίπους (TL) ανά μονάδα καταναλισκόμενης γλυκόζης (Glucose), συμβολίζεται με $Y_{L/S}$ και για την ημισυνεχή καλλιέργεια υπολογίστηκε σε 0.191 g/g.

Στην ακόλουθη εικόνα 24. απεικονίζονται τα κύτταρα του ζυμομύκητα για την παρούσα καλλιέργεια κατά τις 170 h με την μέγιστη συγκέντρωση λίπους 28.74 g/L. Κατά την ημισυνεχή καλλιέργεια πετύχαμε μέγιστη συγκέντρωση ολικού ξηρού βάρους (TDW) 58.94 g/L, ενώ η συγκέντρωση ξηρού βάρους άνευ λίπους (Residual Dry Weight, RDW) καθόλη την ημισυνεχή καλλιέργεια πήρε την μέγιστη τιμή 30.2 g/L RDW στις 170.02 h.



Εικόνα. 24 Μικροσκοπικό παρασκεύασμα κύτταρων ζυμομύκητα *Rhodosporidium toruloides*, μετά από 170 h καλλιέργειας με βιοαντιδραστήρα, σε Υδρόλυμα Άνθους Ορύζης προς παραγωγή μικροβιακού λίπους (TL) - 5^ο Πείραμα Ημισυνεχούς Καλλιέργειας, μέγιστη συγκέντρωση TL 28.74 g/L (Πηγή: Φωτογράφιση από το συγγραφέα, Εργ. Μικροβιολογίας & Βιοτεχνολογίας Τροφίμων, Γ.Π.Α.)

3.3. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην συγκεκριμένη μελέτη, ερευνήσαμε την δυνατότητα παραγωγής μικροβιακού λίπους με την χρήση ανανεώσιμων πρώτων υλών, όπως αποβλήτων και παραπροϊόντων της βιομηχανίας τροφίμων, αντικαθιστώντας εμπορικά παρασκευάσματα θρεπτικών συστατικών. Αρχικά, αναπτύξαμε το βασιδιομύκητα *Aspergillus awamori* 2B. 361 U2/1 γνωστό για την παραγωγή αμυλολυτικών και πρωτεολυτικών ενζύμων (Pandey et al., 1999; Koutinas et al., 2001; Yamamoto et al., 2005; Negi and Banerjee, 2006; Prakasham et al., 2006; Koutinas et al., 2006; Negi and Banerjee, 2009; Wang et al., 2009; Negi and Banerjee, 2010; Negi et al., 2011) σε ζύμωση στερεάς κατάστασης, με χρήση πίτουρου σίτου ως μοναδικό θρεπτικό μέσο.

Ακολούθως, το παραληφθέν σύμπλεγμα ακατέργαστων ενζύμων αξιοποιήθηκε για την υδρόλυση του αμυλοπρωτεϊνούχου αποβλήτου Άνθους ορύζης της βιομηχανίας ΓΙΩΤΗΣ ΑΕ. Το υδρόλυμα που προέκυψε χρησιμοποιήθηκε ως θρεπτικό υπόστρωμα για την ασυνεχή & ημισυνεχή καλλιέργεια του ελαιογόνου ζυμομύκητα *Rhodosporidium toruloides* DSM 444, με στόχο την βελτιστοποίηση παραγωγής μικροβιακών λιπιδίων.

Η παραγωγή μικροβιακών λιπιδίων είναι ένα από τα θέματα αιχμής για την Βιομηχανική Βιοτεχνολογία, λόγω των πολυάριθμων χρήσεων τους στην βελτίωση της ποιότητας ζωής του ανθρώπου που αναφέρθηκαν στην εισαγωγή της παρούσας εργασίας. Αναφορικά υπενθυμίζουμε ότι τα μικροβιακά λιπίδια έχουν εφαρμογή στην παραγωγή προσθέτων σε τρόφιμα υψηλής διατροφικής αξίας, συμπληρωμάτων διατροφής, φαρμακευτικών σκευασμάτων και επιφανειοδραστικών ουσιών. Επιπροσθέτως, το μικροβιακό λίπος δύναται να αξιοποιηθεί για την παραγωγή βιοκαυσίμου (Biodiesel), χρήση με πολύ μεγάλη οικολογική και οικονομική σημασία (Liu et al., 2005; Meng, et al., 2009; Ageitos et al., 2011).

Κατά την υδρόλυση του Άνθους ορύζης σε συγκέντρωση 234 g/L μετά από 24 h προσδιορίσαμε συγκέντρωση γλυκόζης 170 g/L και FAN 800 mg/L. Η απόδοση της ενζυμικής υδρόλυσης του αμύλου ορύζης σε γλυκόζη υπολογίστηκε σε 77.8% στην παράγραφο 3.1. Θεωρητικώς δεν ήταν η μέγιστη δυνατή, πιθανότατα λόγω ταχείας μείωσης της ενεργότητας των αμυλολυτικών ενζύμων (κυρίως γλυκοαμυλάσης), λόγω ποικίλων παραγόντων. Όπως οι συνθήκες υψηλής θερμοκρασίας (55 °C) που επικρατούσαν στο περιβάλλον της υδρόλυσης, η παραγωγή του προϊόντος (γλυκόζης) και η δράση της πρωτεάσης (Koutinas et al., 2001).

Στην παρούσα εργασία ερευνήσαμε την φυσιολογική συμπεριφορά του ελαιογόνου ζυμομύκητα *Rhodosporidium toruloides* DSM 4444, αρχικά μέσω ασυνεχούς και ακολούθως μέσω ημισυνεχούς υγρής καλλιέργειας επί του υδρολύματος Άνθους Ορύζης προς παραγωγή μικροβιακών λιπιδίων. Σε κάθε σειρά πειραμάτων, χρησιμοποιήσαμε διαφορετικές αρχικές συγκεντρώσεις γλυκόζης και ελεύθερου αζώτου (αμινοξέων & πεπτιδίων) στην προσπάθεια μας να προσδιορίσουμε την βέλτιστες συνθήκες για την μεγιστοποίηση της παραγωγής μικροβιακού λίπους. Οι διαφορετικές αρχικές συγκεντρώσεις σε κάθε σειρά πειραμάτων επιτεύχθηκαν μέσω αραιώσεων επί του αρχικού παραληφθέντος υδρολύματος.

Τα συγκριτικά αποτελέσματα από τις ασυνεχείς και ημισυνεχείς καλλιέργειες υγρής κατάστασης με τα κύτταρα του ελαιογόνου ζυμομύκητα *Rhodosporidium toruloides* DSM 4444 που αναλύσαμε στις άνω παραγράφους 3.2.1.- 3.2.10. παρουσιάζονται συγκεντρωτικά στο ακόλουθο πίνακα 6.

Πίνακας 6. Συγκεντρωτικός πίνακας αποτελεσμάτων από τις ασυνεχείς & ημισυνεχείς καλλιέργειες υγρής φάσης των κυττάρων του ζυμομύκητα *Rhodosporidium toruloides* DSM 4444 επί του υδρολύματος Άνθους ορύζης. Σε αναδεδυμένο βιοαντιδραστήρα ενεργού όγκου 1.5 L, με θερμοκρασία 28 °C, ρυθμιζόμενο pH 6.0 ± 0.2, 20% διαλυτό οξυγόνο(DO%) και ανάδευση αυτόματα ρυθμιζόμενη με βάση το DO %)

Καλλιέργεια			Ασυνεχής (Batch)				Ημισυνεχής (Fed-Batch)					
Σειρά	C _{FAN} (mg/L)	C _{Glc} (g/L)	μ _{max} (h ⁻¹)	TDW (g/L)	Y _{x/s} (g/g)	TL (g/L)	TDW (g/L)	TL (g/L)	RDW (g/L)	Y _{L/x} (g/g)	Y _{L/s} (g/g)	Γ _L ^{'''} g/(L h)
1 ⁿ	219.76	55.14	0.205	14.31	0.422	-	43.34	26.00	17.34	0.599	0.204	0.271
2 ⁿ	294.34	62.21	0.453	23.00	0.673	3.7	62.40	35.80	26.60	0.574	0.220	0.225
3 ⁿ	397.52	55.76	0.310	22.47	0.693	1.3	58.50	30.60	27.90	0.523	0.230	0.199
4 ⁿ	491.77	58.06	0.261	30.40	0.870	2.4	64.40	26.80	37.60	0.416	0.230	0.176
5 ⁿ	682.06	54.35	0.184	12.60	0.449	-	58.94	28.74	30.20	0.488	0.191	0.181

C_{Glu} = αρχική συγκέντρωση γλυκόζης στο θρεπτικό μέσο της καλλιέργειας, g/L

C_{FAN} = αρχική συγκέντρωση Ελεύθερου αζώτου Αμινοξέων & Πεπτιδίων(FAN) στο θρεπτικό μέσο της καλλιέργειας, mg/L

μ_{max} = μέγιστος ειδικός ρυθμός αύξησης κυττάρων, εκφράζει την μέγιστη παραγόμενη βιομάζα ανά μονάδα βιομάζας και ώρας, h⁻¹ (αναφέρεται στην εκθετική φάση ανάπτυξης των κυττάρων)

TDW = συγκέντρωση ολικού ξηρού βάρους (βιομάζα) της καλλιέργειας, g/L

Y_{x/s} = συντελεστής απόδοσης βιομάζας, εκφράζει την παραγόμενη βιομάζα (TDW) ανά μονάδα γλυκόζης (Glu), g/g

TL = συγκέντρωση ολικών ενδοκυτταρικών μικροβιακών λιπιδίων της καλλιέργειας, g/L

RDW = συγκέντρωση ξηρού βάρους άνευ λίπους της καλλιέργειας, g/L

Y_{L/x} = συντελεστής απόδοσης παραγόμενου μικροβιακού λίπους (TL) ανά μονάδα παραγόμενης βιομάζας(TDW), g/g

Γ_L^{'''} = ταχύτητα παραγωγής μικροβιακού λίπους ανά μονάδα όγκου, g/(L h)

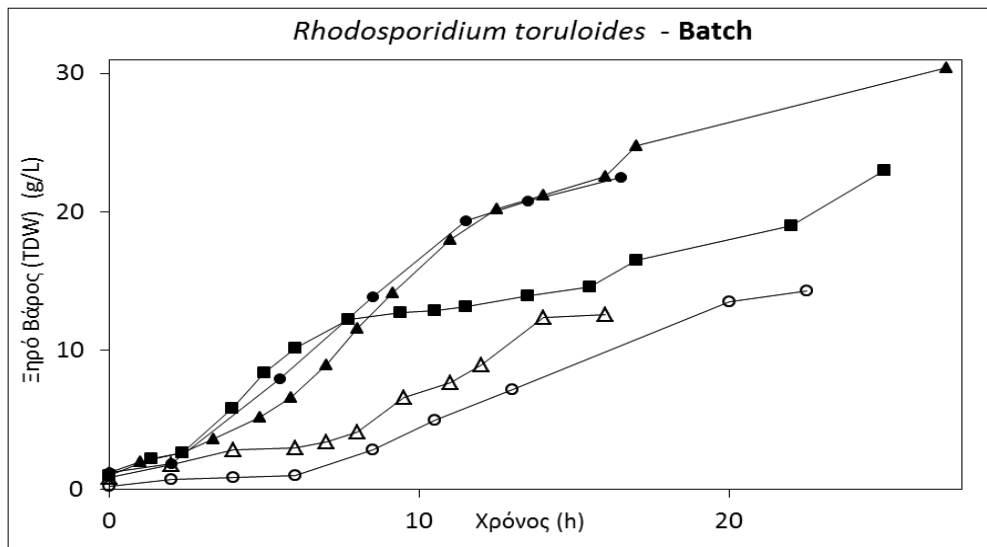
Y_{L/s} = συντελεστής απόδοσης παραγόμενου μικροβιακού λίπους(TL) ανά μονάδα καταναλισκόμενης γλυκόζης(Glu), g/g

Από τον άνω πίνακα 6., βλέπουμε ότι σε όλες τις σειρές πειραμάτων κατά τις ασυνεχείς καλλιέργειες οι τιμές του μέγιστου ειδικού ρυθμού αύξησης(μ_{max}) των κυττάρων του ζυμομύκητα *Rhodosporidium toruloides* κινήθηκαν σε ένα εύρος τιμών 0.184 - 0.453 h⁻¹. Στην βιβλιογραφία, γενικότερα αναφέρεται ότι οι τιμές για το μέγιστο ειδικό ρυθμό αύξησης (μ_{max}) των κυττάρων ζύμης κατά κανόνα κινείται σε ένα εύρος τιμών 0.32 - 0.6 h⁻¹(Αγγελής, 2007; Wiebe, 2012).

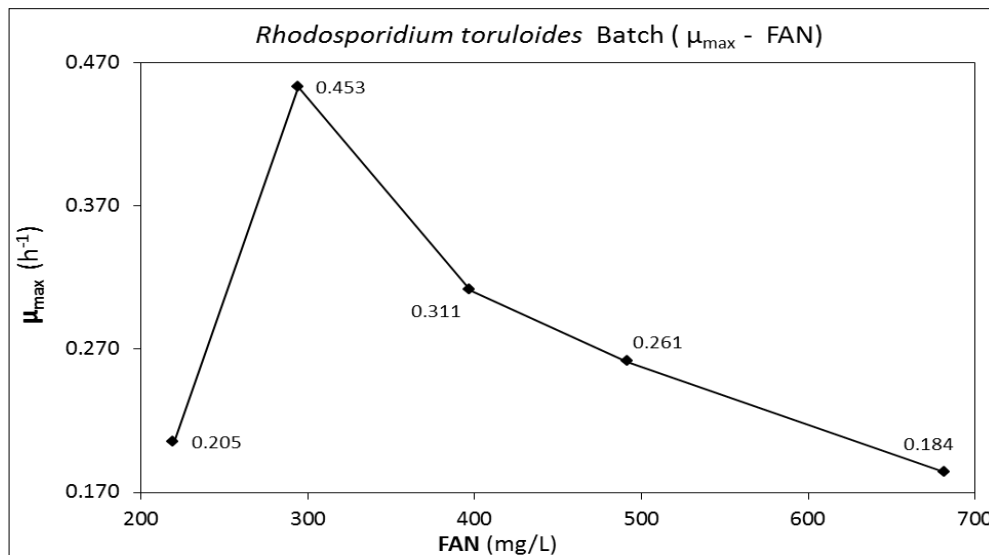
Επιπροσθέτως, μελέτες έδειξαν ότι κύτταρα της ελαιογόνου ζύμης *Yarrowia lipolytica* κατά την καλλιέργεια τους επί γλυκερόλης εμφάνισαν μέγιστο ειδικό ρυθμό αύξησης(μ_{max}) 0.2 h⁻¹(Papanikolaou and Aggelis, 2002). Αντιστοίχως, σε ασυνεχή καλλιέργεια ελαιογόνων κυττάρων *Rhodosporidium toruloides* Y4 σε θρεπτικό μέσο με βάση τη γλυκόζη υπολογίστηκε μέγιστος ειδικός ρυθμός αύξησης(μ_{max}) 0.13 h⁻¹ (Li et al., 2007). Ενώ, κατά την ασυνεχή καλλιέργεια των ελαιογόνων κυττάρων ζύμης *Cryptococcus curvatus* σε βιοαντιδραστήρα 2 L με υπόστρωμα που περιείχε ως πηγή άνθρακα την γλυκερόλη έχει καταγραφεί μέγιστος ειδικός ρυθμός αύξησης(μ_{max}) 0.43 h⁻¹(Meester et al., 1996)

Στηριζόμενοι στο πίνακα 6., ο συντελεστής απόδοσης βιομάζας(Y_{x/s}) ανά μονάδα γλυκόζης στις ασυνεχείς καλλιέργειες μας κυμαίνεται σε ένα εύρος τιμών 0.422– 0.870 g/g. Σε ερευνητικές μελέτες ο συντελεστής απόδοσης βιομάζας(Y_{x/s}) καταγράφει τιμή 0.59 g/g, για κύτταρα *Rhodosporidium toruloides* που καλλιεργήθηκαν ασυνεχώς επί γλυκόζης (Li et al., 2007). Ενώ, ο συντελεστής απόδοσης βιομάζας(Y_{x/s}) παίρνει τιμή 0.47- 0.55 g/g για ελαιογόνα κύτταρα (Ratledge,1982; Yoon et al., 1982). Γενικότερα, ο συντελεστής απόδοσης

βιομάζας ($Y_{x/s}$) ανά μονάδα γλυκόζης με βάση την βιβλιογραφία (Waites et al., 2007), κατά κανόνα παίρνει τιμές 0.43-0.61 g/g σε αερόβιες καλλιέργειες κυττάρων.



Γράφημα 25. Κινητική συγκεντρώσεων Ολικού Ξηρού Βάρους-Βιομάζας (TDW) κατά την ασυνεχή (Batch) υγρή καλλιέργεια του ζυμομύκητα *Rhodosporidium toruloides* σε υδρόλυμα Άνθους Ορύζης με αρχικές συγκεντρώσεις γλυκόζης (Glu) και ελεύθερου αζώτου αμινοξέων & πεπτιδίων (FAN): (O) 55.14 g/L Glu & 219.76 mg/L FAN, (■) 62.21 g/L Glu & 294.34 mg/L FAN, (●) 55.76 g/L Glu & 397.52 mg/L FAN, (▲) 58.06 g/L Glu & 491.77 mg/L FAN, (Δ) 54.35 g/L Glu & 682.06 mg/L FAN. Η ζύμωση έγινε σε αναδευόμενο βιοαντιδραστήρα ενεργού όγκου 1.5 L, με θερμοκρασία 28 °C, ρυθμιζόμενο pH 6.0 ± 0.2, 20% διαλυτό οξυγόνο (DO%) και ανάδευση αυτόματα ρυθμιζόμενη με βάση το DO %. Τα πειραματικά δεδομένα του γραφήματος είναι διαθέσιμα στους πίνακες Π.5.2.- Π.5.6 του παραρτήματος.



Γράφημα 26. Μεταβολή μέγιστου ειδικού ρυθμού αύξησης των κυττάρων (μ_{max}) κατά την ασυνεχή (Batch) υγρή καλλιέργεια του ζυμομύκητα *Rhodosporidium toruloides* σε υδρόλυμα Άνθους Ορύζης, συναρτήση της αρχικής συγκεντρώσεως του ελεύθερου αζώτου αμινοξέων & πεπτιδίων (FAN), με βάση τα δεδομένα του άνω πίνακα 6. της παρούσης παραγράφου. Οι αρχικές συγκεντρώσεις γλυκόζης διατηρήθηκαν σε ένα στενό εύρος τιμών 54.35-62.21 g/L. Η ζύμωση έγινε σε αναδευόμενο βιοαντιδραστήρα ενεργού όγκου 1.5 L, με θερμοκρασία 28 °C, ρυθμιζόμενο pH 6.0 ± 0.2, 20% διαλυτό οξυγόνο (DO%) και ανάδευση αυτόματα ρυθμιζόμενη με βάση το DO %.

Από τα δύο άνω γραφήματα 25 & 26, βλέπουμε ότι κατά την ασυνεχή καλλιέργεια του ζυμομύκητα *Rhodosporidium toruloides* σε υδρόλυμα άνθους ορύζης με αρχική συγκέντρωση γλυκόζης 62.21 g/L και ελεύθερου αζώτου αμινοξέων & πεπτιδίων(FAN) 294.34 mg/L (2^η σειρά πειραμάτων), καταγράφεται ο υψηλότερος ρυθμός ανάπτυξης κατά την εκθετική φάση αύξησης των κυττάρων συγκριτικά με τις άλλες ασυνεχείς καλλιέργειες.

Συγκεκριμένα από το γράφημα 26 και από το πίνακα 6, βλέπουμε ότι ο μέγιστος ειδικός ρυθμός αύξησης(μ_{max}) των κυττάρων εμφανίζει την υψηλότερη τιμή στην 2^η σειρά πειραμάτων με τιμή μ_{max} 0.453 h⁻¹. Ενώ, η μικρότερη τιμή για το μέγιστο ειδικό ρυθμό αύξησης(μ_{max}) των κυττάρων καταγράφεται στην 5^η σειρά πειραμάτων με τιμή 0.184 h⁻¹, όπως παρουσιάζεται στο πίνακα 6 και το γράφημα 26.

Επίσης, στηριζόμενοι στο γράφημα 25 παρατηρούμε ότι η υψηλότερη τελική συγκέντρωση ολικού ξηρού βάρους(βιομάζας) κατά την ασυνεχή καλλιέργεια του ζυμομύκητα *Rhodosporidium toruloides* καταγράφεται στην 4^η σειρά πειραμάτων(με αρχική συγκέντρωση γλυκόζης 58.06 g/L και ελεύθερου αζώτου αμινοξέων & πεπτιδίων(FAN) 491.77 mg/L) με τιμή 30.40 g/L. Ενώ όλες οι υπόλοιπες κινήθηκαν σε χαμηλότερα επίπεδα.

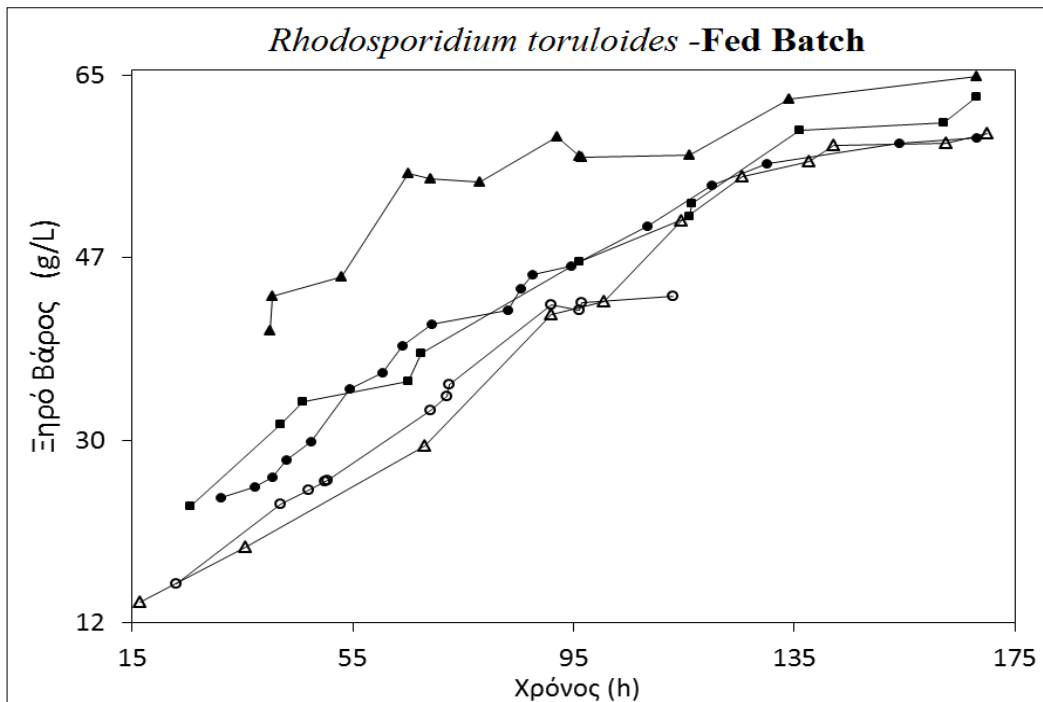
Με βάση τα δεδομένα του άνω πίνακα 6. της παρούσης παραγράφου κατά τις ασυνεχείς καλλιέργειες των κυττάρων *Rhodosporidium toruloides* η συγκέντρωση μικροβιακού λίπους κυμαίνεται σε χαμηλά επίπεδα με τιμές έως 3.7 g/L. Οι χαμηλές συγκεντρώσεις μικροβιακού λίπους αποδίδονται στο γεγονός ότι ο ζυμομύκητας κατά την ασυνεχή καλλιέργεια βρίσκεται κυρίως στην φάση μικροβιακής αύξησης, κυρίως λόγω μη ανάλωσης του αζώτου(FAN) στη καλλιέργεια. Γενικότερα, η χαμηλή συγκέντρωση μικροβιακών λιπιδίων που προσδιορίσαμε κατά την ασυνεχή καλλιέργεια πιθανότητα να αποδίδεται στην σύνθεση δομικών λιπιδίων κυρίως κατά την μικροβιακή αύξηση των κυττάρων (ασυνεχής καλλιέργεια).

Ειδικότερα, κατά το τέλος της ασυνεχούς καλλιέργειας, όπου οι συγκεντρώσεις FAN οδηγούνται σε πολύ χαμηλά επίπεδα(> 20 mg/L), παρατηρήθηκε μικρή συγκέντρωση λίπους. Παρατηρήσαμε ότι η σύνθεση μικροβιακού λίπους στις ασυνεχείς καλλιέργειες σε συγκεντρώσεις ως 3.7 g/L TL καταγράφεται μόνο στις ζυμώσεις με αρχικές συγκεντρώσεις FAN 294.34 mg/L, 397.52 mg/L και 491.77 mg/L, με βάση τον άνω πίνακα 6.

Κατά τις ημισυνεχείς τροφοδοτούμενες καλλιέργειες των πειραμάτων μας τη μέγιστη τελική συγκέντρωση ξηρού βάρους (TDW) την καταγράψαμε στην 4^η σειρά πειραμάτων (▲) με τιμή 64.4 g/L στις 168 h, με βάση το ακόλουθο γράφημα 27. Στην ίδια σειρά πειραμάτων είδαμε και την υψηλότερη συγκέντρωση ξηρού βάρους άνευ λίπους (RDW) με τιμή 37.6 g/L, όπως προκύπτει από το πίνακα 6. Στη 4^η σειρά πειραμάτων κατά την αρχική ασυνεχή καλλιέργεια χρησιμοποιήσαμε αρχικές συγκεντρώσεις γλυκόζης 58.06 g/L και FAN 491.77 mg/L.

Ταυτόχρονα, εστιάζοντας συνολικά στο πίνακα 6. που παραθέσαμε στην παρούσα παράγραφο και το διάγραμμα 25, παρατηρούμε ότι κατά την 4^η σειρά πειραμάτων στην ασυνεχή καλλιέργεια προσδιορίσαμε την μέγιστη συγκέντρωση ξηρού βάρους(TDW) 30.4 g/L και την υψηλότερη τιμή για το συντελεστή απόδοση βιομάζας($Y_{x/s}$) 0.870 g/g.

Εκ των άνω, θα μπορούσαμε να πούμε ότι η 4^η σειρά πειραμάτων χαρακτηρίζεται από τις υψηλότερες συγκεντρώσεις και αποδόσεις βιομάζας για τις καλλιέργειες που πραγματοποιήσαμε στην παρούσα εργασία.

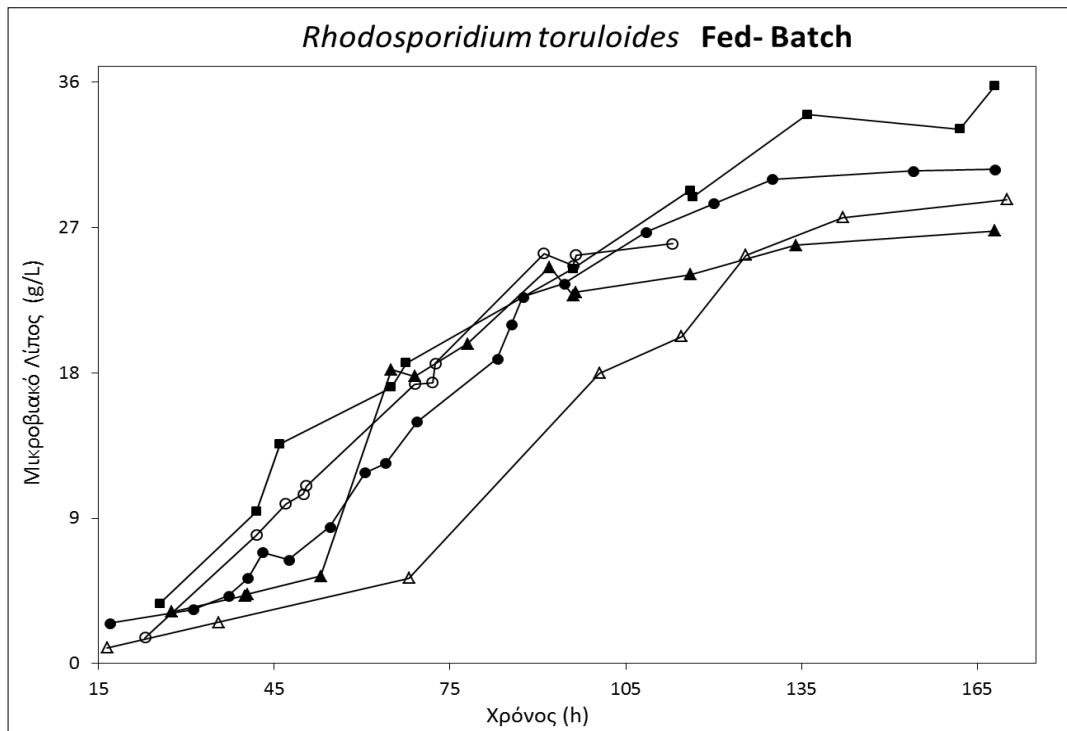


Γράφημα 27. Κινητική συγκεντρώσεων Ολικού Ξηρού Βάρους-Βιομάζας (TDW) κατά την ημισυνεχή(Fed Batch) υγρή καλλιέργεια του ζυμομύκητα *Rhodosporidium toruloides* σε υδρόλυμα Άνθους Ορύζης, μετά την ασυνεχή καλλιέργεια με αρχικές συγκεντρώσεις γλυκόζης(Glu) και ελεύθερου αζώτου αμινοξέων & πεπτιδίων(FAN): (O) 55.14 g/L Glu & 219.76 mg/L FAN, (■) 62.21 g/L Glu & 294.34 mg/L FAN, (●) 55.76 g/L Glu & 397.52 mg/L FAN, (▲) 58.06 g/L Glu & 491.77 mg/L FAN, (Δ) 54.35 g/L Glu & 682.06 mg/L FAN. Η ζύμωση έγινε σε αναδευόμενο βιοαντιδραστήρα ενεργού όγκου 1.5 L, με θερμοκρασία 28 °C, ρυθμιζόμενο pH 6.0 ± 02, 20% διαλυτό οξυγόνο(DO%) και ανάδευση αυτόματα ρυθμιζόμενη με βάση το DO %. Τα πειραματικά δεδομένα του γραφήματος είναι διαθέσιμα στους πίνακες Π.5.2.- Π.5.6 του παραρτήματος.

Επίσης, με βάση το άνω γράφημα βλέπουμε ότι κατά την 3^η(●) & 5^η(Δ) σειρά πειραμάτων στις ημισυνεχείς καλλιέργειες καταγράψαμε παρόμοιες τελικές συγκεντρώσεις ξηρού βάρους(TDW) 58.5 & 58.94 g/L. Ενώ, η μικρότερη συγκέντρωση βιομάζας καταγράφεται για την 1^η σειρά πειραμάτων (O) με τιμή 43.34 g/L. Από το άνω γράφημα 27, προκύπτει ότι στην 2^η σειρά πειραμάτων(■) η μέγιστη συγκέντρωση βιομάζας καταγράφει τιμή 62.4 g/L, δηλαδή πολύ κοντά στην βέλτιστη 64.4 g/L που προσδιορίσαμε κατά την 4^η σειρά πειραμάτων.

Κατά τις ημισυνεχείς καλλιέργειες των κυττάρων του ζυμομύκητα *Rhodosporidium toruloides*, βλέπουμε ότι προσδιορίσαμε μέγιστη συγκέντρωση ενδοκυτταρικού λίπους(TL) 35.8 g/L στην 2^η σειρά πειραμάτων (■), με βάση το κάτω γράφημα 28. Ενώ, αμέσως μικρότερη συγκέντρωση λίπους 30.6 g/L καταγράφεται για την 3^η σειρά πειραμάτων (●). Ενώ, θα πρέπει να αναφέρουμε ότι οι υπόλοιπες ημισυνεχείς καλλιέργειες μας έδωσαν μικροβιακά λιπίδια σε συγκεντρώσεις που κυμαίνονται σε 26- 28,74 g/L.

Παρατηρώντας το κάτω γράφημα 28 προκύπτει ότι κατά την 5^η (Δ) σειρά πειραμάτων (αρχ. συγκεντρώσεις ασυνεχούς καλλιέργειας 54.35 g/L Glu & 682.06 mg/L FAN) είδαμε μια σχετική καθυστέρηση στην παραγωγή μικροβιακών λιπιδίων. Γεγονός που πιθανότατα οφείλεται στο ότι μετά τις 68 h στην συγκεκριμένη καλλιέργεια είδαμε εξάντληση του FAN στο θρεπτικό μέσο.



Γράφημα 28. Κινητική συγκεντρώσεων ενδοκυτταρικού μικροβιακού λίπους (TL) κατά την ημισυνεχή (Fed Batch) υγρή καλλιέργεια του ζυμομύκητα *Rhodosporidium toruloides* σε υδρόλυμα Άνθους Ορύζης, κατόπιν της ασυνεχούς καλλιέργειας με αρχικές συγκεντρώσεις γλυκόζης (Glu) και ελεύθερου αζώτου αμινοξέων & πεπτιδίων (FAN): (O) 55.14 g/L Glu & 219.76 mg/L FAN, (■) 62.21 g/L Glu & 294.34 mg/L FAN, (●) 55.76 g/L Glu & 397.52 mg/L FAN, (▲) 58.06 g/L Glu & 491.77 mg/L FAN, (Δ) 54.35 g/L Glu & 682.06 mg/L FAN. Η ζύμωση έγινε σε αναδεδυμένο βιοαντιδραστήρα ενεργού όγκου 1.5 L, με θερμοκρασία 28 °C, ρυθμιζόμενο pH 6.0 ± 0.2, 20% διαλυτό οξυγόνο (DO%) και ανάδευση αυτόματα ρυθμιζόμενη με βάση το DO %. Τα πειραματικά δεδομένα του γραφήματος είναι διαθέσιμα στους πίνακες Π.5.2.- Π.5.6 του παραρτήματος.

Στην παρούσα εργασία, στηριζόμενοι στα δεδομένα των πινάκων Π.5.2.- Π.5.6 του παραρτήματος, υπολογίσαμε την ταχύτητα παραγωγής μικροβιακού λίπους (r_L''') κατά τις ημισυνεχείς καλλιέργειες για όλες τις σειρές πειραμάτων, όπως διεξοδικώς αναλύσαμε στην παράθεση των αποτελεσμάτων μας. Οι τιμές για την ταχύτητα παραγωγής μικροβιακού λίπους κυμαίνονται σε ένα εύρος 0.176- 0.271 g/(L h), με βάση τον προαναφερόμενο πίνακα 6. της παρούσης παραγράφου.

Οι τιμές αυτές βρίσκονται σε συμφωνία με ερευνητικές εργασίες, στις οποίες χρησιμοποιώντας βιοαντιδραστήρα όγκου 0.5 L, η ταχύτητα παραγωγής μικροβιακού λίπους κατά ημισυνεχή καλλιέργεια των κυττάρων *Rhodosporidium toruloides* υπολογίστηκε στα 0.21 g/(L h) αξιοποιώντας την γλυκόζη ως θρεπτικό μέσο (Weibe et al., 2012). Όμως, σε μελέτες που έγιναν με βιοαντιδραστήρα πολύ μεγαλύτερου όγκου, συγκεκριμένα 15 L, καταγράφεται ταχύτητα παραγωγής μικροβιακού λίπους (r_L''') 0.54 - 0.57 g/(L h) για ημισυνεχή καλλιέργεια των κυττάρων *Rhodosporidium toruloides* σε ως θρεπτικό μέσο με πηγή άνθρακα τη γλυκόζη (Li et al., 2007; Zhao et al., 2011).

Με βάση την βιβλιογραφία, για την παραγωγή μικροβιακού λίπους έχουν εφαρμοστεί διάφορες τεχνικές, συμπεριλαμβανομένου ημι-συνεχούς τροφοδοτούμενης και συνεχούς καλλιέργειας. Συγκεκριμένα, μελέτες έδειξαν ότι η ζύμη *Candida curvata* D αναπτυσσόμενη σε γλυκόζη και ξυλόζη σε συνεχή καλλιέργεια δίδει παραγωγικότητα μικροβιακού λίπους 0.16

και 0.27 g/(L h) (Evans and Ratledge, 1983). Η ανάπτυξη των κυττάρων *Apiotrichum curvatum* σε ένα σύστημα συνεχούς καλλιέργειας σε γλυκόζη έχει επιφέρει παραγωγικότητα λίπους 0.42 g/(L h) (Hassan et al., 1993). Ενώ, παραγωγικότητα λίπους 0.59 g/(L h) έχει καταγραφεί από τα κύτταρα *Lipomyces starkeyi* κατά την ανάπτυξη τους σε ημισυνεχή καλλιέργεια επί αιθανόλης (Yamauchi et al., 1983). Εν κατακλείδι, έρευνες έδειξαν ότι τα ελαιογόνα κύτταρα *Rhodotorula glutinis* σε ημισυνεχής καλλιέργεια, σε συνθήκες έντονου αερισμού έχουν την δυνατότητα να καταγράφουν παραγωγικότητα μικροβιακού λίπους 0.88 g/(L h) (Pan et al., 1986).

Στην συγκεκριμένη μελέτη, υπολογίσαμε το συντελεστή απόδοσης παραγόμενου μικροβιακού λίπους ($Y_{L/S}$) ανά μονάδα καταναλισκόμενης γλυκόζης κατά την ημισυνεχή καλλιέργεια των ελαιογόνων κυττάρων του *Rhodospiridium toruloides* για όλες τις σειρές πειραμάτων, όπως αναλυτικά εξηγήσαμε στην παράθεση των αποτελεσμάτων μας. Οι τιμές $Y_{L/S}$ που προσδιορίσαμε κυμαίνονται σε ένα εύρος 0.191 - 0.230 g/g, με βάση τον προαναφερόμενο πίνακα 6. της παρούσης παραγράφου. Σύμφωνα με ερευνητικές μελέτες οι πειραματικές τιμές για το συντελεστή $Y_{L/S}$ συνήθως κυμαίνονται σε ένα εύρος 0.14- 0.24 g/g για τους ελαιογόνους μικροοργανισμούς (Gill et al., 1977; Granger et al., 1993; Li et al., 2006; 2007; Zhao et al., 2011; Wu et al., 2011; Wiebe et al., 2012; Shen et al., 2013). Όμως η βιβλιογραφία αναφέρει ότι η μέγιστη θεωρητική τιμή για τον συντελεστή $Y_{L/S}$ για ελαιογόνα κύτταρα είναι 0.32- 0.33 g/g (Ratledge, 1988; Ratledge and Wynn, 2002).

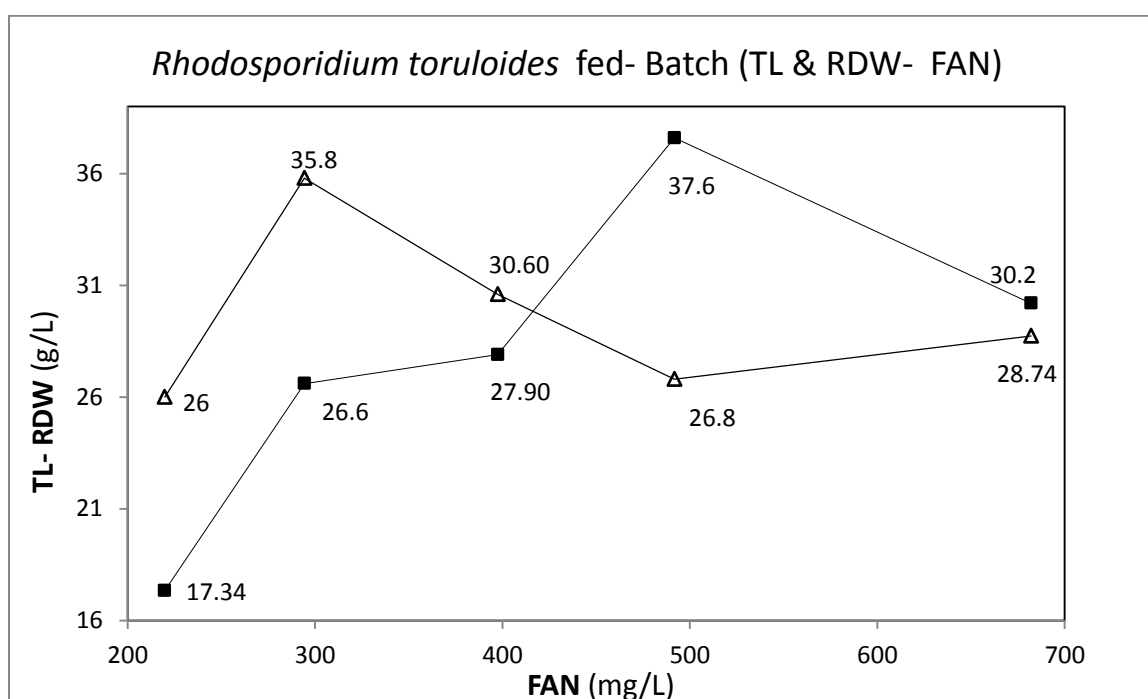
Στηριζόμενοι στα πειραματικά δεδομένα που δίδουμε στους πίνακες Π.5.2.- Π.5.6 του παραρτήματος, υπολογίσαμε τον συντελεστή απόδοσης παραγόμενου μικροβιακού λίπους ($Y_{L/X}$) ανά μονάδα βιομάζας για όλες τις ημισυνεχείς καλλιέργειες κατά την ολοκλήρωσή τους. Οι τιμές $Y_{L/X}$ κινήθηκαν σε ένα εύρος τιμών 0.416 - 0.599 g/g, όπως εξηγήσαμε στα αποτελέσματά μας και συγκριτικά εκθέσαμε στο πίνακα 6 της παρούσης παραγράφου. Ο συντελεστής $Y_{L/X}$ σε σχετικές ερευνητικές μελέτες έχει υπολογιστεί σε 0.349- 0.764 g/g για την καλλιέργεια των ελαιογόνων κυττάρων του ζυμομύκητα *Rhodospiridium toruloides*, είτε σε θρεπτικό μέσο πλούσιο σε γλυκόζη είτε σε υδρόλυμα αποβλήτου, όπως προκύπτει από τους ακόλουθους πίνακες 8. & 9.

Επίσης, όπως τις κινητικές των καλλιεργειών μας προκύπτει ότι οι συγκεντρώσεις του ελεύθερου αζώτου αμινοξέων & πεπτιδίων (FAN) παρέμειναν σε πολύ χαμηλά επίπεδα (> 20 mg/L) κατά την φάση λιποσυσσώρευσης των κυττάρων, σε συμφωνία με την βιβλιογραφία (Ratledge, 1988; 2004; Papanikolaou et al., 2002; Li et al., 2006; Papanikolaou et al., 2007; Wu et al., 2010; Ageitos et al., 2011; Papanikolaou and Aggelis, 2011). Ενώ, για τον ανόργανο φώσφορο (IP) είδαμε μια παρόμοια εικόνα, με τις συγκεντρώσεις φωσφόρου να διατηρούνται σε πολύ χαμηλά επίπεδα κατά την φάση λιποσυσσώρευσης των κυττάρων (> 20 mg/L), σε συμφωνία με σχετικές ερευνητικές μελέτες (Li et al., 2006; Wu et al., 2010).

Συνοψίζοντας όλα τα άνω, συμπεραίνουμε ότι η βέλτιστη συγκέντρωση ενδοκυτταρικού μικροβιακού λίπους 35.8 g/L επιτεύχθηκε στην 2^η σειρά πειραμάτων της ημισυνεχούς καλλιέργειας των ελαιογόνων κυττάρων *Rhodospiridium toruloides* στις 168 h, με βάση το κάτωθι γράφημα 29. Ειδικότερα, στην 2^η σειρά πειραμάτων κατά την αρχική ασυνεχή καλλιέργεια είχαμε χρησιμοποιήσει υδρόλυμα Άνθους ορύζης με αρχική συγκέντρωση γλυκόζης 62.21 g/L & ελεύθερο άζωτο αμινοξέων και πεπτιδίων (FAN) 294.34 mg/L. Ταυτόχρονα, πρέπει να τονίσουμε ότι στην 2^η σειρά πειραμάτων πετύχαμε τελική συγκέντρωση βιομάζας (TDW) 62.4 g/L κατά την ημισυνεχή καλλιέργεια, τιμή που βρίσκεται

πολύ κοντά στην μέγιστη συγκέντρωση βιομάζας(TDW) 64,4 g/L που καταγράψαμε στην 4^η σειρά πειραμάτων.

Συνοψίζοντας όλα τα βέλτιστα αποτελέσματα των καλλιεργειών μας, για τις υψηλότερες συγκεντρώσεις μικροβιακών λιπιδίων (TL) και ξηρού βάρους άνευ λίπους (RDW) συναρτήση της αρχικής συγκέντρωσης FAN που χρησιμοποιήσαμε στις ασυνεχείς καλλιέργειες, δίδουμε το κάτωθι γράφημα 29. Είναι προφανές ότι η υψηλότερη συγκέντρωση μικροβιακών λιπιδίων (TL) 35.8 g/L επιτεύχθηκε στην 2^η σειρά πειραμάτων(με αρχικές συγκεντρώσεις γλυκόζης 62.21 g/L & FAN 294.34 mg/L κατά την ασυνεχή καλλιέργεια), ενώ η υψηλότερη συγκέντρωση ξηρού βάρους άνευ λίπους(RDW) ήταν 37.6 g/L καταγράφεται στην 5^η σειρά πειραμάτων (με αντίστοιχες αρχικές συγκεντρώσεις γλυκόζης 58.06 g/L & FAN 491.77 mg/L).



Γράφημα 29. Μεταβολή μέγιστων συγκεντρώσεων: (Δ) ενδοκυτταρικού μικροβιακού λίπους (TL) σε g/L και (■) ξηρού βάρους άνευ λίπους(RDW) σε g/L, στην ημισυνεχή(Fed Batch) υγρή καλλιέργεια του ζυμομύκητα *Rhodosporidium toruloides* σε υδρόλυμα Άνθους Ορύζης, συναρτήση της αρχικής συγκέντρωσης του ελεύθερου αζώτου αμινοξέων & πεπτιδίων(FAN) κατά την αρχική ασυνεχή καλλιέργεια, με βάση τα δεδομένα του άνω πίνακα 6. της παρούσης παραγράφου. Οι αρχικές συγκεντρώσεις γλυκόζης διατηρήθηκαν σε ένα στενό εύρος τιμών 54.35-62.21 g/L. Η ζύμωση έγινε σε αναδευόμενο βιοαντιδραστήρα ενεργού όγκου 1.5 L, με θερμοκρασία 28 °C, ρυθμιζόμενο pH 6.0 ± 0.2, 20% διαλυτό οξυγόνο(DO%) και ανάδευση αυτόματα ρυθμιζόμενη με βάση το DO %.

Ταυτόχρονα, στην 2^η σειρά πειραμάτων είδαμε και την μέγιστη μικροβιακή αύξηση κατά την εκθετική φάση ανάπτυξης των κυττάρων, συγκριτικά με τις άλλες ασυνεχείς καλλιέργειες με τιμή μέγιστου ειδικού ρυθμού ανάπτυξης (μ_{max}) 0,453 h⁻¹.

Προς σύγκριση των βέλτιστων αποτελεσμάτων μας για την παραγωγή μικροβιακού λίπους από τα κύτταρα *Rhodosporidium toruloides* της παρούσης εργασίας με αντίστοιχες μελέτες

που εντοπίσαμε στην βιβλιογραφία για την παραγωγή μικροβιακών λιπιδίων σε βιοαντιδραστήρα παραθέτουμε τον ακόλουθο πίνακα 8.

Πίνακας 8. Παραγωγή βιομάζας και ενδοκυτταρικών μικροβιακών λιπιδίων από ελαιογόνους μικροοργανισμούς κατά την καλλιέργεια τους σε βιοαντιδραστήρα με ποικίλα θρεπτικά μέσα

Μικροοργανισμός	Είδος	Θρεπτικό Μέσο	Είδος Ζύμωσης	Αντιδ/ας	C/N (g/g)	Χρόνος (h)	TDW (g/L)	$Y_{L/x}$ (g/g)	TL (g/L)	Βιβλιογραφία
<i>Cryptococcus curvatus</i>	Ζύμη	Γλυκερόλη	fed batch	2 L	20	50	118	0.250	29.5	Meester et al., 1996
<i>Mortierella isabellina</i>	Μύκητας	Γλυκόζη	fed batch	2 L	33.4	50	62.6	0.500	31.3	Hiruta et al., 1997
<i>Rhodospiridium toruloides</i>	Ζύμη	Γλυκόζη	batch	7 L	250	120+	19.2	0.738	14.2	Li et al., 2006
<i>Rhodospiridium toruloides</i>	Ζύμη	Γλυκόζη	fed batch	15 L	63.02	134	106.5	0.675	71.8	Li et al., 2007
<i>Rhodospiridium toruloides</i>	Ζύμη	Υδρ. Κονδυ. Ηλίανθου	batch	15 L	42	60	40.0	0.433	17.2	Zhao et al., 2010
<i>Rhodospiridium toruloides</i>	Ζύμη	Υδρ. Κονδυ. Ηλίανθου	fed batch Υδρ. Ηλιαν. (C/N=42 g/g)	15 L	42	120	113	0,401	45.4	Zhao et al., 2011
<i>Rhodospiridium toruloides</i>	Ζύμη	Υδρ. Κονδυ. Ηλίανθου	fed batch Εκ. Ηλιαν. (C/N=18 g/g)	15 L	42	120	70	0.565	39.6	Zhao et al., 2011
<i>Rhodospiridium toruloides</i>	Ζύμη	Γλυκόζη	fed batch	15 L	60	120	101.7	0.604	61.4	Zhao et al., 2011
<i>Rhodospiridium toruloides</i>	Ζύμη	Γλυκόζη	fed batch	15 L	63	134	120.8	0.630	76.1	Jin et al., 2012
<i>Rhodospiridium toruloides</i>	Ζύμη	Γλυκόζη	batch	5 L	24.7	190	16.7	0.659	11	Xu et al., 2012
<i>Rhodospiridium toruloides</i>	Ζύμη	Γλυκερόλη	batch	5 L	30.3	190	26.7	0,693	18.5	Xu et al., 2012
<i>Rhodospiridium toruloides</i>	Ζύμη	Γλυκόζη	fed batch	0.5L	40	175	35	0.750	26.25	Weibe et al., 2012
<i>Rhodospiridium toruloides</i>	Ζύμη	Υδρ. Άνθους Ορύζης	fed batch	2 L	42.27*	168	64.4	0.574	35.8	Παρούσα Μελέτη

$Y_{L/x}$ = συντελεστής απόδοσης παραγόμενου μικροβιακού λίπους (TL) ανά μονάδα παραγόμενης βιομάζας (TDW), g/g

TDW = συγκέντρωση ολικού ξηρού βάρους (βιομάζα) της καλλιέργειας, g/L

TL = συγκέντρωση ολικών ενδοκυτταρικών μικροβιακών λιπιδίων της καλλιέργειας, g/L

C/N = λόγος άνθρακα αζώτου, g/g, Υδρ. Ηλίανθου: Υδρόλυμα Κονδυλώδη Ηλίανθου, Ηλίανθος Κονδυλώδης: *Helianthus tuberosus*

Με βάση τη βιβλιογραφία (Li et al., 2006) το εκχύλισμα Ζύμης (Yeast Extract) περιέχει 12% w/w Άζωτο και 7% w/w Άνθρακα.

*Υπολογισμός C/N με βάση πειραματικές τιμές συγκέντρωσης Συνολικού Αζώτου (Total Kjeldahl Nitrogen) που γνωρίζουμε για το συγκεκριμένο υδρόλυμα Άνθους Ορύζης από προηγούμενες ερευνητικές μελέτες του εργαστηρίου μας. Ως κύρια πηγή άνθρακα θεωρήσαμε την γλυκόζη.

Παρατηρώντας τα δεδομένα του πίνακα 8, βλέπουμε ότι η καλλιέργεια των κυττάρων του ζυμομύκητα επί του υδρολύματος Άνθους ορύζης της παρούσης μελέτης έδωσε σχετικά αξιόλογη συγκέντρωση μικροβιακού λίπους 35.8 g/L, λαμβάνοντας υπόψη ότι οι τελικές συγκεντρώσεις μικροβιακού λίπους των μελετών που αναφέρονται στο πίνακα 8 κινήθηκαν σε ένα εύρος 11- 76.1 g/L. Πρέπει να τονίσουμε ότι ο αρχικός λόγος άνθρακα αζώτου C/N υπολογίστηκε 42.27 g/g για το αρχικό υδρόλυμα Άνθους Ορύζης στην καλλιέργεια μας (άνω πίνακας 8.), με βάση τις τιμές συνολικού αζώτου (Total Kjeldahl Nitrogen) που γνωρίζαμε για το συγκεκριμένο υδρόλυμα από ερευνητικές μελέτες των εργαστηρίων μας.

Παρόμοιες συγκεντρώσεις μικροβιακού λίπους καταγράφεται στην βιβλιογραφία (Zhao et al., 2010) με ημισυνεχής καλλιέργεια (Fed-Batch) σε αντιδραστήρα συνολικού όγκου 15 L του *Rhodospiridium toruloides* επί υδρολύματος Κονδυλώδη Ηλίανθου (*Helianthus tuberosus*) σε αρχικό λόγο C/N 42 g/g. Ειδικότερα, στις 120 h της ημισυνεχούς καλλιέργειας καταγράφεται συγκέντρωση μικρ. λίπους 45.4 g/L όταν η τεχνική Fed έγινε με υδρόλυμα Κονδυλώδη Ηλίανθου (C/N 42 g/g). Αντιθέτως, όταν εφαρμόστηκε το ίδιο πείραμα ξανά

αλλά η τεχνική Fed έγινε με προσθήκη με εκχύλισμα Κονδυλώδη Ηλίανθου (C/N 18 g/g), καταγράφεται τελική συγκέντρωση μικρ. λίπους 39.6 g/L στις 120 h.

Επίσης, σε ημισυνεχής καλλιέργεια του ελαιογόνου μύκητα *Mortierella isabellina* σε βιοαντιδραστήρα συνολικού όγκου 2 L επί γλυκόζης καταγράφεται μέγιστη συγκέντρωση μικροβιακού λίπους 31.3 g/L, με αρχικό λόγο C/N 33.4 g/g για το αρχικό υπόστρωμα.

Από τα προαναφερόμενα τις παρούσης παραγράφου, προκύπτει ότι τα αποτελέσματα της παρούσης ερευνητικής μελέτης συμβαδίζουν με την βιβλιογραφία (Hiruta et al., 1997; Zhao et al., 2011), όπως αναγράφεται στο άνω πίνακα 8.

Θα πρέπει να αναφερθεί ότι, η ημισυνεχής καλλιέργεια των κυτάρων ελαιογόνου ζυμομύκητα *Rhodospiridium toruloides* σε γλυκόζη με βιοαντιδραστήρες συνολικού όγκου 15 L έχει αποδώσει πολύ υψηλές συγκεντρώσεις μικροβιακού λίπους της τάξεως 61.4 – 76.1 g/L (Li et al., 2007; Zhao et al., 2011; Jin et al., 2012), με αρχικό λόγο C/N να κυμαίνεται σε 60- 63 g/g .

Στο ακόλουθο κεφάλαιο αποδίδεται η μοντελοποίηση των δεδομένων μας για τις ζυμώσεις.

4. ΜΟΝΤΕΛΟΠΟΙΗΣΗ

4.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Με βάση τα πειραματικά αποτελέσματα της παρούσας μελέτης είδαμε ότι, αρχικά τα ελαιογόνα κύτταρα του ζυμομύκητα *Rhodosporidium toruloides* κατά την ασυνεχής καλλιέργεια εισέρχονται στην φάση της μικροβιακής ανάπτυξης. Στο στάδιο αυτό παρατηρήσαμε ότι η αύξηση της βιομάζας των κυττάρων λαμβάνει χώρα μέχρι εξάντλησης των συγκεντρώσεων είτε του ελεύθερου αζώτου αμινοξέων (FAN), είτε του ανόργανου φωσφόρου (IP). Ενώ, είδαμε ότι κατά την φάση της μικροβιακής ανάπτυξης έχουμε απότομη μείωση του % διαλυτού οξυγόνου (DO%) στο υγρό της καλλιέργειας, γεγονός που πιθανότατα οφείλεται στην έντονη μεταβολική δραστηριότητα των κυττάρων κατά την παραγωγή βιομάζας στο στάδιο της μικροβιακής αύξησης.

Αντίστοιχα, μετά το στάδιο της μικροβιακής αύξησης, με βάση τα αποτελέσματα μας τα κύτταρα της ζύμης εισέρχονται στην φάση συσσώρευσης μικροβιακού λίπους. Η παραγωγή μικροβιακών λιπιδίων παρατηρείται κυρίως λόγω της εξάντλησης των διαθέσιμων συγκεντρώσεων ελεύθερου αζώτου αμινοξέων (FAN) στο υγρό της καλλιέργειας και ταυτόχρονα λόγω της προσθήκης γλυκόζης με την τεχνική FED. Έτσι, ο αυξημένος λόγος άνθρακα- αζώτου C/N αποτελεί κλειδί για την έναρξη συσσώρευσης λίπους στα μικροβιακά κύτταρα.

Για την μοντελοποίηση των αποτελεσμάτων μας, τόσο κατά το στάδιο της μικροβιακής αύξησης όσο και κατά το στάδιο παραγωγής του δευτερογενή μεταβολίτη (ενδοκυτταρικό μικροβιακό λίπος) χρησιμοποιήσαμε το λογισμικό πακέτο Matlab, σύμφωνα με την βιβλιογραφία (Kookos, 2004).

4.2. ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΑΝΑΠΤΥΞΗ

Κατά την μοντελοποίηση των πειραματικών αποτελεσμάτων για την φάση της μικροβιακής αύξησης (ασυνεχής καλλιέργεια), θεωρήσαμε ότι οι συγκεντρώσεις ελεύθερου αζώτου αμινοξέων & πεπτιδίων(FAN), ανόργανου φωσφόρου(IP) και το % διαλυτό οξυγόνο (DO) στο υγρό της καλλιέργειας αποτελούν τους πιθανούς περιοριστικούς παράγοντες της μικροβιακής αύξησης με βάση το πρότυπο του Monod.

Αρχικά χρησιμοποιήσαμε την εξίσωση του Monod για την μελέτη της επίδρασης κάθε περιοριστικού παράγοντα(FAN , IP & DO) στην μικροβιακή αύξηση, ξεχωριστά κάθε φορά. Με βάση τους ακόλουθους τύπους 12, 13 & 14(απλή Monod) (Shuler and Kargi, 2005):

$$\mu = \mu_{\max} \left[\frac{\text{FAN}}{(k_{fan} + \text{FAN})} \right] \quad (12)$$

$$\mu = \mu_{\max} \left[\frac{\text{IP}}{(k_{ip} + \text{IP})} \right] \quad (13)$$

$$\mu = \mu_{\max} \left[\frac{\text{DO}}{(k_{do} + \text{DO})} \right] \quad (14)$$

Όπου,

μ_{\max} μέγιστος ειδικός ρυθμός αύξησης κυττάρων, εκφράζει την μέγιστη παραγόμενη βιομάζα ανά μονάδα βιομάζας και ώρας, h^{-1} (αναφέρεται στην εκθετική φάση ανάπτυξης των κυττάρων)

IP συγκέντρωση Ανόργανου Φωσφόρου στο θρεπτικό μέσο της καλλιέργειας, mg/L

FAN συγκέντρωση Ελεύθερου αζώτου Αμινοξέων& Πεπτιδίων(FAN) στο θρεπτικό μέσο της καλλιέργειας, mg/L

DO διαλυτό οξυγόνο στο θρεπτικό μέσο της καλλιέργειας και εκφράζει τον % βαθμό κορεσμού της καλλιέργειας σε διαλυτό οξυγόνο, %

k_{fan} σταθερά κορεσμού για την συγκέντρωση Ελεύθερου αζώτου Αμινοξέων& Πεπτιδίων(FAN) στο θρεπτικό μέσο της καλλιέργειας, mg/L

k_{ip} σταθερά κορεσμού για την συγκέντρωση ανόργανου φωσφόρου στο θρεπτικό μέσο της καλλιέργειας, mg/L

k_{do} σταθερά κορεσμού για το % διαλυτό οξυγόνο στο θρεπτικό μέσο της καλλιέργειας, %

Ενώ, για την μείωση της συγκέντρωσης της γλυκόζης και για την παραγωγή βιομάζας σε ασυνεχή καλλιέργεια χρησιμοποιήσαμε τους κάτω τύπους 16 & 17 (Αγγελής, 2007; Shuler and Kargi, 2005; Mosier and Ladisch, 2009):

$$\frac{dX}{dt} = \mu X \quad (16)$$

$$\frac{dS}{dt} = - \left(\frac{\mu}{Y_{XS}} + m_s \right) X \quad (17)$$

Όπου,

X συγκέντρωση βιομάζας (Total Dry Weight, TDW) στη καλλιέργεια, g/L

t χρόνος καλλιέργειας, h

μ ειδικός ρυθμός αύξησης κυττάρων, εκφράζει την παραγόμενη βιομάζα ανά μονάδα βιομάζας και ώρας, h^{-1}

S συγκέντρωση γλυκόζης στο θρεπτικό μέσο της καλλιέργειας, g/L

Y_{XS} συντελεστής απόδοσης βιομάζας, εκφράζει την παραγόμενη βιομάζα (X) ανά μονάδα γλυκόζης, g/g

m_s ενέργεια συντηρήσεως των κυττάρων, εκφράζει την καταναλισκόμενη γλυκόζη ανά μονάδα βιομάζας και ανά ώρα, g/(g h)

Όμως, οι λύσεις που λαμβάναμε από το μοντέλο με την χρήση της κλασικής εξίσωσης Monod για κάθε περιοριστικό παράγοντα (ξεχωριστά) έδειξαν αρκετά μεγάλη απόκλιση από τα πειραματικά μας αποτελέσματα.

Το γεγονός αυτό μας οδήγησε να χρησιμοποιήσαμε την διπλή εξίσωση για το πρότυπο Monod με στόχο την μελέτη της συνεργιστικής επίδρασης των περιοριστικών παραγόντων στην φάση της μικροβιακής αύξησης ανα ζεύγη με την κάτωθι (διπλή Monod) (Bader, 1978; Dutta, 2008; Λυμπεράτος και Παύλου, 2011):

$$\mu = \mu_{\max} \left[\frac{FAN}{(k_{fan} + FAN)} \right] \left[\frac{IP}{(k_{ip} + IP)} \right] \quad (18)$$

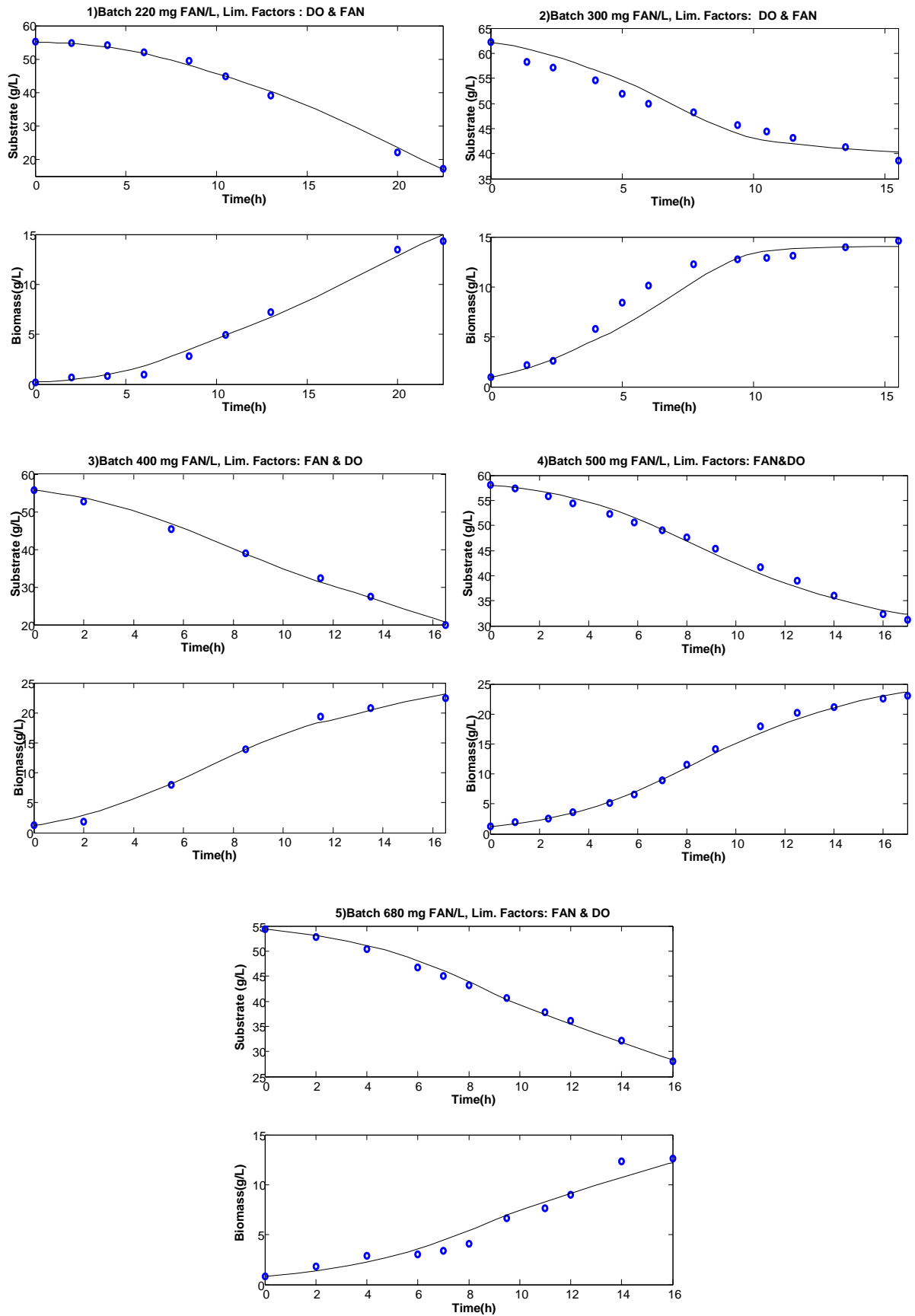
$$\mu = \mu_{\max} \left[\frac{FAN}{(k_{fan} + FAN)} \right] \left[\frac{DO}{(k_{do} + DO)} \right] \quad (19)$$

$$\mu = \mu_{\max} \left[\frac{IP}{(k_{ip} + IP)} \right] \left[\frac{DO}{(k_{do} + DO)} \right] \quad (20)$$

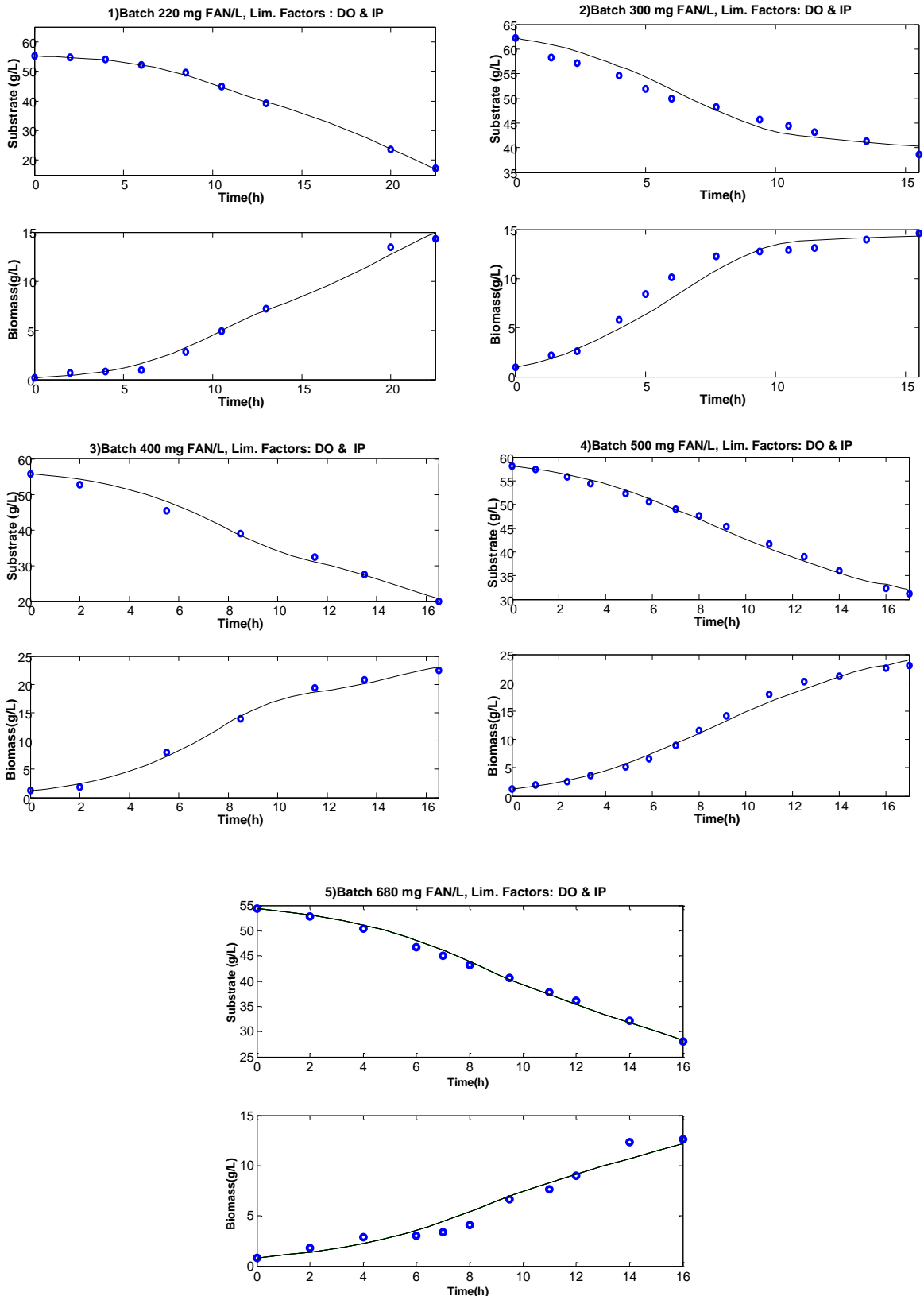
Ομοίως, για την μεταβολή της συγκέντρωσης της γλυκόζης και την παραγωγή βιομάζας χρησιμοποιήσαμε τους τύπους 16 & 17, που ήδη παραθέσαμε και εξηγήσαμε στην παρούσα παράγραφο.

Εφαρμόζοντας την διπλή εξίσωση για το πρότυπο Monod στη δημιουργία του μοντέλου, είδαμε ότι χρησιμοποιώντας τα ακόλουθα ζεύγη: Α) % διαλυτό οξυγόνο(DO)- συγκέντρωση ελεύθερου αζώτου Αμινοξέων & Πεπτιδίων(FAN) και Β) % διαλυτό οξυγόνο(DO)- συγκέντρωση ανόργανου φωσφόρου (IP) λάβαμε λύσεις με πολύ μικρή απόκλιση από τα πειραματικά μας αποτελέσματα. Αντιθέτως, χρησιμοποιώντας το ζεύγος συγκέντρωση ελεύθερου αζώτου Αμινοξέων & Πεπτιδίων(FAN)- συγκέντρωση ανόργανου φωσφόρου (IP), λάβαμε λύσεις με αρκετά μεγάλη απόκλιση από τα πειραματικά μας αποτελέσματα.

Εν συνεχεία, στα κάτωθι γραφήματα 30. & 31. δίδονται οι βέλτιστες λύσεις του πειραματικού μοντέλου για την μελέτη των περιοριστικών παραγόντων DO- FAN & DO- IP ανα ζεύγος.



Γράφημα 30. Κινητική Βιομάζας & γλυκόζης κατά την μικροβιακή αύξηση. --- Λύσεις Μοντέλου (DO- FAN), ○ Πειραματικές τιμές συγκέντρωσης γλυκόζης (Substrate) και βιομάζας (biomass) σε όλες τις σειρές πειραμάτων 1^η 220 mgFAN/L, 2^η 300 mgFAN/L, 3^η 400 mgFAN/L, 4^η 500 mgFAN/L & 5^η 682 mgFAN/L



Γράφημα 31. Κινητική Βιομάζας & γλυκόζης κατά την μικροβιακή αύξηση. --- Λύσεις Μοντέλου (DO- IP), **○** Πειραματικές τιμές συγκέντρωσης γλυκόζης (Substrate) και βιομάζας (biomass) σε όλες τις σειρές πειραμάτων 1^η 220 mgFAN/L, 2^η 300 mgFAN/L, 3^η 400 mgFAN/L, 4^η 500 mgFAN/L & 5^η 682 mgFAN/L

Πίνακας 9. Παράθεση Μεταβλητών ($Y_{x/s}$, μ_{max} , m_s , k_{fan} , k_{do} & k_{ip}) που λάβαμε από την επίλυση του Μοντέλου, μελετώντας την επίδραση των περιοριστικών παραγόντων ανα ζεύγη επί της μικροβιακής αύξησης.

Πειραματικά Δεδομένα			Μοντέλο		
Σειρά Πειραμάτων	Πειραματικές Σταθερές- Αρχικές Συνθήκες		Σταθερές Μοντέλου	DO- FAN	DO- IP
1 ^η	$Y_{x/s}$ (g/g)	0.422	$Y_{x/s}$ (g/g)	0.5288	0.5271
	μ_{max} (h ⁻¹)	0.205	μ_{max} (h ⁻¹)	0.5992	0.5424
	FAN (mg/L)	219.76	m_s [g/(g h)]	0.0742	0.0743
	Glu (g/L)	55.14	k_{fan} (mg/L)	90.2093	-
			k_{do} (mg/L)	0.2255	0.0203
			k_{ip} (mg/L)	-	38.9890
2 ^η	$Y_{x/s}$ (g/g)	0.673	$Y_{x/s}$ (g/g)	0.7022	0.7155
	μ_{max} (h ⁻¹)	0.453	μ_{max} (h ⁻¹)	0.8000	0.7998
	FAN (mg/L)	294.34	m_s [g/(g h)]	0.0230	0.0260
	Glu (g/L)	62.21	k_{fan} (mg/L)	78.3491	-
			k_{do} (mg/L)	1.9707	1.6215
			k_{ip} (mg/L)	-	43.7729
3 ^η	$Y_{x/s}$ (g/g)	0.693	$Y_{x/s}$ (g/g)	0.9008	0.9006
	μ_{max} (h ⁻¹)	0.310	μ_{max} (h ⁻¹)	0.8000	0.7998
	FAN (mg/L)	397.52	m_s [g/(g h)]	0.0509	0.0525
	Glu (g/L)	55.76	k_{fan} (mg/L)	245.3300	-
			k_{do} (mg/L)	0.0079	0.0304
			k_{ip} (mg/L)	-	191.5232
4 ^η	$Y_{x/s}$ (g/g)	0.87	$Y_{x/s}$ (g/g)	0.9003	0.9002
	μ_{max} (h ⁻¹)	0.261	μ_{max} (h ⁻¹)	0.6608	0.5314
	FAN (mg/L)	491.77	m_s [g/(g h)]	0.0038	0.0034
	Glu (g/L)	58.06	k_{fan} (mg/L)	469.9840	-
			k_{do} (mg/L)	0	0.0961
			k_{ip} (mg/L)	-	114
5 ^η	$Y_{x/s}$ (g/g)	0.449	$Y_{x/s}$ (g/g)	0.4384	0.4381
	μ_{max} (h ⁻¹)	0.184	μ_{max} (h ⁻¹)	0.2703	0.2703
	FAN (mg/L)	682.06	m_s [g/(g h)]	0.0010	0.0010
	Glu (g/L)	54.35	k_{fan} (mg/L)	1.3200	-
			k_{do} (mg/L)	0.2612	0.2618
			k_{ip} (mg/L)	-	0.3990

Κατά την επίλυση του πειραματικού μοντέλου οι τιμές k_{do} δίδονται εκφρασμένες σε %. Η μετατροπή έγινε με βάση τον τύπο 8 στην σελίδα 65 την παρούσης μελέτης.

Από τον άνω πίνακα 9 παρατηρούμε ότι οι τιμές για τον συντελεστή απόδοσης βιομάζας $Y_{x/s}$ που προκύπτουν από την επίλυση του μοντέλου κινούνται σε ένα εύρος τιμών 0.4381-0.9 g/g. Αντίστοιχα, οι τιμές που έχουμε προσδιορίσει με υπολογισμούς από τα πειραματικά δεδομένα κινούνται σε ένα εύρος 0.422- 0.870 g/g, πολύ κοντά στις τιμές που μας δίδει το μοντέλο και σε συμφωνία με την βιβλιογραφία (Ratledge, 1982; Yoon et al., 1982; Li et al., 2007; Waites et al., 2007).

Επιπροσθέτως, οι τιμές για τον μέγιστο ειδικό ρυθμό αύξησης (μ_{max}) των κυττάρων που προκύπτουν από την επίλυση του μοντέλου βρίσκονται σε ένα εύρος τιμών 0.27- 0.8 h^{-1} , ενώ από τα πειραματικά δεδομένα υπολογίσαμε τιμές ειδικού ρυθμού αύξησης με εύρος 0.184-0.453 h^{-1} . Θα πρέπει να αναφέρουμε ότι οι τιμές που μας δίδει το μοντέλο είναι ελαφρώς πιο αυξημένες με το εύρος τιμών που βρήκαμε στην βιβλιογραφία 0.13 - 0.6 h^{-1} για τον ειδικό ρυθμό αύξησης των ζυμών (Meester et al., 1996; Papanikolaou and Aggelis, 2002; Αγγελής, 2007; Li et al., 2007; Wiebe, 2012).

Η Ενέργεια συντηρήσεως (m_s) των κυττάρων *Rhodospiridium toruloides* σε συνεχή καλλιέργεια επί γλυκόζης έχει υπολογιστεί σε 0.0057 $g_{γλυκόζης} / (g_{ζύμης} h)$ με βάση τη βιβλιογραφία (Shen et al., 2013). Επίσης, σε ζύμωση ζύθου με την ζύμη *Saccharomyces cerevisiae* υπολογισμοί έδειξαν ότι η ενέργεια συντηρήσεως (m_s) των κυττάρων ήταν 0.06 - 0.0748 $g_{γλυκόζης} / (g_{ζύμης} h)$ (Searle and Kirsop, 1979). Ενώ, θα πρέπει να αναφέρουμε ότι σε άλλες πειραματικές μελέτες η ενέργεια συντηρήσεως των κυττάρων ζύμης *Rhodospiridium toruloides* σε ημισυνεχής καλλιέργεια επί λιγνοκυτταρινούχων υδρολυμάτων (πλούσια σε γλυκόζη) καταγράφει τιμές 0.007- 0.019 $g_{γλυκόζης} / (g_{ζύμης} h)$ (Mondala et al., 2012). Στην παρούσα μελέτη, οι λύσεις του μοντέλου δίδουν τιμές για την ενέργεια συντηρήσεως σε ένα εύρος 0.0010- 0.0743 $g_{γλυκόζης} / (g_{ζύμης} h)$, σε συμφωνία με την προαναφερόμενη βιβλιογραφία.

Παρατηρώντας τα γραφήματα 30 & 31 της παρούσης παραγράφου στις άνω σελίδες 110-111, βλέπουμε ότι η επίδραση των περιοριστικών παραγόντων ανα ζεύγη τόσο DO-FAN όσο και DO - IP δίδουν εξίσου μικρή απόκλιση των λύσεων του Μοντέλου από τις πειραματικές τιμές μας. Ειδικότερα, εστιάζοντας στον πίνακα 9 βλέπουμε ότι οι τιμές των σταθερών ($Y_{x/s}$, μ_{max} , m_s , k_{fan} , k_{do} & k_{ip}) που προκύπτουν από το μοντέλο δεν διαφέρουν σημαντικά μεταξύ τους, συγκρίνοντας τις τιμές των σταθερών που λαμβάνουμε από το μοντέλο για τα ζεύγη DO-FAN και DO - IP. Συνεπώς, το μοντέλο πιθανότατα δύναται να αξιοποιηθεί για την μελέτη της φάσης μικροβιακής αύξησης θεωρώντας ως περιοριστικό παράγοντα την συνεργιστική δράση είτε του ζεύγος DO-FAN είτε DO-IP, δεδομένου του ότι και για τις δύο περιπτώσεις λαμβάνουμε λύσεις με πολύ μικρή απόκλιση από τα πειραματικά μας αποτελέσματα.

Με βάση την βιβλιογραφία, σε παρόμοια ερευνητικές μελέτες όπου το οξυγόνο αποτελούσε περιοριστικό παράγοντα για την ανάπτυξη των κυττάρων οι τιμές της σταθεράς κορεσμού για το οξυγόνο ήταν 0.02 mg/L (Koutinas et al., 2003) και 0.014- 0.073 mg/L (Hao et al., 1983).

4.3. ΣΥΣΣΩΡΕΥΣΗ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΟΥ ΛΙΠΟΥΣ

Μετά την φάση μικροβιακής ανάπτυξης τα κύτταρα εισέρχονται στην φάση λιποσυσώρευσης, κυρίως λόγω της εξάντλησης των συγκεντρώσεων αζώτου στο μέσο της καλλιέργειας, όπως εξηγήσαμε στην εισαγωγή της παρούσης μελέτης. Από τα πειραματικά μας αποτελέσματα, είδαμε ότι η παραγωγή των μικροβιακών λιπιδίων παρατηρείται κυρίως μετά την ολοκλήρωση της μικροβιακής αύξησης. Θα λέγαμε ότι η παραγωγή του μικροβιακού λίπους είναι ανεξάρτητη της κυτταρικής αύξησης, δηλαδή το μικροβιακό λίπος είναι δευτερογενής μεταβολίτης και ο ρυθμός παραγωγής του δίδεται από τον κάτωθι τύπο 21. (Λυμπεράτος και Παύλου, 2011):

$$\frac{dL}{dt} = q_p X \quad (21)$$

Όπου,

L συγκέντρωση ενδοκυτταρικού μικροβιακού λίπους, g/L

t χρόνος, h

X βιομάζα άνευ λίπους(Residual Dry Weight), g/L

q_p ειδικός ρυθμός παραγωγής λίπους, εκφράζει το παραγόμενο ενδοκυτταρικό μικροβιακό λίπος ανά μονάδα βιομάζας άνευ λίπους και ανά ώρα, g/(g h)

Με βάση τον άνω τύπο 21. χρησιμοποιήσαμε τον ακόλουθο τύπο 22. για την μοντελοποίηση της παραγωγής του μικροβιακού λίπους, θέλοντας να εισάγουμε την μεταβολή της λιπο-περιεκτικότητας των κυττάρων κατά την διάρκεια λιποσυσώρευσης. Η λιπο-περιεκτικότητα των κυττάρων των κυττάρων ισούται με το πηλίκο της συγκέντρωσης λίπους(L) προς την συνολική βιομάζα(L+X). Στηριζόμενοι στα πειραματικά μας αποτελέσματα είδαμε ότι η λιπο-περιεκτικότητα των κυττάρων στην αρχή της ημισυνεχούς καλλιέργειας είναι πολύ μικρή της τάξεως του 0.01 g/g και λαμβάνει κατά κανόνα την μέγιστη τιμή 0.6 g/g κατά το τέλος της καλλιέργειας.

$$\frac{dL}{dt} = b \times \left[1 - \left(\frac{\left(\frac{L}{L+X} \right)}{\left(\frac{L}{L+X} \right)_{max}} \right)^n \right] \quad (22)$$

$$Mf_{max} = \left(\frac{L}{L+X} \right)_{max}$$

Όπου,

b ειδικός ρυθμός παραγωγής λίπους, εκφράζει το παραγόμενο ενδοκυτταρικό μικροβιακό λίπος ανά μονάδα βιομάζας άνευ λίπους και ανά ώρα, g/(g h)

n πραγματικός αριθμός άνευ μονάδων, συμβάλει στην ελαχιστοποίηση της απόκλισης των λύσεων που μας δίδει το μοντέλο συγκριτικά με τα πειραματικά μας αποτελέσματα.

Mf_{max} μέγιστη λιπο-περιεκτικότητα των κυττάρων, εκφράζει την ποσότητα ενδοκυτταρικού μικροβιακού λίπους ανα μονάδα βιομάζας, g/g

Για την μοντελοποίηση της μεταβολή της συγκέντρωσης της γλυκόζης κατά την φάση λιποσυσσώρευσης χρησιμοποιήθηκε ο κάτωθι τύπος 23.:

$$\frac{dS}{dt} = - \left(\frac{1}{Y_{LS}} \right) \frac{dL}{dt} \quad (23)$$

Όπου,

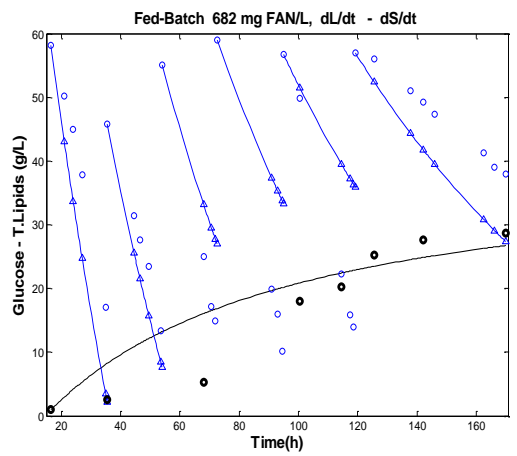
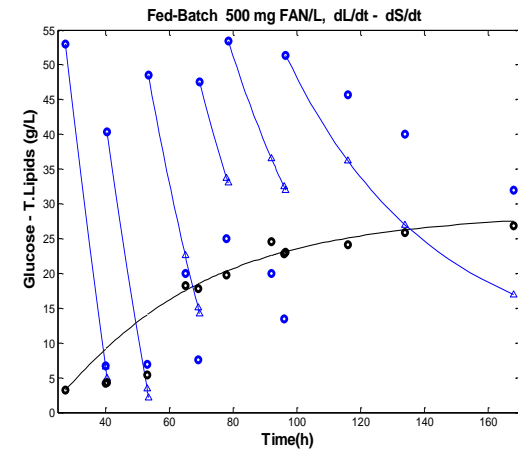
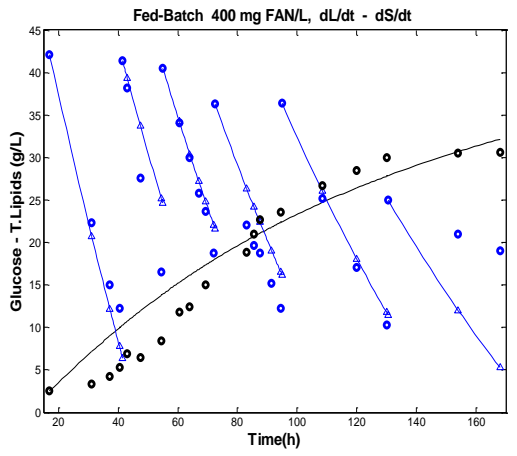
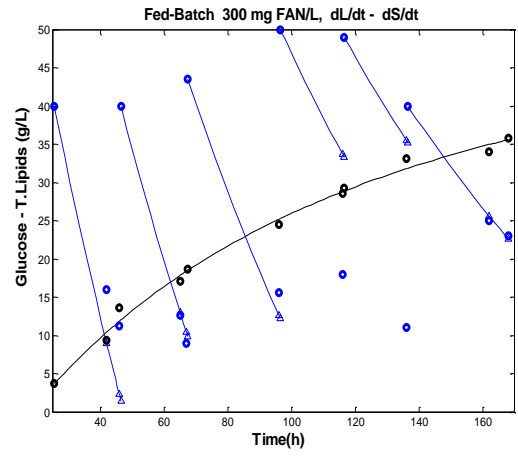
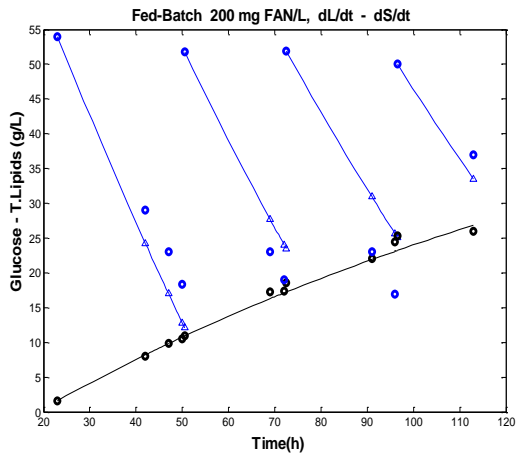
L συγκέντρωση ενδοκυτταρικού μικροβιακού λίπους, g/L

t χρόνος, h

S συγκέντρωση γλυκόζης, g/L

Y_{LS} συντελεστής απόδοσης ενδοκυτταρικού μικροβιακού λίπους ανα μονάδα γλυκόζης, εκφράζει την καταναλισκόμενη γλυκόζη(s) ανα μονάδα μικροβιακού λίπους(L), g/g

Στο ακόλουθο γράφημα 32 δίδονται οι βέλτιστες λύσεις του πειραματικού μοντέλου για το στάδιο λιποσυσσώρευσης των κυττάρων, σχετικά με την μεταβολή της συγκέντρωσης της γλυκόζης και την παραγωγή του ενδοκυτταρικού μικροβιακού λίπους(Total Lipids).



Γράφημα 32. Κινητική Φάσης Λιποσυσσώρευσης. Λύσεις Μοντέλου: ----- συγκέντρωση μικροβιακού λίπους(Total Lipids), ----- συγκέντρωση γλυκόζης (Glucose). Πειραματικές τιμές: ○ συγκέντρωση μικροβιακού λίπους(Total Lipids), ○ συγκέντρωση γλυκόζης(Glucose) για όλες τις σειρές πειραμάτων 1^η 220 mg FAN/L, 2^η 300 mg FAN/L, 3^η 400 mg FAN/L, 4^η 500 mg FAN/L & 5^η 682 mg FAN/L

Πίνακας 10. Παράθεση Μεταβλητών (b , n , Y_{LS} , Mf_{max}) που λάβαμε από την επίλυση του Μοντέλου για την φάση λιποσυσσώρευσης των κυττάρων

Πειραματικά Δεδομένα			Μοντέλο	
Σειρά Πειραμάτων	Σταθερές Λιποσυσσώρευσης		Σταθερές Μοντέλου	
1 ^η	Y_{LS} (g/g)	0.209	Y_{LS} (g/g)	0.0698
	Mf_{max} (g/g)	0.648	Mf_{max} (g/g)	0.9403
	Αρχ. Συνθήκες (Batch): 219.76 mg FAN/L, 55.14 g Glu /L		b [g/(g h)]	0.0256
			n	2.3996
2 ^η	Y_{LS} (g/g)	0.220	Y_{LS} (g/g)	0.0698
	Mf_{max} (g/g)	0.647	Mf_{max} (g/g)	0.7233
	Αρχ. Συνθήκες (Batch): 294.34 mg FAN/L, 62.21 g Glu /L		b [g/(g h)]	0.0233
			n	2.3996
3 ^η	Y_{LS} (g/g)	0.230	Y_{LS} (g/g)	0.0535
	Mf_{max} (g/g)	0.600	Mf_{max} (g/g)	0.6944
	Αρχ. Συνθήκες (Batch): 397.52 mg FAN/L, 55.76 g Glu /L		b [g/(g h)]	0.0163
			n	2.3996
4 ^η	Y_{LS} (g/g)	0.230	Y_{LS} (g/g)	0.0535
	Mf_{max} (g/g)	0.491	Mf_{max} (g/g)	0.5063
	Αρχ. Συνθήκες (Batch): 491.77 mg FAN/L, 58.06 g Glu /L		b [g/(g h)]	0.0186
			n	2.3996
5 ^η	Y_{LS} (g/g)	0.191	Y_{LS} (g/g)	0.0698
	Mf_{max} (g/g)	0.689	Mf_{max} (g/g)	0.7233
	Αρχ. Συνθήκες (Batch): 682.06 mg FAN/L, 54.35 g Glu /L		b [g/(g h)]	0.0349
			n	1.9196
Glu: γλυκόζη, FAN: Ελεύθερο άζωτο Αμινοξέων & Πεπτιδίων				

Από τον άνω πίνακα 10. παρατηρούμε ότι οι τιμές που μας δίνει το Μοντέλο για τον ειδικό ρυθμό παραγωγής μικροβιακού λίπους των κυττάρων κινείται σε ένα εύρος τιμών 0.0163-0.0349 g/(g h). Έρευνες έδειξαν ότι σε συνεχής καλλιέργεια της ελαιογόνου ζύμης *Rhodospiridium toruloides* ο μέγιστος ειδικός ρυθμός παραγωγής λίπους υπολογίστηκε σε 0.058 g/(g h) (Shen, 2013).

Ενώ, σε συνεχής καλλιέργεια της ελαιογόνου ζύμης *Rhodotorula gracilis* σε υπόστρωμα με περιορισμό σε άζωτο και έχοντας ως πηγή άνθρακα τη γλυκόζη, ο μέγιστος ειδικός ρυθμός παραγωγής λίπους υπολογίστηκε σε 0.012 g/(g h) (Choi et al., 1982). Επίσης σε καλλιέργεια της ζύμης *Candida sp.* επί γλυκόζης υπολογίστηκε ειδικός ρυθμός παραγωγής λίπους 0.03

g/(g h) (Gill et al., 1977). Επιπροσθέτως, μελέτες έδειξαν ότι κατά την καλλιέργεια του μύκητα *Mucor circinelloides* σε ηλιέλαιο παρατηρήσαμε συσσώρευση μικροβιακού λίπους στα κύτταρα, στα οποία ο ειδικός ρυθμός παραγωγής λίπους υπολογίστηκε σε 0.06 g/(g h) (Aggelis and Sourdis, 1997).

Από το άνω πίνακα 10., παρατηρούμε ότι οι τιμές για το συντελεστή απόδοσης λίπους σε σχέση με την γλυκόζη $Y_{L/S}$ που μας δίδει το μοντέλο (0.0535- 0.0698 g/g) είναι μικρότερες από τις πειραματικές (0.191- 0.23 g/g). Ερευνητικές εργασίες έχουν δείξει ότι για το συντελεστή $Y_{L/S}$ οι τιμές συνήθως κυμαίνονται σε ένα εύρος 0.14- 0.24 g/g για τους ελαιογόνους μικροοργανισμούς (Gill et al., 1977; Granger et al., 1993; Li et al., 2006; 2007; Zhao et al., 2011; Wu et al., 2011; Wiebe et al., 2012; Shen et al., 2013). Ενώ, η βιβλιογραφία αναφέρει ότι η μέγιστη θεωρητική τιμή για τον συντελεστή $Y_{L/S}$ για ελαιογόνα κύτταρα είναι 0.32- 0.33 g/g (Ratledge, 1988; Ratledge and Wynn, 2002).

Θα πρέπει να αναφέρουμε ότι η μέγιστη λιπο-περιεκτικότητα των κυττάρων ($M_{f_{max}}$) προσεγγίζεται αρκετά καλά από το Μοντέλο, στηριζόμενοι στον πίνακα 10. Με εξαίρεση την 1^η σειρά πειραμάτων στην οποία εμφανίζεται ελαφρά αυξημένη. Γενικότερα για την μέγιστη λιπο-περιεκτικότητα των ελαιογόνων κυττάρων γνωρίζουμε από την βιβλιογραφία ότι δύναται να κυμαίνεται σε ένα εύρος τιμών 0.7- 0.85 g/g (Aggelis et al., 1990; Ratledge, 1994; 2002; 2004; Ratledge and Cohen, 2008; Certik and Shimizu, 1999; Αγγελής, 2007; Papanikolaou et al., 2007; Papanikolaou and Aggelis, 2011; Ageitos et al., 2011).

5. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Πίνακας Π.5.1. Δεδομένα Κινητικής συγκεντρώσεων Γλυκόζης και FAN κατά την Υδρόλυση Άνθους Ορύζης, χωρίς απομάκρυνση των στερεών της ζύμωσης στερεής κατάστασης- (Γράφημα 4. Παράγραφος 3.1.)

Χρόνος Υδρόλυσης (h)	Συγκέντρωση Γλυκόζης (g/L)	Συγκέντρωση FAN (mg/L)
0	3	28
1	36	121
2	68	244
4	109	392
6	124	497
10	139	583
18	159	719
24	171	798

Παράμετροι Υδρόλυσης: θερμοκρασία 55 °C, διάρκεια 24h, με φυσική μη ρυθμισμένη τιμή pH 5.5(σταθερή) και συγκέντρωση Άνθους Ορύζης 234 g/L

Πίνακας Π.5.2. Δεδομένα Κινητικής Συγκεντρώσεων Διαλυτού οξυγόνο(DO), Γλυκόζης(Glu), Ελεύθερου Αζώτου Αμινοξέων & Πεπτιδίων(FAN), Ανόργανου Φωσφόρου(IP), Ολικού Ξηρού Βάρους-Βιομάζα (TDW), Ολικού ενδοκυτταρικού μικροβιακού λίπους(TL), Ολικού Ξηρού Βάρους άνευ Λίπους(RDW) και συντελεστής απόδοσης παραγωγής ενδοκυτταρικού λίπους προς την παραγωγή βιομάζας ($Y_{TL/TDW}/Y_{LX}$) κατά την ασυνεχής & ημισυνεχής υγρή καλλιέργεια του ζυμομύκητα *Rhodospiridium toruloides* σε υδρόλυμα Άνθους Ορύζης με αρχική συγκέντρωση γλυκόζης **55.14 g/L** και ελεύθερου αζώτου (αμινοξέων & πεπτιδίων) **FAN 219.76 mg/L** - (Γραφήματα 5.- 7.- 8. Παράγραφοι 3.2.1.-3.2.2.)

DO (%)	Time (h)	Glu (g/L)	FAN (mg/L)	IP (mg/L)	TDW (g/L)	TL (g/L)	RDW (g/L)	$Y_{TL/TDW}$ (g/g)
93.3	0.0	55.14	219.76	104.52	0.20			
54.0	2.0	54.79	217.02	81.64	0.67			
19.3	4.0	54.08	174.24	63.07	0.83			
16.0	6.0	52.14	132.02	50.24	0.98			
14.0	8.5	49.58	64.01	33.78	2.84			
11.7	10.5	44.72	35.50	20.15	4.95			
10.0	13.0	39.12	29.47	8.24	7.21			
8.2	20.0	23.60	17.95	6.62	13.50			
7.5	22.5	17.30	11.37	4.40	14.31			
15.0	23.0	54.00	12.27		15.72	1.60	14.12	0.102
25.2	42.0	29.00	13.11		23.40	7.96	14.44	0.340
25.1	47.0	23.00	13.46		24.75	9.88	14.87	0.399
26.2	50.0	18.40	13.11		25.50	10.50	15.00	0.412
26.2	50.5	51.80	12.27	5.12	25.60	11.00	14.60	0.430
26.7	69.0	23.00	12.27		32.40	17.30	15.10	0.534
26.2	72.0	19.00			33.75	17.40	16.35	0.516
26.2	72.5	51.90			34.80	18.60	16.20	0.534
28.1	91.0	23.00	12.29	5.20	38.20	22.10	16.10	0.579
25.4	96.0	16.90			40.80	24.40	16.40	0.598
25.4	96.5	50.00			42.65	25.30	17.35	0.593
15.0	113.0	37.00			43.34	26.00	17.34	0.600

Πίνακας Π.5.3. Δεδομένα Κινητικής Συγκεντρώσεων Διαλυτού οξυγόνο(DO), Γλυκόζης(Glu), Ελεύθερου Αζώτου Αμινοξέων & Πεπτιδίων(FAN), Ανόργανου Φωσφόρου(IP), Ολικού Ξηρού Βάρους-Βιομάζα (TDW), Ολικού ενδοκυτταρικού μικροβιακού λίπους(TL), Ολικού Ξηρού Βάρους άνευ Λίπους(RDW) και συντελεστής απόδοσης παραγωγής ενδοκυτταρικού λίπους προς την παραγωγή βιομάζας ($Y_{TL/TDW}/Y_{LX}$) κατά την ασυνεχής & ημισυνεχής υγρή καλλιέργεια του ζυμομύκητα *Rhodosporidium toruloides* σε υδρόλυμα Άνθους Ορύζης με αρχική συγκέντρωση **γλυκόζης 62.21 g/L** και ελεύθερου αζώτου (αμινοξέων & πεπτιδίων) **FAN 294.34 mg/L** - (Γραφήματα 9.- 11.- 12. Παράγραφοι 3.2.3.- 3.2.4.)

DO (%)	Time (h)	Glu (g/L)	FAN (mg/L)	IP (mg/L)	TDW (g/L)	TL (g/L)	RDW (g/L)	$Y_{TL/TDW}$ (g/g)
98.8	0.00	62.21	294.34	137.44	0.96			
60.9	1.38	58.32	274.05	127.99	2.20			
49.3	2.38	57.09	231.82	121.63	2.60			
19.0	3.99	54.61	209.34	93.66	5.82			
20.0	5.00	51.88	189.05	81.34	8.40			
18.0	6.00	49.93	157.24	63.87	10.16			
16.0	7.73	48.25	82.66	27.83	12.26			
10.2	9.40	45.69	48.66	20.66	12.76			
2.0	10.52	44.45	32.01	15.61	12.90			
1.5	11.52	43.13	22.41	12.42	13.14			
1.1	13.52	41.27	11.72	10.15	13.96			
0.1	15.52	38.54	11.07	10.45	14.60			
24.5	17.00	36.00			16.50	0.98	15.52	0.059
23.2	22.00	26.00			19.00	1.14	17.86	0.060
17.8	25.00	19.00			23.00	3.70	19.30	0.161
24.6	25.50	40.00			23.22	3.72	19.50	0.160
26.1	42.00	16.00			29.00	9.40	19.60	0.324
25.8	46.00	11.20			33.20	13.60	19.60	0.410
19.8	46.50	40.00						
15.6	65.00	12.60			35.20	17.12	18.08	0.486
15.6	67.00	9.00						
16.0	67.50	43.50	11.52	10.80	37.80	18.62	19.18	0.493
16.0	96.00	15.60			46.60	24.46	22.14	0.525
15.7	96.50	50.00						
12.9	116.0	18.00			51.00	28.60	22.40	0.561
9.8	116.50	49.00			52.20	29.30	22.90	0.561
11.5	136.00	11.00			59.20	33.10	26.10	0.559
11.2	136.50	40.00	11.05	11.32				
11.7	162.00	25.00			60.00	34.00	26.00	0.567
13.8	162.50							
15.0	168.00	23.00			62.40	35.80	26.60	0.574

Πίνακας Π.5.4. Δεδομένα Κινητικής Συγκεντρώσεων Διαλυτού οξυγόνο(DO), Γλυκόζης(Glu), Ελεύθερου Αζώτου Αμινοξέων & Πεπτιδίων(FAN), Ανόργανου Φωσφόρου(IP), Ολικού Ξηρού Βάρους-Βιομάζα (TDW), Ολικού ενδοκυτταρικού μικροβιακού λίπους(TL), Ολικού Ξηρού Βάρους άνευ Λίπους(RDW) και συντελεστής απόδοσης παραγωγής ενδοκυτταρικού λίπους προς την παραγωγή βιομάζας ($Y_{TL/TDW}/Y_{LX}$) κατά την ασυνεχής & ημισυνεχής υγρή καλλιέργεια του ζυμομύκητα *Rhodosporidium toruloides* σε υδρόλυμα Άνθους Ορύζης με αρχική συγκέντρωση **γλυκόζης 55.76 g/L** και ελεύθερου αζώτου (αμινοξέων & πεπτιδίων) **FAN 397.52 mg/L** - (Γραφήματα 13-15-16. Παράγραφοι 3.2.5.- 3.2.6.)

DO (%)	Time (h)	Glu (g/L)	FAN (mg/L)	IP (mg/L)	TDW (g/L)	TL (g/L)	RDW (g/L)	$Y_{TL/TDW}$ (g/g)
83.5	0.00	55.76	397.52	159.25	1.21			
52.1	2.00	52.67	204.75	142.69	1.88			
18.5	5.50	45.43	92.88	104.16	7.97			
0.9	8.50	38.89	50.65	66.85	13.90			
0.1	11.50	32.44	32.01	28.64	19.37			
0.4	13.50	27.50	20.22	26.62	20.80			
1.1	16.50	20.00	11.17	12.30	22.47	1.30	21.17	0.058
5.5	17.00	42.09	11.34		22.90	2.50	20.40	0.109
12.0	31.15	22.28	11.26		24.00	3.36	20.64	0.140
5.0	37.23	15.00	12.16		25.00	4.20	20.80	0.168
8.0	40.48	12.25	12.03		26.00	5.30	20.70	0.204
1.4	41.50	41.40	12.85	12.00				
8.2	43.06	38.21	11.60		27.60	6.88	20.72	0.249
4.0	47.48	27.61	11.23		29.42	6.42	23.00	0.218
2.5	54.48	16.54	12.04		34.40	8.46	25.94	0.246
3.0	54.98	40.52	10.94					
10.5	60.48	34.06	12.36	11.73	36.00	11.84	24.16	0.329
7.2	64.03	30.00			38.60	12.42	26.18	0.322
11.0	67.03	25.81						
7.0	69.36	23.69			40.60	14.98	25.62	0.369
5.5	72.06	18.80						
6.4	72.56	36.28						
5.4	83.06	22.02			42.00	18.88	23.12	0.450
14.8	85.47	19.67			44.00	21.00	23.00	0.477
9.3	87.47	18.75			45.40	22.70	22.70	0.500
14.1	91.47	15.17						
10.9	94.47	12.21			46.20	23.54	22.66	0.510
10.4	94.97	36.37						
9.6	108.47	25.14	11.81	12.30	50.00	26.72	23.28	0.534
10.5	120.00	17.02			54.00	28.50	25.50	0.528
11.2	130.00	10.27			56.00	30.00	26.00	0.536
8.4	130.50	25.00						
10.3	154.00	21.00			58.00	30.50	27.50	0.526
12.6	168.00	19.00			58.50	30.60	27.90	0.523

Πίνακας Π.5.5. Δεδομένα Κινητικής Συγκεντρώσεων Διαλυτού οξυγόνο(DO), Γλυκόζης(Glu), Ελεύθερου Αζώτου Αμινοξέων & Πεπτιδίων(FAN), Ανόργανου Φωσφόρου(IP), Ολικού Ξηρού Βάρους-Βιομάζα (TDW), Ολικού ενδοκυτταρικού μικροβιακού λίπους(TL), Ολικού Ξηρού Βάρους άνευ Λίπους(RDW) και συντελεστής απόδοσης παραγωγής ενδοκυτταρικού λίπους προς την παραγωγή βιομάζας ($Y_{TL/TDW}/Y_{LX}$) κατά την ασυνεχής & ημισυνεχής υγρή καλλιέργεια του ζυμομύκητα *Rhodosporidium toruloides* σε υδρόλυμα Άνθους Ορύζης με αρχική συγκέντρωση γλυκόζης 58.06 g/L και ελεύθερου αζώτου (αμινοξέων & πεπτιδίων) FAN 491.77 mg/L - (Γραφήματα 17-19-20.. Παράγραφοι 3.2.7.- 3.2.8.)

DO (%)	Time (h)	Glu (g/L)	FAN (mg/L)	IP (mg/L)	TDW (g/L)	TL (g/L)	RDW (g/L)	$Y_{TL/TDW}$ (g/g)
91.0	0.00	58.06	491.77	250.12	1.20			
59.9	1.00	57.44	464.89	239.22	2.00			
40.1	2.37	55.85	403.47	205.09	2.60			
17.0	3.37	54.44	373.86	168.38	3.60			
16.4	4.87	52.23	332.18	129.50	5.20			
14.6	5.87	50.64	294.89	104.97	6.60			
12.1	7.00	49.05	226.89	73.37	9.00			
11.1	8.00	47.55	181.37	60.73	11.60			
10.1	9.17	45.34	137.50	48.65	14.20			
3.8	11.00	41.72	78.82	37.02	18.00			
2.3	12.50	38.98	58.33	33.38	20.20			
1.9	14.00	36.06	41.06	29.75	21.20			
0.2	16.00	32.35	27.93	27.65	22.60			
4.3	17.00	31.20			24.80	1.80	23.00	0.073
2.3	22.00	21.60						
4.5	27.00	10.50			30.40	2.40	28.00	0.079
5.6	27.50	52.98	14.00	13.00				
5.5	40.00	6.70	13.80		40.00	4.20	35.80	0.105
4.5	40.50	40.30	12.80		43.30	4.30	39.00	0.099
5.6	53.00	6.90	14.80		45.20	5.40	39.80	0.119
5.2	53.50	48.50	14.10	12.60				
4.3	65.00	20.00	12.70		55.10	18.20	36.90	0.330
3.6	69.00	7.60	14.20		54.60	17.80	36.80	0.326
5.4	69.50	47.50	13.30					
6.3	78.00	25.00	14.90		54.30	19.80	34.50	0.365
5.9	78.50	53.40	15.00	13.30				
5.9	92.00	20.00	14.06		58.60	24.55	34.05	0.419
5.9	96.00	13.50			56.80	22.80	34.00	0.401
5.9	96.50	51.40			56.70	23.00	33.70	0.406
5.9	116.00	45.70	14.50	12.10	56.90	24.10	32.80	0.411
5.6	134.00	40.00			62.20	25.90	36.30	0.416
5.7	134.50							
5.9	168.00	32.00			64.40	26.80	37.60	0.416

Πίνακας Π.5.6. Δεδομένα Κινητικής Συγκεντρώσεων Διαλυτού οξυγόνο(DO), Γλυκόζης(Glu), Ελεύθερου Αζώτου Αμινοξέων & Πεπτιδίων(FAN), Ανόργανου Φωσφόρου(IP), Ολικού Ξηρού Βάρους-Βιομάζα (TDW), Ολικού ενδοκυτταρικού μικροβιακού λίπους(TL), Ολικού Ξηρού Βάρους άνευ Λίπους(RDW) και συντελεστής απόδοσης παραγωγής ενδοκυτταρικού λίπους προς την παραγωγή βιομάζας ($Y_{TL/TDW} / Y_{LX}$) κατά την ασυνεχής & ημισυνεχής υγρή καλλιέργεια του ζυμομύκητα *Rhodosporidium toruloides* σε υδρόλυμα Άνθους Ορύζης με αρχική συγκέντρωση γλυκόζης 54.35 g/L και ελεύθερου αζώτου (αμινοξέων & πεπτιδίων) FAN 682.06 mg/L - (Γραφήματα 21-23-24.. Παράγραφοι 3.2.9.- 3.2.10.)

DO (%)	Time (h)	Glu (g/L)	FAN (mg/L)	IP (mg/L)	TDW (g/L)	TL (g/L)	RDW (g/L)	$Y_{TL/TDW}$ (g/g)
91.3	0	54.35	682.06	371.69	0.84			
33.3	2	52.76	620.64	237.44	1.80			
20.1	4	50.37	562.51	202.20	2.86			
19.7	6	46.72	485.19	179.28	3.00			
11.2	7	44.96	445.70	164.24	3.38			
9.2	8	43.19	399.09	137.68	4.10			
3.1	9.5	40.63	339.31	96.89	6.64			
2.2	11	37.80	308.05	89.01	7.67			
1.7	12	36.04	263.63	71.75	8.96			
1.2	14	32.15	199.47	65.08	12.36			
1.1	16	28.11	153.95	25.71	12.60			
2.4	16.5	58.20	115.50	23.18	13.98	0.98	13.00	0.070
5.2	21	50.25	57.43					
5.6	24	45.00	56.68					
6.7	27	37.80	42.97					
7.7	35	17.00						
7.5	35.5	45.80	39.31	20.60	19.20	2.54	16.66	0.132
5.3	44.53	31.37	38.00					
4.3	46.53	27.60	35.00					
2.7	49.53	23.46	30.80					
3.6	53.53	13.35						
4.2	54.03	55.10						
5.9	68.03	25.05	15.73	21.00	29.00	5.28	23.72	0.182
2.9	70.69	17.20	14.63					
5.2	72.02	14.90	13.81					
6.9	72.52	59.00						
2.5	91.02	19.90	13.60	20.90	41.60			
7.3	93.02	16.00						
4.3	94.52	10.16						
6.4	95.02	56.72	13.40					
7.7	100.52	49.85			42.80	17.98	24.82	0.420
6.8	114.52	22.30			50.60	20.26	30.34	0.400
3.6	117.52	15.90						
5.8	118.69	14.00						
1.8	119.9	57.00						
3.9	125.52	56.00			54.80	25.3	29.5	0.462
2.9	137.72	51.00			56.20			
2.2	142.02	49.20	14.00	21.00	57.80	27.62	30.18	0.478
2.4	146.02	47.30						
1.2	162.52	41.32			58.00			
5	166.19	39.00						
1.3	170.02	38.00			58.94	28.74	30.2	0.488

6. Βιβλιογραφία

6.1 Διεθνής

- Adolph, S., Miller, S., Siedenberg, D., Jager, K., Lehmann, H., Schiigerl, K. and Giuseppin, M. (1996). Cultivation of *Aspergillus awamori* on wheat bran: Ultrastructural description of growth and localization of xylanase by immunogold labeling, *J. Biotechnol.* 46, pp. 221– 234
- Ageitos, J.M., Vallejo, J.A., Veiga-Crespo, P. and Villa, T.G. (2011). Oily yeasts as oleaginous cell factories, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 90, pp. 1219- 12227
- Aggelis, G., Pina, M. and Graille, J. (1990). Localisation de l'acide gamma linoléique dans les myceliums et les spores chez deux Mucorales, *Oléagineux* 45, pp. 229–232
- Aggelis, G. and Sourdis, J. (1997). Prediction of lipid accumulation– degradation in oleaginous micro-organisms growing on vegetable oils, *Antonie Van Leeuwenhoek* 72, pp. 159- 165
- Akada, R., Minomi, K., Kai, J., Yamashita, I., Miyakawa, T. and Fukui, S. (1989). Multiple Genes Coding for Precursors of Rhodotorucine A, a Farnesyl Peptide Mating Pheromone of the Basidiomycetous Yeast *Rhodospiridium toruloides*, *Mol. Cell Biol.* Vol. 9 N. 8, pp. 3491- 3498
- Akid., R. (2004). Corrosion of Engineering materials, In: *The Handbook of Advanced Materials: Enabling New Designs*, James K. Wessel (Ed.), John Wiley & Sons, New Jersey, Ch. 11, pp. 489- 499
- Angerbauer, C., Siebenhofer, M., Mittelbach, M. and Guebitz, G.M. (2008). Conversion of sewage sludge into lipids by *Lipomyces starkeyi* for biodiesel production, *Biores. Technol.* 99, pp. 3051–3056
- Anson, N.M., Hemery, Y.M., Bast, A. and Haenen, G.R.M.M. (2012). Optimizing the bioactive potential of wheat bran by processing, *Food Funct.* 3(4), pp. 362-375
- Apprich, S., Tirpanalan, Ö., Hell, J., Reisinger, M., Böhmendorfer, S., Siebenhandl-Ehn, S., Novalin, S. and Kneifel, W. (2014). Wheat bran-based biorefinery 2: valorisation of products, *LWT- J. Food Sci. Technol.* 56, pp. 222- 231
- Astoreca, A., Magnoli, C., Ramirez, L.M., Combina, M. and Dalcerro, A. (2007). Water activity and temperature effects on growth of *Aspergillus niger*, *A. awamori* and *A. carbonarius* isolated from different substrates in Argentina, *Int. J. Food Microbiol.* 119, pp.314- 318
- Babiker, M.S., Kijora, C., Abbas, S.A. and Danier, J. (2009). Nutrient composition of main poultry feed ingredients used in Sudan and their variations from local standard tables values, *Int. J. of Poult. Sci.* 8(4), pp. 355- 358
- Bader, F.G. (1978). Analysis of Double Substrate Limited Growth, *Biotechnol. Bioeng.* 20, pp. 183-202
- Beaugrand, J., Crônier, D., Debeire, P. and Chabbert, B. (2004). Arabinoxylan and hydroxycinnamate content of wheat bran in relation to endoxylanase susceptibility, *J. Cer. Sci.* 40(3), pp. 223- 230

- Bertolin, T.E., Schmidell, W., Maiorano, A.E., Casara, J. and Costa, J.A. (2003). Influence of carbon, nitrogen and phosphorous sources on glucoamylase production by *Aspergillus awamori* in solid state fermentation, Z. Naturforsch. 58 c (9-10), pp. 708- 712
- Beopoulos, A., Cescut, J., Haddouche, R., Uribebarrea, J.L., Molina-Jouve, C. and Nicaud, J.M. (2009). *Yarrowia lipolytica* as a model for bio-oil production, Prog. Lipid. Res. 48, pp. 375– 387
- Beopoulos, A., Nicaud, J. M. & Gaillardin, C. (2011). An overview of lipid metabolism in yeasts and its impact on biotechnological processes, Appl. Microbiol. Biotechnol. 90, pp. 1193–1206
- Bertoft, E. (2004). Analysing Starch Structure, In: Starch in Food: Structure, Function and Applications, Ann- Charlotte Eliasson (Ed.), CRC Press, New York, Ch. 2, pp. 57-81
- Botes, A.L. (1999). Affinity purification and characterization of a yeast epoxide hydrolase, Biotechnol. Lett. 21, pp. 511–517
- Boulton, C.A. and Ratledge, C. (1984). *Cryptococcus terricolus*, an oleaginous yeast re-appraised, Appl. Microbiol. Biotechnol. 20, pp. 72–76
- Bungay, H.R. (1994). Growth rate expressions for two substrates one of which is inhibitory, J. Biotechnol. 34, pp. 97-100
- Buzzini, P., Innocenti, M., Turchetti, B., Libkind, D., Van Broock, M. and Mulinacci, N. (2007). Carotenoid profiles of yeasts belonging to the genera *Rhodotorula*, *Rhodospiridium*, *Sporobolomyces*, and *Sporidiobolus*, Can. J. Microbiol. 53, pp. 1024–1031
- Certik, M. and Shimizu, S. (1999). Biosynthesis and regulation of microbial polyunsaturated fatty acid production, J. Biosci. Bioeng. 87, pp. 1–14
- Chawla, R. (2003). Colour Reactions for Proteins, In: Practical Clinical Biochemistry: Methods and Interpretations, (3th ed.), Jaypee Brothers Medical Publishers, New Delhi, Ch. 9, pp. 42-43
- Cheirslip, B. and Louhasakul, Y. (2013). Industrial wastes as a promising renewable source for production of microbial lipid and direct transesterification of the lipid into biodiesel, Biores. Technol. 142, pp. 329- 337
- Chen, P.S., Toribara, T.Y. and Warner, H. (1956). Microdetermination of phosphorus, Anal. Chem. 28, pp. 1756– 1758
- Choi, S.Y., Ryu, D.D. and Rhee, J.S. (1982). Production of microbial lipid: Effects of growth rate and oxygen on lipid synthesis and fatty acid composition of *Rhodotorula gracilis*, Biotechnol. Bioeng. 24(5), pp.1165-72
- Cui, Y.Q., Van der Lans, R.G.J.M., Giuseppin, M.L.F. and Luyben, K.C.A.M. (1998). Influence of fermentation conditions and scale on the submerged fermentation of *Aspergillus awamori*, Enzyme Microb. Technol. 23, pp. 157–167
- Curty, N., Kubitschek-Barreira, P.H., Neves, G.W., Gomes, D., Pizzatti, L., Abdelhay, E., Souza, G.H.M.F. and Lopes-Bezzera L.M. (2014). Discovering the infectome of human endothelial cells challenged with *Aspergillus fumigatus* applying a mass spectrometry label-free approach, J. Proteomics 97, pp. 126-140

- De la Hera, E., Gomez, M. and Rosell, C. M. (2013). Particle size distribution of rice flour affecting the starch enzymatic hydrolysis and hydration properties, *Carbohydr. Polym.* 98, pp. 421-427
- De Souza, P.M. and de Oliveira, P.M. (2010). Application of microbial α -amylase in industry- a review, *Braz. J. Microbiol.* 41, pp. 850- 861
- De Vries, R.P., Kester, H.C.M., Poulsen, C.H., Benen, J.A.E. and Visser, J. (2000). Synergy between enzymes from *Aspergillus* involved in the degradation of plant cell wall polysaccharides, *Carbohydr. Res.* 327, pp. 401–410
- De Vries, R.P. (2003). Regulation of *Aspergillus* genes encoding plant cell wall polysaccharide- degrading enzymes; relevance for industrial production, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 61, pp. 10–20
- Di Lena, G., Vivanti, V. and Quaglia, G.B. (1997). Amino acid composition of wheat milling by-products after bioconversion by edible fungi mycelia, *Food/Nahrung* 41(5), pp. 285- 288
- Dornez, E., Gebruers, K., Wiame, S., Delcour, J. A. and Courtin, C.M. (2006). Insight into the distribution of arabinoxylans, endoxylanases, and endoxylanase inhibitors in industrial wheat roller mill streams, *J. Agric. Food Chem.* 54(22), pp. 8521-8529
- Dutta, R. (2008). Cell Kinetics and Fermenter Design, In: *Fundamentals of Biochemical Engineering*, AneBooksIndia & Springer Berlin Heidelberg, New York, Ch. 6, pp. 127-175
- Elliott, D.C., Orth, R.J., Gao, J., Werpy, T.A., Eakin, D.E., Schmidt, A.J., Neuenschwander, G.G., Flagg, A.J., Murry, J., Lahman, L., Lin, C.J., Mennel, D.L. and Landucci, R. (2002). Biorefinery concept development based on wheat flour milling, In: *Bioenergy 2002*, J. Crockett, & C.L. Peterson (Eds.), p. 35., Pacific Regional Biomass Energy Program, Boise, ID.
- Evans, C.T. and Ratledge, C. (1983). A comparison of the oleaginous yeast *Candida curvata*, grown on different carbon sources in continuous and batch culture, *Lipid* 18, pp. 623–629
- Fakas, S., Čertik, M., Papanikolaou, S., Aggelis, G., Komaitis, M. and Galiotou-Panayotou, M. (2008). γ -Linolenic acid production by *Cunninghamella echinulata* growing on complex organic nitrogen sources, *Biores. Technol.* 99, pp. 5986-5990
- Fardet, A. (2010). New hypotheses for the health-protective mechanisms of wholegrain cereals: what is beyond fibre?, *Nutr. Res. Rev.* 23(1), pp. 65-134
- Fawole, O.B., and Odunfa, S.A. (2003). Some factors affecting production of pectic enzymes by *Aspergillus niger*, *Int. Biodeter. Biodegr.* 52, pp. 223–227
- Fiske, C.H. and Subarrow, Y. (1925). The Colorimetric Determination Of Phosphorus, *J. Biol. Chem.* 66, pp. 375-400
- Folch, J., Lees, M. and Stanley, G.H.S. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues, *J. Biol. Chem.* 226, pp. 497–509
- Fujii, M. and Kawamura, Y. (1985). Synergistic action of α -amylase and glucoamylase on hydrolysis of starch, *Biotechnol. Bioeng.* 27(3), pp. 260-265
- Gebruers, K., Dornez, E., Boros, D., Fras, A., Dynkowska, W., Bedo, Z., Rakszegi, M., Delcour, J.A. and Courtin, C.M. (2008). Variation in the content of dietary fiber and

- components thereof in wheats in the Healthgrain Diversity Screen, *J. Agric. Food Chem.* 56(21), pp. 9740- 9749
- Gen, Q., Wang, Q. and Chi, Z.M. (2014). Direct conversion of cassava starch into single cell oil by co-cultures of the oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides* and immobilized amylases-producing yeast *Saccharomycopsis fibuligera*, *Renew. Energ.* 62, pp. 522–526
- Gill, C.O., Hall, M.J. and Ratledge, C. (1977). Lipid accumulation in an oleaginous yeast (*Candida 107*) growing on glucose in single-stage continuous culture, *Appl. Environ. Microbiol.* 33, pp. 231–239
- Granger, L.M., Perlot, P., Goma, G. and Pareilleux, A. (1993). Efficiency of fatty acid synthesis by oleaginous yeast: prediction of yield and fatty acid cell content from consumed C/N ratio by simple method, *Biotechnol. Bioeng.* 42, pp. 1151–1156
- Gray, N.F. (2005). Factors Determining the Distribution of Animals and Plants in Freshwaters, In: *Water Technology An Introduction for Environmental Scientists and Engineers*, (2th ed.), Elsevier Butterworth-Heinemann, London, Ch. 3, pp. 41-44
- Hassan, M., Blanc, P.J., Granger, L.M., Pareilleux, A. and Goma, G. (1993). Lipid production by an unsaturated fatty acid auxotroph of the oleaginous yeast *Apiotrichum curvatum* grown in a single stage continuous culture, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 40, pp. 483–488
- Hao, O.J., Richard, M.G., Jenkins, D. and Blanch, H.W. (1983). The half-saturation coefficient for dissolved oxygen: A dynamic method for its determination and its effect on dual species competition, *Biotechnol. Bioeng.* 25(2), pp. 403-416
- Herbert, D., Phipps, P.J. and Strange, R.E. (1971). Chemical analysis of microbial cells, In: *Methods in microbiology*, Norris J.R., Ribbons D.W. (Eds.), Academic Press, New York, Vol. 5B. Ch. 3, pp. 209-344
- Hemery, Y., Rouau, X., Lullien-Pellerin, V., Barron, C., & Abecassis, J. (2007). Dry processes to develop wheat fractions and products with enhanced nutritional quality, *J. Cer. Sci.* 46(3), pp. 327- 347
- Hemery, Y.M., Anson, N.M., Havenaar, R., Haenen, G.R.M.M., Noort, M.W.J. and Rouau, X. (2010). Dry-fractionation of wheat bran increases the bioaccessibility of phenolic acids in breads made from processed bran fractions, *Food Res. Int.* 43(5), pp. 1429- 1438
- Hiruta, O., Yamamura, K., Takebe, H., Futamura, T., Inuma, K. and Tanaka H. (1997). Application of Maxblend fermentor for microbial processes, *J. Ferment. Bioeng.* 83, pp. 79–86
- Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A., Staley, J.T. and Williams, S.T. (1994). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, (9th ed.), Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, pp. 3- 17
- Horvathova, V., Janecek, S. and Sturdik, E. (2001). Amylolytic Enzymes: Molecular Aspects of Their Properties, *Gen. Physiol. Biophys.* 20, pp. 7-32
- Hu, C., Zhao, X., Zhao, J., Wu, S. and Zhao, Z.K. (2009). Effects of biomass hydrolysis by-products on oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides*, *Biores. Technol.* 100, pp. 4843–4847
- Huang, Q., Wang, Q., Gong, Z., Jin, G., Shen, H., Xiao, S., Xie, H., Ye, S., Wang, J. and Zhao, Z.K. (2013). Effects of selected ionic liquids on lipid production by the oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides*, *Biores. Technol.* 130, pp. 339- 344

- Jacob, Z. (1992). Yeast lipids: extraction, quality analysis, and acceptability, *Crit. Rev. Biotechnol.* 12, pp. 463– 491
- Jacobus, P.H. (2001). Biotechnology and the utilization of biowaste as a resource for bio-product development, *Trends Biotechnol.* 19(5), pp. 172-177
- Jin, G., Yang, X., Hu, C., Shen, H. and Zhao, Z.K. (2012). Enzyme- assisted extraction of lipids directly from the culture of the oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides*, *Biores. Technol.* 111, pp. 378- 382
- Jin, G., Zhang, Y., Shen, H., Yang, X., Xie, H. and Zhao, Z.K. (2013). Fatty acid ethyl esters production in aqueous phase by the oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides*, *Biores. Technol.* 150, pp. 266- 270
- Iassonova, D.R., Hammond, E.G. and Beattie, S.E. (2008). Oxidative stability of polyunsaturated triacylglycerols encapsulated in oleaginous yeast, *J. Am. Oil. Chem. Soc.* 85, pp. 711–716
- Ibanez, J.G., Hernandez-Esparza, M., Doria-Serrano, C., Fregoso-Infante, A. and Singh, M.M. (2007). The Chemistry of Process in the Hydrosphere, In: *Environmental Chemistry: Fundamentals*, Springer, New York, Ch. 6, pp. 112-114
- Katre, G., Joshi, C., Khot, M., Zinjarde, S. and RaviKumar, A. (2012). Evaluation of single cell oil (SCO) from a tropical marine yeast *Yarrowia lipolytica* NCIM 3589 as a potential feedstock for biodiesel, *AMB Express* 2012 Jul 19;2(1):36. doi: 10.1186/2191-0855-2-36.
- Karant, N.G. and Sattur, A.P. (1991). Mathematical modeling of production of microbial lipids, Part I: Kinetics of lipid accumulation, Part II: Kinetics of lipid accumulation, *Bioprocess Eng.* 6, pp. 241- 248
- King, E.J. (1932). The Colorimetric Determination Of Phosphorus, *Biochem. J.* 26(2), pp. 292- 297
- Koenig, R.A. and Johnson, C.R. (1942). Colorimetric Determination of Phosphorus in Biological Materials, *Ind. Eng. Chem. Anal. Ed.* 14(2), pp. 155–156
- Kolakowski, E. (2005). Analysis of Proteins, Peptides, and Amino Acids in Foods, In: *Methods of Analysis of Food Components and Additives*, Semih Ötleş (Ed.), CRC Press, New York, Ch. 4, pp. 79- 80
- Kong, X., Zhou, H. and Qian, H. (2007). Enzymatic hydrolysis of wheat gluten by proteases and properties of the resulting hydrolysates, *Food Chem.* 102, pp. 759– 763
- Kookos, I.K. (2004). Optimization of batch and fed-batch bioreactors using simulated annealing, *Biotechnol. Prog.* 20(4), pp. 1285-8
- Kopčić, N., Domanovac, M.V., Kucic, D. and Briski, F. (2014). Evaluation of laboratory-scale in- vessel co-composting of tobacco and apple waste, *Waste Manage.* 34, pp. 323- 328
- Kosa, M. and Ragauskas, A.J. (2011). Lipids from heterotrophic microbes: advances in metabolism research, *Trends Biotechnol.* 29, pp. 53–61
- Koutinas, A., Belafi-Bako, K., Kabiri-Badr, A., Tóth, A., Gubicza, L. and Webb, C. (2001). Enzymatic Hydrolysis of Polysaccharides: Hydrolysis of Starch by an Enzyme Complex from Fermentation by *Aspergillus Awamori*, *Food and Biopr. Proc.* 79, pp. 41- 45

- Koutinas, A., Wang, R., Kookos, I.K. and Webb, C. (2003). Kinetic parameters of *Aspergillus awamori* in submerged cultivations on whole wheat flour under oxygen limiting conditions, *Biochem. Eng. J.* 16, pp. 23- 34
- Koutinas, A.A., Arifeen, N., Wang, R.H. and Webb, C. (2006). Cereal-based biorefinery development: Integrated enzyme production for cereal flour hydrolysis, *Biotechnol. Bioeng.* 97, pp. 61- 72
- Koutinas, A.A., Wang, R.H. and Webb, C. (2007). The biochemurgist – Bioconversion of agricultural raw materials for chemical production, *Biofuels Bioprod. Bioref.* 1, pp 24– 38
- Koutinas, A.A., Vlysidis, A., Pleissner, D., Kopsahelis, N., Garcia, I.L., Kookos, I.K., Papanikolaou, S., Kwan, T.H. and Lin C.S. (2014). Valorization of industrial waste and by-product streams via fermentation for the production of chemicals and biopolymers, *Chem. Soc. Rev.* 43, pp. 2587- 2627
- Kumari, M. and Abraham, J. (2011). Biodegradation of Diesel Oil using Yeast *Rhodospiridium toruloides*, *Res. J. Environ. Toxicol.* 5 (6), pp. 369- 377
- Kuszmarn, J. (2006). Introduction to Carbohydrates, In: *Organic Chemistry of Sugars*, Daniel E. Levy & Peter E. Fugendi (Ed.), CRC Press, New York, Ch. 2, pp. 44-71
- Laurence, R.J. (1940). The Estimation Of Phosphorus, *Biochem. J.* 34(6), pp. 858- 865
- Li, J.H., Vasanthan, T., Hoover, R. and Rossnagel, B.G. (2004). Starch from hull-less barley: V. In-vitro susceptibility of waxy, normal, and high-amylose starches towards hydrolysis by alpha-amylases and amyloglucosidase, *Food Chem.* 84, pp. 621-632
- Li, W., Cui, S., and Kakuda, Y. (2006). Extraction, fractionation, structural and physical characterization of wheat β -d-glucans, *Carb. Polym.* 63(3), pp. 408-416
- Li, Y.H., Liu, B., Zhao, Z.B. and Bai F.W. (2006). Optimization of Culture Conditions for lipid production by *Rhodospiridium toruloides*, *Chin. J. Biotechnol.* 22, pp. 650-656
- Li, Y., Zhao, Z.K. and Bai, F. (2007). High-density cultivation of oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides* Y4 in fed-batch culture, *Enzyme Microb. Technol.* 41, pp. 312–317
- Li, Q., Du, W. and Liu, D. (2008). Perspectives of microbial oils for biodiesel production, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 80, pp. 749– 756
- Lie, S. (1973). The EBC- Ninhydrin Method for the Determination of Free Alpha Amino Nitrogen, *J. Inst. Brew.* 79, pp. 37- 41
- Liguori, R., Amore, A. and Faraco, V. (2013). Waste valorization by biotechnological conversion into added value products, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97, pp. 6129- 6147
- Ling, J., Nip, S. and Shim, H. (2013). Enhancement of lipid productivity of *Rhodospiridium toruloides* in distillery wastewater by increasing cell density, *Biores. Technol.* 146, pp. 301-309
- Liu B., Sun Y., Li Y.H. and Zhao Z.B. (2005). Progress on microbial triacylglyceride biosynthesis and metabolic regulation in oleaginous microorganisms. *Acta Microbiol. Sin.* 45, pp. 153–156
- Liu, B. and Zhao, Z.K. (2007). Biodiesel production by direct methanolysis of oleaginous microbial biomass, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 82, pp. 775-780

- Ma, F. and Hanna, M.A. (1999) . Biodiesel production: a review, *Biores. Technol.* 70(1), pp. 1- 15
- MacKenzie, D.A., Jeenes, D.J., Gou, X., and Archer, D.B. (2000). Molecular basis of glucoamylase overproduction by a mutagenized industrial strain of *Aspergillus niger*, *Enz. Microb. Technol.* 26, pp. 193–200
- Mansour-Benamar, M., Savoie, J.M. and Chavant, L. (2013). Valorization of solid olive mill wastes by cultivation of a local Strain of edible mushrooms, *C. R. Biologies* 336, pp. 407-415
- Meesters, P.A.E.P., Huijberts, G.N.M. and Eggink, G. (1996). High-cell-density cultivation of the lipid accumulating yeast *Cryptococcus curvatus* using glycerol as a carbon source, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 45, pp. 575–579
- Meng, X., Yang, J., Xu, X., Zhang, L., Nie, Q. and Xian, M. (2009). Biodiesel production from oleaginous microorganisms, *Renew. Energ.* 34, pp. 1-5
- Miller, G.L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar, *Anal. Chem.* 31(3), pp. 426–428.
- Mondala, A., Hernandez, R., French, T., McFarland, L., Sparks, D., Holmes, W. and Haque, M. (2012). Effect of acetic acid on lipid accumulation by glucose-fed activated sludge cultures, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 87, pp. 33- 41
- Moore, S. and Stein, W.H. (1954). A modified Ninhydrin reagent for photometric determination of amino acids and related compounds, *J. Biol. Chem.* 211, pp. 907–913
- Mosier, N.S. and Ladisch, M.R. (2009). Microbial Fermentations, In: *Modern Biotechnology: Connecting Innovations in Microbiology and Biochemistry to Engineering Fundamentals*, John Wiley & Sons, New Jersey, Ch. 4, pp. 73-110
- Myers, D. (2006). An Overview of Surfactant Science and Technology, In: *Surfactant Science and Technology*, John Wiley & Sons, New Jersey, Ch. 1, pp. 2-25
- Negi, S. and Banerjee, R. (2006). Amylase and Protease Production from *A. awamori* in Single Bioreactor Through EVOP Factorial Design Technique , *Food Technol. Biotechnol.* 44, (2), pp. 257–261
- Negi, S. and Banerjee, R. (2009). Characterization of amylase and protease produced by *Aspergillus awamori* in a single bioreactor, *Food Res. Int.* 42, pp. 443- 448
- Negi, S. and Banerjee, R. (2010). Optimization of culture parameters to enhance production of amylase and protease from *Aspergillus awamori* in a single fermentation, *Afr. J. Biochem. Res.* 4(3), pp. 73-80
- Negi, S., Gupta, S. and Banerjee, R. (2011). Single-Stage Fermentation of Glucoamylase and Protease by *A. awamori*, *Food Technol. Biotechnol.* 49 (3), pp. 310–315
- Neves, M.A., Kimura, T., Shimizu, N., and Shiiba, K. (2006). Production of alcohol by simultaneous saccharification and fermentation of low-grade wheat flour, *Braz. Arch. Biol. Technol.* 49(3), pp. 481-490
- Nutan, D.M., Ulka, S.P., Kulbhushan, B.B., Khire, J.M., and Gokhale, D.V. (2002). Production of acidic lipase by *Aspergillus niger* in solid state fermentation, *Proc. Biochem.* 8, pp. 715–721

- Pan, J.G., Kwak, M.Y. and Rhee, J.S. (1986). High density cell culture of *Rhodotorula glutinis* using oxygen-enriched air, *Biotechnol. Lett.* 8, pp. 715–718
- Papanikolaou, S., Chevalot, I., Komaitis, M., Aggelis, G. and 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, *Antonie van Leeuwenhoek* 80, pp. 215–224
- Papanikolaou, S., Chevalot, I., Komaitis, M., Marc, I. and Aggelis, G. (2002). Single cell oil production by *Yarrowia lipolytica* growing on an industrial derivative of animal fat in batch cultures. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 58, pp. 308-312
- Papanikolaou, S. and Aggelis, G. (2002). Lipid production by *Yarrowia lipolytica* growing on industrial glycerol in a single-stage continuous culture, *Biores. Technol.* 82, pp. 43- 49
- Papanikolaou, S., Muniglia, L., Chevalot, I., Aggelis, G. and Marc, I. (2003). Accumulation of a cocoa-butter-like lipid by *Yarrowia lipolytica* cultivated on agro-industrial residues, *Curr. Microbiol.* 46(2), pp. 124-30
- Papanikolaou, S., Galiotou-Panayotou, M., Fakas, S., Komaitis, M. and Aggelis, G. (2007). Lipid production by oleaginous Mucorales cultivated on renewable carbon sources, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 109, pp. 1060-1070
- Papanikolaou, S., Galiotou-Panayotou, M., Fakas, S., Komaitis, M. and Aggelis, G. (2008). Citric acid production by *Yarrowia lipolytica* cultivated on olive-mill wastewater-based media, *Biores. Technol.* 99, pp. 2419-2428
- Papanikolaou, S. and Aggelis, G. (2009). Biotechnological valorization of biodiesel derived glycerol waste through production of single cell oil and citric acid by *Yarrowia lipolytica*, *Lipid Technol.* 21, pp. 83–87
- Papanikolaou, S. and Aggelis, G. (2011). Lipids of oleaginous yeasts. Part: Biochemistry of single cell oil production, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 113(8), pp. 1031- 1051
- Pan, L.X., Yang, D.F., Shao, L., Li, W., Chen, G.G. and Liang, Z.Q. (2009). Isolation of the oleaginous yeast from the soil and studies of their lipid-producing capacities, *Food. Technol. Biotechnol.* 47, pp 215– 220
- Pandey, A., Selvakumar, P., Soccol, C.R. and Nigam, P. (1999). Solid state fermentation for the production of industrial enzymes, *Curr. Sci.* 77, pp. 149-162
- Pandey, A., Nigam, P., Soccol, C.R., Soccol, V.T., Singh, D. and Mohan, R. (2000). Advances in microbial amylases, *Biotechnol. Appl. Biochem.* 31, pp. 135-152
- Peters, D. (2007). Raw Materials, *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 105, pp. 1- 30
- Petersen, K.L., Lehmbeck, J. and Christensen, T. (1999). A new transcriptional activator for amylase genes in *Aspergillus*, *Mol. Gen. Genet.* 262, 668–676
- Picataggio, S.K. and Smittle, R.B. (1979). Microbiological production of oil, *Eur. Pat. Appl.* EP 5277 A2 19791114
- Politino, M., Tonzi, S.M., Burnett, W.V., Romancik, G. and Usher, J.J. (1997). Purification and characterization of a cephalosporin esterase from *Rhodosporidium toruloides*, *Appl. Environ. Microbiol.* 63, pp. 4807–4811

- Prakasham, R.S., Subba Rao, Ch., Sreenivas Rao, R. and Sarma, P.N. (2006). Enhancement of acid amylase production by an isolated *Aspergillus awamori*, J. Appl. Microbiol. 102 (1), pp. 204–211
- Pruckler, M., Siebenhandl-Ehn, S., Apprich, S., Holtinger, S., Haas, C., Schmid, E. and Kneifel, W. (2014). Wheat bran-based biorefinery 1: Composition of wheat bran and strategies of functionalization, J. Food Sci. Technol. 56, pp. 211-221
- Puncha-Arnon, S. and Uttapap, D. (2013). Rice starch vs. rice flour: Differences in their properties when modified by heat- moisture treatment, Carbohydr. Polym. 91, pp. 85-91
- Ratledge, C. (1982). Microbial oils and fats: an assessment of their commercial potential. In: Progress in Industrial Microbiology, Vol. 16, M. J. Bull (Ed.), Elsevier Butterworth-Heinemann, Amsterdam, pp. 119- 206
- Ratledge, C. (1988). Biochemistry, Stoichiometry, Substrates and Economics, In: Single Cell Oil, Moreton, R. S. (Ed.), Longman Scientific & Technical, Harlow (UK) , pp. 33–70
- Ratledge, C. (1997). Microbial lipids, In: Biotechnology, (2nd ed.), Kleinkauf, H. & Dohren, H. (Ed.), Wiley-VCH, Weinheim , Vol. 7, pp. 135–197
- Ratledge, C. (1994). Yeasts, moulds, algae and bacteria as sources of lipids, In: Technological Advances in Improved and Alternative Sources of Lipids, Kamel, B.S. and Kakuda, Y. (Ed.), Blackie Academic and Professional, London, pp. 235– 291
- Ratledge, C. (2002). Regulation of lipid accumulation in oleaginous micro-organisms, Biochem. Soc. Trans. 30(6), pp. 1047–1050
- Ratledge, C. and Wynn, J.P. (2002). The biochemistry and molecular biology of lipid accumulation in oleaginous microorganisms, Adv. Appl. Microbiol. 51, pp. 1–51
- Ratledge C. (2004). Fatty acid biosynthesis in microorganisms being used for Single Cell Oil production, Biochimie 86, pp. 807-815
- Ratledge, C. and Cohen, Z. (2008). Microbial and algal oils: Do they have a future for biodiesel or as commodity oils?, Lipids Technol. 20(7), pp. 155-160
- Ravi-Kumar, K., Venkatesh, K.S., and Umesh-Kumar, S. (2004). Evidence that cleavage of the precursor enzyme by autocatalysis secretion of multiple amylases by *Aspergillus niger*, FEBS Lett. 557, 239–242
- Reisinger, M., Tirpanalan, O., Prückler, M., Huber, F., Kneifel, W. and Novalin, S. (2013). Wheat bran biorefinery – A detailed investigation on hydrothermal and enzymatic treatment, Biores. Technol. 144, pp. 179-185
- Roberts, P.J., Simmonds, D.H., Wootton, M. and Wrigley, C.W. (1985). Extraction of protein and solids from wheat bran, J. Sci. Food. Agric. 36, pp. 5-10
- Robyt, F.J. (2009). Enzymes and their Action on Starch, In: STARCH: Chemistry and Technology ,(3th ed.), BeMiller James & Whistler Roy (Ed.), Academic Press, New York, Ch. 7, pp. 238- 284
- Rosen, H. (1957). A modified ninhydrin colorimetric analysis for amino acids, Arch. Biochem. Biophys. 67, pp. 10– 15

- Saenge, C., Cheirsilp, B., Suksaroge, T. and Bourtoom, T. (2011). Potential use of oleaginous red yeast *Rhodotorula glutinis* for the bioconversion of crude glycerol from biodiesel plant to lipids and carotenoids, *Process Biochem.* 46, pp. 210-218
- Santos, T.C., Gomes, D.P.P., Bonomo, R.C.F. and Franco, M. (2012). Optimization of solid state fermentation of potato peel for the production of cellulolytic enzymes, *Food Chem.* 133, pp. 1299-1304
- Searle, B.A. and Kirsop, B.H. (1979). Sugar Utilization by a brewing yeast in relation to the growth and maintenance phases of metabolism, *J. Inst. Brew.* 85, pp. 342- 345
- Shen, H., Gong, Z., Yang, X., Jin, G., Bai, F. and Zhao, Z.K. (2013). Kinetics of continuous cultivation of the yeast *Rhodospiridium toruloides*, *J. Biotechnol.* 168, pp. 85-89
- Sitepu, I.R., Sestric, R., Ignatia, L., Levin, D., German, J.B., Gillies, A.L., Almada, L.A.G. and Boundy- Mills, K.L. (2013). Manipulation of culture conditions alters lipid content and fatty acid profiles of a wide variety of known and new oleaginous yeast species, *Biores. Technol.* 144, pp. 360-369
- Stanbury, P.F., Whitaker, A. and Hall, S.J. (1995). Microbial Growth Kinetics, In: Principles of Fermentation Technology, (2nd ed.), Butterworth-Heinemann, London, Ch. 2, pp 13- 31
- Sun, W.S., Lin, C.Y., Weng, M.Y., and Chen, J.M. (2006). Efficiency improvements on ninhydrin method for amino acid quantification, *J. Food Comp. Anal.* 19, pp. 112- 117
- Sundberg, C., Yu, D., Franke-Whittle, I., Kauppi, S., Smars, S., Insam, H., Romantschuk, M. and Jönsson, H. (2013). Effects of pH and microbial composition on odour in food waste composting, *Waste Manage.* 33, pp. 204-211
- Tanaka, N., Kajimoto, S., Mitani, D. and Kunugi, S. (2002). Effects of guanidine hydrochloride and high pressure on subsite flexibility of b-amylase, *Biochim. Biophys. Acta.* 1596, pp. 318- 325
- Teh, C.Y., Wu, T.Y. and Juan, J.C. (2014). Optimization of agro-industrial wastewater treatment using unmodified rice starch as a natural coagulant, *Ind. Crop. Prod.* 56, pp 17-26
- Torbica, A., Hadnadev, M. and Hadnadev, H.T. (2012). Rice and buckwheat flour characterization and its relation to cookie quality, *Food Res. Int.* 48, pp. 277-283
- Turcotte, G. and Kosaric, N. (1988). Biosynthesis of lipids by *Rhodospiridium toruloides* ATCC 10788, *J. Biotechnol.* 8, pp. 211–237
- Turcotte, G. and Kosaric, N. (1989). Lipid biosynthesis in oleaginous yeasts, *Adv. Biochem. Eng. Biotech.* 40, pp. 73–92
- Van der Maarel, M.J.E.C., Van der Veen, B., Uitdehaag, J.C.M., Leemhuis, H. and Dijkhuizen, L. (2002). Properties and applications of starch-converting enzymes of the α -amylase family, *J. Biotechnol.* 94, pp.137-155
- Van Kuyk, P.A., Cheetham, B.F., and Katz, M.E. (2000). Analysis of two *Aspergillus nidulans* genes encoding extracellular proteases, *Fungal Genet. Biol.* 29, pp. 201–210
- Vasudevan, P.T. and Briggs, M. (2008). Biodiesel production—current state of the art and challenges, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 35, pp. 421–430

- Waites, M.J., Morgan, N.L., Rockey, J.S. and Higton, G. (2007). Fermentation media, In: Industrial Microbiology: An Introduction, (6th ed.), Blackwell Science Ltd, Oxford, Ch. 5 pp. 86-88
- Wang, H., Entwistle, J., Morlon, E., Archer, D.B., Peberdy, J.F., Ward, M. and Jeenes, D. J. (2003). Isolation and characterisation of a calnexin homologue, *clxA*, from *Aspergillus niger*, Mol. Gen. Genom. 268, pp. 684–691
- Wang, R., Godoy, L.C., Shaarani, S.M., Melikoglu, M., Koutinas, A. and Webb, C. (2009). Improving Wheat Flour Hydrolysis by an enzyme mixture from solid state fungal fermentation, Enzyme Microb. Technol. 44, pp. 223–228
- Wang, Q., Guo, F.J., Rong, Y.J. and Chi, Z.M. (2012). Lipid production from hydrolysate of cassava by *Rhodospiridium toruloides* 21167 for biodiesel making, Renew. Energy 46, pp. 164-168
- Ward, O.P., Qin, W.M., Dhanjoon, J., Ye, J. and Singh, A. (2005). Physiology and Biotechnology of *Aspergillus*, Adv. Appl. Microbiol. 58C, pp. 1- 75
- Wiebe, G.M., Koivuranta, K., Penttila, M. and Ruohonen, L. (2012). Lipid production in batch and fed-batch cultures of *Rhodospiridium toruloides* from 5 and 6 carbon carbohydrates, BMC Biotechnol. 2012, 12:26 doi:10.1186/1472-6750-12-26
- Wu, S., Hu, C., Jin, G., Zhao, X. and Zha, Z.K. (2010). Phosphate-limitation mediated lipid production by *Rhodospiridium toruloides*, Biores. Technol. 101, pp. 6124-6129
- Wu, S., Zhao, X., Shen, H., Wang, Q. and Zhao, K.Z. (2011). Microbial lipid production by *Rhodospiridium toruloides* under sulfate-limited conditions, Biores. Technol. 102, pp. 1803- 1807
- Xu, J., Oura, T., Liu, D. and Kajiwara, S. (2011). Heat-alkaline treatment of excess sludge and the potential use of hydrolysate as nitrogen source for microbial lipid production, Chin. J. Biotechnol. 27, pp. 482–488
- Xu, J., Zhao, X., Wang, W., Du, W. and Liu, D. (2012). Microbial conversion of biodiesel by-product glycerol to triacylglycerols by oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides* and the individual effect of some impurities on lipid production, Biochem. Eng. J. 65, pp. 30-36
- Yang, F., Zhang, S., Tang, W. and Zhao, Z.K. (2008). Identification of the orotidine- 5- monophosphate decarboxylase gene of the oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides*, Yeast 2008, 25(9), pp. 623–630
- Yamamoto, M., Saleh, F., Ohtsuka, A. and Hayashi, K. (2005). New fermentation technique to process fish waste, Animal Sci. J. 76, pp. 245- 248
- Yamauchi, H., Mori, H., Kobayashi, T. and Shimizu, S. (1983). Mass production of lipids by *Lipomyces starkeyi* in microcomputer-aided fed-batch culture, J. Ferment. Technol. 61, pp. 275–280
- Ykema, A., Verbree, E.C., Kater, M.M. and Smit, H. (1988). Optimization of lipid production in the oleaginous yeast *Apiotrichum curvatum* in whey permeate, Appl. Microbiol. Biotechnol. 29, pp. 211-218
- Yoon, S.H., Rhim, J.W., Choi, S.Y., Ryu, D.D.Y. and Rhee, J.S. (1982). Effect of carbon and nitrogen sources on lipid production of *Rhodotorula gracilis*, J. Biosci. Bioeng. 60(3), pp. 243- 246

- Zhao, X., Wu, S., Hu, C., Wang, Q., Hua, Y. and Zhao, Z.K. (2010). Lipid production from Jerusalem artichoke by *Rhodospiridium toruloides* Y4, J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 37, pp. 581–585
- Zhao, X., Hu, C., Wu, S., Shen, H. and Zhao, Z.K. (2011). Lipid production by *Rhodospiridium toruloides* Y4 using different substrate feeding strategies, J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 38, pp. 627–632
- Zhou, W., Wang, W., Li, Y. and Zhang, Y. (2013). Lipid production by *Rhodospiridium toruloides* Y2 in bioethanol wastewater and evaluation of biomass energetic yield, Biores. Technol. 127, pp. 435-440
- Zhu, L.Y., Zong, M.H. and Wu, H. (2008). Efficient lipid production with *Trichosporon fermentans* and its use for biodiesel preparation, Biores. Technol. 99, pp. 7881–7885.
- Zhu, Z., Zhang, S., Liu, H., Shen, H., Lin, X., Yang, F., Zhou, Y.J., Jin, G., Ye, M., Zou, H. and Zhao, Z.Z. (2012). A multi-omic map of the lipid-producing yeast *Rhodospiridium toruloides*, Nat. Commun. 3:1112 doi: 10.1038/ncomms2112

6.2 Ελληνική

- Αγγελής, Γ. (2007). Μικροβιολογία & Μικροβιακή Τεχνολογία, Εκδόσεις Σταμούλη, Αθήνα
- Λυμπεράτος, Γ. και Παύλου, Σ. (2011). Μικροβιακή Ανάπτυξη σε Πολλαπλά Περιοριστικά Συστατικά - Κινητική Ανάπτυξης Μικροβίων και Παραγωγής Μεταβολικών Προϊόντων, Εισαγωγή στη Βιοχημική Μηχανική, Εκδόσεις Τζιόλα, Αθήνα, Κεφ. 4 & 5, σελ. 95-135, 141-158
- Shuler, M. and Kargi, F. (2005). Πώς Αναπτύσσονται τα Κύτταρα, Μηχανική Βιοδιεργασιών – Βασικές Έννοιες, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις ΕΜΠ, Αθήνα, Κεφ. 6, σελ. 200- 259