

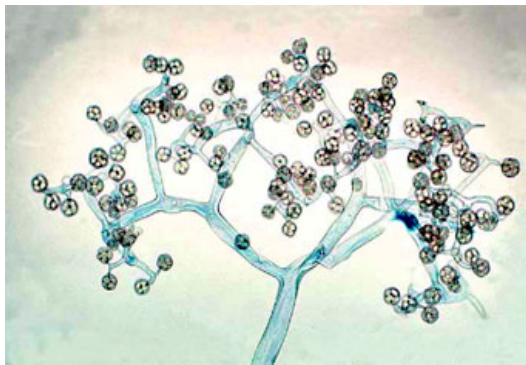
ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
Π.Μ.Σ. «ΕΠΙΣΤΗΜΗ & ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ &
ΔΙΑΤΡΟΦΗ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ»

Κατεύθυνση «Συστήματα Διαχείρισης Ποιότητας & Διασφάλισης
Υγιεινής Τροφίμων»

Εργαστήριο Μικροβιολογίας & Βιοτεχνολογίας Τροφίμων

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

«Βιοσύνθεση ενδοκυτταρικού λίπους υψηλού διατροφικού και
φαρμακευτικού ενδιαφέροντος κατά την αύξηση του μύκητα
Thamnidium elegans σε σακχαρούχα ανανεώσιμα υποστρώματα»



Thamnidium elegans (Mucorales)

Μεταπτυχιακή φοιτήτρια: Ελένη Σ. Ζήκου

Επιβλέπων καθηγητής: Σεραφείμ Παπανικολάου, Επίκουρος καθηγητής

ΑΘΗΝΑ, 2010

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
Π.Μ.Σ. «ΕΠΙΣΤΗΜΗ & ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ &
ΔΙΑΤΡΟΦΗ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ»

Κατεύθυνση «Συστήματα Διαχείρισης Ποιότητας & Διασφάλισης
Υγιεινής Τροφίμων»

Εργαστήριο Μικροβιολογίας & Βιοτεχνολογίας Τροφίμων

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

«Βιοσύνθεση ενδοκυτταρικού λίπους υψηλού διατροφικού και
φαρμακευτικού ενδιαφέροντος κατά την αύξηση του μύκητα
***Thamnidium elegans* σε σακχαρούχα ανανεώσιμα υποστρώματα»**

Μεταπτυχιακή φοιτήτρια: Ελένη Σ. Ζήκου

Επιβλέπων καθηγητής: Σεραφείμ Παπανικολάου, Επίκουρος καθηγητής

ΑΘΗΝΑ, 2010

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

**«Βιοσύνθεση ενδοκυτταρικού λίπους υψηλού διατροφικού και
φαρμακευτικού ενδιαφέροντος κατά την αύξηση του μήκητα
Thamnidium elegans σε σακχαρούχα ανανεώσιμα υποστρώματα»**

Μεταπτυχιακή φοιτήτρια: Ελένη Σ. Ζήκου

Τριμελής επιτροπή:

Σεραφείμ Παπανικολάου, Επίκουρος καθηγητής (Επιβλέπων)

Μιχαήλ Κωμαΐτης, Καθηγητής

Ελευθέριος Δροσινός, Αναπληρωτής καθηγητής

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα ερευνητική μελέτη εκπονήθηκε στο εργαστήριο Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, στα πλαίσια του Π.Μ.Σ. «Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου». Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επίκουρο καθηγητή και επιβλέπων κο. Παπανικολάου για την εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπο μου καθώς και για την καθοδήγηση και τη συνεργασία μας κατά τη διάρκεια της μελέτης αυτής. Επιπλέον, θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες στην υποψήφια διδάκτορα κα. Χατζηφράγκου Αφροδίτη για την πολύτιμη βοήθεια της, τη συνεχή καθοδήγηση και τις χρήσιμες συμβουλές της κατά τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας και τη συγγραφή της μελέτης. Επίσης, θα ήθελα να εκφράσω ένα μεγάλο ευχαριστώ στις υποψήφιες διδάκτορες κα. Μετσοβίτη Μαρία και κα. Μπέλκα Κατερίνα για την πολύτιμη βοήθεια τους και τις συμβουλές τους στο χώρο του εργαστηρίου καθώς και για τη συνεχή στήριξη και ενθάρρυνση καθόλη τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας. Επιπλέον, ευχαριστώ τις συμφοιτήτριες μου και τους συμφοιτητές μου για την άριστη συνεργασία μας και το ευχάριστο κλίμα που επικράτησε στο χώρο του εργαστηρίου. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την οικογένεια μου για την αμέριστη συμπαράσταση και τη στήριξη τους καθ' όλη τη διάρκεια διεξαγωγής της μελέτης αυτής.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η παρούσα ερευνητική μελέτη έχει στόχο τη διερεύνηση της βιοφυσιολογικής συμπεριφοράς του Ζυγομύκητα *Thamnidium elegans* (τάξη Mucorales) και της ικανότητας του να συσσωρεύει ενδοκυτταρικό λίπος πλούσιο σε γ -λινολενικό οξύ (GLA), ένα λιπαρό οξύ με σημαντικές διατροφικές και θεραπευτικές ιδιότητες. Η καλλιέργεια του μύκητα πραγματοποιήθηκε σε σακχαρούχα ανανεώσιμα υποστρώματα, τα οποία αποτελούν προϊόντα υδρόλυσης των λιγνοκυτταρινούχων υπολειμμάτων. Συγκεκριμένα, τα θρεπτικά μέσα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη ήταν η γλυκόζη και η ξυλόζη, καθώς και μίγματα αυτών. Όλες οι ζυμώσεις πραγματοποιήθηκαν σε καλλιέργειες κλειστού τύπου και σε κάθε περίπτωση ο λόγος C/N ήταν υψηλός (140 mol/mol), προκειμένου να ευνοηθεί η συσσώρευση ενδοκυτταρικού λίπους. Επιπλέον, μετά την αριστοποίηση των παραμέτρων της καλλιέργειας, έγινε εφαρμογή της διεργασίας σε βιοαντιδραστήρα και για το σκοπό αυτό επιλέχθηκε η ζύμωση που έδωσε τα πιο ικανοποιητικά αποτελέσματα, ήτοι 100 g/L γλυκόζη. Κατά τη διεξαγωγή της πειραματικής διαδικασίας, ο μύκητας παρουσίασε σημαντική κυτταρική αύξηση σε όλα τα υποστρώματα, καθώς και ικανοποιητική παραγωγή μικροβιακού λίπους πλούσιο σε GLA. Συγκεκριμένα, στο μέσο με 100 g/L γλυκόζη, ο μύκητας παρήγαγε 31.9 g/L βιομάζας και 15.0 g/L ενδοκυτταρικού λίπους με περιεκτικότητα σε GLA που έφτασε τα 1014.6 mg/L. Αντίθετα, στη ξυλόζη (100 g/L), ο μύκητας εμφάνισε μικρότερη κυτταρική αύξηση (21.4 g/L) σε σχέση με τη γλυκόζη και παρήγαγε 8.9 g/L λίπος με 534.4 mg/L GLA. Ωστόσο, στα μίγματα γλυκόζης-ξυλόζης, ο μύκητας αναπτύχθηκε ικανοποιητικά και παρήγαγε σημαντικές ποσότητες ενδοκυτταρικού λίπους με σημαντική περιεκτικότητα σε GLA. Στο μίγμα γλυκόζης-ξυλόζης 50:50 (g/L), ο μύκητας παρήγαγε 27.4 g/L βιομάζας, 12.6 g/L ενδοκυτταρικού λίπους και 974.9 mg/L GLA. Παρόμοια αποτελέσματα σημειώθηκαν κατά την καλλιέργεια του μύκητα στο μίγμα γλυκόζης-ξυλόζης 75:25 (g/L), με παραγωγή βιομάζας 29.5 g/L, ενδοκυτταρικό λίπος 10.8 g/L και 888.1 mg/L GLA. Επιπλέον, στο μίγμα γλυκόζης-ξυλόζης 25:75 (g/L), ο μύκητας παρήγαγε 27.1 g/L βιομάζας και 11.0 g/L ενδοκυτταρικού λίπους με 925.5 mg/L GLA. Η ζύμωση στο βιοαντιδραστήρα με 100 g/L γλυκόζη έδωσε ικανοποιητικά αποτελέσματα με παραγωγή βιομάζας 30.1 g/L και παραγωγή ενδοκυτταρικού λίπους 10.6 g/L. Ωστόσο, η περιεκτικότητα του λίπους σε GLA ήταν ελαφρώς χαμηλότερη και έφτασε τα 742.0 mg/L. Η εξέλιξη της κατανάλωσης της πηγής άνθρακα καταγράφηκε σε όλα τα θρεπτικά μέσα ανάπτυξης και σχεδόν σε όλες τις περιπτώσεις παρατηρήθηκε πλήρης εξάντλησή της. Αξίζει να σημειωθεί, ότι στα θρεπτικά υποστρώματα που περιείχαν τη ξυλόζη, είτε ως μοναδική πηγή άνθρακα είτε ως μίγμα, παρατηρήθηκε παραγωγή ξυλιτόλης, η συγκέντρωση της οποίας φτάνει σε μια μέγιστη τιμή και στη συνέχεια φαίνεται να ανακαταναλώνεται κατά την εξέλιξη των ζυμώσεων. Η μέγιστη ποσότητα ξυλιτόλης που παρήχθη ήταν 31.3 g/L όταν η ξυλόζη αποτέλεσε τη μοναδική πηγή

άνθρακα. Τέλος, πραγματοποιήθηκε ανάλυση της σύστασης του ενδοκυτταρικού λίπους σε λιπαρά οξέα και των κλάσεων αυτών (ουδέτερα λιπίδια, σφιγγο-και γλυκολιπίδια και φωσφολιπίδια). Από τις αναλύσεις αυτές στην πλειοψηφία των δειγμάτων προκύπτει ότι τα μεγαλύτερα ποσοστά παραγωγής γ -λινολενικού οξέος (GLA) σημειώνονται κατά την πρώιμη στάσιμη φάση του αυξητικού κύκλου, όταν δηλαδή η παραγωγή του ενδοκυτταρικού λίπους είναι χαμηλή. Επιπλέον, κατά την κλασμάτωση των λιπιδίων παρατηρήθηκε ότι τα ουδέτερα λιπίδια (N) αποτελούν το μεγαλύτερο ποσοστό των ολικών λιπιδίων (TFA) και ακολουθούν τα σφιγγο-και γλυκολιπίδια (SG) και τα φωσφολιπίδια (P) με χαμηλότερα ποσοστά. Μάλιστα, το κλάσμα των ουδέτερων λιπιδίων ομοιάζει σε σύσταση με αυτό των ολικών λιπιδίων, ενώ το κλάσμα των φωσφολιπιδίων, στις περισσότερες περιπτώσεις, εμφανίζει μεγαλύτερη ακορεστότητα σε σύγκριση με το ολικό λίπος του Ζυγομύκητα *T. elegans*.

Λέξεις κλειδιά: *Thamnidium elegans*, Λιγνοκυτταρινούχα υλικά, Μικροβιακό λίπος, γ -Λινολενικό οξύ, Ξυλιτόλη

ABSTRACT

Aim of the present study was to investigate the biochemical behavior and ability of a Zygomycetes strain, namely *Thamnidium elegans*, to accumulate single cell oil (SCO) rich in γ -linolenic acid (GLA), an unsaturated fatty acid (PUFA) of nutritional and medical importance. The aforementioned microorganism was cultivated on sugar-based renewable carbon sources, that are the principle products from hydrolysis of lignocellulosic residues. Particularly, the substrates used were glucose and xylose, either as sole carbon source or as mixture in foregone proportions. Experiments were conducted in shake-flasks as well as in a bioreactor, while in any case, nitrogen limited media were employed in order to direct the microbial metabolism towards the synthesis of intra-cellular lipid (initial molar C/N ratio 140 moles/moles). The microorganism grew well in all substrates, while lipid accumulation was overall satisfactory. Specifically, in case of glucose (100 g/L) *T. elegans* produced 31.9 g/L biomass and 15.0 g/L lipid with significant high GLA content (1014.6 mg/L). On the contrary, xylose (100 g/L) represented lower final concentrations as far as growth (21.4 g/L) and lipid accumulation (8.9 g/L) were concerned. However, the microorganism grew satisfactorily and produced noticeable amounts of lipids, rich in GLA, in all glucose-xylose mixtures. Especially, *T. elegans* grew well on glucose-xylose mixture 50:50 (g/L) and produced 27.4 g/L biomass with a lipid content of 12.6 g/L, yielding an amount of 974.9 mg/L GLA. Similar results arose from the cultivation of the microorganism on the glucose-xylose mixture 75:25 (g/L), where the produced biomass was 29.5 g/L, containing 10.8 g/L lipid and 888.1 mg/L GLA. Furthermore, the glucose-xylose mixture 25:75 (g/L) was proven an adequate substrate for *T. elegans*, by producing fair amounts of biomass (27.1 g/L) with satisfactory lipid content (11.0 g/L), while the GLA yield was 925.5mg/L. Finally, cultivation in bioreactor (glucose 100 g/L) gave satisfactory results concerning the produced biomass (30.1 g/L) and the accumulated lipid (10.6 g/L) but the GLA yield was lower (742.0 mg/L) compared with the corresponding shake-flask experiment. Moreover, in substrates containing xylose, either as sole carbon source or as a mixture, production of xylitol took place, reaching a highest value of 31.3 g/L in trials with xylose as sole carbon source. Analysis of intra-cellular lipid showed that the highest GLA content was observed in early stationary growth phase (ES). Furthermore, fraction analysis of total lipids revealed that mycelia contained higher amounts of neutral lipids (N) than polar lipids (SG, P). Additionally, the composition of fatty acids of the neutral fraction resembled with that of total lipids, while the phospholipids, in most cases, were the most unsaturated fraction compared to the other lipid fractions of *T. elegans*.

Keywords: *Thamnidium elegans*, Lignocellulosic residues, Mycelial lipid, γ -linolenic acid, Xylitol

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

	Σελίδα
I. Εισαγωγή	10
I.1. Λιγνοκυτταρινούχα υποστρώματα	10
I.1.1. Σύσταση	10
I.1.2. Παραγωγή λιγνοκυτταρινούχων υποστρωμάτων	12
I.1.3. Αξιοποίηση λιγνοκυτταρινούχων υπολειμμάτων	13
I.2. Πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFAs)	15
I.2.1. Δομή και σύσταση των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (PUFAs)	15
I.2.2. Ιδιότητες των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (PUFAs)	17
I.2.3. γ - Λινολενικό οξύ (GLA, C18:3, ω -6)	18
I.2.4. Μικροβιακή παραγωγή λιπών και ελαίων	19
I.2.5. Παραλαβή και καθαρισμός των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (PUFAs)	22
I.3. Βιοχημεία συσσώρευσης ενδοκυτταρικού λίπους	24
I.4. Σκοπός της μελέτης	28
II. Υλικά και μέθοδοι	29
II.1. Βιολογικό υλικό	29
II.2. Θρεπτικά υποστρώματα	29
II.3. Αναλύσεις	31
II.3.1. Προσδιορισμός pH	31
II.3.2. Προσδιορισμός βιομάζας	31
II.3.3. Προσδιορισμός ανάγοντων σακχάρων με τη μέθοδο DNS	31
II.3.4. Προσδιορισμός ανάγοντων σακχάρων με HPLC	33
II.3.5. Μελέτη ενδοκυτταρικού λίπους	35
III. Αποτελέσματα	38
III.1. Καλλιέργεια του Ζυγομύκητα <i>Thamnidium elegans</i> στη γλυκόζη ($S_{0\text{ GLU}}=100\text{ g/L}$)	40
III.1.1. Κινητική της κυτταρικής αύξησης, της κατανάλωσης υποστρώματος και της συσσώρευσης λίπους.	40
III.2. Καλλιέργεια του Ζυγομύκητα <i>Thamnidium elegans</i> στη ξυλόζη ($S_{0\text{ XYL}}=100\text{ g/L}$)	46
III.2.1. Κινητική της κυτταρικής αύξησης, της κατανάλωσης υποστρώματος και της συσσώρευσης λίπους.	46
III.3. Καλλιέργεια του Ζυγομύκητα <i>Thamnidium elegans</i> σε μίγμα γλυκόζης και ξυλόζης με αναλογία 50:50 ($S_{0\text{ GLU}}=50\text{ g/L}$ και $S_{0\text{ XYL}}=50\text{ g/L}$)	51

III.3.1 Κινητική της κυτταρικής αύξησης, της κατανάλωσης υποστρώματος και της συσσώρευσης λίπους.	51
III.4. Καλλιέργεια του Ζυγομύκητα <i>Thamnidium elegans</i> σε μίγμα γλυκόζης και ξυλόζης με αναλογία 75:25 ($S_0_{\text{GLU}}=75$ g/L και $S_0_{\text{XYL}}=25$ g/L)	56
III.4.1. Κινητική της κυτταρικής αύξησης, της κατανάλωσης υποστρώματος και της συσσώρευσης λίπους.	56
III.5. Καλλιέργεια του Ζυγομύκητα <i>Thamnidium elegans</i> σε μίγμα γλυκόζης και ξυλόζης με αναλογία 25:75 ($S_0_{\text{GLU}}=25$ g/L και $S_0_{\text{XYL}}=75$ g/L)	61
III.5.1. Κινητική της κυτταρικής αύξησης, της κατανάλωσης υποστρώματος και της συσσώρευσης λίπους.	61
III.6. Καλλιέργεια του Ζυγομύκητα <i>Thamnidium elegans</i> σε γλυκόζη ($S_0=100$ g/L) σε βιοαντιδραστήρα	66
III.6.1. Κινητική της κυτταρικής αύξησης, της κατανάλωσης υποστρώματος και της συσσώρευσης λίπους.	66
IV. Συζήτηση	72
Βιβλιογραφία	86

I. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

I.1. ΛΙΓΝΟΚΥΤΤΑΡΙΝΟΥΧΑ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ

Τα θρεπτικά υποστρώματα στην πλειοψηφία τους περιλαμβάνουν πηγές άνθρακα, νιτρικών, ανόργανων συστατικών και άλλων θρεπτικών στοιχείων. Ωστόσο, η πηγή άνθρακα αποτελεί το κύριο συστατικό των θρεπτικών μέσων και απαντάται σε μεγαλύτερη συγκέντρωση σε αυτά. Ένας σημαντικός αριθμός πρώτων υλών που λειτουργούν ως θρεπτικά μέσα, καθώς και πρωτογενή υλικά που χρησιμοποιούνται ως πηγές άνθρακα, βρίσκουν εφαρμογή στις βιομηχανικές ζυμώσεις με σκοπό την παραγωγή βιοκαυσίμων και άλλων προϊόντων βιολογικής προέλευσης. Για παράδειγμα, οι υδατάνθρακες που προέρχονται από καλλιέργειες πλούσιες σε σάκχαρα ή άμυλο αποτελούν τις κύριες πηγές άνθρακα στις βιομηχανικές ζυμώσεις. Επιπλέον, τα λίπη και τα έλαια χρησιμοποιούνται ως μόνη πηγή άνθρακα ή σε συνδυασμό με τους υδατανθράκες, καθώς επίσης οι αλκοόλες και άλλα οργανικά συστατικά.

Τα τελευταία χρόνια, οι λιγνοκυτταρινούχες πρώτες ύλες έχουν γίνει αντικείμενο μελέτης και έχουν χρησιμοποιηθεί ως θρεπτικά μέσα σε βιομηχανικές ζυμώσεις. Το ξύλο, το γρασίδι, τα διάφορα γεωργικά και δασικά υπολείμματα, καθώς και τα θειούχα υδατικά διαλύματα χαρτοποιίας, που είναι άφθονα στη φύση και δύνανται να βιο-αποικοδομηθούν, αποτελούν τις κύριες πηγές των λιγνοκυτταρινούχων υποστρωμάτων. Ιδιαίτερη σημασία πρέπει να δοθεί στην αξιοποίηση των λιγνοκυτταρινούχων υλικών από τα υπολείμματα των γεωργικών καλλιεργειών, ο όγκος των οποίων αυξάνει συνεχώς και οδηγεί στην υποβάθμιση του περιβάλλοντος και στην απώλεια ωφέλιμων υλικών, τα οποία μπορούν να χρησιμοποιηθούν για παραγωγή βιο-καυσίμων, για δημιουργία προϊόντων κομποστοποίησης (compost) καθώς και για τη διατροφή του ανθρώπου και των ζώων.

I.1.1. Σύσταση

Τα λιγνοκυτταρινούχα υλικά, όπως φαίνεται στην εικόνα I.1, αποτελούνται από κυτταρίνη σε μεγαλύτερο ποσοστό (30–60%), ημικυτταρίνες (20–40%) και λιγνίνη (10–30%). Η κυτταρίνη και οι ημικυτταρίνες είναι μακρομόρια που αποτελούνται από διάφορα σάκχαρα, ενώ η λιγνίνη είναι ένα φαινολικό πολυμερές. Η συγκέντρωση των συστατικών αυτών ποικίλει στις διάφορες πηγές των λιγνοκυτταρινούχων υλικών (Πίνακας I.1).

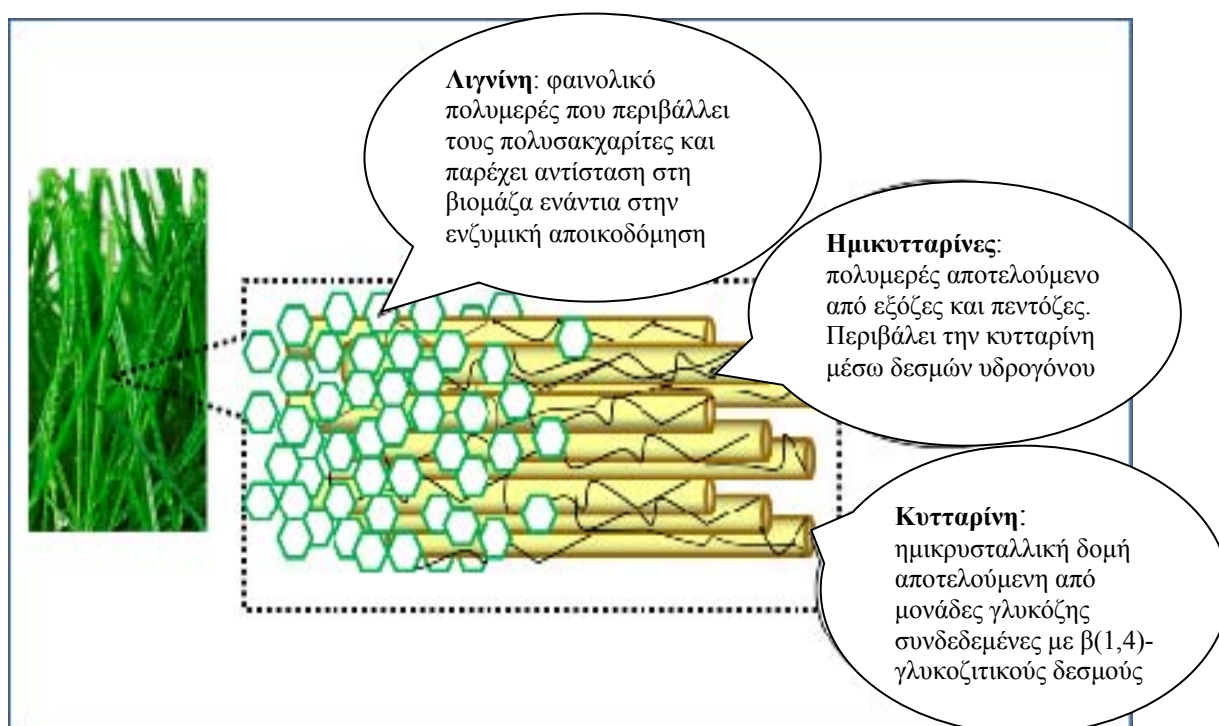
Πίνακας I.1. Μέση περιεκτικότητα (%) διαφόρων φυτικών ιστών σε λιγνοκυτταρινούχα συστατικά (Peters, 2006)

Πηγή	Κυτταρίνη	Ημικυτταρίνες	Λιγνίνη
Ευλεία φυλλοβόλων δέντρων	43-47	25-35	16-24
Ευλεία κωνοφόρων δέντρων	40-44	25-29	25-31
Σιτάρι	30	50	15
Στελέχη από αραβόσιτο	45	35	15
Βαγγάση (Ζαχαροκαλαμόσκονη)	40	30	20

Η κυτταρίνη είναι ένας πολυσακχαρίτης που αποτελείται από μονάδες D-γλυκόζης ενωμένες με β -1,4-γλυκοζιτικούς δεσμούς. Έτσι, δημιουργούνται μακριές αλυσίδες που συνδέονται μεταξύ τους με δεσμούς υδρογόνου και δυνάμεις van der Waals. Η κυτταρίνη απαντάται σε κρυσταλλική μορφή και λόγω των δεσμών υδρογόνου σημειώνονται άμορφες περιοχές στις ίνες της. Εξαιτίας της διαμόρφωσης αυτής, η κυτταρίνη είναι περισσότερο επιρρεπής στην ενζυμική αποικοδόμηση.

Οι ημικυτταρίνες είναι πολυσακχαρίτες με μικρότερο μοριακό βάρος από αυτό της κυτταρίνης. Η δομή τους αποτελείται από κοντές και διακλαδισμένες αλυσίδες σακχάρων (εξόζες και πεντόζες). Αυτό σημαίνει ότι οι ημικυτταρίνες αποτελούνται από σάκχαρα με 6 άτομα άνθρακα (γαλακτόζη, γλυκόζη και μανόζη) και από σάκχαρα με 5 άτομα άνθρακα (ξυλόζη και αραβινόζη). Οι ημικυτταρίνες που προέρχονται από ξυλεία των φυλλοβόλων διαθέτουν περισσότερα σάκχαρα με 5 άτομα άνθρακα (κυρίως ξυλόζη), ενώ οι ημικυτταρίνες που προέρχονται από ξυλεία των κωνοφόρων μετρούν περισσότερα σάκχαρα με 6 άτομα άνθρακα. Επιπλέον, οι ημικυτταρίνες υδρολύονται πιο εύκολα σε σχέση με την κυτταρίνη.

Η λιγνίνη είναι ένα άμορφο ετερομερές, μη διαλυτό στο νερό και οπτικά ανενεργό, το οποίο δομείται από μονάδες φαινολοπροπανίου που συνδέονται μεταξύ τους με δεσμούς που δεν υδρολύονται. Η λιγνίνη συνδέεται τόσο με την κυτταρίνη, όσο και με τις ημικυτταρίνες, σχηματίζοντας ένα αδιαπέραστο φυσικό κάλυμα στο κυτταρικό τοίχωμα των φυτικών οργανισμών. Με αυτό τον τρόπο παρέχει στο κυτταρικό τοίχωμα μηχανική υποστήριξη, αδιαπερατότητα και αντίσταση στις προσβολές από μικροοργανισμούς και στο οξειδωτικό stress.



Σχήμα 1.1. Δομή λιγνοκυτταρινούχων υλικών (www.napier.ac.uk)

I.1.2. Παραγωγή λιγνοκυτταρινούχων υποστρωμάτων

Η δομή και η σύσταση των λιγνοκυτταρινούχων υλικών (κυτταρίνη, ημικυτταρίνες και λιγνίνη) είναι υπεύθυνη για την αντίσταση τους στην υδρόλυση και την αποικοδόμηση από τα ένζυμα. Για αυτό το λόγο, προκειμένου τα λιγνοκυτταρινούχα υλικά να μετατραπούν σε αποικοδομήσιμα υποστρώματα, θα πρέπει να προηγηθούν κατάλληλοι χειρισμοί και διεργασίες έτσι ώστε να απομακρυνθεί η λιγνίνη. Ωστόσο, θα πρέπει να παρεμποδιστεί η αποικοδόμηση των προϊόντων υδρόλυσης (π.χ. οι αντιδράσεις αποικοδόμησης των μονοσακχαριτών οδηγούν στο σχηματισμό φουρφουράλης ή 5-υδροξυμεθυλοφουρφουράλης) (Peters, 2007). Η αποικοδόμηση των λιγνοκυτταρινούχων υπολειμμάτων περιλαμβάνει μια σειρά διεργασιών αποτελούμενες από (Sánchez, 2009):

- 1) προεπεξεργασία (μηχανική, χημική ή βιολογική)
- 2) υδρόλυση των πολυμερών για την παραγωγή αποικοδομήσιμων σακχάρων (π.χ. εξόζες, πεντόζες)
- 3) αξιοποίηση των ενώσεων αυτών ως υποστρώματα για την ανάπτυξη μικροοργανισμών ή την παραγωγή χημικών προϊόντων
- 4) διαχωρισμός και καθαρισμός

Μετά τον μηχανικό διαχωρισμό και τον τεμαχισμό, η βιομάζα των λιγνοκυτταρινούχων υπολειμμάτων πρέπει να υδρολυθεί έτσι ώστε να γίνει μετατροπή της κυτταρίνης και των ημικυτταρινών σε απλούς υδατάνθρακες με 6 και 5 άτομα άνθρακα. Το μίγμα των σακχάρων που προκύπτει μετά την υδρόλυση περιέχει κυρίως γλυκόζη και ξυλόζη, και σε μικρότερες ποσότητες αραβινόζη, γαλακτόζη και μανόζη.

Σύμφωνα με τον Peters (2007), η τεχνολογία της υδρόλυσης μπορεί να περιλαμβάνει φυσικές διεργασίες (explosion-καύση με ατμό, καύση με αμμωνία, ζεστό νερό, θερμοϋδρόλυση υπό πίεση), χημικές μεθόδους, όπως υδρόλυση με συμπυκνωμένο και αραιωμένο οξύ και ακόμα ενζυμικές μεθόδους οι οποίες συχνά συνδυάζονται με τη χημική υδρόλυση. Τα υγρά υδρολύματα που παραλαμβάνονται από κάθε στάδιο και περιέχουν τα σάκχαρα, καθαρίζονται για να αξιοποιηθούν στη συνέχεια ως πηγή άνθρακα στις διάφορες ζυμώσεις.

Οι μικροοργανισμοί που είναι κυρίως υπεύθυνοι για την αποικοδόμηση των λιγνοκυτταρινούχων υπολειμμάτων είναι οι μύκητες. Η ικανότητα τους να αποικοδομούν αποτελεσματικά τα λιγνοκυτταρινούχα υλικά σχετίζεται με την ανάπτυξη του μυκηλίου τους κατά τη διάρκεια της οποίας μεταφέρουν ανεπιθύμητα συστατικά, όπως νιτρικά και σίδηρο, στο φτωχό σε θρεπτικά στοιχεία υπόστρωμα των λιγνοκυτταρινούχων υλικών, που αποτελεί τη δική τους πηγή άνθρακα. Οι μύκητες διαθέτουν δυο τύπους εξωκυτταρικού ενζυμικού συστήματος: το υδρολυτικό σύστημα, κατά το οποίο παράγουν υδρολάσες που αποικοδομούν τους πολυσακχαρίτες και το εξωκυτταρικό και οξειδωτικό λιγνολυτικό σύστημα, όπου αποικοδομούν τη λιγνίνη και λύουν τους

φαινολικούς δακτυλίους. Μύκητες όπως οι *Phanerochaete chrysosporium*, *Trichoderma reesei*, *Ceriporiopsis subvermispora*, θεωρούνται ιδιαίτερα αποτελεσματικοί στην αποικοδόμηση των λιγνοκυτταρινούχων υλικών (Sánchez, 2009).

Η διεργασία κατά την οποία η ενζυμική υδρόλυση πραγματοποιείται χωριστά από τη διαδικασία της ζύμωσης είναι γνωστή ως ξεχωριστή υδρόλυση και ζύμωση (Separate Hydrolysis and Fermentation, SHF). Ωστόσο, υπάρχουν και ταυτόχρονες διεργασίες σακχαροποίησης της κυτταρίνης σε γλυκόζη και της ζύμωσης (Simultaneous Saccharification and Fermentation, SSF), καθώς επίσης ταυτόχρονη σακχαροποίηση της κυτταρίνης και των ημικυτταρινών σε εξόζες και πεντόζες, αντίστοιχα, και της ζύμωσης όλων των αποικοδομήσιμων σακχάρων (Simultaneous Saccharification Co-Fermentation, SSCF). Τα στερεά υπολείμματα της κυτταρίνης και της λιγνίνης μετά την υδρόλυση μπορούν να αξιοποιηθούν ως καύσιμα για παραγωγή ενέργειας (Peters, 2007).

Την τελευταία δεκαετία έχουν αναπτυχθεί διάφορες διεργασίες υδρόλυσης των λιγνοκυτταρινούχων υλικών με τη χρήση οξέων, με σκοπό τη σακχαροποίηση του ξύλου για παραγωγή αποικοδομήσιμων σακχάρων που μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως πηγές άνθρακα στις διάφορες ζυμώσεις. Μόνο οι δύο από αυτές έχουν εξελιχθεί σε σημαντικές: η διεργασία Bergius-Rheinau και η διεργασία Scholler-Tornesch (Peters, 2007). Η διεργασία Bergius-Rheinau αποτελεί τη μόνη διεργασία κατά την οποία παραλαμβάνεται κρυσταλλική γλυκόζη προερχόμενη από την κυτταρίνη του ξύλου. Επίσης, η ζύμωση ακετόνης-βουτανόλης-αιθανόλης (Acetone-Butanol-Ethanol, ABE), ήταν πριν, κατά τη διάρκεια και λίγο μετά το δεύτερο παγκόσμιο πόλεμο, η σημαντικότερη διεργασία βιομηχανικής ζύμωσης. Οι πρώτες ύλες που χρησιμοποιούνταν για τη ζύμωση αυτή ήταν τα υπολείμματα γεωργικών εκμεταλλεύσεων και τα παραγόμενα προϊόντα αποτελούσαν η ακετόνη και η βουτανόλη (Jones, 2001).

I.1.3. Αξιοποίηση λιγνοκυτταρινούχων υπολειμμάτων

Η βιο-αποικοδόμηση των λιγνοκυτταρινούχων υπολειμμάτων και η βιομετατροπή αυτών σε προϊόντα υψηλής προστιθέμενης αξίας απαιτεί μια σειρά διεργασιών, όπως αναφέρθηκε παραπάνω. Η αξιοποίηση των αποικοδομήσιμων λιγνοκυτταρινούχων υπολειμμάτων αναπτύσσεται συνεχώς και αφορά πολλούς τομείς. Μεταξύ αυτών είναι η χρήση τους ως πρώτες ύλες για την παραγωγή αιθανόλης, για τις χαρτοβιομηχανίες, την παραγωγή compost, την καλλιέργεια εδώδιμων μανιταριών και άμεσα για την διατροφή των ζώων (Sánchez, 2009).

Η έρευνα για την εύρεση εναλλακτικών πηγών με σκοπό την παραγωγή καυσίμων χρησιμοποιώντας βιολογικές μεθόδους έχει αναπτυχθεί αρκετά, κυρίως λόγω της ανάγκης για την προστασία του περιβάλλοντος. Η αιθανόλη μπορεί να αξιοποιηθεί είτε ως χημική πρώτη ύλη είτε ως πρόσθετο στη βενζίνη, με αποτέλεσμα τη μείωση εκπομπής αερίων που είναι υπεύθυνα για το φαινόμενο του θερμοκηπίου, τη μείωση της ατμοσφαιρικής ρύπανσης και την αύξηση του κέρδους.

Τις δυο τελευταίες δεκαετίες, το κόστος της βιο-αποικοδόμησης των λιγνοκυτταρινούχων υπολειμμάτων για την παραγωγή αιθανόλης έχει μειωθεί αρκετά ώστε να καθιστά τη μέθοδο αυτή οικονομικά βιώσιμη.

Επιπλέον, η καλλιέργεια εδώδιμων μανιταριών μέσω της αξιοποίησης των λιγνοκυτταρινούχων υπολειμμάτων ως υποστρώματων, αποτελεί μια ενδιαφέρουσα βιοεφαρμογή, αφού μέσω αυτής, μετατρέπονται τα εν λόγω υλικά σε προϊόντα διατροφής για τον άνθρωπο. Η βιολογική αυτή διαδικασία είναι αρκετά αποτελεσματική όσον αφορά την ανακύκλωση των λιγνοκυτταρινούχων υλικών. Τα μανιτάρια μπορούν να αναπτυχθούν ικανοποιητικά σε μια μεγάλη ποικιλία λιγνοκυτταρινούχων υπολειμμάτων, όπως τα στάχυα των δημητριακών, τα φύλλα μπανάνας, πολτός από καφέ κτλ. Επίσης, κάποιοι μικροοργανισμοί έχουν τη δυνατότητα να μετατρέπουν την κυτταρίνη και άλλα σάκχαρα των φυτικών ιστών σε μεγάλες ποσότητες οξικού, βουτυρικού και προπιονικού οξέος, τα οποία αποτελούν πηγές άνθρακα και ενέργειας για τα μηρυκαστικά ζώα.

Στη λίστα των προϊόντων προστιθέμενης αξίας που μπορούν να παραχθούν από την αξιοποίηση των λιγνοκυτταρινούχων υπολειμμάτων συμπεριλαμβάνονται και άλλα προϊόντα, όπως οργανικά οξέα, αμινοξέα, βιταμίνες και πλήθος σακχάρων από βακτήρια και μύκητες (ξανθίνες), σε ζυμώσεις που ως πηγή άνθρακα χρησιμοποιείται η γλυκόζη (Sánchez, 2009). Αξίζει να σημειωθεί ότι η παραγωγή μικροβιακού λίπους και ιδιαιτέρως λιπιδίων που περιέχουν πολυακόρεστα λιπαρά οξέα σπανίως απαντώνται στη φύση, αποτελεί ακόμη μια κατηγορία προϊόντων που μπορούν να παραχθούν από την αξιοποίηση των λιγνοκυτταρινούχων υπολειμμάτων. Κάποιοι μικροοργανισμοί, κυρίως μύκητες, όταν αναπτύσσονται σε υπόστρωμα με υψηλή συγκέντρωση πηγής άνθρακα, έχουν τη δυνατότητα να συσσωρεύουν λίπος σε σημαντικές ποσότητες, στο οποίο ενδέχεται να περιέχονται σε ποικίλα ποσά το λιπαρό οξύ γ-λινολενικό (GLA). Το συγκεκριμένο λιπαρό οξύ παρουσιάζει εξαιρετικό ενδιαφέρον εξαιτίας των φαρμακευτικών και διατροφικών ιδιοτήτων που διαθέτει. Ωστόσο, το κόστος της παραγωγής μικροβιακού ενδοκυτταρικού λίπους είναι υψηλό. Για το λόγο αυτό, το βιοτεχνολογικό ενδιαφέρον έχει στραφεί προς την αξιοποίηση υπολειμμάτων ως υποστρώματων για την καλλιέργεια αυτών των μικροοργανισμών. Αξίζει δε να σημειωθεί ότι τα προϊόντα υδρόλυσης των λιγνοκυτταρινούχων υλικών (π.χ. γλυκόζη και ξυλόζη) αποτελούν άριστο υπόστρωμα για την ανάπτυξη των μυκήτων, ενώ υπό δεδομένες συνθήκες καλλιέργειας δύναται να ευνοηθεί η συσσώρευση του ενδοκυτταρικού λίπους.

Η δυνατότητα αυτή βρίσκει εφαρμογή στην παρούσα ερευνητική μελέτη, η οποία έχει ως στόχο την αξιοποίηση προϊόντων υδρόλυσης λιγνοκυτταρινούχων υπολειμμάτων (γλυκόζη και ξυλόζη) προς μια εναλλακτική κατεύθυνση για την παραγωγή μικροβιακού λίπους και πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (PUFAs).

1.2. ΠΟΛΥΑΚΟΡΕΣΤΑ ΛΙΠΑΡΑ ΟΞΕΑ (PUFAs)

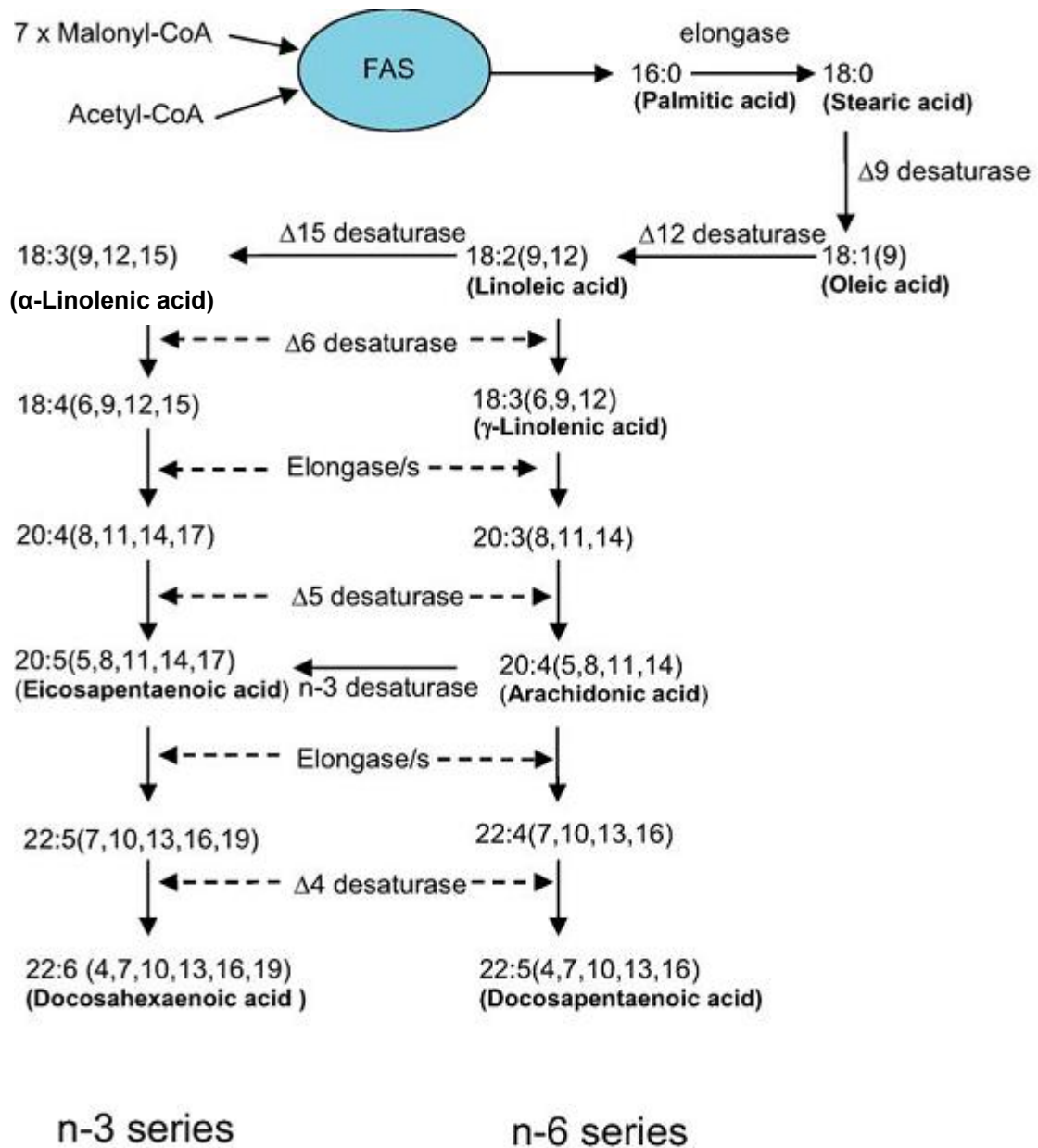
1.2.1. Δομή και σύσταση των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (PUFAs)

Τα λιπαρά οξέα είναι οργανικές ενώσεις που αποτελούνται από αλυσίδες υδρογονανθράκων οι οποίες καταλήγουν σε μια καρβοξυλική ομάδα. Ανάλογα με τη φύση της ανθρακικής αλυσίδας, τα λιπαρά οξέα διακρίνονται σε κορεσμένα λιπαρά οξέα (διαθέτουν μόνο απλούς δεσμούς στο μόριο τους) και σε ακόρεστα λιπαρά οξέα (διαθέτουν τουλάχιστον ένα διπλό δεσμό στο μόριο τους). Τα ακόρεστα λιπαρά οξέα διακρίνονται σε μονοακόρεστα (ένας διπλός δεσμός) και σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFAs) όταν διαθέτουν περισσότερους διπλούς δεσμούς.

Πολλά από τα λιπαρά οξέα μπορούν να συντεθούν από τον ανθρώπινο οργανισμό *de novo*, όμως υπάρχει μια κατηγορία πολυακόρεστων λιπαρών οξέων, τα απαραίτητα λιπαρά οξέα (Essential Fatty Acids—EFAs), τα οποία δε μπορούν να παραχθούν από τον άνθρωπο. Αυτά τα λιπαρά οξέα (EFAs) διακρίνονται σε δυο κύριες κατηγορίες: τα λιπαρά οξέα που ανήκουν στην ω-3 ομάδα (λινολενικός τύπος) και αυτά που ανήκουν στην ω-6 ομάδα (λινελαϊκός τύπος), ανάλογα με τη θέση του τελευταίου διπλού δεσμού σε σχέση με την τελική μεθυλική ομάδα. Η βιοσύνθεση των δυο βασικών αυτών ομάδων των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων παρουσιάζεται στο σχήμα 1.2. Η ομάδα ω-6 και ω-3 συντίθενται από το λινελαϊκό οξύ (C18:2, ω-6) και το α-λινολενικό οξύ (C18:3, ω-3), αντίστοιχα. Τόσο το λινελαϊκό όσο και το α-λινολενικό οξύ ανήκουν στα απαραίτητα λιπαρά οξέα (EFAs) και όπως αναφέρθηκε παραπάνω, δε μπορούν να συντεθούν *de novo* από τον άνθρωπο. Ωστόσο, τα απαραίτητα αυτά λιπαρά οξέα συντίθενται στους φυτικούς οργανισμούς από τους οποίους ο άνθρωπος τα παραλαμβάνει μέσω της τροφής. Το λινελαϊκό οξύ (C18:2, ω-6) και το α-λινολενικό οξύ (C18:3, ω-3), μετά την πρόσληψη τους, αποτελούν πρόδρομες ενώσεις για το σχηματισμό μακρομοριακών πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (Long Chain Polyunsaturated Fatty Acids, LC-PUFAs), που περιέχουν 20 ή και περισσότερα άτομα άνθρακα, καθώς και τρεις ή περισσότερους διπλούς δεσμούς (Ratledge and Wynn, 2006). Αξίζει να σημειωθεί ότι η σύνθεση των μακρομοριακών πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (LC-PUFAs) από τα απαραίτητα λιπαρά οξέα, που λειτουργούν ως προάγγελοι, λαμβάνει χώρα μόνο στα ζωϊκά κύτταρα, ενώ η σύνθεση τους στα φυτικά κύτταρα είναι αδύνατη. Επομένως, το ζωϊκό λίπος και ιδιαίτερα το ιχθυέλαιο αποτελεί κύρια πηγή παραγωγής μακρομοριακών πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (LC-PUFAs). Τα μακρομοριακά πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (LC-PUFAs) που προέρχονται τόσο από την ομάδα ω-3 όσο και από την ομάδα ω-6, αποτελούν ενώσεις κλειδιά για τη ρύθμιση της ρευστότητας των μεμβρανών και για άλλες λειτουργίες που σχετίζονται με αυτήν. Το λινελαϊκό οξύ (C18:2, ω-6) αποτελεί πρόδρομη ένωση για τη σύνθεση του γ-λινολενικού οξέος (GLA, C18:3, ω-6) και του αραχιδονικού οξέος (ARA, C20:4, ω-6), ενώ το α-λινολενικό οξύ (C18:3, ω-3) είναι προάγγελος για τη σύνθεση του εικοσιδυοεξανοϊκού οξέος (DHA, C22:6, ω-3) και του εικοσιπεντενοϊκού οξέος

(EPA, C20:5, ω-3). Ο ρόλος του DHA στην ανάπτυξη του εγκεφάλου τονίζεται ιδιαίτερα, καθώς μια διατροφή πλούσια σε DHA συμβάλλει στην αύξηση του μεγέθους του εγκεφάλου και επομένως και στην ανάπτυξη της νοητικής ικανότητας.

Επίσης, το αραχιδονικό οξύ (ARA, C20:4, ω-6) και το διομο-γ-λινολενικό οξύ (C20:3, ω-6) είναι προάγγελοι της ω-6 ομάδας για τη σύνθεση των προσταγλανδινών, ενώ το εικοσιπεντενοϊκό οξύ (C20:5, ω-3) αποτελεί πρόδρομη ένωση της ομάδας ω-3 για τη σύνθεση επίσης των προσταγλανδινών (Ratledge and Wynn, 2006).



Σχήμα 1.2. Βιοσύνθεση *de novo* των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (PUFAs) των ομάδων ω-3 και ω-6 (Ratledge, 2004).

1.2.2. Ιδιότητες των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (PUFAs)

Τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (Polyunsaturated Fatty acids–PUFAs) παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον γιατί παίζουν σημαντικό ρόλο στη διατροφή και τη λειτουργία του ανθρώπινου οργανισμού. Οι κύριες πηγές που είναι πλούσιες σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα με 18 άτομα C (C18 PUFAs) είναι οι σπόροι κάποιων φυτών με μεγάλη περιεκτικότητα σε λινελαϊκό οξύ (C18:2, ω -6) και σε α -λινολενικό οξύ (C18:3, ω -3). Αντίθετα, τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFAs) με περισσότερα από 18 άτομα C στο μόριο τους δε μπορούν να συντεθούν από τα ανώτερα φυτικά είδη εξαιτίας της έλλειψης των απαιτούμενων ενζύμων (Certik and Shimizu, 1999). Ωστόσο, το λίπος των ψαριών είναι πλούσιο σε λιπαρά οξέα της ομάδας ω -3, όπως το εικοσιπεντενοϊκό οξύ (EPA, C20:5, ω -3) και το εικοσιδυοεξενοϊκό οξύ (DHA, C22:6, ω -3).

Παρά το γεγονός ότι σε γενικές γραμμές τα λιπίδια θεωρούνται επιβλαβή για τη υγεία του ανθρώπου, όταν λαμβάνονται με μέτρο αποτελούν απαραίτητα και ωφέλιμα συστατικά για μια ισορροπημένη διατροφή. Τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα με τα μοναδικά δομικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά που διαθέτουν, ξεχωρίζουν για δυο βασικές λειτουργίες. Συμβάλλουν στη ρύθμιση της δομής, της δυναμικής και της διαπερατότητας των μεμβρανών και επιπλέον, ελέγχουν την έκφραση διαφόρων γονιδίων επηρεάζοντας διάφορες διεργασίες, όπως τη βιοσύνθεση των λιπαρών οξέων και τη μεταφορά της χοληστερόλης στο ανθρώπινο σώμα. Επιπλέον, ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει ο ρόλος των ακόρεστων λιπαρών οξέων ως προάγγελοι για τη σύνθεση διαφόρων μεταβολιτών-ορμονών (προσταγλανδίνες, υδροξυ-λιπαρά οξέα και εικοσανοειδή) που ρυθμίζουν σημαντικές βιολογικές λειτουργίες (Certik and Shimizu, 1999). Είναι φανερό ότι η παρουσία των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων σε κάθε οργανισμό είναι απαραίτητη προκειμένου να τελεστούν σωστά όλες οι λειτουργίες. Επομένως, η έλλειψη τους σε έναν οργανισμό μπορεί να οδηγήσει σε ανωμαλίες του δέρματος, του νευρικού, του ανοσοποιητικού και του καρδιαγγειακού συστήματος, καθώς και σε νεφρικά, αναπνευστικά και ενδοκρινολογικά προβλήματα.

Έχουν πραγματοποιηθεί πολλές μελέτες που αφορούν στην σπουδαιότητα των ω -3 λιπαρών οξέων και την αναγκαιότητα πρόσληψής τους από τον άνθρωπο. Επιδημιολογικές έρευνες έδειξαν ότι μια διατροφή πλούσια σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα της ομάδας ω -3 συμβάλλει στην πρόληψη από σοβαρές ασθένειες, όπως έμφραγμα του μυοκαρδίου και βρογχικό άσθμα. Επιπλέον, έχει μελετηθεί ότι τα ω -3 πολυακόρεστα λιπαρά οξέα μπορεί να έχουν θετικά αποτελέσματα σε ασθένειες όπως η ψωρίαση, οι νοητικές ασθένειες και η ρευματοειδής αρθρίτιδα (Rubio-Rodríguez et al., 2010).

1.2.3. γ -Λινολενικό οξύ (GLA, C18:3, ω -6)

Το γ -λινολενικό οξύ (GLA, C18:3, ω -6) ανήκει στην ομάδα ω -6 των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (PUFAs) και συντίθεται μετά από την Δ6 αφυδρογόνωση του λινελαϊκού οξέος (C18:2, ω -6). Η παρουσία του γ -λινολενικού οξέος (GLA, C18:3, ω -6) σε σημαντικές ποσότητες είναι σπάνια στους φυτικούς ιστούς και η πιο αξιοσημείωτη πηγή του συγκεκριμένου λιπαρού οξέος είναι οι σπόροι του ηράνθεμου (*Oenothera biennis*) με περιεκτικότητα σε GLA 8–10% (w/w). Επίσης, οι σπόροι του βοτάνου *Borago officinalis* περιέχουν 24–25% (w/w) GLA, ενώ οι σπόροι του φυτού *Ribes nigrum* έχουν περιεκτικότητα 16–17% (w/w) σε γ -λινολενικό οξύ (Certik and Shimizu, 1999; Ratledge and Wynn, 2006). Ωστόσο, αρκετοί μύκητες και ορισμένα μικροφύκη δύνανται να συσσωρεύουν λίπος με ικανοποιητική περιεκτικότητα σε GLA. Οι σημαντικότεροι μικροοργανισμοί που παράγουν GLA είναι οι μύκητες του γένους *Mucor*, *Rhizopus* και *Mortierella*, καθώς και ορισμένα μικροφύκη, όπως *Spirulina platensis* και *Chlorella vulgaris* (Chen and Chang, 1996; Certik and Shimizu, 1999). Είναι λοιπόν φανερό, ότι η περιεκτικότητα των τροφών σε GLA είναι περιορισμένη, με εξαίρεση το μητρικό γάλα. Επομένως, η πρόσληψη επαρκούς ποσότητας γ -λινολενικού οξέος μέσω της διατροφής, έτσι ώστε να επιτυγχάνονται θρεπτικά και θεραπευτικά οφέλη, είναι πρακτικά αδύνατη.

Το γ -λινολενικό οξύ (GLA) διαθέτει εκτός από σημαντική διατροφική αξία και θεραπευτικές ιδιότητες. Έρευνες έχουν δείξει ότι η πρόσληψη GLA έχει θετικά αποτελέσματα στην αντιμετώπιση της ρευματοειδούς αρθρίτιδας (Ahmed et al., 2009), δερματικών προβλημάτων (έκζεμα), προεμμηνορροϊκής έντασης, φλεγμονών, καρδιαγγειακών προβλημάτων καθώς και κάποιων μορφών καρκίνου (Hogrobin, 1992). Συγκεκριμένα, η πρόσληψη GLA σε ποσότητα 4-8 g/ημέρα μπορεί να παρεμποδίσει την ανάπτυξη του καρκίνου του μαστού ή του δέρματος. Το γλοϊώμα αποτελεί τη συχνότερη και σοβαρότερη μορφή καρκίνου του εγκεφάλου και έχουν πραγματοποιηθεί πολλές *in vitro* και *in vivo* μελέτες για την αντιμετώπιση του με τη βοήθεια του γ -λινολενικού οξέος (GLA). Το GLA παρουσιάζει επιλεκτική και στοχευμένη δραστηριότητα στα κύτταρα του γλοϊώματος, χωρίς να προκαλεί βλάβη στα υγιή νευρικά κύτταρα, ενώ εμφανίζει μικρή ή μηδενική νευροτοξικότητα. Επιπλέον, το GLA επιφέρει απόπτωση των καρκινικών κυττάρων του εγκεφάλου, ενισχύοντας παράλληλα τη ριζική ανανέωση των κυττάρων (Das, 2003). Ακόμη, μελέτες δεικνύουν ότι λιπαρά οξέα, όπως το γ -λινολενικό οξύ (GLA), μπορεί να αυξήσουν την κυτταροτοξικότητα ενός αντικαρκινικού φαρμάκου σε καρκινικά κύτταρα του μαστού (Menéndez et al., 2000). Το γεγονός αυτό αποδεικνύει την αποτελεσματικότητα και τη συμβολή ορισμένων ακόρεστων λιπαρών οξέων στη χημειοθεραπεία για την αντιμετώπιση κακοηθών όγκων.

Επομένως, η ενδεδειγμένη μελέτη και η γνώση της αξιοποίησης του γ -λινολενικού οξέος (GLA), τόσο για τις διατροφικές όσο και για τις θεραπευτικές του ιδιότητες, τυγχάνουν συνεχούς εξέλιξης. Παρόλα αυτά, πολλές πληροφορίες που προκύπτουν από τις κλινικές βιβλιογραφικές

έρευνες δεν είναι γνωστές σε αρκετό κόσμο που ασχολείται με τη βιοχήμεια των απαραίτητων λιπαρών οξέων (EFAs).

1.2.4. Μικροβιακή παραγωγή λιπών και ελαίων

Ο άνθρωπος από τα αρχαία χρόνια χρησιμοποίησε τους μικροοργανισμούς ως πηγή θρεπτικών συστατικών και τροφής, όπως τα ζυμούμενα τρόφιμα (γιαούρτι, τυρί, αλλαντικά) και τα αλκοολούχα ποτά τα οποία έχουν υποστεί ζυμώσεις (μπύρα, κρασί). Με το ίδιο σκεπτικό της παραγωγής μικροβιακής βιομάζας ως πηγή πρωτεϊνών για τα τρόφιμα, γίνεται προσπάθεια παραγωγής λίπους και ελαίων αξιοποιώντας τους μικροοργανισμούς. Το μικροβιακό λίπος, γνωστό ως Single Cell Oil (SCO), αφορά στο λίπος που παραλαμβάνεται από ένα μικροοργανισμό, ενώ παρουσιάζει συνηθέστερα σύσταση ομοιάζουσα με εκείνης των ελαίων φυτικής ή/ και ζωϊκής προέλευσης. Ωστόσο, υπάρχουν κάποιες βασικές αρχές που θα πρέπει να ληφθούν υπ' όψιν (Ratledge and Wynn, 2006):

1. Η συσσώρευση λίπους δεν επιτελείται από όλους τους μικροοργανισμούς. Οι μικροοργανισμοί που παράγουν λίπος πάνω από το 20% της ξηρής βιομάζας τους ονομάζονται ελαιογόνοι.

2. Οι κύριοι οργανισμοί παραγωγί λίπους είναι οι μύκητες και οι ζύμες.

3. Κάποιοι μικροοργανισμοί συσσωρεύουν μεγαλύτερες ποσότητες λίπους από κάποιους άλλους.

4. Κάποιοι μικροοργανισμοί μπορούν να παράγουν λίπος έως και 70% (w/w) επί της ξηρής βιομάζας τους.

5. Η συσσώρευση λίπους σε ένα μικροοργανισμό ενεργοποιείται από την εξάντληση κάποιου θρεπτικού συστατικού (συνήθως αζώτου) στο θρεπτικό μέσο και η υπάρχουσα πηγή άνθρακα (συνήθως γλυκόζη) συνεχίζει να αφομειώνεται από το μικροοργανισμό και αποθηκεύεται αποθησαυριστικά σε λίπος.

6. Τα έλαια που συσσωρεύονται από τους μικροοργανισμούς έχουν την ίδια σύσταση με αυτά που απαντώνται στους σπόρους των ελαιογόνων φυτών (τριγλυκερίδια και εστεροποιημένα λιπαρά οξέα).

Οι ελαιογόνοι μικροοργανισμοί δύνανται να συσσωρεύουν λίπος σε ποσότητα μεγαλύτερη από το 20% (w/w) της ξηρής βιομάζας τους και παράγουν ευρύ φάσμα λιπαρών οξέων που ομοιάζουν με αυτά που απαντώνται στο λίπος των φυτών. Οι κύριοι μικροοργανισμοί που παράγουν μικροβιακό λίπος είναι οι μύκητες, οι ζύμες και ορισμένα μικροφύκη. Αξίζει να σημειωθεί ότι κάποιοι μικροοργανισμοί (κυρίως είδη μυκήτων και μικροφύκων) παράγουν πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFAs), τα οποία διαθέτουν μακρύτερες μοριακές αλυσίδες και είναι

περισσότερο ακόρεστα σε σύγκριση με τα λιπαρά οξέα που εντοπίζονται στους φυτικούς οργανισμούς (Πίνακας I.2)

Το εικοσιδυοεξενοϊκό οξύ (DHA, C22:6, ω-3) και το αραχιδονικό οξύ (ARA, C20:4, ω-6) είναι λιπαρά οξέα σημαντικής βιολογική αξίας μιας και βρίσκονται σε μεγάλο ποσοστό στους ιστούς του εγκεφάλου και στο μητρικό γάλα, αλλά απουσιάζουν από το γάλα της αγελάδος και τα παρασκευάσματα βρεφικού γάλακτος. Έχει αποδειχθεί λοιπόν, ότι τα δυο αυτά λιπαρά οξέα παίζουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη του εγκεφάλου των νεογνών και βελτιώνουν τη μνήμη και την όραση τους. Παρά το γεγονός ότι το ιχθυέλαιο περιέχει μεγάλες ποσότητες σε εικοσιδυοεξενοϊκό οξύ (DHA, C22:6, ω-3), αντενδείκνυται για τη διατροφή των βρεφών λόγω της πιθανής παρουσίας ρυπογόνων ενώσεων (διοξίνες, PCBs, και βαρέα μέταλλα) εξαιτίας της περιβαλλοντικής ρύπανσης. Για αυτό το λόγο οι έρευνες στρέφονται στην πιθανή χρήση μικροοργανισμών, οι οποίοι μπορούν να παράγουν το εικοσιδυοεξενοϊκό οξύ (DHA, C22:6, ω-3). Η παραγωγή του αραχιδονικού οξέος (ARA, C20:4, ω-6) από το μύκητα *Mortierella alpina* ήταν ήδη γνωστή στην Ιαπωνία (Ratledge, 2004). Σήμερα, υπάρχουν το λιγότερο τρεις ζυμώσεις που χρησιμοποιούν διαφορετικό μικροοργανισμό για την παραγωγή DHA, ενώ για την παραγωγή του ARA χρησιμοποιούνται διάφορα στελέχη του γένους *Mortierella alpina* στην Ευρώπη, την Κίνα και την Ιαπωνία. Το εικοσιδυοεξενοϊκό οξύ (DHA, C22:6, ω-3) και το αραχιδονικό οξύ (ARA, C20:4, ω-6) έχουν ενσωματωθεί σε αναλογία 2:1 για τη δημιουργία συνταγής με το όνομα Formulaid, η οποία χορηγείται στα βρέφη (Ratledge, 2004).

Η συνεχής απαίτηση για την παραγωγή λιπιδίων υψηλής διατροφικής και θεραπευτικής αξίας έστρεψε το ενδιαφέρον σε ελαιογόνους μύκητες, όπως εκείνους της κλάσης των Ζυγομυκήτων, οι οποίοι έχουν τη δυνατότητα να παράγουν πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFAs). Οι μύκητες αυτοί μπορεί να είναι οικονομικά ωφέλιμοι μιας και το κυρίαρχο κλάσμα των μικροβιακών λιπιδίων συνίσταται από τριγλυκερίδια (Certik and Shimizu, 1999). Ωστόσο, τα μικροφύκη αποτελούν άλλη μια πιθανή πηγή πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (PUFAs) κυρίως λόγω της παραγωγής PUFAs της ομάδας ω-3. Παρόλα αυτά, προκειμένου η χρήση των μικροοργανισμών αυτών να γίνει οικονομικά εφικτή θα πρέπει να αναπτυχθούν ειδικές συνθήκες ανάπτυξης καθώς και κατάλληλες τεχνικές επεξεργασίας.

Πίνακας Ι.2.: Συμβατικές και μικροβιακές πηγές των κυριότερων πολυακόρεστων λιπαρών (PUFAs) (Ratledge and Wynn, 2006)

ΠΗΓΕΣ	Ομάδα ω-6			Ομάδα ω-3	
	γ-Λινολενικό οξύ (GLA, C18:3)	Αραχιδονικό οξύ (ARA, C20:4)	α-Λινολενικό οξύ (ALA, C18:3)	Εικοσιπεντενοϊκό οξύ (EPA, C20:5)	Εικοσιδυοεξενοϊκό οξύ (DHA, C22:6)
Συμβατικές πηγές	Φυτά: <i>Borago officinalis</i> , <i>Oenothera biennis</i> , <i>Ornithogalum</i> spp.	Ψάρια: <i>Brevoortia</i> , <i>Clupea</i> , <i>Sardina</i> spp., ζωϊκοί ιστοί	Φυτά: <i>Brassica</i> , <i>Glycine</i> , <i>Linum</i> spp.	Ψάρια και οστρακοειδή	Ψάρια: <i>Brevoortia</i> , <i>Engraulis</i> , <i>Sardina</i> , <i>Scomber</i> spp.
Μικροοργανισμοί	Μύκητες: <i>Mucor</i> , <i>Mortierella</i> . Μικροφύκη: <i>Chlorella</i> and <i>Spirulina</i> spp.	Μύκητες: <i>Pythium</i> , <i>Mortierella</i> spp. Μικροφύκη: <i>Porphyridium</i> spp.	Μικροφύκη: <i>Chlorella</i> spp.	Μύκητες: <i>Mortierella</i> , <i>Pythium</i> spp. Μικροφύκη: <i>Chlorella</i> , <i>Monodus</i> , <i>Porphyridium</i> , <i>Nannochloropsis</i> , <i>Cryptoleura</i> , <i>Shizymenia</i> , <i>Navicula</i> spp. Βακτήρια: <i>Rhodopseudomonas</i> , <i>Shewanella</i> spp., <i>Photobacterium</i>	Μύκητες: <i>Thraustochytrium</i> , <i>Entomophthora</i> spp. Μικροφύκη: <i>Gonyaulax</i> , <i>Gyrodinium</i> , <i>Cryptheconidium</i> Βακτήρια: <i>Colwellia</i> , <i>Moritella (Vibrio)</i> <i>marinus</i>

Οι μικροοργανισμοί που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή ενδοκυτταρικού λίπους έχουν την ικανότητα να παράγουν υψηλά ποσά επιθυμητών πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (PUFAs). Για παράδειγμα, ο μικροοργανισμός *Cryptocodinium cohnii* παράγει λίπος του οποίου η περιεκτικότητα σε DHA φτάνει το 40–50% επί των ολικών λιπιδίων (Ratledge, 2004). Το γ-λινολενικό οξύ (GLA, C18:3, ω-6) παράγεται ενδοκυτταρικά από πλήθος μυκήτων της κλάσης των Ζυγομυκήτων, όμως οι μεγαλύτερες ποσότητες GLA παράγονται από τους μύκητες της τάξης των Mucorales με ποσοστά που φτάνουν το 20–25%. Για παράδειγμα, το στέλεχος *Mortierella ramanniana* παράγει ενδοκυτταρικό λίπος με περιεκτικότητα 18% σε GLA, ενώ η περιεκτικότητα του μικροβιακού λίπους σε GLA από το στέλεχος *Mortierella isabellina* φτάνει το 18.6%. Παράλληλα, ο μύκητας *Cunninghamella japonica* απέδωσε 20% γ-λινολενικό οξύ επί της ξηρής ουσίας (Certik and Shimizu, 1999). Ωστόσο, το κυανοβακτήριο *Spirulina platensis* έχει μελετηθεί επίσης ως πιθανό στέλεχος για την παραγωγή γ-λινολενικού οξέος, με μικρότερη αποτελεσματικότητα στην παραγωγή GLA. Αξίζει να σημειωθεί ότι οι μύκητες της κλάσης των Ζυγομυκήτων που συσσωρεύουν μεγάλες ποσότητες ενδοκυτταρικού λίπους, τείνουν να έχουν μικρή περιεκτικότητα σε γ-λινολενικό οξύ, ενώ εκείνοι που παράγουν σχετικά μικρές ποσότητες

μικροβιακού λίπους εμφανίζουν αρκετά ικανοποιητικά ποσοστά παραγωγής GLA (Certik and Shimizu, 1999; Kavadia et al., 2001).

Οι μύκητες του γένους *Mortierella* (*Mortierella elongata*, *Mortierella alpina*) αποτελούν πηγές παραγωγής πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (PUFAs), όπως το αραχιδονικό (ARA, C20:4, ω-6) και το εικοσιπεντενοϊκό οξύ (EPA, C20:5, ω-3). Η περιεκτικότητα του μικροβιακού λίπους σε ARA και EPA από τους συγκεκριμένους μύκητες είναι αρκετά ικανοποιητική με ποσοστό που αγγίζει το 20% επί των ολικών λιπιδίων. Ωστόσο υπάρχουν αρκετά μικροφύκη (*Porphyridium cruentum*) τα οποία συναγωνίζονται και πολλές φορές υπερέχουν σε σύγκριση με τους μύκητες στην παραγωγή των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων ARA και EPA.

Η παραγωγή του εικοσιδυοεξενοϊκού οξέος (DHA, C22:6, ω-3) μελετήθηκε κατά τη καλλιέργεια του μύκητα *Thraustochytrium aureum*, ο οποίος δύναται να συσσωρεύει πάνω από 50% DHA επί των ολικών λιπιδίων. Παρά το εξαιρετικά υψηλό ποσοστό παραγόμενου DHA, ο συντελεστής απόδοσης παραγωγής ενδοκυτταρικού λίπους είναι μόλις 10–15% και ο μύκητας εμφανίζει μειωμένη κυτταρική ανάπτυξη. Αντίθετα, σύμφωνα με τους Yaguchi et al. (1997) το μικροφύκος *Schizochytrium* SR21 αποτελεί εξαιρετική πηγή παραγωγής DHA (4.7 g/L), ενώ ταυτόχρονα εμφανίζει ικανοποιητική παραγωγή βιομάζας.

1.2.5. Παραλαβή και καθαρισμός των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (PUFAs)

Τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFAs) εμφανίζουν ποικίλες φυσιολογικές λειτουργίες και μπορούν να χρησιμοποιηθούν για πολλούς σκοπούς. Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, ορισμένα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFAs), όπως το εικοσιπεντενοϊκό οξύ (EPA, C20:5, ω-3), το εικοσιδυοεξενοϊκό οξύ (DHA, C22:6, ω-3), το αραχιδονικό οξύ (ARA, C20:4, ω-6) και το γ-λινολενικό οξύ (GLA) έχουν σημαντικές διατροφικές και θεραπευτικές ιδιότητες και για αυτό το λόγο είναι επιτακτική η ανάγκη ανάπτυξης μεθόδων για την παραλαβή και τον καθαρισμό τους. Το σημαντικότερο πρόβλημα που προκύπτει κατά τη διεργασία ανάκτησης των εν λόγω λιπαρών οξέων είναι η λιπόλυση. Επίσης, στην περίπτωση που το μικροβιακό λίπος αξιοποιηθεί για θεραπευτικούς ή διατροφικούς σκοπούς, θα πρέπει οι διαλύτες που θα χρησιμοποιηθούν να είναι μη τοξικοί, αλλά αντίθετα να είναι ασφαλείς για την ανθρώπινη υγεία και να έχουν χαμηλό κόστος.

Η παραλαβή των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (PUFAs) εξαρτάται τόσο από τη φύση των μικροβιακών κυττάρων όσο και από την επιθυμητή μορφή του προς εκχύλιση λίπους. Η παραλαβή μικροβιακού λίπους με τη χρήση αιθανόλης και εξανίου είναι αποτελεσματική, όμως κάποια ένζυμα (π.χ λιπάσες) παραμένουν ενεργά με αποτέλεσμα να καταλύουν ανεπιθύμητες αντιδράσεις. Οι Certik and Horenitzky (1999) εφάρμοσαν πρόσφατα μια μέθοδο με τη χρήση υπερκρίσιμου CO₂ για την παραλαβή μικροβιακού λίπους πλούσιο σε γ-λινολενικό οξύ (GLA) από τον μύκητα *Cunninghamella echinulata*. Το παραληφθέν εκχύλισμα λίπους ήταν της ίδιας

ποιότητας με αυτό που παρελήφθη με τη συμβατική μέθοδο αιθανόλης/εξανίου, αλλά με μεγαλύτερη απόδοση σε GLA (Certik and Shimizu, 1999)

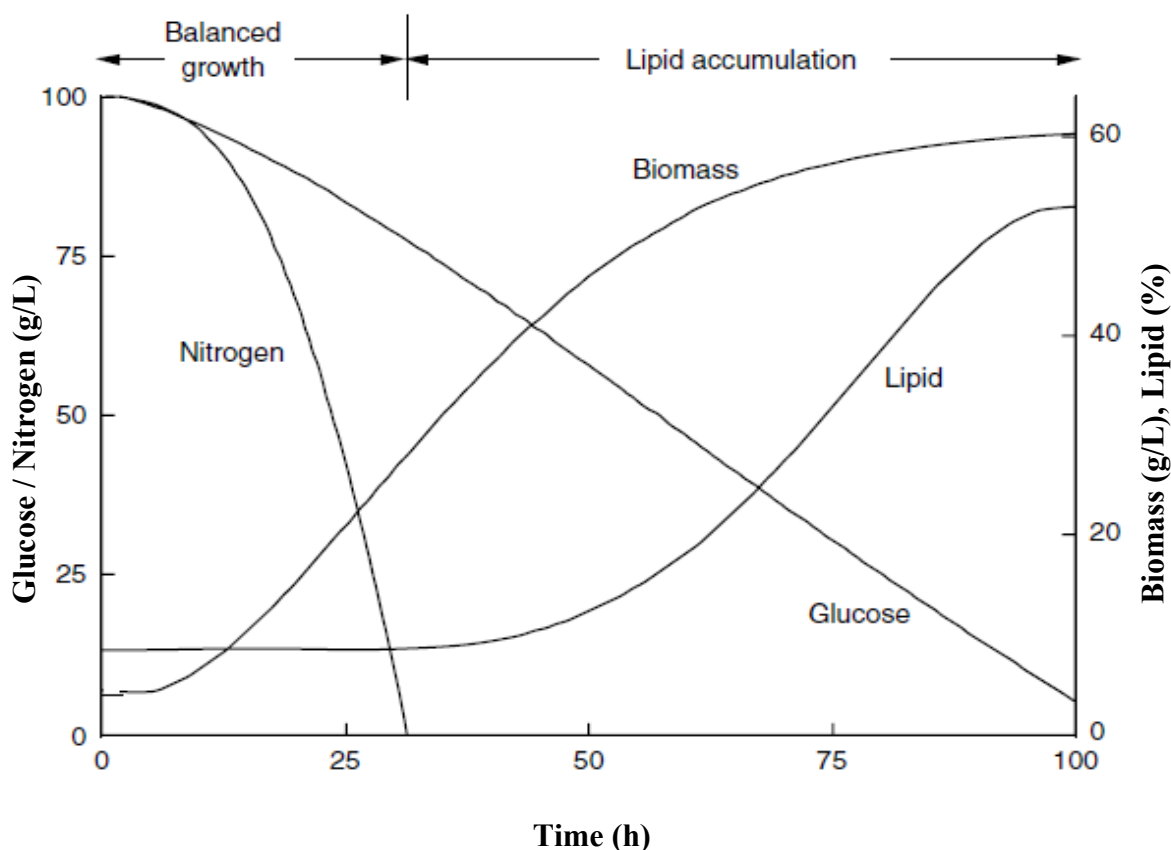
Ο καθαρισμός και εξευγενισμός του παραληφθέντος μικροβιακού λίπους είναι απαραίτητος προκειμένου να απομακρυνθούν ή τουλάχιστον να περιοριστούν, όσο το δυνατόν, οι επιμολυντές του ακατέργαστου λίπους, οι οποίοι με τη σειρά τους επηρεάζουν την ποιότητα του τελικού προϊόντος και την αποτελεσματικότητα των διεργασιών επεξεργασίας. Ωστόσο, το ακατέργαστο λίπος περιέχει και κάποια ωφέλιμα συστατικά (τοκοφερόλες, τοκοτριενόλες) τα οποία θα πρέπει να διατηρηθούν στο τελικό προϊόν. Για αυτό το λόγο σε κάθε περίπτωση πρέπει να εφαρμόζονται οι κατάλληλες διεργασίες καθαρισμού και εξευγενισμού του μικροβιακού λίπους. Η υγρή χρωματογραφία υψηλής αποδόσεως (HPLC), η χρωματογραφία ανταλλαγής ιόντων και οι ενζυμικές μέθοδοι, αποτελούν μερικές από τις βασικές διεργασίες καθαρισμού του μικροβιακού λίπους. Η ενζυμική μέθοδος είναι μια διεργασία που ολοκληρώνεται σε 2 στάδια: το στάδιο της επιλεκτικής υδρόλυσης και το στάδιο της επιλεκτικής εστεροποίησης. Το πρώτο στάδιο περιλαμβάνει την υδρόλυση του μικροβιακού λίπους, το οποίο είναι πλούσιο σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFAs), με τη βοήθεια κάποιας λιπάσης, η οποία δρα επί των PUFAs. Με αυτό τον τρόπο γίνεται η προετοιμασία των ελεύθερων λιπαρών οξέων (Free Fatty Acids, FFAs). Το επόμενο στάδιο περιλαμβάνει την εστεροποίηση με αλκοόλη των παραλαμβανόμενων FFAs μέσω κάποιας λιπάσης, η οποία δρα επί των PUFAs. Το αποτέλεσμα της διεργασίας αυτής είναι ο εμπλουτισμός των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (PUFAs) στο κλάσμα των ελεύθερων λιπαρών οξέων (FFAs). Με την επιλεκτική υδρόλυση επιτυγχάνεται εμπλουτισμός των PUFAs έως και 60% (w/w), ενώ με την επιλεκτική εστεροποίηση ο εμπλουτισμός των (PUFAs) φτάνει έως και 90% (w/w) (Shimada et al., 2001).

Σύμφωνα με τους Ahmed et al. (2009), η κρυστάλλωση με ουρία είναι μια ακόμη αποτελεσματική διεργασία με σκοπό τη συμπύκνωση και τον εμπλουτισμό του γ -λινολενικού οξέος (GLA). Μετά την παραλαβή του ενδοκυτταρικού λίπους του μύκητα *Mucor zychae* MTCC 5420, ο οποίος αναπτύχθηκε σε θρεπτικό υπόστρωμα με πηγή άνθρακα τη γλυκόζη, ακολούθησε η κρυστάλλωση του μικροβιακού λίπους σε διάλυμα αιθανόλης και ουρίας. Ο εμπλουτισμός των ολικών λιπιδίων σε GLA αυξήθηκε από 8.7% (αρχική περιεκτικότητα λίπους σε γ -λινολενικό οξύ) σε 63.5% και η ανάκτηση του εν λόγω λιπαρού οξέος ήταν 68%, ενώ μετά τη δεύτερη κρυστάλλωση του ίδιου δείγματος, το GLA εμπλουτίστηκε έως 92.7%.

Με το ίδιο σκεπτικό, έχουν γίνει προσπάθειες για τον καθαρισμό και εξευγενισμό διαφόρων πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (PUFAs) με σκοπό να επεκτείνουν τη χρήση του μικροβιακού λίπους και να παράγουν προϊόντα με επιθυμητή οξύτητα και γεύση.

I.3. ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ ΣΥΣΣΩΡΕΥΣΗΣ ΕΝΔΟΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΛΙΠΟΥΣ

Η συσσώρευση ενδοκυτταρικού λίπους στους μικροοργανισμούς ακολουθεί ένα συγκεκριμένο πρότυπο (Σχήμα I.3). Κατά βάση, ο μικροοργανισμός καλλιεργείται σε θρεπτικό υπόστρωμα στο οποίο υπάρχει περίσσεια πηγής άνθρακα (συνήθως γλυκόζη ή σακχαρόζη), ενώ επικρατούν περιοριστικές σε άζωτο συνθήκες. Έχει αποδειχθεί ότι ο μικροοργανισμός αρχικά εξαντλεί την πηγή αζώτου αλλά συνεχίζει να αφομειώνει την πηγή άνθρακα. Με την έλλειψη αζώτου σταματά η κυτταρική αύξηση, αφού το άζωτο είναι απαραίτητο για τη σύνθεση των πρωτεϊνών και των νουκλεοτιδίων, τα οποία είναι ζωτικής σημασίας για τη δημιουργία νέων κυττάρων. Η συνεχής κατανάλωση της πηγής άνθρακα έχει ως αποτέλεσμα τη μετατροπή της σε ενδοκυτταρικό λίπος (με τη μορφή τριγλυκεριδίων) στους ελαιογόνους μικροοργανισμούς. Η συσσώρευση του μικροβιακού λίπους συνεχίζεται μέχρι ενός ορίου, το οποίο είναι γενετικά καθορισμένο για κάθε μικροοργανισμό και κυμαίνεται από 20%–60% (w/w επί της ξηρής βιομάζας) (Ratledge and Wynn, 2006).

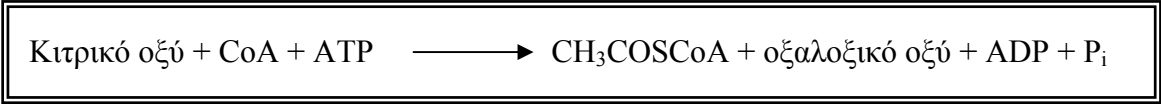


Σχήμα I.3. Τρόπος συσσώρευσης ενδοκυτταρικού λίπους από τους ελαιογόνους μικροοργανισμούς (Ratledge and Wynn, 2006)

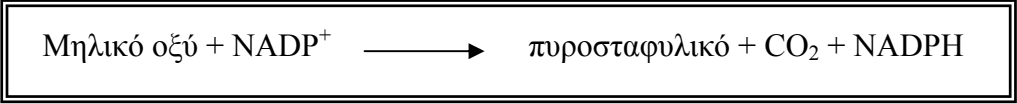
Αντίθετα, οι μη-ελαιογόνοι μικροοργανισμοί δεν έχουν την ικανότητα να συσσωρεύουν λίπος σε ποσοστό πάνω από 10% επί της ξηρής βιομάζας τους. Έτσι, κατά την καλλιέργεια τους σε θρεπτικό μέσο με περιοριστικές σε άζωτο συνθήκες συνεχίζουν την αφομείωση της πηγής άνθρακα, είτε για την ανάπτυξη των κυττάρων τους, είτε για την ενδοκυτταρική συσσώρευση διαφόρων οργανικών ενώσεων, είτε για την έκκριση μεταβολιτών (π.χ. οργανικά οξέα).

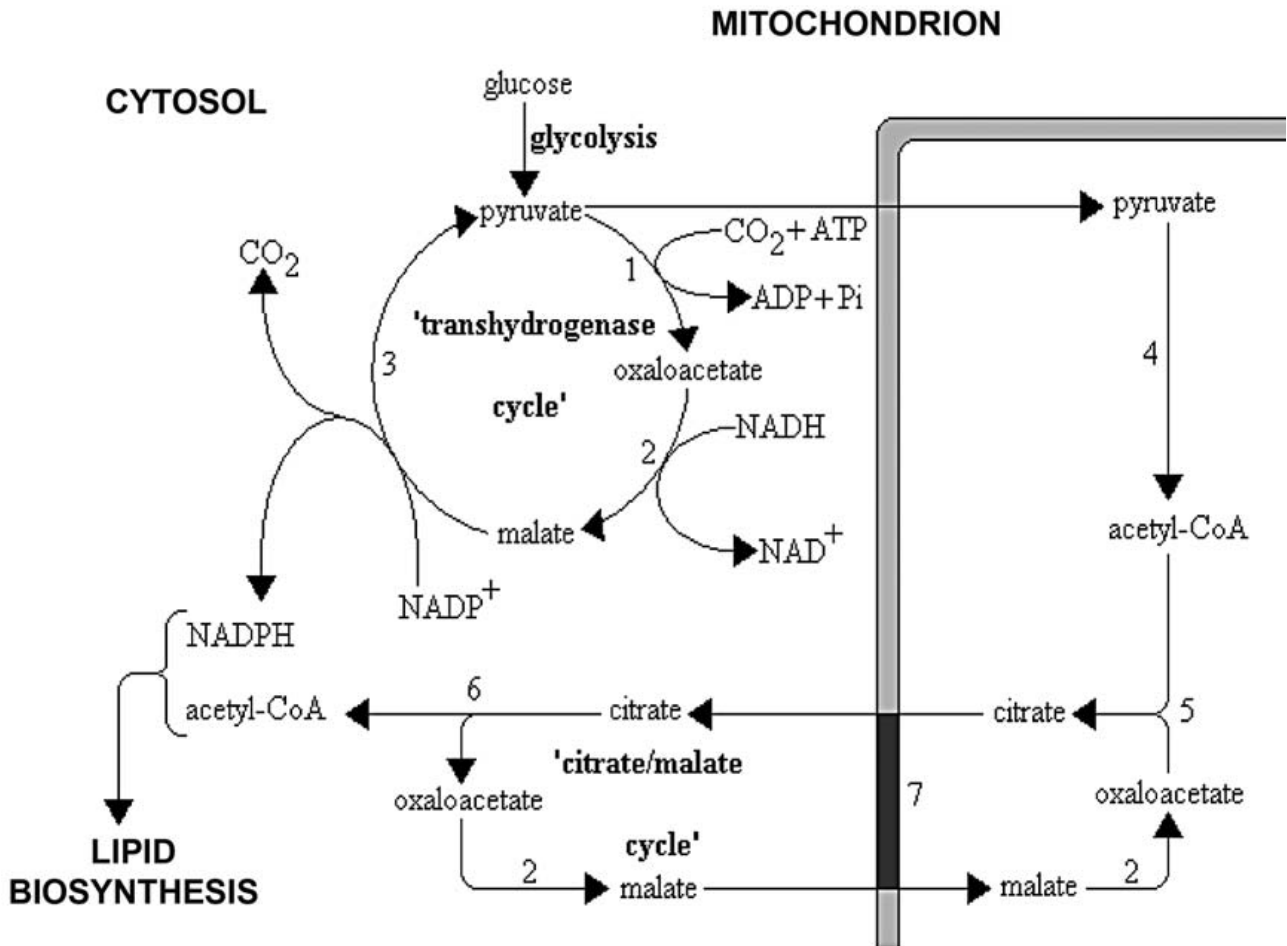
Επομένως, οι λόγοι για τους οποίους ένας μικροοργανισμός παράγει ενδοκυτταρικό λίπος εξαρτώνται κυρίως από δυο παράγοντες: α) την ικανότητα του μικροοργανισμού να παράγει συνεχώς ακετυλοσυνένζυμο Α (Acetyl-CoA) απευθείας στο κυτταρόπλασμα του κυττάρου, δρώντας ως απαραίτητος προάγγελος για τη σύνθεση των λιπαρών οξέων και β) τη δυνατότητα του μικροοργανισμού να παρέχει επαρκείς ποσότητες NADPH, το οποίο είναι σημαντικό αναγωγικό μέσο κατά τη σύνθεση των λιπαρών οξέων (Ratledge, 2004)

Ο σχηματισμός του ακετυλοσυνένζυμου Α στους ελαιογόνους μικροοργανισμούς αποδίδεται στην παρουσία της ATP:κιτρικής λυάσης (ACL), η οποία δεν απαντάται στην πλειοψηφία των μη-ελαιογόνων μικροοργανισμών. Η εξάντληση της πηγής αζώτου στο θρεπτικό μέσο από το μικροοργανισμό οδηγεί σε μια σειρά αντιδράσεων με αποτέλεσμα το σχηματισμό του ακετυλοσυνένζυμου Α. Έτσι, κατά την κατανάλωση του αζώτου ενεργοποιείται το ένζυμο AMP-απαμινάση με αποτέλεσμα την ταχύτατη πτώση της περιεκτικότητας του κυττάρου σε AMP και την παρεμπόδιση της δράσης του ενζύμου ισοκιτρική αφυδρογονάση. Με αυτό τον τρόπο το κιτρικό οξύ δε μπορεί να μεταβολιστεί και συσσωρεύεται στο μιτοχόνδριο. Στη συνέχεια, το κιτρικό οξύ εισέρχεται στο κυτταρόπλασμα και διασπάται από την ATP:κιτρική λυάση (ACL) σε ακετυλοσυνένζυμο Α και σε οξαλοξικό οξύ. Έπειτα, το ακετυλοσυνένζυμο Α χρησιμοποιείται ως προάγγελος για τη βιοσύνθεση των λιπαρών οξέων, ενώ το οξαλοξικό οξύ μετατρέπεται μέσω της αφυδρογονάσης του μηλικού οξέος σε μηλικό, το οποίο στη συνέχεια χρησιμοποιείται στον κύκλο κιτρικού/μηλικού οξέος (Ratledge, 2002; 2004) (Σχήμα Ι.4). Η αντίδραση που λαμβάνει χώρα είναι η εξής:



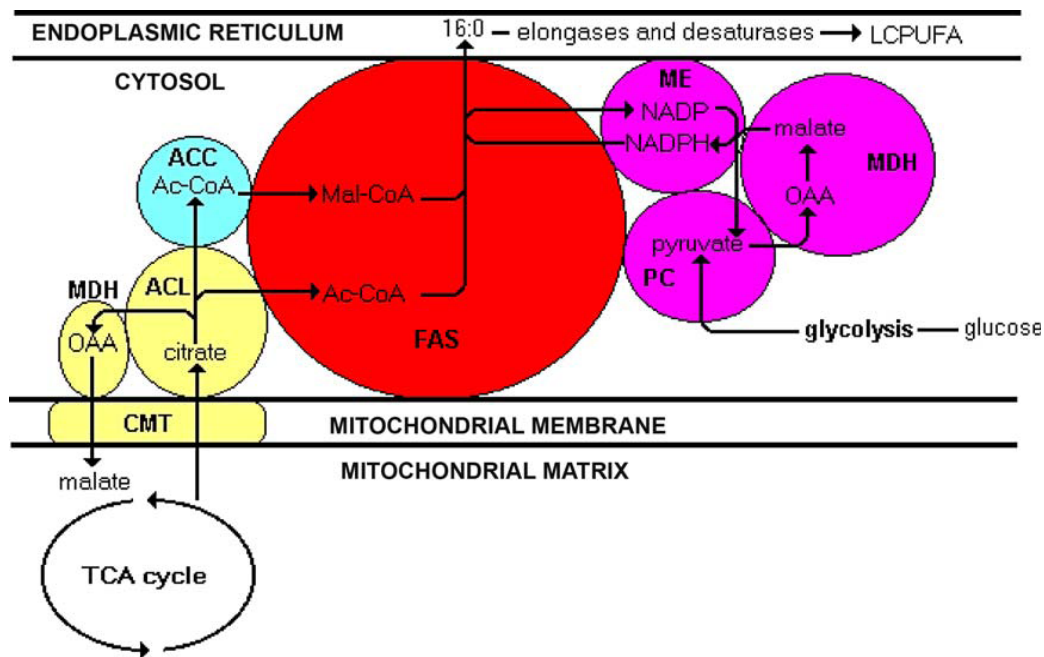
Για τη βιοσύνθεση των λιπαρών οξέων, εκτός από την παραγωγή του ακετυλοσυνένζυμου Α, είναι απαραίτητη η παροχή επαρκούς ποσότητας NADPH. Το μηλικό ένζυμο λειτουργεί ως προμηθευτής NADPH κατά την ακόλουθη εξίσωση:





Σχήμα I.4. Απεικόνιση του κύκλου του Krebs (transhydrogenase cycle) και του κύκλου του κιτρικού/μηλικού οξέος (citrate/malate cycle) ως προάγγελου στην παραγωγή του ακετυλοσυνένζυμου Α και NADPH, για τη λιπογένεση στους ελαιογόνους μικροοργανισμούς. Ένζυμα: 1. αποκαρβοξυλάση του πυροσταφυλικού οξέος, 2. αφυδρογονάση του μηλικού οξέος, 3. μηλικό ένζυμο, 4. αφυδρογονάση του πυροσταφυλικού οξέος, 5. κιτρική συνθάση, 6. ATP:κιτρική λύαση, 7. ένζυμο υπεύθυνο για τη λειτουργία του συστήματος μεταφοράς κιτρικού/μηλικού οξέος μεταξύ μιτοχόνδριου και κυτταροπλάσματος (Ratledge, 2004).

Η δραστηριότητα του μηλικού ενζύμου απαντάται στην πλειοψηφία των ελαιογόνων μικροοργανισμών και αποτελεί ένα μεταβολικό σύμπλοκο, το οποίο δρα συνεργιστικά με την ATP:κιτρική λύαση και τη συνθάση των λιπαρών οξέων, έτσι ώστε να εξασφαλίζεται άμεση επικοινωνία κατά τη μετατροπή του ακετυλοσυνένζυμου Α σε λιπαρά οξέα. Τα λιπαρά οξέα που βιοσυντίθενται, εστεροποιούνται με γλυκερόλη σε τριγλυκερίδια και ενσωματώνονται μέσω του ενδοπλασματικού δικτύου σε σταγονίδια λιπαρών οξέων (Σχήμα I.5).



Σχήμα 1.5. Απεικόνιση της λιπογένεσης στους ελαιογόνους μικροοργανισμούς, κατά την οποία πραγματοποιείται η ροή της πηγής άνθρακα από το μιτοχόνδριο και μέσω του κύκλου του κιτρικού/μηλικού οξέος και του σχηματισμού του ακετυλοσυνένζυμου Α στο κυτταρόπλασμα, σχηματίζονται τα λιπαρά οξέα και στη συνέχεια τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFAs) και κατ' επέκταση τα LCPUFAs, στις μεμβράνες του ενδοπλασματικού δικτύου. Τα ένζυμα με το κίτρινο χρώμα συνιστούν τον κύκλο του κιτρικού/μηλικού οξέος (citrate/malate cycle), ενώ τα ένζυμα με το μωβ χρώμα συνιστούν τον κύκλο του Krebs (transhydrogenase cycle) (Ratledge, 2004)

Είναι λοιπόν φανερό ότι τα ένζυμα κλειδιά για τη βιοσύνθεση ενδοκυτταρικού λίπους από τους ελαιογόνους μικροοργανισμούς είναι η ATP:κιτρική λυάση (ACL) και το μηλικό ένζυμο, τα οποία απαντώνται στους περισσότερους από αυτούς. Ωστόσο, η παρουσία της ATP:κιτρικής λυάσης (ACL) σε κάποιες ζύμες δεν οδήγησε στη συσσώρευση ενδοκυτταρικού λίπους, γεγονός που αποδεικνύει ότι απαιτείται η δραστηριότητα άλλων ενζύμων για να εξασφαλιστεί η παραγωγή μικροβιακού λίπους (Ratledge and Wynn, 2002). Όσον αφορά το μηλικό ένζυμο, έρευνες έχουν δείξει ότι υπάρχουν κάποιες ελαιογόνες ζύμες (*Lipomyces* sp. και *Candida* sp.) οι οποίες δεν διαθέτουν το εν λόγω ένζυμο και παρόλα αυτά έχουν την ικανότητα να βιοσυνθέτουν λίπος. Πιθανώς οι ζύμες αυτές να έχουν κάποιο εναλλακτικό ένζυμο το οποίο είναι εξειδικευμένο στην παραγωγή NADPH για τη βιοσύνθεση ενδοκυτταρικού λίπους (Ratledge, 2004).

1.4. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Η αξιοποίηση του ενδοκυτταρικού μικροβιακού λίπους σαν εναλλακτική πηγή για την παραγωγή των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (PUFAs), τα οποία σπάνια απαντώνται σε σημαντικές ποσότητες στους φυτικούς και τους ζωϊκούς οργανισμούς, αποτελεί σημαντικό στόχο για την βιοτεχνολογία των τροφίμων. Τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFAs) έχουν αξιοσημείωτες διατροφικές και θεραπευτικές ιδιότητες. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί το γ-λινολενικό οξύ (GLA), το οποίο συμβάλλει στην καταπολέμηση πολλών ασθενειών, όπως η ρευματοειδής αρθρίτιδα, δερματικά προβλήματα, καρδιαγγειακά προβλήματα και στην αντιμετώπιση κάποιων μορφών καρκίνου. Επίσης, τα ω-3 πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (π.χ. εικοσιδυοεξανοϊκό οξύ, C22:6, DHA,) εμφανίζουν θετικά αποτελέσματα σε νοητικές ασθένειες, στη ψωρίαση, και γενικότερα συμβάλλουν στην ανάπτυξη του εγκεφάλου.

Παρόλα αυτά, η παραγωγή του μικροβιακού λίπους είναι εξαιρετικά δαπανηρή και γίνονται σημαντικές προσπάθειες ώστε να μειωθεί το κόστος. Η αξιοποίηση των λιγνοκυτταρινούχων υπολειμμάτων για τη χρήση των υδρολυμένων προϊόντων τους (γλυκόζη, ξυλόζη) ως θρεπτικά υποστρώματα, αποτελεί μια εναλλακτική λύση. Η γλυκόζη και η ξυλόζη αποτελούν εξαιρετικές πηγές άνθρακα για την καλλιέργεια και ανάπτυξη των ελαιογόνων μικροοργανισμών.

Κατά συνέπεια, στόχος της παρούσας ερευνητικής μελέτης είναι η διερεύνηση της βιοφυσιολογικής συμπεριφοράς και της βιοσύνθεσης ενδοκυτταρικού λίπους του Ζυγομύκητα *Thamnidium elegans*, κατά την καλλιέργεια του σε σακχαρούχα ανανεώσιμα υποστρώματα, με απώτερο σκοπό την παραγωγή γ-λινολενικού οξέος (GLA).

II. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

II.1. ΒΙΟΛΟΓΙΚΟ ΥΛΙΚΟ

Στην παρούσα ερευνητική μελέτη χρησιμοποιήθηκε ο μύκητας *Thamnidium elegans* CCF-1465 που ανήκει στην κλάση των Ζυγομυκήτων. Το εν λόγω στέλεχος ανήκει στη συλλογή του εργαστηρίου Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών.

Η διατήρηση του στελέχους γινόταν σε κεκλιμένους σωλήνες πεπληρωμένους με θρεπτικό μέσο PDA (Potato Dextrose Agar) στους 4 °C. Προκειμένου να διατηρηθεί η ζωτικότητα του πραγματοποιούνταν ανανεώσεις σε τακτά χρονικά διαστήματα, ενώ πριν από κάθε εμβολιασμό του θρεπτικού μέσου το στέλεχος ανανεωνόταν προκειμένου να είναι ηλικίας περίπου 5 ημερών.

II.2. ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ

Οι ζυμώσεις που πραγματοποιήθηκαν κατά τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας ήταν ζυμώσεις βυθού κλειστού τύπου σε κωνικές φιάλες όγκου 250 mL, πληρωμένες κατά το 1/5 τους (50±1 mL) με το αντίστοιχο θρεπτικό μέσο κάθε φορά. Οι πηγές άνθρακα που χρησιμοποιήθηκαν για την διεξαγωγή των πειραμάτων ήταν η εμπορική γλυκόζη (προερχόμενη από την Ελληνική Βιομηχανία Ζάχαρης) και η ξυλόζη (Sigma-Aldrich, 99%), είτε μόνες τους (100 g/L) είτε σε συνδυασμο με τη μορφή μίγματος [γλυκόζη-ξυλόζη 50:50 (g/L), γλυκόζη-ξυλόζη 75:25 (g/L), γλυκόζη-ξυλόζη 25:75 (g/L)]. Μαζί με την εκάστοτε πηγή άνθρακα (μόνη ή σε συνδυασμό) προσθέτονταν και ένα μίγμα αλάτων, η σύσταση του οποίου παρουσιάζεται στον πίνακα II.1.

Πίνακας II.1. Συγκεντρώσεις αλάτων στο θρεπτικό μέσο (Papanikolaou et al, 2001)

Συστατικά	Συγκέντρωση (g/L)
KH ₂ PO ₄	7
Na ₂ HPO ₄	2.5
MgSO ₄ × 7H ₂ O	1.5
FeCl ₃ × 6H ₂ O	0.15
ZnSO ₄ × 7H ₂ O	0.02
MnSO ₄ × H ₂ O	0.06
CaCl ₂ × 2H ₂ O	0.15

Όλες οι ζυμώσεις πραγματοποιήθηκαν σε περιοριστικές σε άζωτο συνθήκες. Οι πηγές αζώτου που χρησιμοποιήθηκαν ήταν το θειϊκό αμμώνιο $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$ και το εκχύλισμα ζύμης (yeast extract). Σε όλες τις περιπτώσεις, οι συγκεντρώσεις για τις πηγές αζώτου ήταν 2 g/L $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$ και 4 g/L yeast extract. Ο λόγος C/N ήταν υψηλός (140 mol/mol) προκειμένου να ευνοηθεί η συσσώρευση ενδοκυτταρικού λίπους, ενώ το pH του μέσου καλλιέργειας μετά την αποστείρωση ήταν 6.0 ± 0.1 .

Μετά την παρασκευή του εκάστοτε υποστρώματος ακολουθούσε η μεταφορά του σε κωνικές φιάλες των 250 mL, κάθε μια εκ των οποίων περιείχε 50 ± 1 mL θρεπτικού μέσου και στη συνέχεια τοποθετούνταν στο αυτόκλειστο για αποστείρωση (115°C , 20 min). Μαζί με τις φιάλες προς αποστείρωση, προσθέτονταν και δυο μικρότερες φιάλες των 100 mL, η μια πεπληρωμένη με ποσότητα απιονισμένου νερού και η άλλη κενή. Μετά την αποστείρωση των φιαλών, πραγματοποιούνταν ο εμβολιασμός του θρεπτικού μέσου στις φιάλες. Αρχικά προστίθετο απιονισμένο νερό υπό ασηπτικές συνθήκες στον κεκλιμένο σωλήνα που περιείχε το μύκητα, και μετά από έντονη ανάδευση του σωλήνα παραλαμβάνονταν τα σπόρια του μύκητα στο εναιώρημα, το οποίο συλλεγόταν στην κενή αποστειρωμένη κωνική φιάλη υπό ασηπτικές συνθήκες. Στη συνέχεια οι φιάλες ενοφθαλμίζονταν με 1 mL εμβολίου που αντιστοιχούσε σε 10^5 - 10^7 cfu. Μετά τον εμβολιασμό οι φιάλες τοποθετούνταν σε ανακινούμενο επωαστικό κλίβανο (New Brunswick Sc, Usa) στις 180 rpm και θερμοκρασία $T=28^\circ\text{C}$.

Εκτός από τις ζυμώσεις βυθού σε κωνικές φιάλες, έλαβε χώρα μια ζύμωση σε βιοαντιδραστήρα (New Brunswick Scientific, USA) όγκου 3 L και ενεργού όγκου 1.5 L. Στην καλλιέργεια αυτή επιλέχθηκε ως μόνη πηγή άνθρακα η εμπορική γλυκόζη σε συγκέντρωση 100 g/L, ενώ οι πηγές αζώτου που χρησιμοποιήθηκαν ήταν το θειϊκό αμμώνιο $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$ σε συγκέντρωση 2 g/L και το εκχύλισμα ζύμης (yeast extract) σε συγκέντρωση 4 g/L. Το παρασκευασθέν θρεπτικό υπόστρωμα προστίθεντο στο βιοαντιδραστήρα και στη συνέχεια αποστειρωνόταν στο αυτόκλειστο. Η διαδικασία του εμβολιασμού του βιοαντιδραστήρα ήταν όμοια με αυτή που ακολουθήθηκε στις φιάλες, αλλά η ποσότητα του εμβολίου ήταν 30 mL εμβολίου (5% v/v εναιώρημα σπορίων *T. elegans*). Μετά τον εμβολιασμό ο βιοαντιδραστήρας τέθηκε σε λειτουργία με ταχύτητα ανάδευσης 500 έως 550 rpm και αερισμό 0.5 vvm. Το pH του υποστρώματος ήταν 6.0 ± 0.1 και διατηρούνταν σταθερό με προσθήκη βάσης NaOH 5M, ενώ η θερμοκρασία ήταν $T=28^\circ\text{C}$. Επιπλέον, κατά τη διάρκεια της ζύμωσης υπήρχε συνεχής είσοδος αέρα και ο κορεσμός του οξυγόνου ήταν μεγαλύτερος από 25%.

II.3. ΑΝΑΛΥΣΕΙΣ

II.3.1. Προσδιορισμός pH

Το pH της εκάστοτε καλλιέργειας μετρήθηκε με pH-μετρο τύπου Jenway 3020 pH meter. Μετά την μέτρηση του εκάστοτε σημείου της κινητικής, πραγματοποιείται διόρθωση του pH στο θρεπτικό μέσο της καλλιέργειας, όπου ήταν αναγκαίο, έτσι ώστε η τιμή του pH να επιστρέψει στην επιθυμητή τιμή του. Η διόρθωση του pH γινόταν με προσθήκη διαλύματος καυστικού καλίου (KOH) 5M υπό ασηπτικές συνθήκες.

II.3.2 Προσδιορισμός βιομάζας

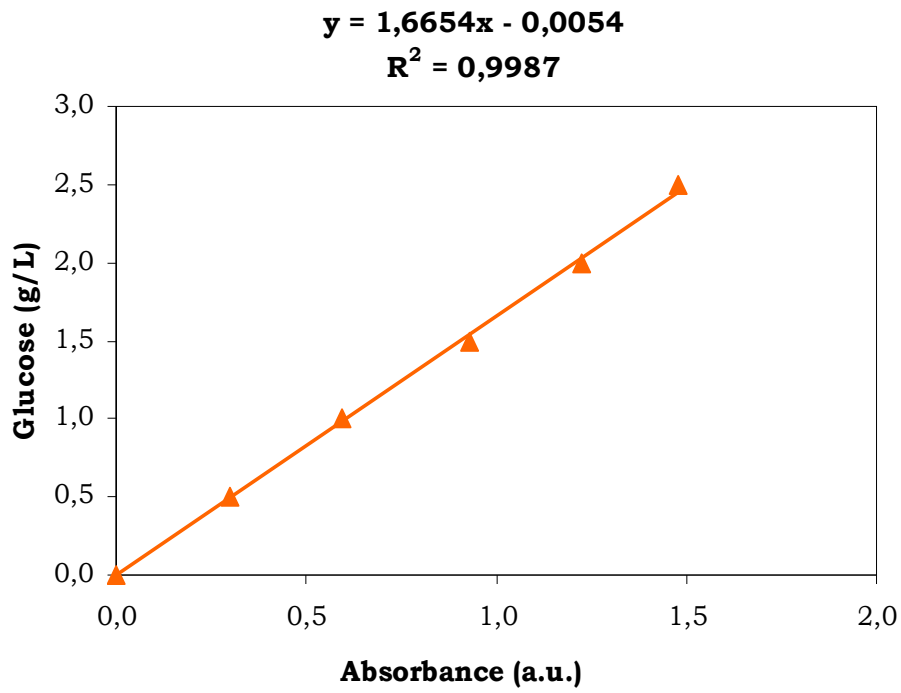
Ο προσδιορισμός της βιομάζας, τόσο στις φιάλες όσο και στον βιοαντιδραστήρα, πραγματοποιούνταν με μέτρηση του ξηρού βάρους. Η παραλαβή της βιομάζας γινόταν με εσχαρισμό (διαμέτρου 0.09 mm, ανοξείδωτο). Αρχικά, πραγματοποιείται διαχωρισμός της βιομάζας από το υπερκείμενο του δείγματος και στη συνέχεια η βιομάζα ξεπλενόταν με απιονισμένο νερό. Μετά από επαρκή πλύση η βιομάζα τοποθετούνταν σε προζυγισμένο φιαλίδιο και οδηγείτο στο φούρνο προς ξήρανση (90 ± 5 °C) μέχρι σταθερού βάρους. Το ξηρό υπόλειμμα ζυγίζοταν σε ζυγό ακριβείας (τύπου Sartorius basic), εκφρασμένο σε g/L.

II.3.3. Προσδιορισμός ανάγοντων σακχάρων με τη μέθοδο DNS

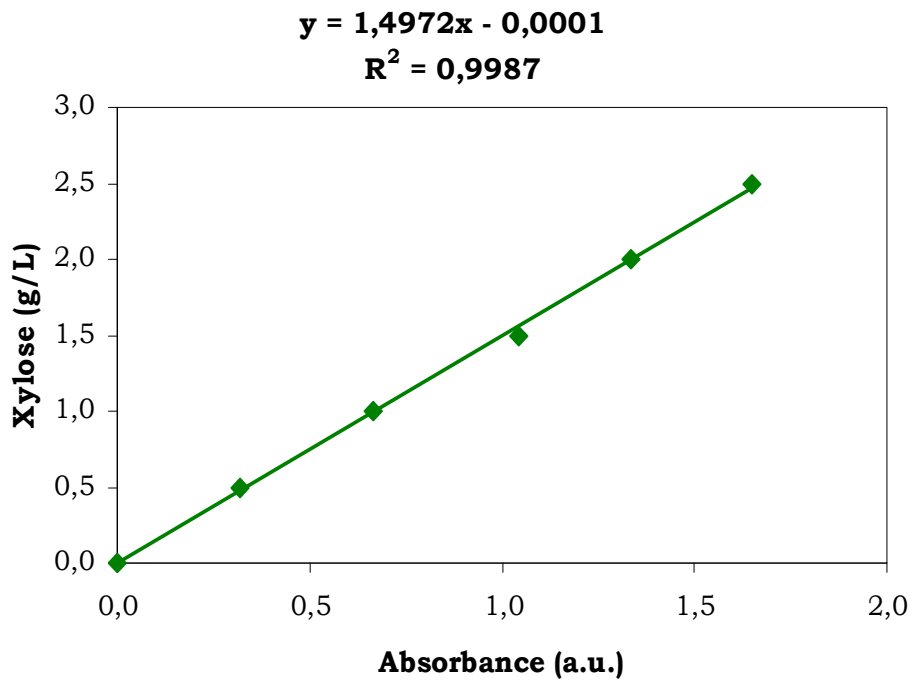
Ο προσδιορισμός της γλυκόζης και της ξυλόζης στα θρεπτικά υποστρώματα με μόνη πηγή άνθρακα τη γλυκόζη ή τη ξυλόζη πραγματοποιήθηκε με τη φωτομετρική μέθοδο του δι-νιτροσαλικυλικού οξέος (DNS) (Miller, 1959). Η μέθοδος στηρίζεται στην αναγωγή του 3,5 δι-νιτροσαλικυλικού οξέος προς 3-αμινο-5-νιτροσαλικυλικό οξύ, παρουσία NaOH και την ταυτόχρονη οξείδωση της γλυκόζης προς γλυκονικό οξύ (Miller, 1959).

▪ Εφαρμογή της μεθόδου

Σε γυάλινους δοκιμαστικούς σωλήνες προστίθενται 0.5 mL δείγματος (κατάλληλα αραιώμενο με απιονισμένο νερό) και 0.5 mL αντιδραστηρίου DNS και αναδεύονται. Στη συνέχεια, τα δείγματα μεταφέρονται σε υδατόλουτρο (100 °C) για 5 min ακριβώς και ψύχονται αμέσως σε H_2O (25 °C). Έπειτα, προστίθενται 5 mL απιονισμένο νερό στα δείγματα, αναδεύονται και ακολουθεί μέτρηση της απορρόφησης στα 540 nm. Για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης των ανάγοντων σακχάρων (γλυκόζη και ξυλόζη) στα δείγματα, χρησιμοποιήθηκαν οι ακόλουθες καμπύλες αναφοράς και τα αποτελέσματα εκφράστηκαν σε ισοδύναμα γλυκόζης (g/L) (γράφημα II.1) και ξυλόζης (g/L) (γράφημα II.2). Όλες οι απορροφήσεις μετρήθηκαν με φασματοφωτόμετρο τύπου Hitachi U-2000 Spectrophotometer.



Γράφημα II.1. Πρότυπη καμπύλη γλυκόζης με τη μέθοδο DNS



Γράφημα II.2. Πρότυπη καμπύλη ξυλόζης με τη μέθοδο DNS

II.3.4. Προσδιορισμός ανάγοντων σακχάρων με HPLC

Ο προσδιορισμός της γλυκόζης, της ξυλόζης και της παραγόμενης ξυλιτόλης στις καλλιέργειες με τα μίγματα της γλυκόζης και της ξυλόζης [(γλυκόζη-ξυλόζη 50:50 (g/L), γλυκόζη-ξυλόζη 75:25 (g/L), γλυκόζη-ξυλόζη 25:75 (g/L)] έγινε με τη χρήση υγρής χρωματογραφίας υψηλής αποδόσεως (HPLC) σε σύστημα Waters 600E. Η ανίχνευση των σακχάρων αυτών έγινε σε σύστημα RI εφοδιασμένο με διαφορικό διαθλασίμετρο.

Η ταυτοποίηση των σακχάρων βασίστηκε στο χρόνο κατακράτησης, ο οποίος ταυτοποιήθηκε με γνωστά δείγματα των αντίστοιχων σακχάρων. Ως κινητή φάση χρησιμοποιήθηκε αραιό διάλυμα H_2SO_4 (0.005 M) με ροή 0.6 mL/min. Η στήλη με την οποία έγινε ο διαχωρισμός του μίγματος ήταν τύπου Aminex HPX-87H (BIO-Rad) και θερμοκρασίας $T=57^\circ C$. Από τη στήλη περνούσαν 50 μ l δείγματος και η διάρκεια της ανάλυσης ήταν 20 min.

Προκειμένου να προσδιοριστεί η συγκέντρωση του εκάστοτε σακχάρου στα μίγματα γλυκόζης-ξυλόζης καθώς και της παραγόμενης ξυλιτόλης, χρησιμοποιήθηκαν πρότυπα διαλύματα αυτών από τα οποία προέκυψαν οι ακόλουθες εξισώσεις:

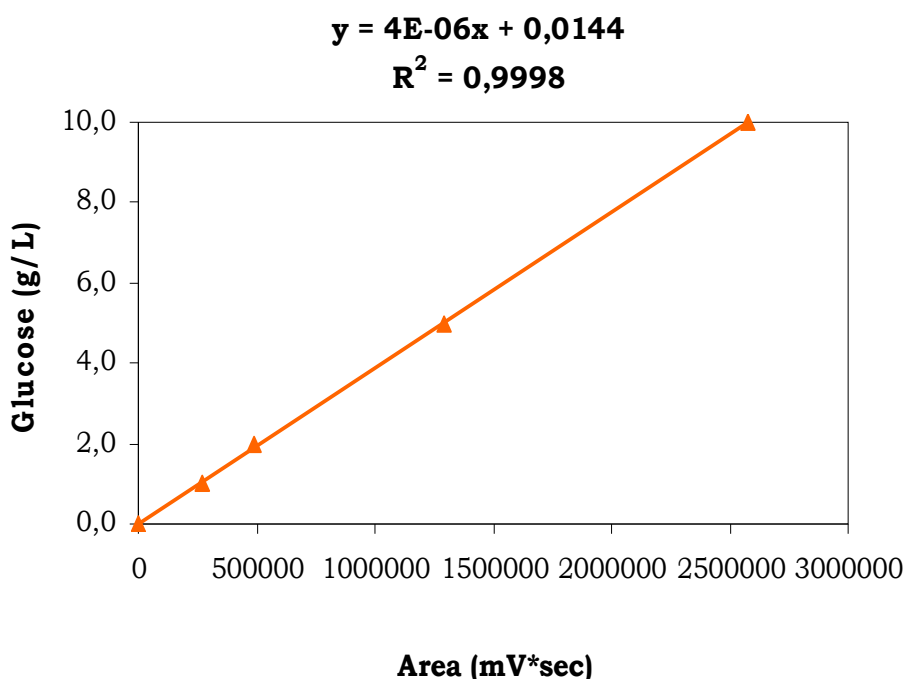
$$\text{Γλυκόζη (g/L)} = 4 \cdot 10^{-6} \cdot x + 0,0144$$

$$\text{Ξυλόζη (g/L)} = 4 \cdot 10^{-6} \cdot x + 0,0242$$

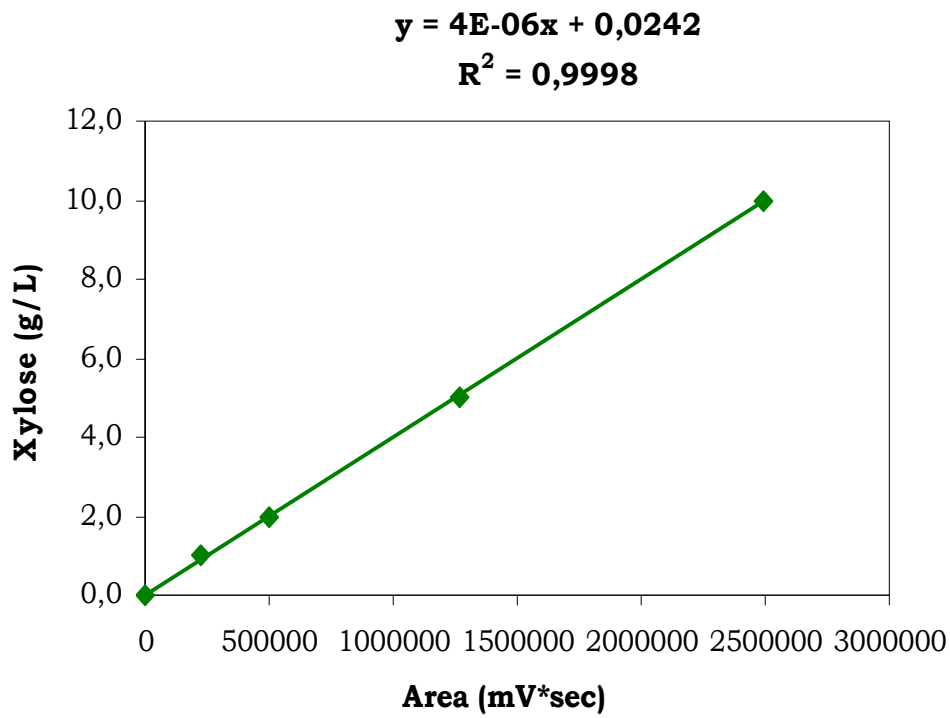
$$\text{Ξυλιτόλη (g/L)} = 4 \cdot 10^{-6} \cdot x + 0,099$$

, όπου x: το εμβαδόν της κορυφής στο χρωματογράφημα

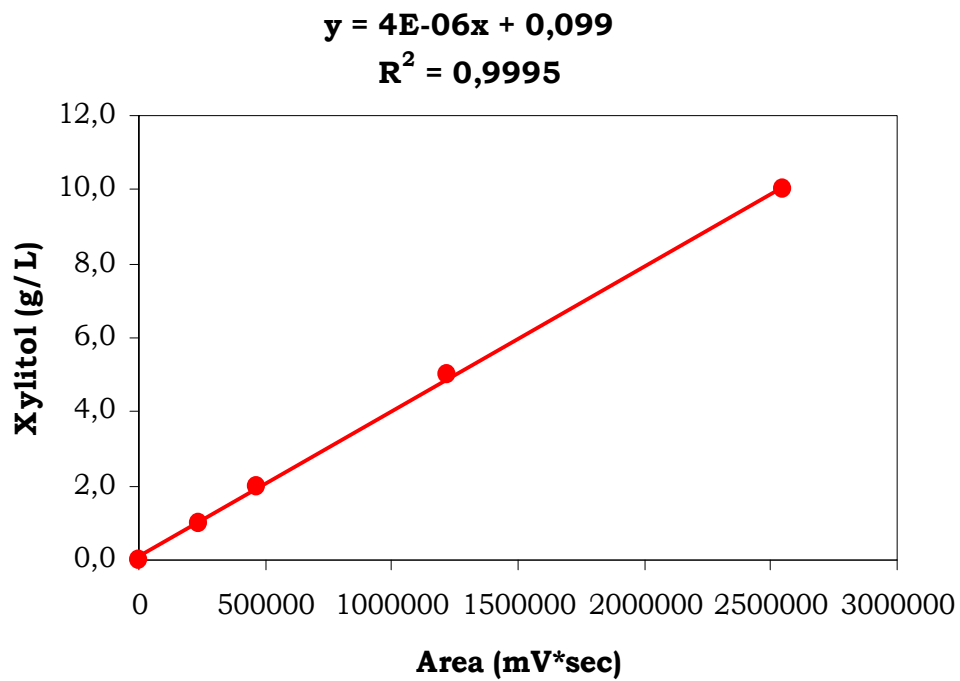
Οι καμπύλες αναφοράς με βάση τις οποίες υπολογίστηκαν οι συγκεντρώσεις της γλυκόζης, της ξυλόζης και της ξυλιτόλης παρουσιάζονται στα γραφήματα που ακολουθούν (γράφημα II.3, II.4 και II.5).



Γράφημα II.3. Πρότυπη καμπύλη γλυκόζης με HPLC



Γράφημα Π.4. Πρότυπη καμπύλη ξυλόζης με HPLC



Γράφημα Π.5. Πρότυπη καμπύλη ξυλιτόλης με HPLC

II.3.5. Μελέτη ενδοκυτταρικού λίπους

Σε κάθε ζύμωση που έλαβε χώρα πραγματοποιήθηκε ποσοτική και ποιοτική ανάλυση του παραγόμενου ενδοκυτταρικού λίπους στην πλειοψηφία των δειγμάτων που προέκυψαν από κάθε καλλιέργεια.

▪ Εκχύλιση λίπους

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό του ενδοκυτταρικού λίπους που παρήχθη από το μύκητα *T. elegans* σε κάθε μια από τις ζυμώσεις ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία: Μετά την παραλαβή και την ξήρανση της βιομάζας του εκάστοτε δείγματος, προστίθεται ποσότητα μίγματος διαλυτών χλωροφορμίου (CHCl_3)-μεθανόλης σε αναλογία 2:1 (Folch et al., 1957). Το χρησιμοποιούμενο διάλυμα έχει την δυνατότητα να εκχυλίζει το συνολικό μικροβιακό λίπος. Στη συνέχεια, η βιομάζα με το μίγμα των διαλυτών υφίσταται διήθηση και το διήθημα αυτό προστίθεται σε προζυγισμένη φιάλη εξάτμισης. Έπειτα, ακολουθούσε εξάτμιση του διηθήματος από την φιάλη εξάτμισης με τη βοήθεια περιστροφικού εξατμιστήρα (flash evaporator) έτσι ώστε να απομακρυνθούν οι διαλύτες και να παραμείνει μόνο το μικροβιακό λίπος, το οποίο υπολογιζόταν σε g/L.

▪ Κλασμάτωση λιπιδίων

Μετά την εκχύλιση του ενδοκυτταρικού λίπους και τον ποσοτικό προσδιορισμό του, ακολουθεί η κλασμάτωση η οποία γίνεται σε επιλεγμένο αριθμό δειγμάτων. Για την προετοιμασία των λιπιδίων προς κλασμάτωση, πραγματοποιήθηκε έκπλυση των λιπιδίων με 0.88% KCl και παραλαμβάνονταν η κάτω φάση. Στη συνέχεια, προστίθεται Na_2SO_4 (άνυδρο θειϊκό νάτριο) για ξήρανση και τα λιπίδια συμπυκνώνονταν μέχρι ξηρού βάρους με τη βοήθεια περιστροφικού εξατμιστήρα. Το εναπομείναν μικροβιακό λίπος ζυγιζόταν (Fakas et al., 2006)

Για την προετοιμασία της στήλης, ζυγιζόταν 10πλάσια ποσότητα silicic acid σε σχέση με το βάρος των λιπιδίων και τοποθετούνταν στο φούρνο ($110\text{ }^\circ\text{C}$) για 24 h και έπειτα ακολουθούσε το πακετάρισμα της στήλης με τη χρήση διχλωρομεθανίου. Στη συνέχεια, τα λιπίδια διαλύονταν σε 1-2 mL χλωροφορμίου ή διχλωρομεθανίου και με πιπέτα Pasteur προσθέτονταν στη στήλη. Έπειτα, προστίθεται στη στήλη χλωροφόρμιο (100 mL χλωροφόρμιο ανά 100 mg λιπιδίων) έτσι ώστε να διαχωριστούν τα ουδέτερα λιπίδια και σε προζυγισμένη σφαιρική φιάλη παραλαμβάνονταν το πρώτο κλάσμα των λιπιδίων που περιέχει τα ουδέτερα λιπίδια (N) (Guo and Otta, 2000; Fakas et al., 2006). Με τον ίδιο τρόπο, προστίθεται ακετόνη στη στήλη προκειμένου να παραληφθεί το κλάσμα των σφιγγολιπιδίων και των γλυκολιπιδίων (S+G) και τέλος μεθανόλη για να παραληφθεί το κλάσμα των φωσφολιπιδίων (P). Τα κλάσματα αυτά τοποθετούνταν σε προζυγισμένες σφαιρικές φιάλες, εξατμιζόνταν σε περιστροφικό εξατμιστήρα, υφίσταντο μεθυλεστεροποίηση και αναλύονταν σε αέριο χρωματογράφο (GC).

▪ Μεθυλεστεροποίηση

Η μεθυλεστεροποίηση είναι μια μέθοδος η οποία εφαρμόζεται προκειμένου να γίνει ο ποσοτικός προσδιορισμός των λιπαρών οξέων που περιέχονται στο ενδοκυτταρικό λίπος. Το κυτταρικό λίπος μετατρέπεται με μεθυλίωση στους αντίστοιχους μεθυλικούς εστέρες, με τη γενικευμένη μέθοδο AFNOR (Papanikolaou et al., 2001). Η εστεροποίηση είναι μια διαδικασία που τελείται σε δυο στάδια, το πρώτο σε αλκαλικό περιβάλλον και το δεύτερο σε όξινο. Κατά το πρώτο στάδιο, τελείται η πυρηνόφιλη υποκατάσταση στο μόριο των τριγλυκεριδίων και των φωσφολιπιδίων, με τελικό προϊόν τους αντίστοιχους μεθυλεστέρες των λιπαρών οξέων. Παράλληλα, τα ήδη υπάρχοντα ελεύθερα λιπαρά οξέα αντιδρούν με το διάλυμα του μεθανολικού νατρίου και παραλαμβάνονται οι αντίστοιχοι σάπωνές τους. Στο δεύτερο στάδιο, πραγματοποιείται η μετατροπή των σαπώνων των λιπαρών οξέων προς τους αντίστοιχους μεθυλεστέρες.

ο Εφαρμογή της μεθόδου

Στις σφαιρικές φιάλες που έχουν εξατμιστεί οι διαλύτες και έχει παραμείνει το ζυγισθέν κυτταρικό λίπος, προσθέτουμε 1-2 πέτρες βρασμού και 10 mL μεθανολικού νατρίου (MeO-Na⁺). Στη συνέχεια, το δείγμα τοποθετείται προς βρασμό για 20 min σε κάθετο ψυκτήρα. Μετά το πέρας του χρόνου, προστίθεται στο δείγμα ποσότητα υδροχλωρικής μεθανόλης έτσι ώστε το δείγμα να αποχρωματιστεί και αφήνεται προς βρασμό για άλλα 20 min. Έπειτα, προστίθεται νερό στο δείγμα έτσι ώστε η αντίδραση να λάβει τέλος και το δείγμα μεταφέρεται σε εκχυλιστική χοάνη. Προστίθενται 6 mL εξανίου και το δείγμα αναδεύεται έντονα και στη συνέχεια αφήνεται σε ηρεμία έως ότου διαχωριστούν οι δυο φάσεις (η οργανική με το εξάνιο και η υδατική). Η πάνω φάση, που αποτελείται από τους εστέρες των λιπαρών οξέων και το εξάνιο, παραλαμβάνεται σε φιαλίδιο και προστίθεται μικρή ποσότητα άνυδρου Na₂SO₄ για απορρόφηση της υγρασίας, ενώ η κάτω φάση απορρίπτεται. Τέλος, το δείγμα που συλλέγεται οδηγείται στον αέριο χρωματογράφο (GC) για ανάλυση.

▪ Ανάλυση στον αέριο χρωματογράφο (GC)

Τα δείγματα που προκύπτουν από τη μεθυλεστεροποίηση, είτε έχουν υποστεί κλασμάτωση είτε όχι, οδηγούνται στον αέριο χρωματογράφο για την ανάλυση της σύστασης των λιπιδίων στα επιμέρους λιπαρά οξέα. Πραγματοποιείται έγχυση 1-2 μL δείγματος με ειδική σύριγγα στην υποδοχή του αέριου χρωματογράφου 8000 series FISONs.

Συνθήκες αέριου χρωματογράφου:

- ο Θερμοκρασία εισαγωγέα 250 °C
- ο Θερμοκρασία ανιχνευτή (FID) 250 °C
- ο Φέρον αέριο He (ροή 1.38 mL/ min), H₂ (60 kPa), O₂ (110 kPa)
- ο Τύπος στήλης Fused silica WCOT: CP-Sill 88 (0.2 μL)

Μήκος 50 m

Διάμετρος 0.32 m

Πάχος επικάλυψης εσωτερικά που έρχεται σε επαφή με το δείγμα DF=0.32 μm.

Η θερμοκρασία της στήλης παρέμενε σταθερή στους 200 °C για 20 min. (Fakas et al., 2006).

Με τη χρήση πρότυπων μεθυλεστέρων των κυριότερων λιπαρών οξέων, ταυτοποιήθηκαν οι αντίστοιχοι χρόνοι κατακράτησης για τους μεθυλεστέρες κάθε λιπαρού οξέος. Η συγκέντρωση του κάθε λιπαρού οξέος στο δείγμα των λιπιδίων υπολογίστηκε με βάση το εμβαδόν της κάθε κορυφής του αντίστοιχου χρωματογραφήματος.

III. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Στόχος της παρούσας εργασίας είναι η μελέτη της βιοφυσιολογικής συμπεριφοράς του Ζυγομύκητα *Thamnidium elegans* (κινητική της αύξησης του μύκητα, κατανάλωσης των σακχαρούχων υποστρωμάτων) και της βιοσύνθεσης ενδοκυτταρικού λίπους καθώς και η διερεύνηση της σύστασης των μικροβιακών λιπιδίων και των κλάσεων αυτών, κατά την καλλιέργεια του σε σακχαρούχα ανανεώσιμα υποστρώματα. Ο εν λόγω μύκητας κατά την καλλιέργεια του σε συνθήκες που ευνοούν την υψηλή συγκέντρωση μικροβιακού λίπους (καλλιέργεια σε ζυμώσεις βυθού με υψηλό λόγο C/N), δύναται να συσσωρεύσει λίπος σε υψηλές συγκεντρώσεις, στο οποίο περιέχονται σε ποικίλα ποσά το λιπαρό οξύ γ -λινολενικό (GLA). Συγκεκριμένα, τα υποστρώματα τα οποία χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη αυτή ήταν η γλυκόζη και η ξυλόζη, καθώς και μίγματα αυτών, ενώ ως πηγή αζώτου προστέθηκαν 4 g/L yeast extract και 2 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Συνολικά πραγματοποιήθηκαν 5 ζυμώσεις βυθού με τις εξής αρχικές συγκεντρώσεις (S_0) πηγής άνθρακα: 100 g/L γλυκόζη, 100 g/L ξυλόζη, 50 g/L γλυκόζη:50 g/L ξυλόζη, 75 g/L γλυκόζη:25 g/L ξυλόζη, 25 g/L γλυκόζη:75 g/L ξυλόζη, ενώ ο λόγος C/N ήταν υψηλός σε κάθε περίπτωση (140 mol/mol) προκειμένου να ευνοηθεί η συσσώρευση ενδοκυτταρικού λίπους. Επίσης, μετά την αριστοποίηση των παραμέτρων της καλλιέργειας, έγινε εφαρμογή της διεργασίας σε βιοαντιδραστήρα και για το σκοπό αυτό επιλέχθηκε η ζύμωση που έδωσε τα πιο ικανοποιητικά αποτελέσματα, ήτοι 100 g/L γλυκόζη με πηγή αζώτου 4 g/L yeast extract και 2 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

Στη συνέχεια, παρατίθεται ο συνοπτικός πίνακας (Πίνακας III.1) των σημείων της κινητικής για κάθε ένα από τα προαναφερθέντα υποστρώματα και τα μίγματα τους, στα οποία παρατηρήθηκε η μεγαλύτερη συσσώρευση μικροβιακού λίπους (L_{\max}) από το μύκητα *T. elegans*. Αξίζει να σημειωθεί ότι ο μύκητας αναπτύχθηκε ικανοποιητικά σε όλα τα υποστρώματα και παρουσίασε σημαντική κυτταρική αύξηση (14.9–30.1 g/L), ενώ η ποσότητα του ενδοκυτταρικού λίπους που παρήχθη ήταν ιδιαίτερος υψηλή (6.2–15.0 g/L). Επιπλέον, η περιεκτικότητα του λίπους σε γ -λινολενικό οξύ (GLA) έφτασε σε πολύ υψηλά επίπεδα και μάλιστα στο θρεπτικό μέσο με μόνη πηγή άνθρακα τη γλυκόζη (100 g/L), παρήχθησαν 1014.6 mg/L γ -λινολενικού οξέος. Ως καταλληλότερο υπόστρωμα για την αύξηση του μύκητα φαίνεται να είναι η γλυκόζη ως μόνη πηγή άνθρακα (100 g/L γλυκόζη), αφού η ποσότητα της βιομάζας που παρήχθη έφτασε τα 31.9 g/L και σημειώθηκε η μεγαλύτερη παραγωγή ενδοκυτταρικού λίπους (15.0 g/L). Για το λόγο αυτό, επιλέχθηκε η ζύμωση αυτή προκειμένου να εφαρμοστεί σε βιοαντιδραστήρα με αριστοποίηση των συνθηκών καλλιέργειας. Σε όλα τα μέσα ανάπτυξης παρατηρήθηκε πλήρης κατανάλωση της γλυκόζης. Η ξυλόζη καταναλώθηκε πλήρως όταν αποτέλεσε τη μοναδική πηγή άνθρακα (100 g/L), ενώ στα μίγματα γλυκόζης-ξυλόζης, ένα μικρό ποσοστό της ξυλόζης έμεινε ακατανάλωτο (5–15%)

με εξαίρεση το μίγμα γλυκόζης-ξυλόζης 25:75 (g/L), όπου παρατηρήθηκε πλήρης κατανάλωση της ξυλόζης. Τέλος, στο βιοαντιδραστήρα με μέσο ανάπτυξης 100 g/L γλυκόζη, το ποσοστό της γλυκόζης που έμεινε ακατανάλωτο ήταν μόλις 8%. Κατά την εξέλιξη της κατανάλωσης των υποστρωμάτων που περιείχαν ως πηγή άνθρακα τη ξυλόζη, είτε ως μοναδική πηγή είτε ως μίγματα, παρατηρήθηκε παραγωγή ξυλιτόλης, η συγκέντρωση της οποίας φτάνει σε μια μέγιστη τιμή και στη συνέχεια ανακαταναλώνεται καθώς οι ζυμώσεις προχωρούν προς τη λήξη τους. Μάλιστα, στη ζύμωση με μόνη πηγή άνθρακα τη ξυλόζη (100 g/L) παρήχθη σημαντική ποσότητα ξυλιτόλης (31.3 g/L).

Πίνακας III.1. Συγκεντρωτικός πίνακας αποτελεσμάτων της καλλιέργειας του Ζυγομύκητα *Thamnidium elegans* σε σακχαρούχα ανανεώσιμα υποστρώματα με πηγές άνθρακα τη γλυκόζη, τη ξυλόζη και μίγματα αυτών.

Υπόστρωμα (g/L)	S ₀ GLU (g/L)	S ₀ XYL (g/L)	Χρόνος (h)	S _{con} (g/L)		X (g/L)	X _f (g/L)	Xylitol (g/L)	L _{max} (g/L)	Y _{L/X} (%)	Y _{L/Scon} (%)	GLA (mg/L)
				GLU	XYL							
100 Glu	100.5	-	304	100.5	-	31.9	16.9	-	15.0	47.1	15.0	909.6
100 Xyl	-	106.9	384	-	103.5	21.4	12.5	22.3	8.9	41.8	8.6	487.1
			240	-	84.0	14.9	9.8	31.3*	5.1	34.5	6.1	338.9
50 Glu:	45.5	56.8	429	45.5	54.7	27.4	14.8	3.4	12.6	45.9	12.6	936.2
50 Xyl			429	45.5	54.7	27.4	14.8	3.4*	12.6	45.9	12.6	936.2
75 Glu:	63.9	32.3	501	63.9	26.8	29.5	18.7	1.4	10.8	36.7	11.9	883.5
25 Xyl			501	63.9	26.8	29.5	18.7	1.4*	10.8	36.7	11.9	883.5
25 Glu:	21.2	77.7	504	21.2	77.7	27.1	16.1	0.0	11.0	40.5	11.1	925.5
75 Xyl			264	21.2	36.8	18.6	14.6	10.1*	4.0	21.0	6.9	538.0
Bio100 Glu	118.2	-	158	101.9	-	30.1	19.5	-	10.6	35.3	10.4	742.0

S₀: Αρχική συγκέντρωση υποστρώματος (g/L)

S_{con}: Καταναλωθέν υπόστρωμα (g/L)

X: Παραγόμενη βιομάζα (g/L)

X_f: Βιομάζα ελεύθερη λίπους (g/L)

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

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

Y_{L/Scon}: Συντελεστής απόδοσης παραγωγής ενδοκυτταρικού λίπους ως προς το καταναλωθέν υπόστρωμα (%)

GLA: γ-λινολενικό οξύ (^{Δ6,9,12}C18-3, ω-6) (mg/L)

(*) Οι τιμές αυτές αντιπροσωπεύουν τη μέγιστη συγκέντρωση ξυλιτόλης, Xylitol_{max} (g/L)

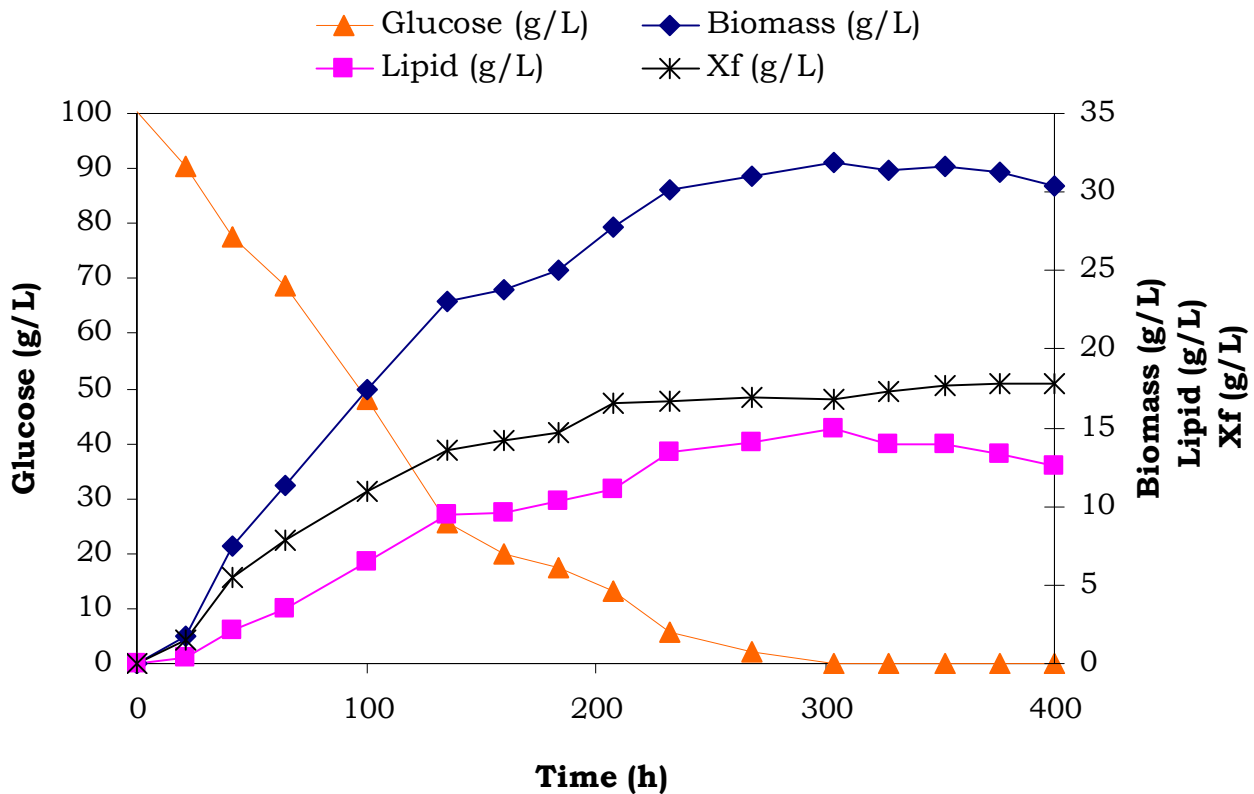
III.1. Καλλιέργεια του Ζυγομύκητα *Thamnidium elegans* στη γλυκόζη ($S_{0\text{ GLU}}=100\text{ g/L}$)

III.1.1. Κινητική της κυτταρικής αύξησης, της κατανάλωσης υποστρώματος και της συσσώρευσης λίπους.

Η κινητική της αύξησης της βιομάζας, της κατανάλωσης του υποστρώματος και της παραγωγής ενδοκυτταρικού λίπους από το μύκητα *Thamnidium elegans* κατά την καλλιέργεια του σε μέσο αύξησης με μόνη πηγή άνθρακα τη γλυκόζη (100 g/L) απεικονίζεται στο γράφημα III.1.1.α. Από το γράφημα αυτό φαίνεται ότι ο μικροοργανισμός παρουσιάζει σημαντική κυτταρική αύξηση με μέγιστη παραγωγή βιομάζας 31.9 g/L περί τις 304 h. Μετά το πέρας των ωρών αυτών η κυτταρική αύξηση του μύκητα σταθεροποιείται καθώς εισέρχεται στη στάσιμη φάση του αυξητικού κύκλου. Η κατανάλωση του υποστρώματος ξεκινά λίγες ώρες μετά τον εμβολιασμό και πραγματοποιείται εξάντληση της πηγής άνθρακα από τις 304 h. Η παραγωγή του ενδοκυτταρικού λίπους από τον εν λόγω μύκητα στο παρόν υπόστρωμα είναι ιδιαίτερα σημαντική και έχει μέγιστη τιμή 15.0 g/L, με συντελεστή απόδοσης ($Y_{L/X}$) 47% (0.47 g λίπους ανα g παραγόμενης βιομάζας).

Επίσης, στο γράφημα III.1.1.α. απεικονίζεται η παράμετρος X_f (g/L), η οποία αντιπροσωπεύει την ελεύθερη λίπους βιομάζα. Μετά την εξάντληση της πηγής αζώτου ο μικροοργανισμός ξεκινά να συσσωρεύει λίπος με σταθερό ρυθμό μέχρι τις 304 h, όπου και παρατηρείται η μέγιστη ποσότητα λίπους (15.0 g/L). Ταυτόχρονα με τη συσσώρευση ενδοκυτταρικού λίπους, ο μύκητας εμφανίζει σημαντική κυτταρική αύξηση με αποτέλεσμα η παράμετρος X_f να αυξάνεται μέχρι τις 208 h περίπου. Από το χρονικό αυτό σημείο και έπειτα η παράμετρος X_f μένει σχεδόν σταθερή, εξαιτίας της σταθεροποίησης της παραγωγής βιομάζας και της μικρής πτώσης της παραγωγής ενδοκυτταρικού λίπους.

GLUCOSE 100



Γράφημα III.1.1.α. Κινητική της εξέλιξης της βιομάζας (◆), της κατανάλωσης υποστρώματος (▲), της παραγωγής ενδοκυτταρικού λίπους (■), και της ελεύθερης λίπους βιομάζας (*) συναρτήσει του χρόνου για το Ζυγομύκητα *Thamnidium elegans*, με τη γλυκόζη ως μόνη πηγή άνθρακα.

Συνθήκες καλλιέργειας: ασυνεχής ζύμωση σε ανακινούμενες κωνικές φιάλες (180 rpm) και θερμοκρασία $T=28\text{ }^{\circ}\text{C}$, αρχική συγκέντρωση γλυκόζης ($S_{0\text{ GLU}}=100\text{ g/L}$) και πηγές αζώτου 4 g/L yeast extract και 2 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, υπό αερόβιες συνθήκες.

Μετά την παραλαβή του ενδοκυτταρικού λίπους από το μικροοργανισμό ακολούθησε η ανάλυση της σύστασης των λιπιδίων σε λιπαρά οξέα και των κλάσεων αυτών με τη βοήθεια του αέριου χρωματογράφου. Η ανάλυση της σύστασης των λιπιδίων σε λιπαρά οξέα πραγματοποιήθηκε επιλεκτικά στην πλειοψηφία των δειγμάτων που προέκυψαν από τη ζύμωση αυτή. Αντιθέτως, για την ανάλυση των λιπιδίων στις 3 κλάσεις (ουδέτερα, σφιγγο-γλυκολιπίδια και φωσφολιπίδια) τα δείγματα που επιλέχθηκαν αντιπροσωπεύουν τις εξής φάσεις του αυξητικού κύκλου: την πρώιμη στάσιμη (Early Stationary-ES), τη στάσιμη (Stationary-S) και την παρατεταμένη στάσιμη (Late Stationary-LS). Τα αποτελέσματα της ανάλυσης από τον αέριο χρωματογράφο φαίνονται στον παρακάτω πίνακα III.1.

Πίνακας III.1. Σύσταση των λιπιδίων σε λιπαρά οξέα του μύκητα *Thamnidium elegans* σε υπόστρωμα γλυκόζης 100 g/L

ΛΙΠΑΡΑ ΟΞΕΑ (%)									
Χρόνος (h)	C14:0	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3 (GLA)	GLA (mg/L)	(UI)*
65	0.0	22.9	0.0	9.1	52.0	10.1	5.9	204.5	0.84
135	0.6	18.6	1.1	6.7	55.5	10.9	6.6	628.4	0.92
184	0.7	17.3	1.5	5.1	56.1	12.9	6.5	600.7	0.96
232	0.0	22.3	0.0	7.5	58.3	8.7	3.2	435.3	0.82
304	0.5	17.5	1.1	5.1	56.4	13.3	6.1	909.6	0.96
376	0.0	21.7	0.0	4.2	52.6	14.3	7.2	1014.6	0.96

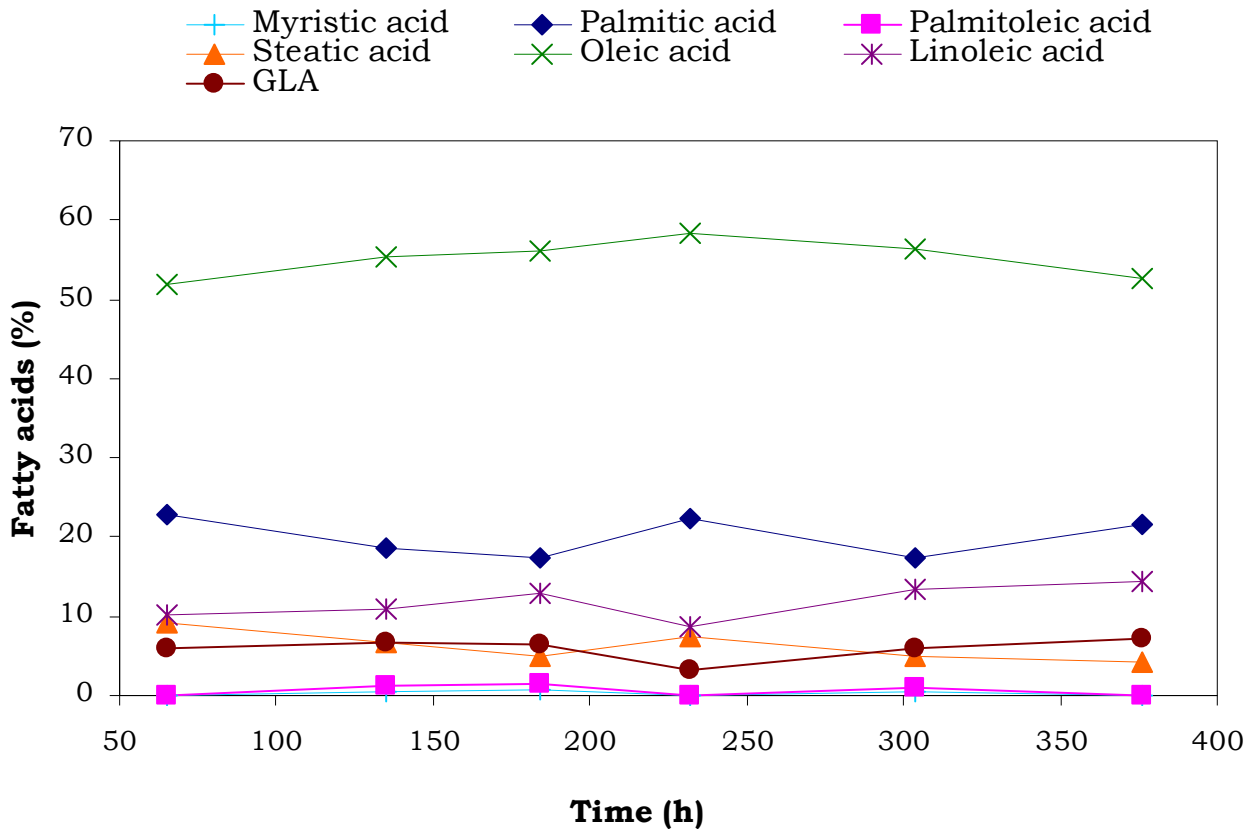
*Unsaturation Index (UI)=[% monoene + 2 * (% diene)]/100

Συνθήκες καλλιέργειας: ασυνεχής ζύμωση σε ανακινούμενες κωνικές φιάλες (180 rpm) και θερμοκρασία T=28 °C, αρχική συγκέντρωση γλυκόζης ($S_{0\text{ GLU}}=100\text{ g/L}$) και πηγές αζώτου 4 g/L yeast extract και 2 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, υπό αερόβιες συνθήκες.

Από τον πίνακα III.1. βλέπουμε ότι όταν ο μικροοργανισμός βρίσκεται στην πρώιμη στάσιμη φάση (135–184 h) το ποσοστό του γ -λινολενικού οξέος (C18:3, GLA) είναι υψηλό. Με την εξέλιξη της ζύμωσης το ποσοστό του γ -λινολενικού πέφτει με ταυτόχρονη αύξηση του ποσοστού του ελαϊκού οξέος (C18:1). Όμως, το ποσοστό του γ -λινολενικού παρουσιάζει ξανά μια αύξηση προς το τέλος της ζύμωσης όταν ο μικροοργανισμός βρίσκεται στην παρατεταμένη στάσιμη φάση του αυξητικού κύκλου όπου έχουμε και υψηλή συγκέντρωση γ -λινολενικού οξέος (7.2%). Την ίδια περίπου εξέλιξη με το γ -λινολενικό οξύ παρουσιάζει και το λινελαϊκό οξύ (C18:2). Η απεικόνιση της σύστασης των λιπιδίων σε λιπαρά οξέα (%) του μύκητα *T. elegans* στο υπόστρωμα της γλυκόζης φαίνεται στο γράφημα III.1.1.β. Στο γράφημα αυτό είναι εμφανής η αυξομείωση του γ -λινολενικού οξέος κατά τη διάρκεια της ζύμωσης.

Ο δείκτης ακορεστότητας (UI) είναι ένας δείκτης που εκφράζει το πόσο ακόρεστο είναι ένα λιπίδιο. Ακόρεστα λιπαρά οξέα είναι το παλμιτελαϊκό οξύ (C16:1) και το ελαϊκό οξύ (C18:1) με ένα διπλό δεσμό, το λινελαϊκό οξύ (C18:2) με 2 διπλούς δεσμούς και το γ -λινολενικό οξύ (C18:3) με 3 διπλούς δεσμούς. Όσο μεγαλύτερη είναι η περιεκτικότητα των λιπιδίων σε ακόρεστα λιπαρά οξέα, τόσο περισσότερο ακόρεστα είναι τα λιπίδια και τόσο μεγαλύτερος είναι ο δείκτης ακορεστότητας. Στον πίνακα III.1. φαίνεται ότι κατά την εξέλιξη της ζύμωσης αυξάνεται η ακορεστότητα των λιπιδίων εξαιτίας της αύξησης του ελαϊκού (C18:1), του λινελαϊκού (C18:2) και του γ -λινολενικού οξέος (C18:3).

TOTAL FATTY ACIDS GLUCOSE 100

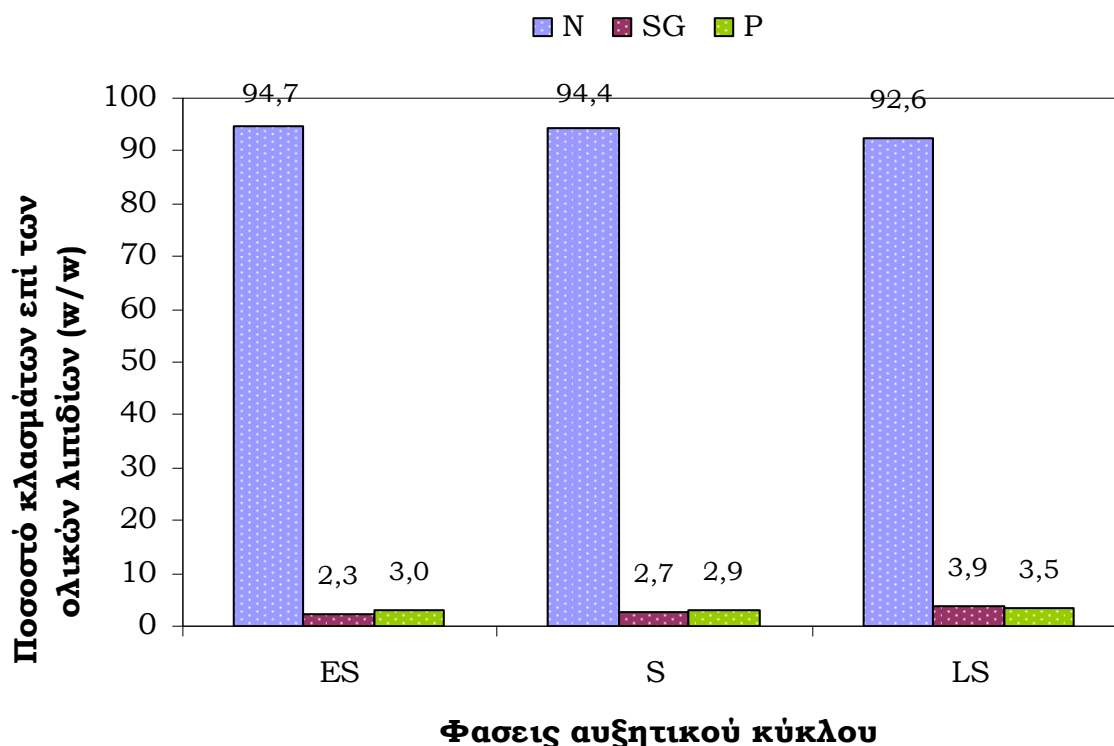


Γράφημα III.1.1.β Σύσταση των λιπιδίων σε λιπαρά οξέα (%): Μυριστικό οξύ (+), Παλμιτικό οξύ (◆), Παλμιτελαϊκό οξύ (■), Στεατικό οξύ (▲), Ελαϊκό οξύ (×), Λινελαϊκό οξύ (*) και γ-λινολενικό οξύ (GLA) (●), του Ζυγομύκητα *Thamnidium elegans* με τη γλυκόζη ως μόνη πηγή άνθρακα.

Συνθήκες καλλιέργειας: ασυνεχής ζύμωση σε ανακινούμενες κωνικές φιάλες (180 rpm) και θερμοκρασία T=28 °C, αρχική συγκέντρωση γλυκόζης ($S_{0\text{ GLU}}=100\text{ g/L}$) και πηγές αζώτου 4 g/L yeast extract και 2 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, υπό αερόβιες συνθήκες.

Εκτός από την ανάλυση της σύστασης των λιπιδίων σε λιπαρά οξέα (%), πραγματοποιήθηκε στο στάδιο αυτό η ανάλυση του μικροβιακού λίπους στα επιμέρους κλάσματα των ουδέτερων λιπιδίων, των σφιγγο-γλυκολιπιδίων και των φωσφολιπιδίων. Όπως αναφέρθηκε παραπάνω τα δείγματα που επιλέχθηκαν για την ανάλυση αυτή αντιπροσωπεύουν τρεις φάσεις του αυξητικού κύκλου: την πρώιμη στάσιμη (135 h), τη στάσιμη (208 h) και την παρατεταμένη στάσιμη φάση (304 h). Το γράφημα III.1.1.γ. παρουσιάζει τα ποσοστά των κλασμάτων επί των ολικών λιπιδίων στα τρία δείγματα που αντιπροσωπεύουν τις τρεις φάσεις του αυξητικού κύκλου. Από το γράφημα αυτό είναι εμφανές ότι τα ουδέτερα λιπίδια (N) αποτελούν το μεγαλύτερο ποσοστό επί του συνόλου των λιπιδίων (TFA), ενώ τα σφιγγο-γλυκολιπίδια (SG) και τα φωσφολιπίδια (P) απαντώνται σε πολύ χαμηλότερα ποσοστά (2–4%).

ΚΛΑΣΜΑΤΑ GLUCOSE 100



Γράφημα III.1.1.γ. Ποσοστιαία κατανομή των κλασμάτων (ουδέτερα, σφιγγο-γλυκολιπίδια και φωσφολιπίδια) επί του συνόλου των ολικών λιπιδίων (TFA) του Ζυγομύκητα *Thamnidium elegans* με τη γλυκόζη ως μόνη πηγή άνθρακα στην πρώιμη στάσιμη, τη στάσιμη και την παρατεταμένη στάσιμη φάση. Συνθήκες καλλιέργειας: ασυνεχής ζύμωση σε ανακινούμενες κωνικές φιάλες (180 rpm) και θερμοκρασία $T=28\text{ }^{\circ}\text{C}$, αρχική συγκέντρωση γλυκόζης ($S_{0\text{ GLU}}=100\text{ g/L}$) και πηγές αζώτου 4 g/L yeast extract και 2 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, υπό αερόβιες συνθήκες.

Ο πίνακας III.2. που ακολουθεί παρουσιάζει τα αποτελέσματα από την ανάλυση των λιπιδίων στα επιμέρους κλάσματα και την κατανομή των λιπαρών οξέων στα κλάσματα αυτά. Είναι εμφανές ότι το κλάσμα των ουδέτερων λιπιδίων (N) είναι παρόμοιο σε σύσταση με το κλάσμα των ολικών λιπιδίων (TFA). Όσον αφορά το δείκτη ακορεστότητας (UI), τα πολικά λιπίδια (φωσφολιπίδια) παρουσιάζουν μεγαλύτερη ακορεστότητα σε σχέση με τα ουδέτερα λιπίδια και τα σφιγγο-γλυκολιπίδια του ενδοκυτταρικού λίπους του *T. elegans*. Αυτό συμβαίνει λόγω του υψηλότερου ποσοστού του λινελαϊκού (C18:2) και του γ -λινολενικού οξέος (C18:3) στα δείγματα των 135 και 208 h. Αντίθετα, στο δείγμα των 304 h το κλάσμα των φωσφολιπιδίων είναι λιγότερο ακόρεστο σε σχέση με αυτό των ουδέτερων λιπιδίων. Το γεγονός αυτό οφείλεται κυρίως στο χαμηλό ποσοστό του ελαϊκού οξέος (C18:1) (35.5%), καθώς και στο σημαντικά υψηλό ποσοστό του κορεσμένου λιπαρού οξέος, του στεατικού οξέος (C18:0) (20.8%).

Πίνακας III.2. Σύσταση των κλασμάτων σε λιπαρά οξέα του μικροβιακού λίπους του *Thamnidium elegans* στην πρώιμη στάσιμη, τη στάσιμη και την παρατεταμένη στάσιμη φάση σε υπόστρωμα γλυκόζης 100 g/L

ΛΙΠΑΡΑ ΟΞΕΑ (%)									
Χρόνος (h)	Λίπος	C14:0	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3 (GLA)	(UI)*
135 h	TFA	0.6	18.6	1.1	6.7	55.5	10.9	6.6	0.92
	N	0.7	17.9	1.2	6.7	57.2	10.8	5.4	0.91
	S+G	0.0	31.0	0.0	0.0	55.1	13.8	0.0	0.83
	P	0.0	22.8	0.0	4.5	43.8	20.9	8.1	1.02
208 h	TFA	0.9	18.3	1.8	4.5	53.9	15.5	5.0	0.97
	N	0.6	19.3	1.2	5.7	56.4	12.1	4.6	0.91
	S+G	0.0	28.2	0.0	9.2	51.1	11.5	0.0	0.74
	P	0.9	17.5	1.1	5.3	43.8	23.8	7.4	1.07
304 h	TFA	0.5	17.5	1.1	5.1	56.4	13.3	6.1	0.96
	N	0.6	17.3	1.5	5.3	57.6	12.4	5.3	0.95
	S+G	0.0	21.4	0.0	18.2	48.6	11.8	0.0	0.72
	P	1.1	19.7	0.9	20.8	35.5	16.9	5.2	0.80

*Unsaturation Index (UI)=[% monoene + 2 * (% diene)]/100

TFA: Ολικά λιπίδια

N: Κλάσμα ουδέτερων λιπιδίων

S+G: Κλάσμα σφίγγο-γλυκολιπιδίων

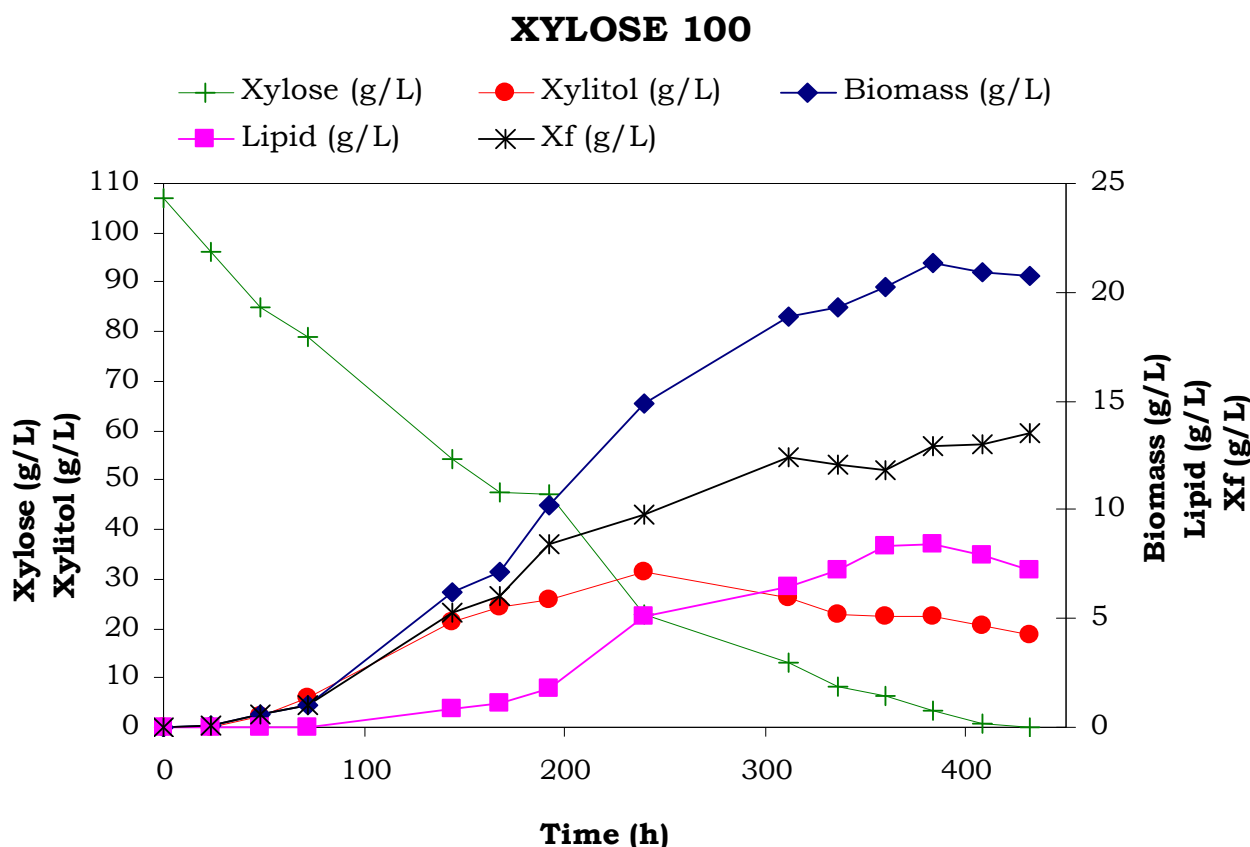
P: Κλάσμα φωσφολιπιδίων

Συνθήκες καλλιέργειας: ασυνεχής ζύμωση σε ανακινούμενες κωνικές φιάλες (180 rpm) και θερμοκρασία T=28 °C, αρχική συγκέντρωση γλυκόζης ($S_{0\text{ GLU}}=100\text{ g/L}$) και πηγές αζώτου 4 g/L yeast extract και 2 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, υπό αερόβιες συνθήκες.

III.2. Καλλιέργεια του Ζυγομύκητα *Thamnidium elegans* στη ξυλόζη ($S_{0\text{XYL}}=100\text{ g/L}$)

III.2.1. Κινητική της κυτταρικής αύξησης, της κατανάλωσης υποστρώματος και της συσσώρευσης λίπους.

Η κινητική της παραγωγής βιομάζας, της κατανάλωσης του μέσου αύξησης και της παραγωγής λίπους από τον μύκητα *Thamnidium elegans* σε υπόστρωμα ξυλόζης, το οποίο διαθέτει ως μόνη πηγή άνθρακα τη ξυλόζη ($S_{0\text{XYL}}=100\text{ g/L}$) απεικονίζεται στο γράφημα III.2.1.α.



Γράφημα III.2.1.α. Κινητική της εξέλιξης της βιομάζας (◆), της κατανάλωσης υποστρώματος (+), της παραγωγής ξυλιτόλης (●), της παραγωγής ενδοκυτταρικού λίπους (■), και της ελεύθερης λίπους βιομάζας (*) συναρτήσει του χρόνου για το Ζυγομύκητα *Thamnidium elegans*, με τη ξυλόζη ως μόνη πηγή άνθρακα. Συνθήκες καλλιέργειας: ασυνεχής ζύμωση σε ανακινούμενες κωνικές φιάλες (180 rpm) και θερμοκρασία $T=28\text{ }^{\circ}\text{C}$, αρχική συγκέντρωση γλυκόζης ($S_{0\text{XYL}}=100\text{ g/L}$) και πηγές αζώτου 4 g/L yeast extract και 2 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, υπό αερόβιες συνθήκες.

Από το γράφημα αυτό φαίνεται ότι ο μικροοργανισμός αναπτύσσεται ικανοποιητικά και η μέγιστη παραγωγή βιομάζας (21.4 g/L) σημειώνεται περί τις 384 h. Η κατανάλωση της ξυλόζης ξεκινά λίγες ώρες μετά τον εμβολιασμό και εξαντλείται όλη η ποσότητα της πηγής άνθρακα μέχρι τις 432 h. Αξίζει να σημειωθεί ότι παράλληλα με την κατανάλωση της ξυλόζης παράγεται ξυλιτόλη με μέγιστη συγκέντρωση 31.3 g/L στις 240 h και ενώ έχει καταναλωθεί περίπου το 78% της πηγής άνθρακα. Η παραγωγή ξυλιτόλης, όπως θα αναφερθεί στη συνέχεια, αφορά κυρίως τις ζύμες και

αποτελεί μια εναλλακτική και πολλά υποσχόμενη μέθοδο για σημαντική μικροβιακή παραγωγή ξυλιτόλης σε υποστρώματα που έχουν ως κύρια πηγή άνθρακα τη ξυλόζη. Στη συνέχεια, και καθώς μειώνεται η συγκέντρωση της ξυλόζης, μειώνεται και η ποσότητα της παραγόμενης ξυλιτόλης.

Ακόμη, από το γράφημα III.2.1.α. δεικνύεται ότι η ξυλόζη αποτελεί κατάλληλο υπόστρωμα για τον μύκητα *T. elegans* όσον αφορά την παραγωγή ενδοκυτταρικού λίπους. Ωστόσο, όταν η πηγή άνθρακα εξαντλείται από το μέσο της καλλιέργειας, ο μικροοργανισμός ανακαταναλώνει τόσο ένα μέρος του συσσωρευμένου λίπους, όσο και της παραγόμενης ξυλιτόλης, προς παραγωγή βιομάζας ελεύθερης λίπους (X_f). Η παραγωγή ενδοκυτταρικού λίπους ήταν ικανοποιητική και σε αυτή τη ζύμωση και η μέγιστη ποσότητα παραγωγής GLA ήταν 534.4 mg/L. Η μέγιστη συσσώρευση λίπους έφτασε τα 8.9 g/L και σημειώθηκε στις 240 h, χρονική στιγμή που συμπίπτει με αυτή της μέγιστης παραγωγής βιομάζας. Ο συντελεστής απόδοσης για το παραγόμενο λίπος ($Y_{L/X}$) σε αυτό το χρονικό σημείο ήταν 42%. Η ανάλυση της σύστασης των λιπιδίων σε λιπαρά οξέα πραγματοποιήθηκε επιλεκτικά στην πλειοψηφία των δειγμάτων που προέκυψαν από τη ζύμωση αυτή (Πίνακας III.3.).

Πίνακας III.3. Σύσταση των λιπιδίων σε λιπαρά οξέα του μύκητα *Thamnidium elegans* σε υπόστρωμα ξυλόζης 100 g/L

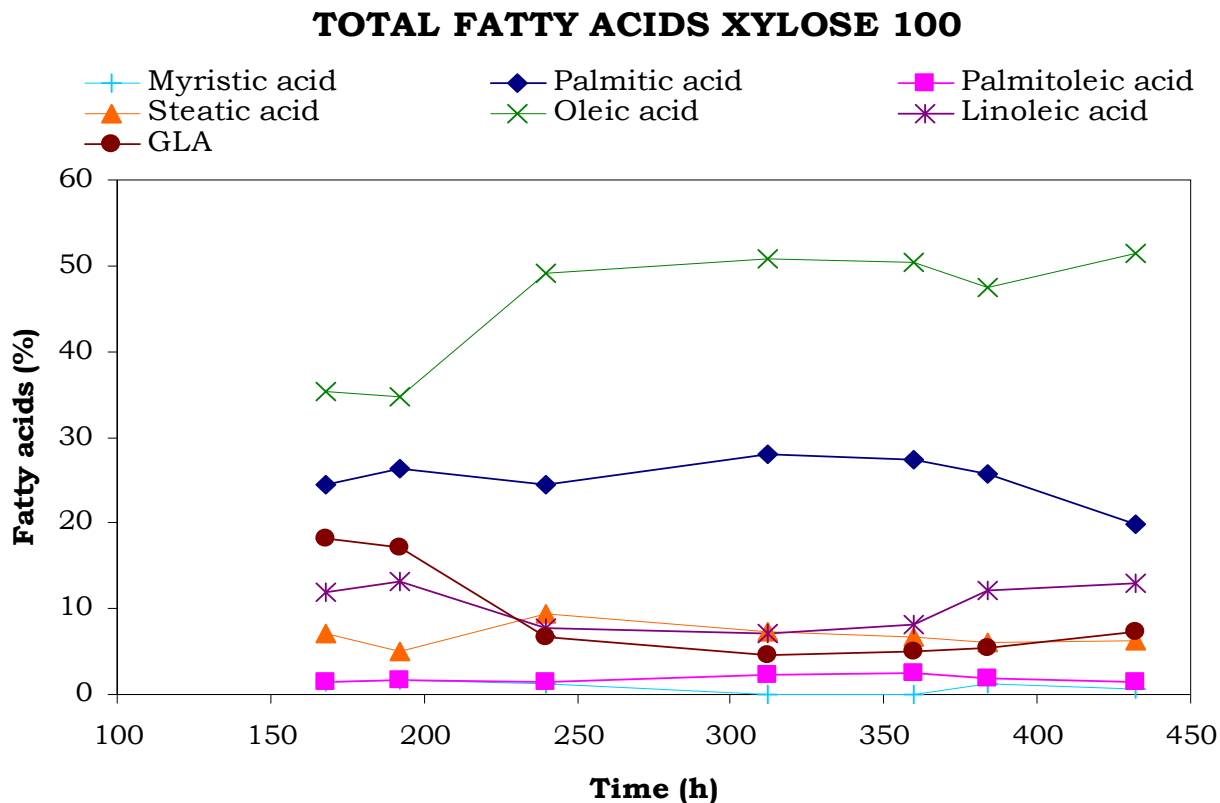
ΛΙΠΑΡΑ ΟΞΕΑ (%)									
Χρόνος (h)	C14:0	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3 (GLA)	GLA (mg/L)	(UI)*
168	1.4	24.6	1.5	7.1	35.4	11.9	18.1	317.2	0.97
192	1.7	26.4	1.8	4.9	34.8	13.2	17.2	152.7	0.98
240	1.2	24.5	1.5	9.4	49.1	7.8	6.6	338.9	0.79
312	0.0	27.9	2.3	7.3	50.8	7.2	4.5	361.3	0.76
360	0.0	27.3	2.4	6.8	50.3	8.2	4.9	410.3	0.79
384	1.3	25.7	1.9	6.1	47.6	12.0	5.5	487.1	0.84
432	0.6	19.9	1.5	6.2	51.5	12.9	7.4	534.4	0.94

*Unsaturation Index (UI)=[% monoene + 2 * (% diene)]/100

Συνθήκες καλλιέργειας: ασυνεχής ζύμωση σε ανακινούμενες κωνικές φιάλες (180 rpm) και θερμοκρασία T=28 °C, αρχική συγκέντρωση ξυλόζης (S_0_{XYL} =100 g/L) και πηγές αζώτου 4 g/L yeast extract και 2 g/L (NH₄)₂SO₄, υπό αερόβιες συνθήκες.

Κατά την ανάλυση του μικροβιακού λίπους στον αέριο χρωματογράφο, παρατηρήθηκε και σε αυτή την περίπτωση η αυξομείωση του ποσοστού του γ-λινολενικού οξέος (C18:3). Κατά την πρώιμη στάσιμη φάση (168–192 h) το ποσοστό του γ-λινολενικού οξέος είναι αρκετά υψηλό (18.1%). Καθώς ο μικροοργανισμός εισέρχεται στη στάσιμη φάση το ποσοστό του GLA μειώνεται

σημαντικά και μάλιστα στις 384 h, όπου σημειώνεται η μέγιστη παραγωγή λίπους (L_{max}), το ποσοστό του γ -λινολενικού οξέος είναι ιδιαίτερα χαμηλό. Ωστόσο, στην παρατεταμένη στάσιμη φάση (432 h) το ποσοστό του GLA αυξάνεται και πάλι. Το γράφημα III.2.1.β. απεικονίζει την ανάλυση των λιπιδίων σε λιπαρά οξέα στο υπόστρωμα της ξυλόζης.



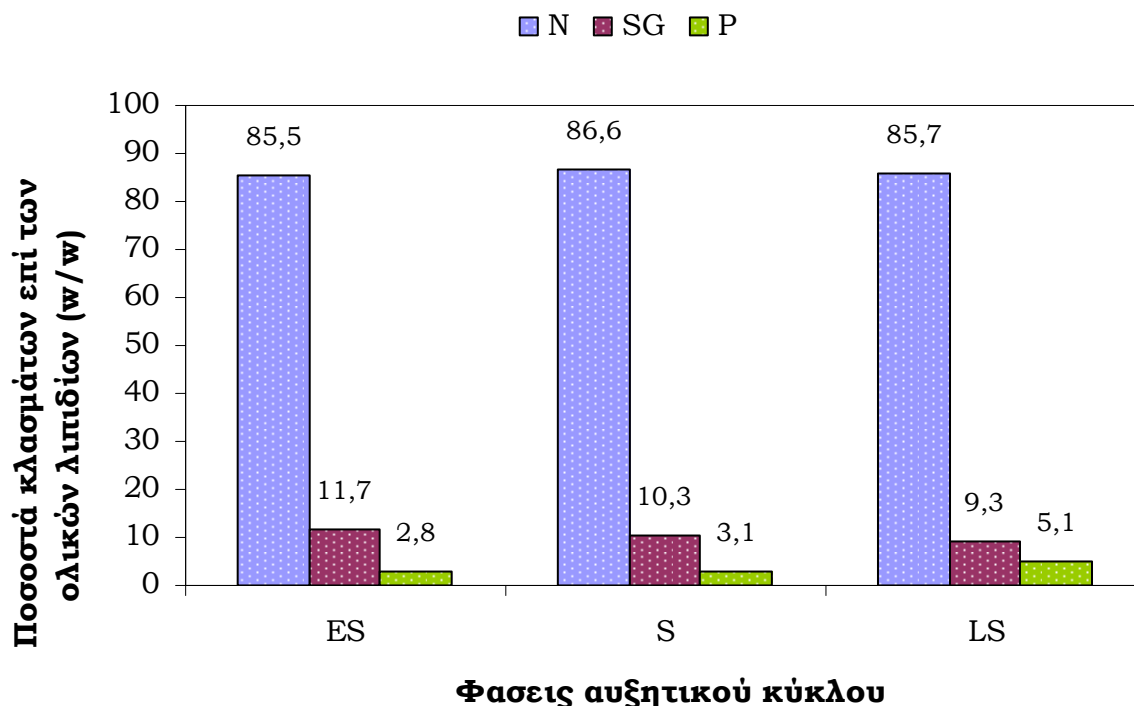
Γράφημα III.2.1.β. Σύσταση των λιπιδίων σε λιπαρά οξέα (%): Μυριστικό οξύ (+), Παλμιτικό οξύ (◆), Παλμιτελαϊκό οξύ (■), Στεατικό οξύ (▲), Ελαϊκό οξύ (×), Λινελαϊκό οξύ (*) και γ -λινολενικό οξύ (GLA) (●), του Ζυγομύκητα *Thamnidium elegans* με τη ξυλόζη ως μόνη πηγή άνθρακα.

Συνθήκες καλλιέργειας: ασυνεχής ζύμωση σε ανακινούμενες κωνικές φιάλες (180 rpm) και θερμοκρασία $T=28\text{ }^{\circ}\text{C}$, αρχική συγκέντρωση ξυλόζης ($S_{0\text{XYL}}=100\text{ g/L}$) και πηγές αζώτου 4 g/L yeast extract και 2 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, υπό αερόβιες συνθήκες.

Αξίζει να σημειωθεί ότι τη χρονική περίοδο που το ποσοστό του γ -λινολενικού οξέος (C18:3) είναι υψηλό, το ποσοστό το ελαϊκού οξέος (C18:1) μειώνεται. Όσον αφορά το δείκτη ακορεστότητας (UI), αυτός είναι υψηλός όταν το ποσοστό του γ -λινολενικού οξέος είναι υψηλό και στη συνέχεια μειώνεται εξαιτίας της πτώσης του GLA και του λινελαϊκού οξέος (C18:2). Τέλος, στην παρατεταμένη στάσιμη φάση του αυξητικού κύκλου ο δείκτης ακορεστότητας αυξάνεται και πάλι κυρίως λόγω της αύξησης του ποσοστού του γ -λινολενικού οξέος και του ελαϊκού οξέος (C18:1).

Η κλασμάτωση των λιπιδίων του μύκητα πραγματοποιήθηκε σε τρεις διακριτές φάσεις του αυξητικού κύκλου: στην πρώιμη στάσιμη (168 h), στη στάσιμη (240 h) και στην παρατεταμένη στάσιμη (336 h).

ΚΛΑΣΜΑΤΑ XYLOSE 100



Γράφημα III.2.1.γ. Ποσοστιαία κατανομή των κλασμάτων (ουδέτερα, σφιγγο-γλυκολιπίδια και φωσφολιπίδια) επί του συνόλου των ολικών λιπιδίων (TFA) του Ζυγομύκητα *Thamnidium elegans* σε ξυλόζη ως μόνη πηγή άνθρακα στην πρώιμη στάσιμη, τη στάσιμη και την παρατεταμένη στάσιμη φάση.

Συνθήκες καλλιέργειας: ασυνεχής ζύμωση σε ανακινούμενες κωνικές φιάλες (180 rpm) και θερμοκρασία $T=28\text{ }^{\circ}\text{C}$, αρχική συγκέντρωση ξυλόζης ($S_0_{XYL}=100\text{ g/L}$) και πηγές αζώτου 4 g/L yeast extract και 2 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, υπό αερόβιες συνθήκες.

Στο γράφημα III.2.1.γ. εμφανίζονται τα ποσοστά των κλασμάτων επί των ολικών λιπιδίων στα τρία δείγματα που αντιπροσωπεύουν τις τρεις φάσεις του αυξητικού κύκλου. Από το γράφημα αυτό είναι εμφανές ότι τα ουδέτερα λιπίδια (N) αποτελούν το μεγαλύτερο ποσοστό επί του συνόλου των λιπιδίων (TFA), ενώ τα σφιγγο-γλυκολιπίδια (SG) και τα φωσφολιπίδια (P) απαντώνται σε χαμηλότερα ποσοστά (3–11%). Η κατανομή των τριών κλασμάτων στο ενδοκυτταρικό λίπος στο παρόν θρεπτικό υπόστρωμα (ξυλόζη 100 g/L) είναι λίγο διαφορετική σε σχέση με αυτή του θρεπτικού μέσου με μόνη πηγή άνθρακα τη γλυκόζη. Στην τελευταία, τα ουδέτερα λιπίδια αντιπροσωπεύουν περίπου το 90% των ολικών λιπιδίων, ενώ τα ποσοστά των σφιγγο-γλυκολιπιδίων και των φωσφολιπιδίων ήταν πολύ χαμηλότερα.

Η ανάλυση του ενδοκυτταρικού λίπους στις κλάσεις των ουδέτερων λιπιδίων, των σφιγγο-γλυκολιπιδίων και των φωσφολιπιδίων και η κατανομή των ποσοστών των λιπαρών τους οξέων παρατίθενται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας III.4).

Πίνακας III.4. Σύσταση των κλασμάτων σε λιπαρά οξέα του μικροβιακού λίπους του *Thamnidium elegans* στην πρώιμη στάσιμη, τη στάσιμη και την παρατεταμένη στάσιμη φάση, σε υπόστρωμα ξυλόζης 100 g/L

ΛΙΠΑΡΑ ΟΞΕΑ (%)									
Χρόνος (h)	Λίπος	C14:0	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3 (GLA)	(UI)*
168 h	TFA	1.4	24.6	1.5	7.1	35.4	11.9	18.1	0.97
	N	0.9	22.5	1.3	8.1	39.2	11.8	16.2	0.96
	S+G	0.0	23.8	0.0	9.0	44.1	10.5	12.7	0.90
	P	0.0	18.4	0.0	4.7	43.4	13.8	19.7	1.10
240 h	TFA	1.2	24.5	1.5	9.4	49.1	7.8	6.6	0.79
	N	0.8	19.9	1.2	10.2	53.4	8.3	6.2	0.84
	S+G	0.0	25.4	0.0	11.1	52.9	10.5	0.0	0.74
	P	0.0	20.5	0.0	6.8	49.1	13.4	10.2	0.96
336 h	TFA	1.5	24.3	1.4	7.3	50.7	9.8	5.1	0.82
	N	0.7	19.4	1.5	7.9	55.5	9.4	5.6	0.87
	S+G	0.0	20.6	1.7	8.1	54.6	10.1	4.9	0.86
	P	0.0	17.1	0.0	5.2	51.3	15.3	11.1	1.04

*Unsaturation Index (UI)=[% monoene + 2 * (% diene)]/100

TFA: Ολικά λιπίδια

N: Κλάσμα ουδέτερων λιπιδίων

S+G: Κλάσμα σφιγγο-γλυκολιπιδίων

P: Κλάσμα φωσφολιπιδίων

Συνθήκες καλλιέργειας: ασυνεχής ζύμωση σε ανακινούμενες κωνικές φιάλες (180 rpm) και θερμοκρασία T=28 °C, αρχική συγκέντρωση ξυλόζης (S_0_{XYL} =100 g/L) και πηγές αζώτου 4 g/L yeast extract και 2 g/L $(NH_4)_2SO_4$, υπό αερόβιες συνθήκες.

Από τον παραπάνω πίνακα (Πίνακας III.4) τεκμαίρεται ότι η σύσταση των ολικών λιπιδίων είναι παρόμοια με αυτή των ουδέτερων λιπιδίων στην εν λόγω ζύμωση. Όπως και στην προηγούμενη ζύμωση, κατά την κλασμάτωση του ενδοκυτταρικού λίπους ο δείκτης ακορεστότητας (UI) των φωσφολιπιδίων είναι μεγαλύτερος σε σχέση με αυτόν των ουδέτερων λιπιδίων και των σφιγγο-γλυκολιπιδίων. Αυτό συμβαίνει κυρίως λόγω του αυξημένου ποσοστού του γ-λινολενικού οξέος (C18:3) και του λινελαϊκού οξέος (C18:2).

III.3. Καλλιέργεια του Ζυγομύκητα *Thamnidium elegans* σε μίγμα γλυκόζης και ξυλόζης με αναλογία 50:50 ($S_0_{\text{GLU}}=50$ g/L και $S_0_{\text{XYL}}=50$ g/L)

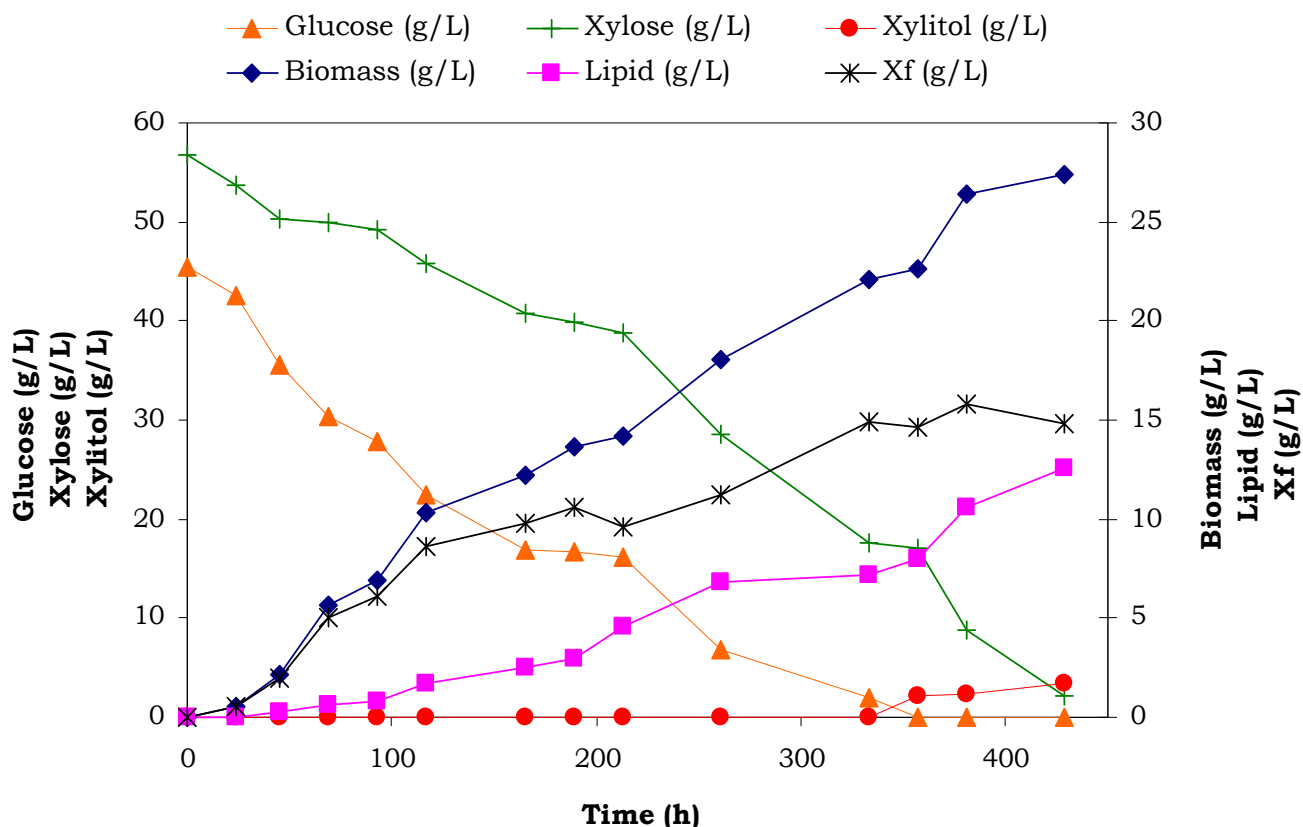
III.3.1 Κινητική της κυτταρικής αύξησης, της κατανάλωσης υποστρώματος και της συσσώρευσης λίπους.

Η καλλιέργεια του μύκητα *Thamnidium elegans* σε θρεπτικό μέσο το οποίο περιέχει δυο πηγές άνθρακα, τη γλυκόζη και τη ξυλόζη, σε αναλογία γλυκόζης-ξυλόζης 50:50 (g/L), έδωσε ικανοποιητικά αποτελέσματα όσον αφορά την κυτταρική αύξηση, τη συσσώρευση ενδοκυτταρικού λίπους και την κατανάλωση υποστρώματος (Γράφημα III.3.1.α). Η μέγιστη παραγωγή βιομάζας ήταν 27.4 g/L περί τις 429 h, ιδιαίτερα σημαντική αν τη συγκρίνουμε με αυτή του υποστρώματος με 100 g/L γλυκόζη, όπου έφτασε τα 31.9 g/L. Επίσης, στο μίγμα γλυκόζης-ξυλόζης 50:50 (g/L), η κυτταρική αύξηση του μύκητα ήταν μεγαλύτερη σε σύγκριση με τη μέγιστη παραγωγή βιομάζας (21.4 g/L) στο υπόστρωμα με μόνη πηγή άνθρακα τη ξυλόζη. Η μέγιστη συσσώρευση ενδοκυτταρικού λίπους ήταν 12.6 g/L με συντελεστή απόδοσης λίπους 0.46 g/g παραγόμενης βιομάζας και σημειώθηκε τη χρονική στιγμή όπου παρατηρήθηκε και η μέγιστη παραγωγή βιομάζας (429 h). Η ποσότητα του παραγόμενου λίπους είναι αρκετά σημαντική και άμεσα συγκρίσιμη με τη μέγιστη συσσώρευση λίπους στο υπόστρωμα της γλυκόζης 100 g/L με 15.0 g/L. Παράλληλα, και σε αυτή τη ζύμωση παράγεται σημαντική ποσότητα γ -λινολενικού οξέος που φτάνει τα 974.9 mg/L.

Σχετικά με την κατανάλωση του μέσου αύξησης σημειώθηκε πλήρης εξάντληση της γλυκόζης μέχρι τις 357 h, ενώ μόνο ένα 4% της ξυλόζης έμεινε ακατανάλωτο περί τις 430 h. Αξίζει να σημειωθεί ότι η γλυκόζη καταναλώθηκε με ταχύτερο ρυθμό σε σχέση με την κατανάλωση της ξυλόζης. Ο ρυθμός κατανάλωσης των δυο πηγών άνθρακα απεικονίζεται στο γράφημα III.1. Εξάλλου, η μέγιστη παραγωγή ξυλιτόλης ($X_{\text{ylitol}}_{\text{max}}$) στο μίγμα γλυκόζης-ξυλόζης 50:50 (g/L), είναι χαμηλή (3.4 g/L) σε σύγκριση με την παραγωγή ξυλιτόλης στο θρεπτικό μέσο με μόνη πηγή άνθρακα τη ξυλόζη, όπου παρήχθησαν 31.3 g/L. Μάλιστα, από το γράφημα III.3.1.α. φαίνεται ότι η παραγωγή ξυλιτόλης ξεκινά περί τις 357 h, όταν δηλαδή καταναλώνεται πλήρως η γλυκόζη. Όπως έχει αναφερθεί βιβλιογραφικά, η γλυκόζη πιθανόν να δρα παρεμποδιστικά κατά τη μεταβολική διεργασία της παραγωγής ξυλιτόλης από τη ξυλόζη.

Τέλος, η βιομάζα ελεύθερη λίπους (X_f) παρουσιάζει συνεχή αύξηση κατά τη διάρκεια της ζύμωσης εξαιτίας της σημαντικής αύξησης της βιομάζας και της σταθερής συσσώρευσης λίπους. Ωστόσο, κατά τη στάσιμη φάση (213 h) και την παρατεταμένη στάσιμη φάση (429 h) του αυξητικού κύκλου η παράμετρος X_f μειώνεται ελαφρώς, καθώς συνεχίζει να λαμβάνει χώρα η συσσώρευση ενδοκυτταρικού λίπους.

50 GLU : 50 XYL



Γράφημα III.3.1.a. Κινητική της εξέλιξης της βιομάζας (◆), της κατανάλωσης υποστρώματος ξυλόζης (+), της κατανάλωσης υποστρώματος γλυκόζης (▲), της παραγωγής ξυλιτόλης (●), της παραγωγής ενδοκυτταρικού λίπους (■), και της ελεύθερης λίπους βιομάζας (*) συναρτήσεως του χρόνου για το ζυγομύκητα *Thamnidium elegans*, σε μίγμα γλυκόζης-ξυλόζης 50:50 (g/L).

Συνθήκες καλλιέργειας: ασυνεχής ζύμωση σε ανακινούμενες κωνικές φιάλες (180 rpm) και θερμοκρασία T=28 °C, αρχική συγκέντρωση γλυκόζης ($S_{0\text{ GLU}}=50\text{ g/L}$) & αρχική συγκέντρωση ξυλόζης ($S_{0\text{ XYL}}=50\text{ g/L}$) και πηγές αζώτου 4 g/L yeast extract και 2 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, υπό αερόβιες συνθήκες.

Και σε αυτή τη ζύμωση πραγματοποιήθηκε ανάλυση της σύστασης του ενδοκυτταρικού λίπους που παρήχθη στα επιμέρους λιπαρά οξέα. Η ανάλυση έγινε με τη βοήθεια του αέριου χρωματογράφου στην πλειοψηφία των δειγμάτων τα οποία παραλήφθησαν κατά τη διάρκεια της ζύμωσης και μετά τη μεθυλίωση τους.

Από τον πίνακα III.5. είναι εμφανής η αυξομείωση του ποσοστού του γ-λινολενικού οξέος (C18:3) και σε αυτή τη ζύμωση. Κατά την πρώιμη στάσιμη φάση του αυξητικού κύκλου (45–93 h) σημειώνονται υψηλά ποσοστά παραγωγής GLA, ενώ καθώς προχωρά η ζύμωση το ποσοστό του γ-λινολενικού οξέος μειώνεται. Στη συνέχεια, περί τις 213 h (στάσιμη φάση) το ποσοστό του GLA αυξάνεται και πάλι και φτάνει στην υψηλότερη τιμή του (13.2%). Χαρακτηριστικό αποτελεί το γεγονός ότι κατά την παρατεταμένη στάσιμη φάση (429 h), όπου σημειώνεται η υψηλότερη συσσώρευση ενδοκυτταρικού λίπους ($L_{\text{max}}=12.6\text{ g/L}$), το ποσοστό του γ-λινολενικού οξέος είναι το

χαμηλότερο που παρατηρείται κατά τη διάρκεια της ζύμωσης (7.4%). Το φαινόμενο αυτό παρατηρήθηκε και κατά τη καλλιέργεια του μύκητα στο υπόστρωμα με 100 g/L ξυλόζης.

Πίνακας III.5. Σύσταση των λιπιδίων σε λιπαρά οξέα του μύκητα *Thamnidium elegans* σε μίγμα γλυκόζης-ξυλόζης 50:50 (g/L)

ΛΙΠΑΡΑ ΟΞΕΑ (%)									
Χρόνος (h)	C14:0	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3 (GLA)	GLA (mg/L)	(UI)*
69	0.0	22.7	0.0	11.4	39.9	13.9	12.0	97.3	0.92
93	0.0	25.3	0.0	7.2	42.4	14.6	10.5	67.4	0.93
117	0.0	22.3	1.5	6.9	45.4	14.2	9.7	291.0	0.95
165	0.0	20.8	1.8	7.1	46.3	14.4	9.5	434.4	0.96
189	0.9	21.5	1.5	7.4	41.0	16.3	11.3	188.5	0.98
213	0.9	21.8	1.3	6.0	41.0	15.8	13.2	326.6	1.00
261	0.6	19.7	1.3	6.6	47.8	15.9	8.2	558.1	0.97
357	0.7	21.0	1.1	6.9	48.3	12.2	9.8	783.5	0.93
381	0.6	19.9	1.0	7.0	49.3	12.9	9.2	974.9	0.95
429	0.6	20.6	1.1	7.2	50.9	12.1	7.4	936.2	0.91

*Unsaturation Index (UI)=[% monoene + 2 * (% diene)]/100

Συνθήκες καλλιέργειας: ασυνεχής ζύμωση σε ανακινούμενες κωνικές φιάλες (180 rpm) και θερμοκρασία T=28 °C, αρχική συγκέντρωση γλυκόζης (S_{0 GLU}=50 g/L) & αρχική συγκέντρωση ξυλόζης (S_{0 XYL}=50 g/L) και πηγές αζώτου 4 g/L yeast extract και 2 g/L (NH₄)₂SO₄, υπό αερόβιες συνθήκες.

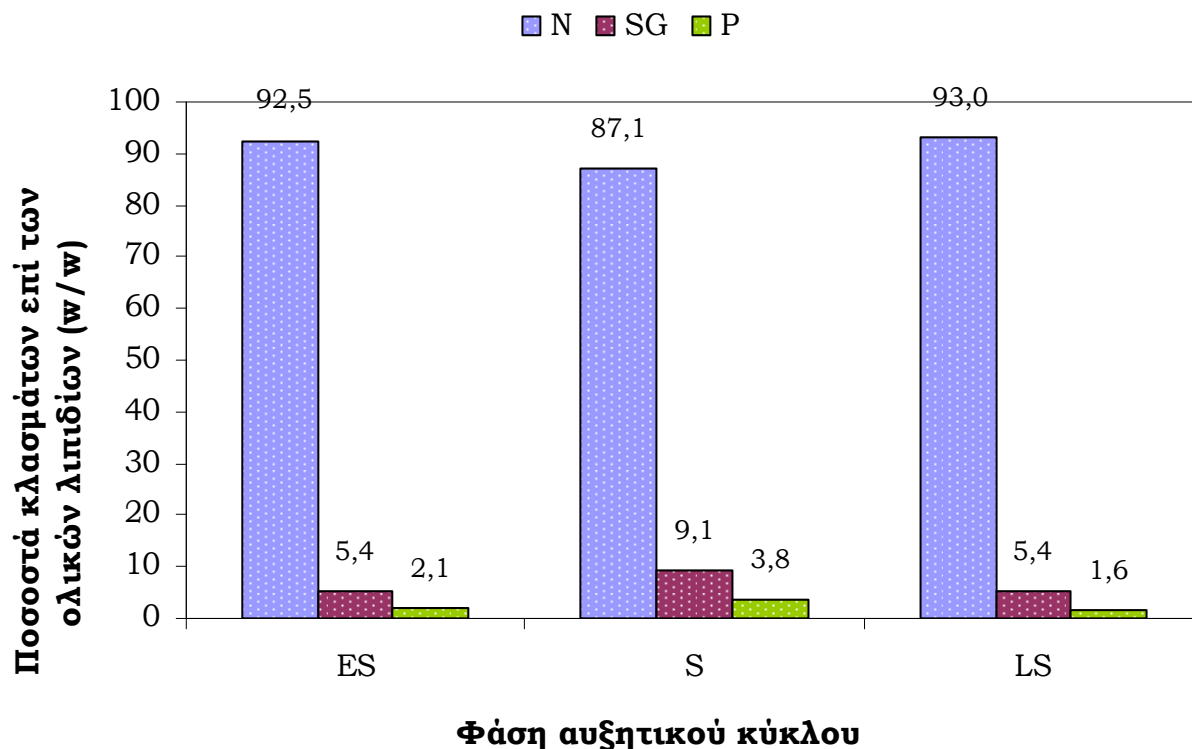
Αξίζει να σημειωθεί ότι όταν αυξάνεται το ποσοστό του γ-λινολενικού οξέος, μειώνεται το ποσοστό του ελαϊκού οξέος (C18:1) και αντίστροφα. Η σύσταση του ενδοκυτταρικού λίπους σε GLA ομοιάζει με αυτή του στεατικού οξέος (C18:0). Τα ποσοστά των υπόλοιπων λιπαρών οξέων δεν παρουσιάζουν ιδιαίτερες μεταβολές κατά τη διάρκεια της ζύμωσης.

Όσον αφορά το δείκτη ακορεστότητας (UI), αυτός αυξάνεται με την άξηση της περιεκτικότητας των λιπιδίων σε γ-λινολενικό οξύ και σε λινελαϊκό οξύ (C18:2), και μάλιστα φτάνει να πάρει τη μέγιστη τιμή του (1.00) όταν σημειώνεται το μέγιστο ποσοστό του GLA (13.2%).

Εκτός από την ανάλυση της σύστασης του ενδοκυτταρικού λίπους σε λιπαρά οξέα, λαμβάνει χώρα η κλασμάτωση των λιπιδίων και ο διαχωρισμός σε ουδέτερα λιπίδια (N), σφιγγο-γλυκολιπίδια (SG) και φωσφολιπίδια (P). Τα δείγματα που επιλέχθηκαν για κλασμάτωση αντιπροσωπεύουν ως γνωστόν τις τρεις φάσεις του αυξητικού κύκλου: την πρώιμη στάσιμη (165 h), τη στάσιμη (261 h) και την παρατεταμένη στάσιμη φάση (429 h). Στο γράφημα III.3.1.β.

απεικονίζεται η σύσταση των ολικών λιπιδίων στα επιμέρους κλάσματα και πως κατανέμονται αυτά ποσοστιαία στα προς ανάλυση δείγματα.

ΚΛΑΣΜΑ 50 GLU : 50 XYL



Γράφημα III.3.1.β. Ποσοστιαία κατανομή των κλασμάτων (ουδέτερα, σφιγγο-γλυκολιπίδια και φωσφολιπίδια) επί του συνόλου των ολικών λιπιδίων (TFA) του Ζυγομύκητα *Thamnidium elegans* σε μίγμα γλυκόζης-ξυλόζης 50:50 (g/L) στην πρώιμη στάσιμη, τη στάσιμη και την παρατεταμένη στάσιμη φάση.

Συνθήκες καλλιέργειας: ασυνεχής ζύμωση σε ανακινούμενες κωνικές φιάλες (180 rpm) και θερμοκρασία T=28 °C, αρχική συγκέντρωση γλυκόζης ($S_{0\text{ GLU}}=50\text{ g/L}$) & αρχική συγκέντρωση ξυλόζης ($S_{0\text{ XYL}}=50\text{ g/L}$) και πηγές αζώτου 4 g/L yeast extract και 2 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, υπό αερόβιες συνθήκες.

Όπως και στις ζυμώσεις που προηγήθηκαν, τα ουδέτερα λιπίδια (N) αντιπροσωπεύουν το μεγαλύτερο ποσοστό των ολικών λιπιδίων σε σχέση με τα σφιγγο-γλυκολιπίδια (SG) και τα φωσφολιπίδια (P). Αξίζει να σημειωθεί ότι κατά τη στάσιμη φάση όπου το ποσοστό των ουδέτερων λιπιδίων μειώνεται, αυξάνονται τα ποσοστά τόσο των σφιγγο-γλυκολιπιδίων όσο και των φωσφολιπιδίων.

Ακολουθεί η ανάλυση του ενδοκυτταρικού λίπους στις κλάσεις των ουδέτερων λιπιδίων, των σφιγγο-γλυκολοπιδίων και των φωσφολιπιδίων καθώς και η κατανομή των λιπαρών οξέων στα κλάσματα αυτά. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης φαίνονται στον επόμενο πίνακα (Πίνακας III.6).

Πίνακας III.6. Σύσταση των κλασμάτων σε λιπαρά οξέα του μικροβιακού λίπους του *Thamnidium elegans* στην πρώτη στάσιμη, τη στάσιμη και την παρατεταμένη στάσιμη φάση, σε μίγμα γλυκόζης-ξυλόζης 50:50 (g/L)

ΛΙΠΑΡΑ ΟΞΕΑ (%)									
Χρόνος (h)	Λίπος	C14:0	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3 (GLA)	(UI)*
165 h	TFA	0.0	20.8	1.8	7.1	46.3	14.4	9.5	0.96
	N	0.7	20.1	1.3	7.5	46.9	14.1	9.3	0.95
	S+G	0.0	21.8	0.0	8.2	46.5	14.7	8.8	0.94
	P	0.0	17.8	0.0	4.0	45.7	21.2	11.3	1.11
261 h	TFA	0.6	19.7	1.3	6.6	47.8	15.9	8.2	0.97
	N	0.7	19.8	1.2	5.9	48.0	16.0	8.4	0.98
	S+G	0.0	22.1	0.0	7.4	48.1	15.4	7.0	0.93
	P	0.0	18.9	0.0	4.9	46.3	21.7	8.2	1.06
429 h	TFA	0.6	20.6	1.1	7.2	50.9	12.1	7.4	0.91
	N	0.6	20.7	1.1	7.1	51.1	12.0	7.4	0.91
	S+G	0.0	23.1	0.0	9.0	48.3	12.9	6.7	0.88
	P	0.0	23.6	0.0	7.8	46.9	14.3	7.4	0.90

*Unsaturation Index (UI)=[% monoene + 2 * (% diene)]/100

TFA: Ολικά λιπίδια

N: Κλάσμα ουδέτερων λιπιδίων

S+G: Κλάσμα σφίγγο-γλυκολιπιδίων

P: Κλάσμα φωσφολιπιδίων

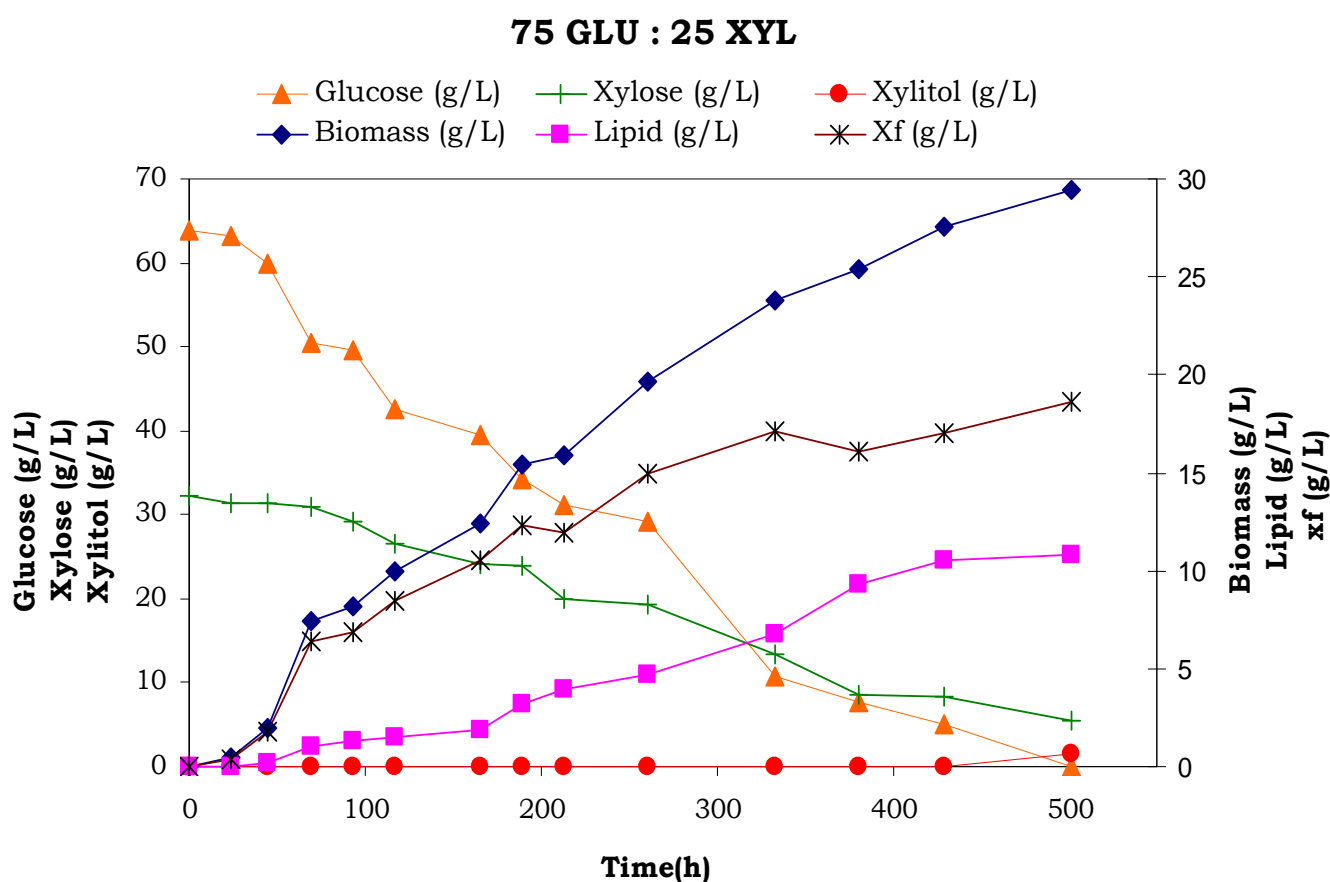
Συνθήκες καλλιέργειας: ασυνεχής ζύμωση σε ανακινούμενες κωνικές φιάλες (180 rpm) και θερμοκρασία T=28 °C, αρχική συγκέντρωση γλυκόζης (S_{0 GLU}=50 g/L) & αρχική συγκέντρωση ξυλόζης (S_{0 XYL}=50 g/L) και πηγές αζώτου 4 g/L yeast extract και 2 g/L (NH₄)₂SO₄, υπό αερόβιες συνθήκες.

Από τον παραπάνω πίνακα (Πίνακας III.6) φαίνεται ότι η σύσταση των ολικών λιπιδίων (TFA) είναι ομοιάζουσα με αυτή των ουδέτερων λιπιδίων (N), όπως ήταν αναμενόμενο. Επίσης, το κλάσμα των φωσφολιπιδίων (P) παρουσιάζει τη μεγαλύτερη ακορεστότητα σε σύγκριση με τα υπόλοιπα κλάσματα (N, SG) στα δυο πρώτα δείγματα. Αυτό οφείλεται κυρίως στο αυξημένο ποσοστό του γ-λινολενικού οξέος (C18:3) και του λινελαϊκού οξέος (C18:2). Αντίθετα, στο δείγμα των 429 h το κλάσμα των φωσφολιπιδίων (P) φαίνεται να είναι λιγότερο ακόρεστο (UI=0.90) σε σχέση με αυτό των ουδέτερων λιπιδίων (UI=0.91), κυρίως λόγω του αυξημένου ποσοστού του παλμιτικού οξέος (C16:0) και του σχετικά χαμηλού ποσοστού του λινελαϊκού οξέος (C18:2).

III.4. Καλλιέργεια του Ζυγομύκητα *Thamnidium elegans* σε μίγμα γλυκόζης και ξυλόζης με αναλογία 75:25 ($S_0_{GLU}=75$ g/L και $S_0_{XYL}=25$ g/L)

III.4.1. Κινητική της κυτταρικής αύξησης, της κατανάλωσης υποστρώματος και της συσσώρευσης λίπους.

Η καλλιέργεια του μύκητα *Thamnidium elegans* σε θρεπτικό μέσο που έχει δυο πηγές άνθρακα, τη γλυκόζη και τη ξυλόζη, σε αναλογία 75:25 (g/L) αντίστοιχα, έδωσε ικανοποιητικά αποτελέσματα τόσο στην κυτταρική αύξηση και την κατανάλωση του υποστρώματος, όσο και στην παραγωγή ενδοκυτταρικού λίπους. Η εξέλιξη της ζύμωσης και τα αποτελέσματα της απεικονίζονται στο γράφημα III.4.1.α.



Γράφημα III.4.1.α. Κινητική της εξέλιξης της βιομάζας (◆), της κατανάλωσης υποστρώματος ξυλόζης (+), της κατανάλωσης υποστρώματος γλυκόζης (▲), της παραγωγής ξυλιτόλης (●), της παραγωγής ενδοκυτταρικού λίπους (■), και της ελεύθερης λίπους βιομάζας (*) συναρτήσεως του χρόνου για το Ζυγομύκητα *Thamnidium elegans*, σε μίγμα γλυκόζης-ξυλόζης 75:25 (g/L).

Συνθήκες καλλιέργειας: ασυνεχής ζύμωση σε ανακινούμενες κωνικές φιάλες (180 rpm) και θερμοκρασία $T=28$ °C, αρχική συγκέντρωση γλυκόζης ($S_0_{GLU}=75$ g/L) & αρχική συγκέντρωση ξυλόζης ($S_0_{XYL}=25$ g/L) και πηγές αζώτου 4 g/L yeast extract και 2 g/L $(NH_4)_2SO_4$, υπό αερόβιες συνθήκες.

Συγκεκριμένα, η μέγιστη παραγωγή βιομάζας ήταν 29.5 g/L και σημειώθηκε περί τις 501 h. Η ποσότητα αυτή είναι ιδιαίτερα ικανοποιητική σε σύγκριση με τη μέγιστη παραγωγή βιομάζας μεταξύ των ζυμώσεων που σημειώθηκε στο θρεπτικό μέσο με 100 g/L γλυκόζη και ήταν 31.9 g/L. Επίσης, η ζύμωση σε μίγμα γλυκόζης-ξυλόζης 50:50 (g/L) παρουσίασε παρόμοια κυτταρική αύξηση (27.4 g/L) με την παρούσα ζύμωση (29.5 g/L).

Σχετικά με την κατανάλωση του υποστρώματος, η γλυκόζη καταναλώθηκε πλήρως μέχρι το τέλος της ζύμωσης (501 h), ενώ το ποσοστό της ξυλόζης που έμεινε ακατανάλωτο ήταν περίπου 17%. Από το γράφημα III.4.1.α. φαίνεται ότι η γλυκόζη καταναλώνεται με ταχύτερο ρυθμό σε σχέση με τη ξυλόζη παρά το γεγονός ότι η αρχική συγκέντρωση της γλυκόζης στο θρεπτικό μέσο ήταν 75 g/L, ενώ της ξυλόζης μόλις 25 g/L. Επιπλέον, και σε αυτή τη ζύμωση παρατηρείται παραγωγή ξυλιτόλης με μέγιστη τιμή ($Xylitol_{max}$) 1.4 g/L περί τις 501 h. Μάλιστα, η μέγιστη ποσότητα παραγωγής ξυλιτόλης σημειώνεται όταν καταναλώνεται όλη η πηγή άνθρακα της γλυκόζης. Το ίδιο φαινόμενο παρατηρήθηκε στην ζύμωση σε μίγμα γλυκόζης και ξυλόζης σε αναλογία 50:50 (g/L) αντίστοιχα.

Η βιομάζα ελεύθερη λίπους (X_F) παρουσιάζει συνεχή αύξηση κατά τη διάρκεια της ζύμωσης εξαιτίας της σημαντικής αύξησης της βιομάζας και της σταθερής συσσώρευσης λίπους, προφανώς λόγω συσσώρευσης πολυσακχαριδίων. Ωστόσο, κατά τη την πρώιμη στάσιμη φάση (213 h) και την παρατεταμένη στάσιμη (381 h) του αυξητικού κύκλου η παράμετρος X_F μειώνεται ελαφρώς λόγω της σταθεροποίησης της παραγωγής βιομάζας και της αύξησης του παραγόμενου ενδοκυτταρικού λίπους.

Η μέγιστη συσσώρευση ενδοκυτταρικού λίπους (L_{max}) έφτασε τα 10.8 g/L με συντελεστή απόδοσης 0.37 g/g παραγόμενης βιομάζας και σημειώθηκε τη χρονική στιγμή όπου παρατηρείται και η μέγιστη παραγωγή βιομάζας (501 h). Η παραγόμενη ποσότητα λίπους είναι σημαντική αν και είναι χαμηλότερη σε σύγκριση με αυτή του μίγματος γλυκόζης-ξυλόζης 50:50 (g/L) (12.6 g/L). Όσον αφορά την παραγόμενη ποσότητα γ -λινολενικού οξέος, αυτή ήταν αρκετά σημαντική με 883.5 mg/L και συγκρίσιμη με την ποσότητα GLA (974.9 mg/L) που παρήχθη κατά τη ζύμωση του μίγματος γλυκόζης-ξυλόζης 50:50 (g/L)

Τα αποτελέσματα από την ανάλυση του ενδοκυτταρικών λιπιδίων του μύκητα παρουσιάζονται στον πίνακα III.7. Η παραγωγή του γ -λινολενικού οξέος στη παρούσα ζύμωση είναι ιδιαίτερα σημαντική και το ποσοστό του GLA (C18:3) φτάνει το 16.2%, από τα υψηλότερα ποσοστά παραγωγής γ -λινολενικού οξέος, σε σύγκριση με 17.2–18.1%, που σημειώθηκαν στη ζύμωση με μόνη πηγή άνθρακα τη ξυλόζη (100 g/L). Μέχρι τις 165 h (πρώιμη στάσιμη φάση) τα ποσοστά του GLA είναι αρκετά αυξημένα, ενώ καθώς εξελίσσεται η ζύμωση αυτά μειώνονται. Η σύσταση του εν λόγω λίπους ομοιάζει με τη σύσταση του λίπους κατά την καλλιέργεια του μύκητα σε μίγμα γλυκόζης-ξυλόζης 50:50 (g/L), ως προς το γ -λινολενικό οξύ.

Πίνακας III.7. Σύσταση των λιπιδίων σε λιπαρά οξέα του μύκητα *Thamnidium elegans* σε μίγμα γλυκόζης-ξυλόζης 75:25 (g/L).

ΛΙΠΑΡΑ ΟΞΕΑ (%)									
Χρόνος (h)	C14:0	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3 (GLA)	GLA (mg/L)	(UI)*
24	0.0	17.4	0.0	15.9	44.9	11.5	10.4	4.6	0.89
69	1.5	20.3	1.8	8.4	47.6	9.7	10.8	115.7	0.90
93	1.0	21.3	1.9	6.5	44.2	13.6	11.5	176.9	0.96
165	1.2	23.1	1.8	4.9	35.0	17.8	16.2	309.2	1.05
261	0.8	20.5	1.1	6.1	44.4	15.9	11.2	436.3	1.00
333	0.8	20.6	1.0	6.3	50.2	13.5	7.6	710.1	0.94
381	0.6	20.0	1.0	6.4	49.4	14.2	8.4	888.1	0.96
429	0.8	18.9	1.0	7.4	47.9	14.6	9.4	635.0	0.97
501	0.7	20.0	1.0	7.1	50.6	12.5	8.2	883.5	0.93

*Unsaturation Index (UI)=[% monoene + 2 * (% diene)]/100

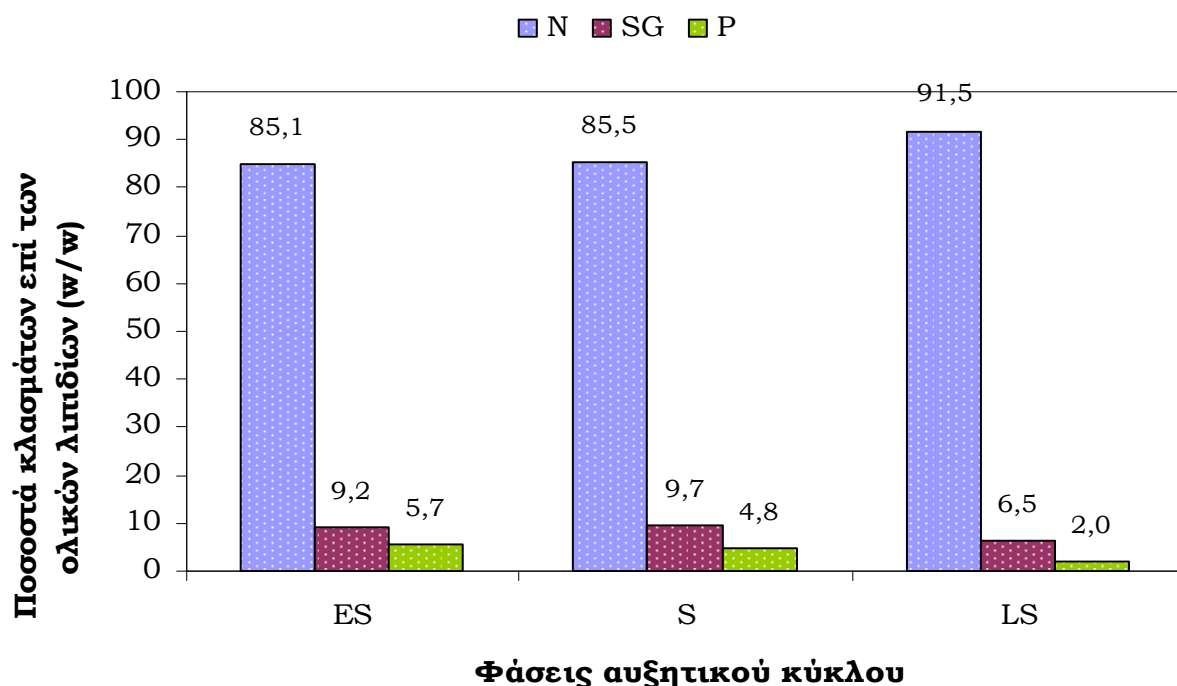
Συνθήκες καλλιέργειας: ασυνεχής ζύμωση σε ανακινούμενες κωνικές φιάλες (180 rpm) και θερμοκρασία T=28 °C, αρχική συγκέντρωση γλυκόζης (S₀ GLU=75 g/L) & αρχική συγκέντρωση ξυλόζης (S₀ XYL=25 g/L) και πηγές αζώτου 4 g/L yeast extract και 2 g/L (NH₄)₂SO₄, υπό αερόβιες συνθήκες.

Τα χαμηλότερα ποσοστά γ-λινολενικού οξέος σημειώνονται κατά την παρατεταμένη στάσιμη φάση του αυξητικού κύκλου, όταν δηλαδή η συσσώρευση του ενδοκυτταρικού λίπους είναι αυξημένη. Το φαινόμενο αυτό παρατηρείται σε όλες τις προηγούμενες ζυμώσεις. Φαίνεται λοιπόν, ότι όσο μικρότερη είναι η ποσότητα του λίπους που παράγεται, τόσο μεγαλύτερη είναι η περιεκτικότητα του σε GLA. Η ποσότητα του γ-λινολενικού οξέος σε mg/L λίπους φαίνεται να αυξάνει όσο εξελίσσεται η ζύμωση κυρίως λόγω της αύξησης της παραγωγής ενδοκυτταρικού λίπους.

Ο δείκτης ακορεστότητας (UI) είναι χαμηλός τις πρώτες ώρες της καλλιέργειας εξαιτίας της σημαντικά υψηλής περιεκτικότητας του λίπους σε στεατικό οξύ (C18:0). Ωστόσο, στη συνέχεια η σύσταση του λίπους σε λιπαρά οξέα διαφοροποιείται με αποτέλεσμα να αυξάνει η περιεκτικότητα του ενδοκυτταρικού λίπους σε γ-λινολενικό οξύ (C18:3) και σε λινελαϊκό οξύ (C18:2). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα ο δείκτης ακορεστότητας να αυξάνει σταδιακά με μικρές διακυμάνσεις. Επιπλέον, όταν αυξάνει η περιεκτικότητα του λίπους σε γ-λινολενικό οξύ (C18:3), μειώνεται το ποσοστό του ελαϊκού οξέος (C18:1). Το ίδιο συμβαίνει κατά την καλλιέργεια του μύκητα στην ξυλόζη 100 g/L και στο μίγμα γλυκόζης-ξυλόζης 50:50 (g/L). Το λινελαϊκό οξύ (C18:2) παρουσιάζει παρόμοια κατανομή στη σύσταση του λίπους με αυτή του GLA (C18:3), ενώ το στεατικό οξύ φαίνεται να μειώνεται κατά την αυξητική φάση.

Εκτός από την ανάλυση της σύστασης του ενδοκυτταρικού λίπους σε λιπαρά οξέα, πραγματοποιήθηκε η κλασμάτωση των λιπιδίων σε ουδέτερα λιπίδια (N), σφίγγο-γλυκολιπίδια (SG) και φωσφολιπίδια (P). Τα δείγματα που επιλέχθηκαν αντιπροσωπεύουν τις τρεις φάσεις του αυξητικού κύκλου του μύκητα *T. elegans*: την πρώιμη στάσιμη (189 h), τη στάσιμη (261 h) και την παρατεταμένη στάσιμη φάση (501 h).

ΚΛΑΣΜΑ 75 GLU : 25 XYL



Γράφημα III.4.1.β. Ποσοστιαία κατανομή των κλασμάτων (ουδέτερα, σφίγγο-γλυκολιπίδια και φωσφολιπίδια) επί του συνόλου των ολικών λιπιδίων (TFA) του Ζυγομύκητα *Thamnidium elegans* σε μίγμα γλυκόζης-ξυλόζης 75:25 (g/L) στην πρώιμη στάσιμη, τη στάσιμη και την παρατεταμένη στάσιμη φάση.

Συνθήκες καλλιέργειας: ασυνεχής ζύμωση σε ανακινούμενες κωνικές φιάλες (180 rpm) και θερμοκρασία T=28 °C, αρχική συγκέντρωση γλυκόζης ($S_{0\text{ GLU}}=75\text{ g/L}$) & αρχική συγκέντρωση ξυλόζης ($S_{0\text{ XYL}}=25\text{ g/L}$) και πηγές αζώτου 4 g/L yeast extract και 2 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, υπό αερόβιες συνθήκες.

Το γράφημα III.4.1.β. απεικονίζει την ανάλυση του ενδοκυτταρικού λίπους στα επιμέρους κλάσματα (N, SG, P) εκφραζόμενα σε ποσοστά. Είναι εμφανές ότι τα ουδέτερα λιπίδια (N) αποτελούν το μεγαλύτερο ποσοστό των ολικών λιπιδίων (TFA) και ακολουθούν τα σφίγγο-γλυκολιπίδια (SG) και τα φωσφολιπίδια (P) με πολύ χαμηλότερα ποσοστά. Αξίζει να σημειωθεί ότι όσο αυξάνει το ποσοστό των ουδέτερων λιπιδίων επί των ολικών λιπιδίων, τόσο μειώνονται τα ποσοστά των σφίγγο-γλυκολιπιδίων και των φωσφολιπιδίων. Το φαινόμενο αυτό παρατηρείται και στην προηγούμενη ζύμωση στο μίγμα γλυκόζης-ξυλόζης 50:50 (g/L).

Επιπλέον, με τη βοήθεια του αέριου χρωματογράφου προέκυψε η ανάλυση της σύστασης των κλασμάτων στα επιμέρους λιπαρά οξέα (Πίνακας III.8).

Πίνακας III.8. Σύσταση των κλασμάτων σε λιπαρά οξέα του μικροβιακού λίπους του *Thamnidium elegans* στην πρώιμη στάσιμη, τη στάσιμη και την παρατεταμένη στάσιμη φάση, σε μίγμα γλυκόζης-ξυλόζης 75:25 (g/L).

ΛΙΠΑΡΑ ΟΞΕΑ (%)									
Χρόνος (h)	Λίπος	C14:0	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3 (GLA)	(UI)*
189 h	TFA	0.7	21.0	1.1	6.1	47.3	14.0	9.8	0.96
	N	0.8	21.0	1.2	6.1	47.5	13.6	9.8	0.96
	S+G	0.0	21.9	0.0	7.3	47.7	14.2	8.9	0.94
	P	0.0	19.2	0.0	4.8	48.4	17.2	10.4	1.04
261 h	TFA	0.8	20.5	1.1	6.1	44.4	15.9	11.2	1.00
	N	0.9	20.5	1.2	5.8	43.7	15.9	12.0	1.01
	S+G	0.9	20.8	1.2	6.2	43.6	15.8	11.5	1.00
	P	0.0	21.9	0.0	0.0	42.6	22.2	13.3	1.14
501 h	TFA	0.7	20.0	1.0	7.1	50.6	12.5	8.2	0.93
	N	0.7	20.5	1.0	6.8	49.8	12.6	8.5	0.93
	S+G	0.0	21.0	0.0	8.8	50.3	12.5	7.3	0.90
	P	0.0	25.5	0.0	0.0	65.0	0.0	9.5	0.84

*Unsaturation Index (UI)=[% monoene + 2 * (% diene)]/100

TFA: Ολικά λιπίδια

N: Κλάσμα ουδέτερων λιπιδίων

S+G: Κλάσμα σφίγγο-γλυκολιπιδίων

P: Κλάσμα φωσφολιπιδίων

Συνθήκες καλλιέργειας: ασυνεχής ζύμωση σε ανακινούμενες κωνικές φιάλες (180 rpm) και θερμοκρασία T=28 °C, αρχική συγκέντρωση γλυκόζης ($S_{0\text{ GLU}}=75\text{ g/L}$) & αρχική συγκέντρωση ξυλόζης ($S_{0\text{ XYL}}=25\text{ g/L}$) και πηγές αζώτου 4 g/L yeast extract και 2 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, υπό αερόβιες συνθήκες.

Από τον πίνακα III.8. φαίνεται ότι η σύσταση των ολικών λιπιδίων είναι σε μεγάλο βαθμό ομοιάζουσα με αυτή των ουδέτερων λιπιδίων. Αυτό συμβαίνει σε όλες τις ζυμώσεις που προηγήθηκαν. Το δείγμα των λιπιδίων των 261 h εμφανίζει υψηλά ποσοστά γ-λινολενικού οξέος (C18:3) και στα τρία κλάσματα. Όσον αφορά το δείκτη ακορεστότητας (UI), είναι μικρότερος στα κλάσματα των ουδέτερων λιπιδίων και των σφίγγο-γλυκολιπιδίων, ενώ το κλάσμα των φωσφολιπιδίων είναι περισσότερο ακόρεστο. Ωστόσο, στο δείγμα των 501 h το κλάσμα των φωσφολιπιδίων φαίνεται να είναι περισσότερο κορεσμένο από το κλάσμα των ουδέτερων λιπιδίων και των σφίγγο-γλυκολιπιδίων εξαιτίας της μηδενικής περιεκτικότητας του σε λινελαϊκό οξύ (C18:2), καθώς και του αυξημένου ποσοστού του στεατικού οξέος (C16:0).

III.5. Καλλιέργεια του Ζυγομύκητα *Thamnidium elegans* σε μίγμα γλυκόζης και ξυλόζης με αναλογία 25:75 ($S_0_{\text{GLU}}=25$ g/L και $S_0_{\text{XYL}}=75$ g/L)

III.5.1. Κινητική της κυτταρικής αύξησης, της κατανάλωσης υποστρώματος και της συσσώρευσης λίπους.

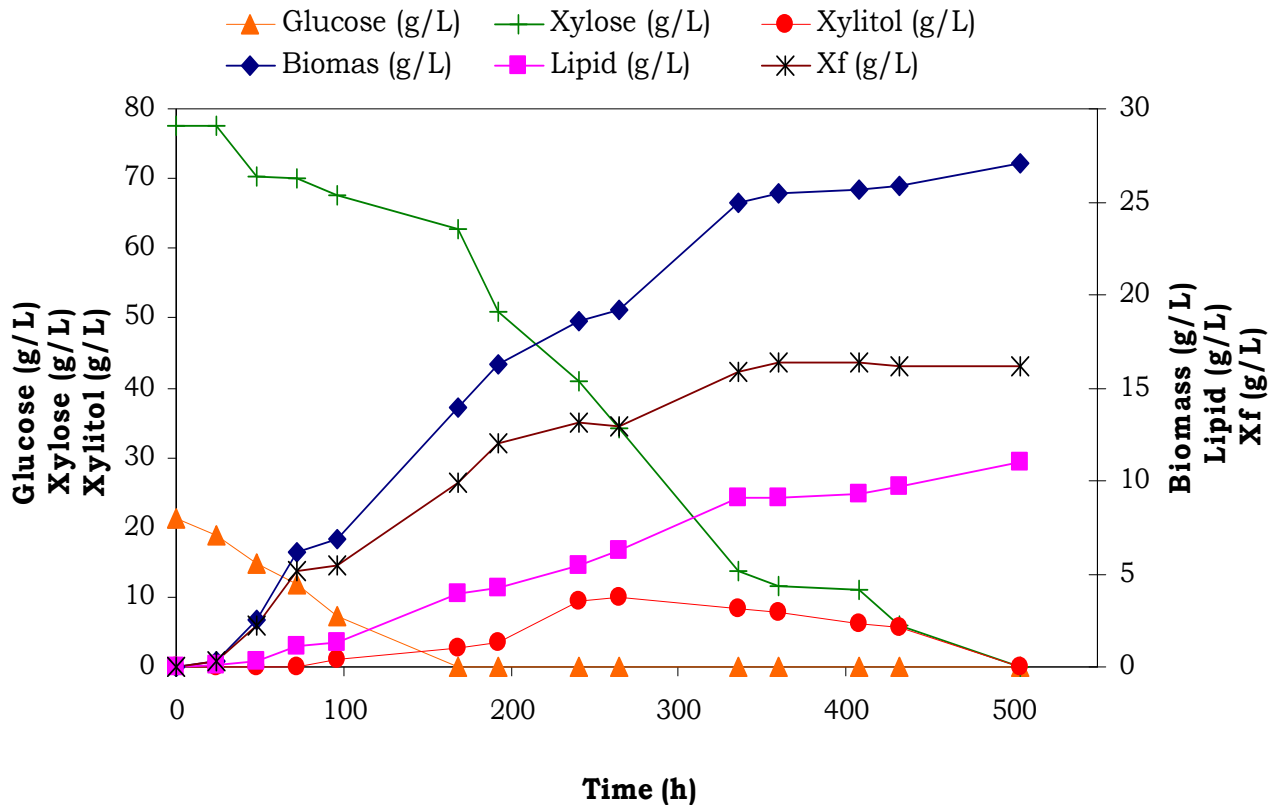
Η κινητική της παραγωγής βιομάζας, της κατανάλωσης υποστρώματος και της συσσώρευσης λίπους από το μύκητα *Thamnidium elegans* όταν αυτός αναπτύχθηκε σε θρεπτικό μέσο με δύο πηγές άνθρακα, τη γλυκόζη και τη ξυλόζη, σε αναλογία 25:75 (g/L) αντίστοιχα, παρουσιάζονται στο γράφημα III.5.1.α. Από το γράφημα αυτό φαίνεται ότι ο μικροοργανισμός εμφάνισε ικανοποιητική κυτταρική αύξηση με μέγιστη παραγωγή βιομάζας 27.1 g/L περί τις 504 h μετά τον εμβολιασμό. Η ποσότητα αυτή είναι άμεσα συγκρίσιμη με την παραγωγή βιομάζας των προηγούμενων ζυμώσεων και κυρίως των μιγμάτων γλυκόζης-ξυλόζης, όπου η κυτταρική αύξηση κυμαινόταν μεταξύ 27.4 και 29.5 g/L.

Η κατανάλωση του θρεπτικού μέσου ξεκίνησε λίγες ώρες μετά τον εμβολιασμό και τόσο η γλυκόζη ($S_0_{\text{GLU}}=25$ g/L) όσο και η ξυλόζη ($S_0_{\text{XYL}}=75$ g/L) καταναλώθηκαν πλήρως. Η μεν γλυκόζη εξαντλήθηκε μόλις 168 h μετά τον εμβολιασμό, η δε ξυλόζη καταναλώθηκε περί τις 504 h στο τέλος της ζύμωσης. Αξίζει να σημειωθεί ότι κατά την καλλιέργεια του μύκητα στο παρόν θρεπτικό μέσο παρήχθη ξυλιτόλη με μέγιστη ποσότητα $\text{Xylitol}_{\text{max}}=10.1$ g/L, η οποία αποτελεί τη δεύτερη μεγαλύτερη παραγόμενη ποσότητα ξυλιτόλης μετά από αυτή που σημειώθηκε κατά τη ζύμωση στο υπόστρωμα με μόνη πηγή άνθρακα τη ξυλόζη, με $\text{Xylitol}_{\text{max}}=31.3$ g/L. Μάλιστα, η παραγωγή ξυλιτόλης ξεκινά μόλις αρχίζει να καταναλώνεται πλήρως η γλυκόζη. Είναι λοιπόν φανερό, ότι όσο μεγαλύτερη είναι η συγκέντρωση της γλυκόζης σε ένα θρεπτικό μέσο με δυο πηγές άνθρακα (γλυκόζη και ξυλόζη), τόσο μικρότερη είναι η ποσότητα της ξυλιτόλης που παράγεται από το μικροοργανισμό.

Η βιομάζα ελεύθερη λίπους (X_f) εμφανίζει συνεχή αύξηση κατά την πρώιμη στάσιμη φάση του αυξητικού κύκλου του μύκητα, λόγω της σημαντικής παραγωγής βιομάζας και της σχετικά μικρής συσσώρευσης ενδοκυτταρικού λίπους. Στην παρατεταμένη στάσιμη φάση η παράμετρος X_f μένει σταθερή κυρίως λόγω της στάσιμης παραγωγής της βιομάζας και της αυξημένης παραγωγής μικροβιακού λίπους.

Η συσσώρευση ενδοκυτταρικού λίπους είναι αρκετά ικανοποιητική και η μέγιστη παραγωγή λίπους ήταν 11.0 g/L στο τέλος της ζύμωσης (504 h), ποσότητα που δε διαφέρει σημαντικά από αυτή που σημειώθηκε κατά τη καλλιέργεια του μύκητα στα προηγούμενα θρεπτικά υποστρώματα (8.9–15.0 g/L). Ο συντελεστής απόδοσης λίπους ήταν 0.41 g/g παραγόμενης βιομάζας και η μέγιστη ποσότητα παραγωγής γ -λινολενικού οξέος (GLA) ήταν αρκετά ικανοποιητική (925.5 mg/L).

25 GLU : 75 XYL



Γράφημα III.5.1.α. Κινητική της εξέλιξης της βιομάζας (◆), της κατανάλωσης υποστρώματος ξυλόζης (+), της κατανάλωσης υποστρώματος γλυκόζης (▲), της παραγωγής ξυλιτόλης (●), της παραγωγής ενδοκυτταρικού λίπους (■), και της ελεύθερης λίπους βιομάζας (*) συναρτήσει του χρόνου για το Ζυγομύκητα *Thamnidium elegans*, σε μίγμα γλυκόζης-ξυλόζης 25:75 (g/L).

Συνθήκες καλλιέργειας: ασυνεχής ζύμωση σε ανακινούμενες κωνικές φιάλες (180 rpm) και θερμοκρασία T=28 °C, αρχική συγκέντρωση γλυκόζης ($S_{0\text{ GLU}}=25\text{ g/L}$) & αρχική συγκέντρωση ξυλόζης ($S_{0\text{ XYL}}=75\text{ g/L}$) και πηγές αζώτου 4 g/L yeast extract και 2 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, υπό αερόβιες συνθήκες.

Η ανάλυση της σύστασης του ενδοκυτταρικού λίπους στα επιμέρους λιπαρά οξέα πραγματοποιήθηκε επιλεκτικά στην πλειοψηφία των δειγμάτων που παραλήφθησαν κατά τη διάρκεια της ζύμωσης με τη βοήθεια του αέριου χρωματογράφου. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης των λιπιδίων παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας III.9).

Πίνακας III.9. Σύσταση των λιπιδίων σε λιπαρά οξέα του μύκητα *Thamnidium elegans* σε μίγμα γλυκόζης-ξυλόζης 25:75 (g/L).

ΛΙΠΑΡΑ ΟΞΕΑ (%)

Χρόνος (h)	C14:0	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3 (GLA)	GLA (mg/L)	(UI)*
24	0.0	21.4	0.0	8.4	45.6	16.5	8.1	4.2	0.95
48	1.1	19.8	1.7	7.2	44.1	13.2	12.9	39.0	0.98
96	0.9	20.8	1.8	6.4	42.0	14.1	14.0	191.1	1.00
168	0.7	18.5	1.3	6.9	50.2	13.7	8.7	366.7	0.96
192	0.7	21.3	1.2	7.0	48.6	12.6	8.6	465.6	0.92
336	0.6	20.7	1.2	7.8	48.7	13.2	7.8	709.6	0.92
360	1.6	22.7	3.4	7.4	45.2	12.0	7.7	721.2	0.88
408	0.8	22.0	1.2	7.5	47.0	13.1	8.5	821.1	0.91
432	0.7	21.5	1.1	7.6	45.9	13.9	9.3	845.1	0.93
504	0.6	18.5	1.3	5.1	50.5	15.6	8.4	925.5	1.00

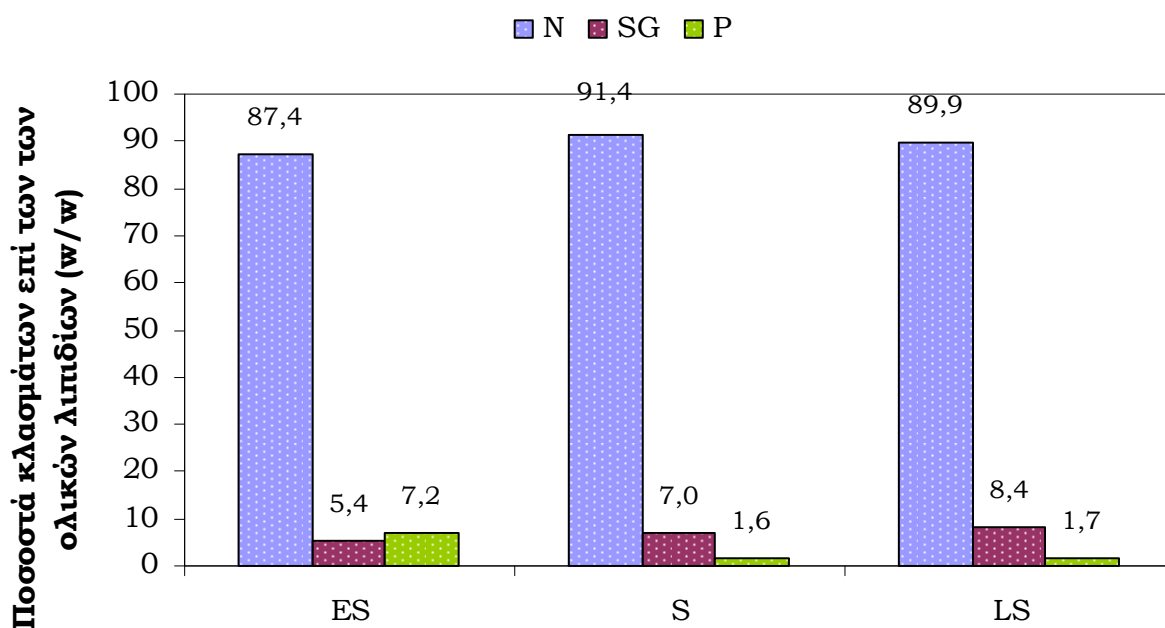
*Unsaturation Index (UI)=[% monoene + 2 * (% diene)]/100

Συνθήκες καλλιέργειας: ασυνεχής ζύμωση σε ανακινούμενες κωνικές φιάλες (180 rpm) και θερμοκρασία T=28 °C, αρχική συγκέντρωση γλυκόζης (S_{0 GLU}=25 g/L) & αρχική συγκέντρωση ξυλόζης (S_{0 XYL}=75 g/L) και πηγές αζώτου 4 g/L yeast extract και 2 g/L (NH₄)₂SO₄, υπό αερόβιες συνθήκες.

Η περιεκτικότητα των λιπιδίων του μύκητα *T. elegans* σε γ-λινολενικό οξύ (C18:3) στο παρών θρεπτικό μέσο φτάνει σε ποσοστό 14% και αποτελεί σημαντική ποσότητα που είναι άμεσα συγκρίσιμη με την περιεκτικότητα του λίπους σε GLA των προηγούμενων ζυμώσεων της παρούσας μελέτης. Από τον πίνακα III.9. φαίνεται ότι τις πρώτες ώρες μετά τον εμβολιασμό (24–96 h) σημειώνονται τα υψηλότερα ποσοστά του γ-λινολενικού οξέος και καθώς η ζύμωση εξελίσσεται η περιεκτικότητα του ενδοκυτταρικού λίπους σε GLA μειώνεται μέχρι να παρουσιάσει και πάλι μικρή άνοδο κατά την παρατεταμένη στάσιμη φάση του αυξητικού κύκλου (408–504 h). Είναι λοιπόν εμφανές ότι τις πρώτες ώρες της ζύμωσης, που η συσσώρευση του ενδοκυτταρικού λίπους είναι χαμηλή, η περιεκτικότητα του σε γ-λινολενικό οξύ είναι αρκετά αυξημένη και τα λιπίδια δρουν αποθησαυριστικά. Σχετικά με το δείκτη ακορεστότητας (UI), αυτός παρουσιάζει μικρές αυξομειώσεις ανάλογα με την αύξηση της περιεκτικότητας των λιπιδίων σε ακόρεστα λιπαρά οξέα [γ-λινολενικό οξύ (C18:3), λινελαϊκό οξύ (C18:2), ελαϊκό οξύ (C18:1)]. Επίσης, όταν μειώνεται η περιεκτικότητα των λιπιδίων σε γ-λινολενικό οξύ, αυξάνει η περιεκτικότητα σε ελαϊκό οξύ (C18:1) και αντίστροφα. Το φαινόμενο αυτό εμφανίζεται και στις προηγούμενες ζυμώσεις (ξυλόζη 100 g/L και στα μίγματα γλυκόζης-ξυλόζης). Αντίθετα, το λινελαϊκό οξύ (C18:2) φαίνεται να έχει παρόμοια κατανομή στα λιπίδια με αυτή του GLA.

Εκτός από την ανάλυση της σύστασης του ενδοκυτταρικού λίπους σε λιπαρά οξέα, πραγματοποιήθηκε η κλασμάτωση των λιπιδίων σε ουδέτερα λιπίδια (N), σφιγγο-γλυκολιπίδια (SG) και φωσφολιπίδια (P). Τα δείγματα που επιλέχθηκαν αντιπροσωπεύουν τις τρεις φάσεις του αυξητικού κύκλου του μύκητα *T. elegans*: την πρώιμη στάσιμη (168 h), τη στάσιμη (336 h) και την παρατεταμένη στάσιμη φάση (432 h).

ΚΛΑΣΜΑ 25 GLU : 75 XYL



Φάσεις αυξητικού κύκλου

Γράφημα III.5.1.β. Ποσοστιαία κατανομή των κλασμάτων (ουδέτερα, σφιγγο-γλυκολιπίδια και φωσφολιπίδια) επί του συνόλου των ολικών λιπιδίων (TFA) του Ζυγομύκητα *Thamnidium elegans* σε μίγμα γλυκόζης-ξυλόζης 25:75 (g/L) στην πρώιμη στάσιμη, τη στάσιμη και την παρατεταμένη στάσιμη φάση. Συνθήκες καλλιέργειας: ασυνεχής ζύμωση σε ανακινούμενες κωνικές φιάλες (180 rpm) και θερμοκρασία T=28 °C, αρχική συγκέντρωση γλυκόζης ($S_{0\text{ GLU}}=25\text{ g/L}$) & αρχική συγκέντρωση ξυλόζης ($S_{0\text{ XYL}}=75\text{ g/L}$) και πηγές αζώτου 4 g/L yeast extract και 2 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, υπό αερόβιες συνθήκες.

Στο γράφημα III.5.1.β. παρουσιάζεται η ανάλυση του ενδοκυτταρικού λίπους στα επιμέρους κλάσματα (N, SG, P) εκφραζόμενα σε ποσοστά. Είναι εμφανές ότι τα ουδέτερα λιπίδια (N) αποτελούν το μεγαλύτερο μέρος των ολικών λιπιδίων (TFA) με ποσοστά που φτάνουν το 90% περίπου και ακολουθούν τα σφιγγο-γλυκολιπίδια (SG) και τα φωσφολιπίδια (P) με πολύ χαμηλότερα ποσοστά. Επιπλέον, με τη βοήθεια του αέριου χρωματογράφου προέκυψε η ανάλυση της σύστασης των κλασμάτων στα επιμέρους λιπαρά οξέα (Πίνακας III.10).

Πίνακας III.10. Σύσταση των κλασμάτων σε λιπαρά οξέα του μικροβιακού λίπους του *Thamnidium elegans* στην πρώιμη στάσιμη, τη στάσιμη και την παρατεταμένη στάσιμη φάση, σε μίγμα γλυκόζης-ξυλόζης 25:75 (g/L)

ΛΙΠΑΡΑ ΟΞΕΑ (%)									
Χρόνος (h)	Λίπος	C14:0	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3 (GLA)	(UI)*
168 h	TFA	0.7	18.5	1.3	6.9	50.2	13.7	8.7	0.96
	N	0.7	19.9	1.4	7.5	47.4	13.8	9.3	0.95
	S+G	0.0	21.5	0.0	8.9	45.9	14.5	9.1	0.93
	P	0.0	16.8	0.0	3.6	44.3	22.4	12.9	1.15
336 h	TFA	0.6	20.7	1.2	7.8	48.7	13.2	7.8	0.92
	N	0.7	20.8	1.2	6.9	49.4	13.1	7.9	0.93
	S+G	0.0	23.0	0.0	8.5	48.3	13.0	7.2	0.89
	P	0.0	21.1	0.0	0.0	47.1	22.5	9.3	1.11
432 h	TFA	0.7	21.5	1.1	7.6	45.8	13.9	9.3	0.93
	N	0.8	21.5	1.2	7.4	46.3	13.7	9.2	0.93
	S+G	7.1	20.8	0.0	18.5	40.6	13.0	0.0	0.67
	P	0.0	19.7	0.0	4.6	53.4	16.7	5.6	0.98

*Unsaturation Index (UI)=[% monoene + 2 * (% diene)]/100

TFA: Ολικά λιπίδια

N: Κλάσμα ουδέτερων λιπιδίων

S+G: Κλάσμα σφίγγο-γλυκολιπιδίων

P: Κλάσμα φωσφολιπιδίων

Συνθήκες καλλιέργειας: ασυνεχής ζύμωση σε ανακινούμενες κωνικές φιάλες (180 rpm) και θερμοκρασία T=28 °C, αρχική συγκέντρωση γλυκόζης (S_{0 GLU}=25 g/L) & αρχική συγκέντρωση ξυλόζης (S_{0 XYL}=75 g/L) και πηγές αζώτου 4 g/L yeast extract και 2 g/L (NH₄)₂SO₄, υπό αερόβιες συνθήκες.

Από τον πίνακα III.10. φαίνεται ότι η σύσταση των ολικών λιπιδίων (TFA) είναι σε μεγάλο βαθμό ομοιάζουσα με αυτή των ουδέτερων λιπιδίων (N). Αυτό συμβαίνει σχεδόν σε όλες τις ζυμώσεις που προηγήθηκαν. Ο δείκτης ακορεστότητας (UI) είναι μεγαλύτερος στο κλάσμα των φωσφολιπιδίων και στα τρία δείγματα, εξαιτίας της υψηλής περιεκτικότητας τους σε γ-λινολενικό οξύ (C18:3) και σε λινελαϊκό οξύ (C18:2). Ωστόσο, στο δείγμα των 432 h, το κλάσμα των σφίγγο-γλυκολιπιδίων φαίνεται να είναι ιδιαίτερα κορεσμένο (UI=0.67). Το γεγονός αυτό οφείλεται στο μηδενικό ποσοστό του GLA και στην υψηλή περιεκτικότητα του κλάσματος σε μυριστικό οξύ (C14:0) και σε στεατικό οξύ (C18:0).

III.6. Καλλιέργεια του Ζυγομύκητα *Thamnidium elegans* σε γλυκόζη ($S_0=100$ g/L) σε βιοαντιδραστήρα

III.6.1. Κινητική της κυτταρικής αύξησης, της κατανάλωσης υποστρώματος και της συσσώρευσης λίπους.

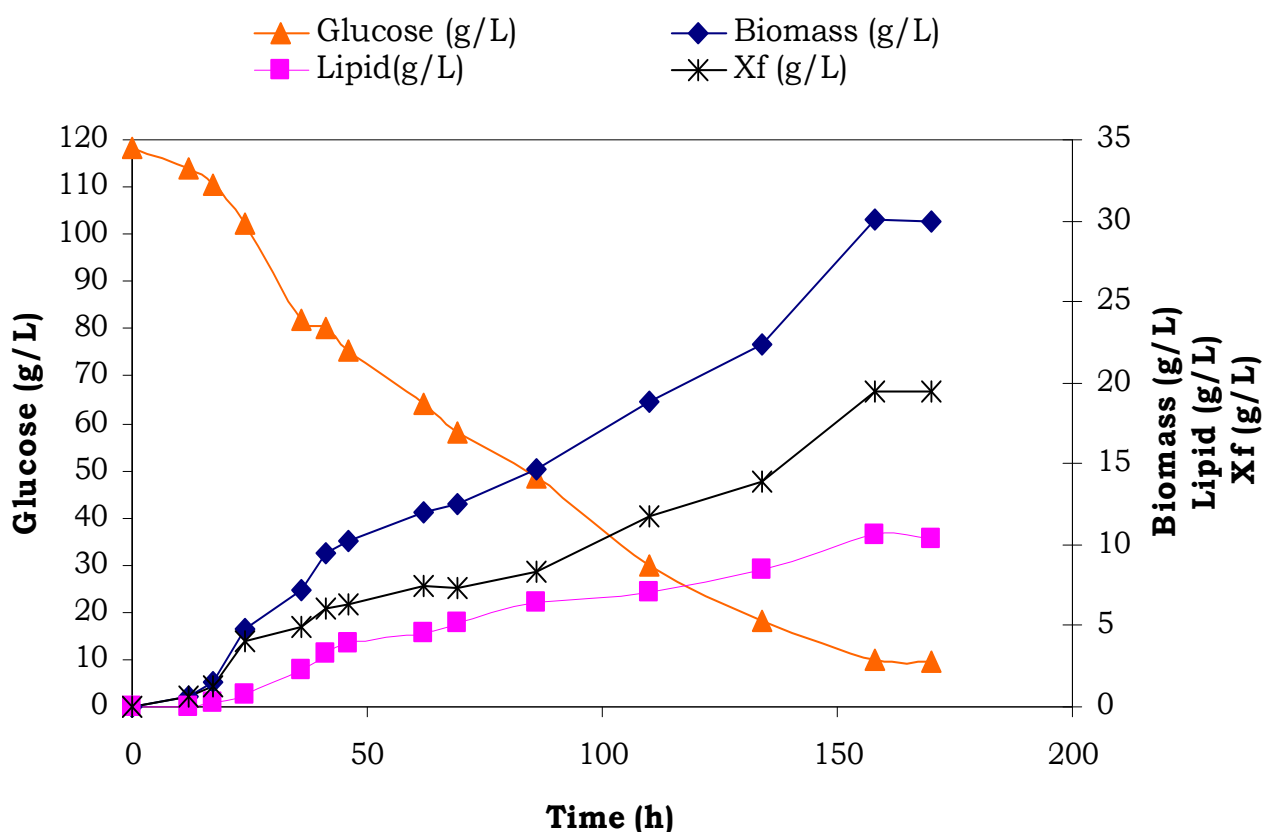
Με βάση τις κινητικές της κυτταρικής αύξησης και της συσσώρευσης ενδοκυτταρικού λίπους των ζυμώσεων που προηγήθηκαν, η καλλιέργεια του μύκητα σε θρεπτικό μέσο με μόνη πηγή άνθρακα τη γλυκόζη (100 g/L) εμφάνισε τα περισσότερο ικανοποιητικά αποτελέσματα όσον αφορά την παραγωγή βιομάζας (31.9 g/L) καθώς και τη συσσώρευση μικροβιακού λίπους ($L_{max}=15.0$ g/L). Παράλληλα, ο συντελεστής απόδοσης λίπους ήταν 47% (0.47 g λίπους g/g παραγόμενης βιομάζας) και η ποσότητα GLA που παρήχθη (1014.6 mg/L) ήταν η υψηλότερη που σημειώθηκε μεταξύ όλων των ζυμώσεων που έλαβαν χώρα. Εξαιτίας των αποτελεσμάτων αυτών επιλέχθηκε να γίνει εφαρμογή της ζύμωσης αυτής (γλυκόζη 100 g/L) σε βιοαντιδραστήρα χωρητικότητας 3 L και ενεργού όγκου 1.5 L.

Η κινητική της παραγωγής βιομάζας, της κατανάλωσης υποστρώματος και της συσσώρευσης λίπους από τον μύκητα *Thamnidium elegans* όταν αυτός αναπτύχθηκε σε βιοαντιδραστήρα σε θρεπτικό μέσο με μόνη πηγή άνθρακα τη γλυκόζη (100 g/L) παρουσιάζεται στο γράφημα III.6.1.α. Από το γράφημα αυτό φαίνεται ότι ο μικροοργανισμός εμφάνισε ιδιαίτερα ικανοποιητική κυτταρική αύξηση, η οποία έλαβε τη μέγιστη τιμή της 158 h μετά τον εμβολιασμό, φτάνοντας τα 30.1 g/L. Αξίζει να σημειωθεί ότι η παραγόμενη ποσότητα βιομάζας στο βιοαντιδραστήρα είναι της ίδιας τάξης με τη βιομάζα που παρήχθη από το μύκητα κατά την καλλιέργεια του στις φιάλες στο θρεπτικό υπόστρωμα με γλυκόζη 100 g/L, η οποία έφτασε τα 31.9 g/L περί τις 304 h. Είναι εμφανές ότι η κυτταρική ανάπτυξη του μικροοργανισμού στο βιοαντιδραστήρα είναι ταχύτερη σε σχέση με τη ζύμωση στις φιάλες με το αντίστοιχο θρεπτικό μέσο.

Η κατανάλωση της γλυκόζης ξεκινά λίγες ώρες μετά τον εμβολιασμό και μένει ακατανάλωτο ένα μικρό ποσοστό της τάξεως του 8% στο τέλος της ζύμωσης (170 h). Σε σύγκριση με την αντίστοιχη καλλιέργεια στις φιάλες, όπου η γλυκόζη εξαντλείται 304 μετά τον εμβολιασμό, η κατανάλωση της πηγής άνθρακα προχωρά με γρηγορότερο ρυθμό στον βιοαντιδραστήρα.

Η βιομάζα ελεύθερη λίπους (X_f) εμφανίζεται να αυξάνει συνεχώς κυρίως λόγω της αυξημένης παραγωγής βιομάζας και της συγκριτικά χαμηλότερης συσσώρευσης ενδοκυτταρικού λίπους.

BIO GLU 100



Γράφημα III.6.1.α. Κινητική της εξέλιξης της βιομάζας (◆), της κατανάλωσης υποστρώματος (▲), της παραγωγής ενδοκυτταρικού λίπους (■), και της ελεύθερης λίπους βιομάζας (*) συναρτήσει του χρόνου για το Ζυγομύκητα *Thamnidium elegans*, σε βιοαντιδραστήρα με γλυκόζη ως μόνη πηγή άνθρακα.

Συνθήκες καλλιέργειας: ζύμωση σε βιοαντιδραστήρα ενεργού όγκου 1.5 L (500-550 rpm), θερμοκρασία $T=28\text{ }^{\circ}\text{C}$, pH 6.0, αρχική συγκέντρωση γλυκόζης ($S_{0\text{ GLU}}=100\text{ g/L}$) και πηγές αζώτου 4 g/L yeast extract και 2 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, υπό αερόβιες συνθήκες (0.5 vvm).

Όσον αφορά την παραγωγή ενδοκυτταρικού λίπους από τον Ζυγομύκητα *T. elegans* στο βιοαντιδραστήρα, η μέγιστη τιμή της φτάνει τα 10.6 g/L περί τις 158 h. Ο συντελεστής απόδοσης λίπους ήταν 0.35 g/g παραγόμενης βιομάζας. Η παραγόμενη ποσότητα μικροβιακού λίπους είναι σαφώς μειωμένη σε σχέση με την ποσότητα που παρήχθη στην αντίστοιχη καλλιέργεια στις φιάλες ($L_{\text{max}}=15.0\text{ g/L}$) με συντελεστή απόδοσης λίπους 47%.

Όπως και σε όλες τις προηγούμενες καλλιέργειες του μύκητα στα διάφορα υποστρώματα, έτσι και εδώ πραγματοποιήθηκε η ανάλυση της σύστασης του ενδοκυτταρικού λίπους στα επιμέρους λιπαρά οξέα στην πλειοψηφία των δειγμάτων που παρελήφθησαν κατά τη διάρκεια της ζύμωσης με τη βοήθεια του αερίου χρωματογράφου. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης των λιπιδίων παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας III.11).

Πίνακας III.11. Σύσταση των λιπιδίων σε λιπαρά οξέα του μύκητα *Thamnidium elegans* σε βιοαντιδραστήρα σε υπόστρωμα γλυκόζης 100 g/L.

ΛΙΠΑΡΑ ΟΞΕΑ (%)

Χρόνος (h)	C14:0	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3 (GLA)	GLA (mg/L)	(UI)*
24	0.5	16.2	0.8	7.0	45.8	17.6	12.1	86.7	1.06
36	0.5	16.0	0.8	8.2	56.1	11.0	7.4	166.5	0.94
41	0.5	16.0	0.8	8.1	58.6	9.5	6.5	216.7	0.91
69	0.7	21.8	1.3	7.9	58.3	7.3	2.7	141.8	0.80
86	0.7	20.3	1.3	7.2	57.6	9.1	3.8	241.9	0.86
110	0.5	20.6	1.1	6.9	56.6	9.6	4.7	276.9	0.86
158	0.6	17.7	1.2	5.5	55.2	12.8	7.0	742.0	0.96

*Unsaturation Index (UI)=[% monoene + 2 * (% diene)]/100

Συνθήκες καλλιέργειας: ζύμωση σε βιοαντιδραστήρα ενεργού όγκου 1.5 L (500-550 rpm), θερμοκρασία T=28 °C, pH 6.0, αρχική συγκέντρωση γλυκόζης ($S_{0\text{ GLU}}=100\text{ g/L}$) και πηγές αζώτου 4 g/L yeast extract και 2 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, υπό αερόβιες συνθήκες (0.5 vvm).

Κατά την καλλιέργεια του μύκητα στο βιοαντιδραστήρα με γλυκόζη ως μόνη πηγή άνθρακα, η περιεκτικότητα του μικροβιακού λίπους σε γ -λινολενικό οξύ (C18:3) φτάνει στο 12.1%. Το ποσοστό αυτό είναι αρκετά ικανοποιητικό και ομοιάζει με αυτό των υπόλοιπων ζυμώσεων βυθού που προηγήθηκαν (10–16%). Παράλληλα, η μέγιστη παραγόμενη ποσότητα GLA (mg/L παραγόμενου λίπους) είναι ικανοποιητική (742.0 mg/L). Από τον πίνακα III.11. φαίνεται ότι τις πρώτες ώρες μετά τον εμβολιασμό (24 h) σημειώνονται τα υψηλότερα ποσοστά του γ -λινολενικού οξέος και καθώς η ζύμωση εξελίσσεται η περιεκτικότητα του ενδοκυτταρικού λίπους σε GLA μειώνεται μέχρι να παρουσιάσει και πάλι μικρή άνοδο στο τέλος της ζύμωσης περί τις 158 h (παρατεταμένη στάσιμη φάση του αυξητικού κύκλου). Το φαινόμενο αυτό παρατηρείται σχεδόν σε όλες τις ζυμώσεις που πραγματοποιήθηκαν, τόσο στα θρεπτικά υπόστρωματα με μόνη πηγή άνθρακα τη γλυκόζη ή τη ξυλόζη, όσο και στα μίγματα αυτών. Είναι εμφανές λοιπόν, ότι τις πρώτες ώρες μετά τον εμβολιασμό ο μικροοργανισμός παράγει μικρές ποσότητες ενδοκυτταρικού λίπους το οποίο έχει μεγάλη περιεκτικότητα σε γ -λινολενικό οξύ (C18:3).

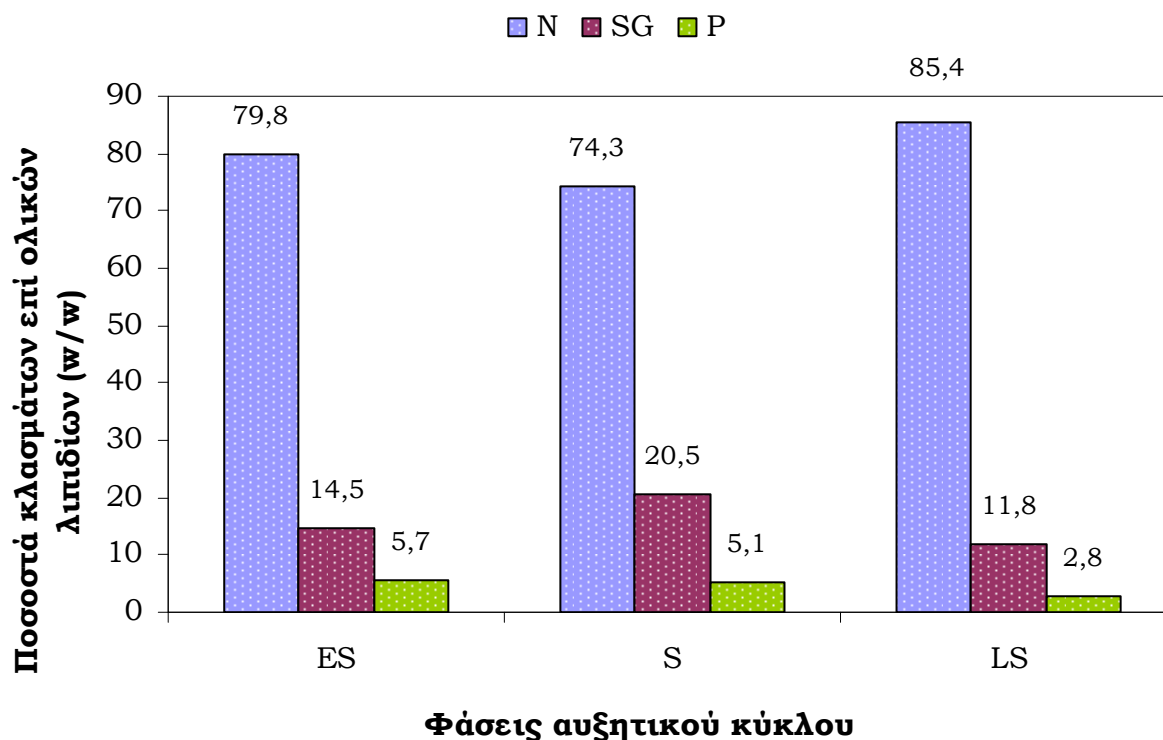
Ο δείκτης ακορεστότητας (UI) αυξάνεται όταν το μικροβιακό λίπος είναι πλούσιο σε ακόρεστα λιπαρά οξέα [γ -λινολενικό οξύ (C18:3), λιγνελικό οξύ (C18:2), ελαϊκό οξύ (C18:1)] και κυρίως κατά την πρώιμη στάσιμη φάση του αυξητικού κύκλου (24–41 h).

Αξίζει να σημειωθεί ότι όταν η περιεκτικότητα των λιπιδίων σε γ -λινολενικό οξύ (C18:3) είναι αυξημένη, η περιεκτικότητα σε ελαϊκό οξύ (C18:1) μειώνεται και αντίστροφα. Παράλληλα, το λιγνελικό οξύ (C18:2) εμφανίζει παρόμοια κατανομή με το GLA στη σύσταση των λιπιδίων, ενώ

το παλμιτικό οξύ (C16:0) και το στεατικό οξύ (C18:0) εμφανίζουν παρόμοια κατανομή στη σύσταση των λιπιδίων κατά την εξέλιξη της ζύμωσης.

Εκτός από την ανάλυση της σύστασης του ενδοκυτταρικού λίπους σε λιπαρά οξέα, πραγματοποιήθηκε η κλασμάτωση των λιπιδίων σε ουδέτερα λιπίδια (N), σφιγγο-γλυκολιπίδια (SG) και φωσφολιπίδια (P). Τα δείγματα που επιλέχθηκαν αντιπροσωπεύουν τις τρεις φάσεις του αυξητικού κύκλου του μύκητα *T. elegans*: την πρώιμη στάσιμη (41 h), τη στάσιμη (110 h) και την παρατεταμένη στάσιμη φάση (158 h).

ΚΛΑΣΜΑ ΒΙΟ GLU 100



Γράφημα III.6.1.β. Ποσοστιαία κατανομή των κλασμάτων (ουδέτερα, σφιγγο-γλυκολιπίδια και φωσφολιπίδια) επί του συνόλου των ολικών λιπιδίων (TFA) του Ζυγομύκητα *Thamnidium elegans* σε βιοαντιδραστήρα με γλυκόζη ως μόνη πηγή άνθρακα στην πρώιμη στάσιμη, τη στάσιμη και την παρατεταμένη στάσιμη φάση.

Συνθήκες καλλιέργειας: ζύμωση σε βιοαντιδραστήρα ενεργού όγκου 1.5 L (500-550 rpm), θερμοκρασία T=28 °C, pH 6.0, αρχική συγκέντρωση γλυκόζης ($S_0_{GLU}=100$ g/L) και πηγές αζώτου 4 g/L yeast extract και 2 g/L $(NH_4)_2SO_4$, υπό αερόβιες συνθήκες (0.5 vvm).

Το παραπάνω γράφημα (Γράφημα III.6.1.β) απεικονίζει την ανάλυση του ενδοκυτταρικού λίπους στα επιμέρους κλάσματα (N, SG, P) εκφραζόμενα σε ποσοστά. Είναι εμφανές ότι τα ουδέτερα λιπίδια (N) αποτελούν το μεγαλύτερο ποσοστό των ολικών λιπιδίων (TFA) και ακολουθούν τα σφιγγο-γλυκολιπίδια (SG) και τα φωσφολιπίδια (P) με χαμηλότερα ποσοστά. Αξίζει να σημειωθεί ότι κατά την καλλιέργεια του μύκητα στο βιοαντιδραστήρα η ποσοστιαία κατανομή των ουδέτερων λιπιδίων επί των ολικών λιπιδίων είναι χαμηλότερη (75–85%) σε σχέση με αυτή που σημειώθηκε στις ζυμώσεις που προηγήθηκαν. Έτσι, τα σφιγγο-γλυκολιπίδια και τα φωσφολιπίδια φαίνεται να εμφανίζουν αυξημένα ποσοστά (12–20%) σε σύγκριση με αυτά των προηγούμενων ζυμώσεων (1.6–12%).

Επιπλέον, μετά τη μεθυλίωση των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε η κλασμάτωση τους και με τη βοήθεια του αέριου χρωματογράφου προέκυψε η ανάλυση της σύστασης των κλασμάτων στα επιμέρους λιπαρά οξέα. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης αυτής παρουσιάζονται στον πίνακα που ακολουθεί (Πίνακας III.12). Από τον πίνακα III.12. φαίνεται ότι η σύσταση των ολικών λιπιδίων (TFA) είναι σε μεγάλο βαθμό ομοιάζουσα με αυτή των ουδέτερων λιπιδίων (N). Ο δείκτης ακορεστότητας (UI) είναι μικρότερος στο κλάσμα των ουδέτερων λιπιδίων (N) και στο κλάσμα των σφιγγο-γλυκολιπιδίων (SG), ενώ το κλάσμα των φωσφολιπιδίων (P) εμφανίζει μεγαλύτερη ακορεστότητα λόγω της υψηλής περιεκτικότητας του μικροβιακού λίπους σε γ -λινολενικό οξύ (C18:3), λινελαϊκό οξύ (C18:2) και ελαϊκό οξύ (C18:1). Το φαινόμενο αυτό παρατηρείται στο κλάσμα των 41 h και των 110 h. Ωστόσο, στο δείγμα των λιπιδίων των 158 h το κλάσμα των φωσφολιπιδίων εμφανίζει ακορεστότητα ίδια με την αντίστοιχη των ουδέτερων λιπιδίων και των ολικών λιπιδίων.

Πίνακας III.12. Σύσταση των κλασμάτων σε λιπαρά οξέα του μικροβιακού λίπους του *Thamnidium elegans* στην πρώιμη στάσιμη, τη στάσιμη και την παρατεταμένη στάσιμη φάση, σε βιοαντιδραστήρα σε υπόστρωμα γλυκόζης 100 g/L.

ΛΙΠΑΡΑ ΟΞΕΑ (%)									
Χρόνος (h)	Λίπος	C14:0	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3 (GLA)	(UI)*
41 h	TFA	0.5	16.0	0.8	8.1	58.6	9.5	6.5	0.91
	N	0.5	16.9	0.8	8.1	57.4	9.3	6.9	0.91
	S+G	0.0	17.1	0.0	8.7	58.4	9.5	6.3	0.90
	P	0.0	12.4	0.0	4.1	59.5	13.8	10.3	1.08
110 h	TFA	0.5	20.6	1.1	6.9	56.6	9.6	4.7	0.86
	N	0.0	20.8	1.2	6.9	57.8	9.4	3.9	0.86
	S+G	0.0	25.8	0.0	8.7	57.3	8.2	0.0	0.74
	P	0.0	28.1	0.0	0.0	54.2	12.5	5.2	0.90
158 h	TFA	0.6	17.7	1.2	5.5	55.2	12.8	7.0	0.96
	N	0.5	17.8	1.2	5.8	56.5	12.4	5.7	0.94
	S+G	0.0	23.3	0.0	12.4	50.9	9.7	3.8	0.78
	P	0.0	20.6	0.0	3.2	57.3	10.1	8.8	0.95

*Unsaturation Index (UI)=[% monoene + 2 * (% diene)]/100

TFA: Ολικά λιπίδια

N: Κλάσμα ουδέτερων λιπιδίων

S+G: Κλάσμα σφίγγο-γλυκολιπιδίων

P: Κλάσμα φωσφολιπιδίων

Συνθήκες καλλιέργειας: ζύμωση σε βιοαντιδραστήρα ενεργού όγκου 1.5 L (500-550 rpm), θερμοκρασία T=28 °C, pH 6.0, αρχική συγκέντρωση γλυκόζης ($S_{0\text{ GLU}}$ =100 g/L) και πηγές αζώτου 4 g/L yeast extract και 2 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, υπό αερόβιες συνθήκες (0.5 lpm).

IV. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η παραγωγή μικροβιακού λίπους με υψηλή περιεκτικότητα σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFAs) αποτελεί τεχνολογία αιχμής για την επιστήμη της βιοτεχνολογίας. Ως γνωστόν, τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFAs) κατέχουν ένα σημαντικό βιοχημικό ρόλο στη ρύθμιση των λειτουργιών της κυτταρικής μεμβράνης, αλλά και στην παραγωγή διαφόρων μεταβολιτών οι οποίοι ρυθμίζουν ποικίλες ζωτικές βιολογικές διεργασίες. Εξάλλου, η παρουσία των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (PUFAs) είναι απαραίτητη στη διατροφή του ανθρώπου προκειμένου να γίνουν σωστά όλες οι οργανικές λειτουργίες και να αποφευχθούν τυχόν ελλείψεις και παθήσεις στον ανθρώπινο οργανισμό (Certik and Shimizu, 1999). Επομένως, στόχος της παρούσας μελέτης ήταν η διερεύνηση της βιοφυσιολογικής συμπεριφοράς του Ζυγομύκητα *Thamnidium elegans* κατά την καλλιέργεια του σε σακχαρούχα ανανεώσιμα υποστρώματα. Όπως είναι ήδη γνωστό από πολλές βιβλιογραφικές μελέτες, οι μύκητες της κλάσης των Ζυγομυκήτων κατά την αύξηση τους σε σακχαρούχα ανανεώσιμα υλικά (προϊόντα υδρόλυσης λιγνοκυτταρινούχων υπολειμμάτων), δύνανται να συσσωρεύουν σημαντικές ποσότητες ενδοκυτταρικού λίπους, το οποίο περιέχει σε ποικίλα ποσά το υψηλής διατροφικής και φαρμακευτικής αξίας γ -λινολενικό οξύ (GLA, C18:3, ω -6) (Certik et al., 1988; Fakas et al., 2008b; Chen and Chang, 1996; Kavadia et al., 2001). Ως εκ τούτου, κεντρικό άξονα στην παρούσα εργασία αποτέλεσε η μελέτη της βιοχημικής συμπεριφοράς του Ζυγομύκητα *T. elegans* κατά την αύξηση του σε ζυμώσεις βυθού με πηγές άνθρακα τη γλυκόζη, τη ξυλόζη και μίγματα αυτών, καθώς επίσης και σε βιοαντιδραστήρα με μόνη πηγή άνθρακα τη γλυκόζη.

Ο μύκητας *T. elegans* κατά την καλλιέργεια του σε θρεπτικό μέσο με μόνη πηγή άνθρακα τη γλυκόζη (100 g/L) παρουσίασε τα πιο ελπιδοφόρα αποτελέσματα σε σύγκριση με τις υπόλοιπες ζυμώσεις που πραγματοποιήθηκαν. Η μέγιστη παραγωγή βιομάζας έφτασε τα 31.9 g/L με αντίστοιχη παραγωγή λίπους 15.0 g/L, με συντελεστή απόδοσης λίπους ($Y_{L/X}$) 47%. Επίσης, στην παρούσα ζύμωση σημειώθηκε η μέγιστη παραγωγή γ -λινολενικού οξέος (GLA) μεταξύ όλων των ζυμώσεων που έλαβαν χώρα σε αυτήν τη μελέτη, ήτοι 1014.6 mg/L. Με βάση τη βιβλιογραφία, η παραγόμενη αυτή ποσότητα GLA είναι ιδιαίτερος σημαντική και άμεσα συγκρίσιμη με τα αποτελέσματα από το στέλεχος *Chunninghamella echinulata* CCRC 31840, το οποίο μετά από αριστοποίηση των συνθηκών παρήγαγε 964 mg/L GLA (Chen and Chang, 1996). Παράλληλα, το στέλεχος *Cunninghamella echinulata* ATHUM 4411 κατά την καλλιέργεια του σε ξυλόζη (με υψηλό λόγο C/N) παρήγαγε 1119 mg/L GLA (Fakas et al., 2008b), ποσότητα ελαφρώς υψηλότερη από αυτή που σημειώθηκε στην παρούσα ερευνητική μελέτη, ενώ ο ίδιος μύκητας κατά την καλλιέργεια του σε υδρολυμένα παραπροϊόντα τομάτας παρήγαγε 800 mg/L GLA (Fakas et al., 2008a). Ωστόσο, υπάρχουν αρκετές βιβλιογραφικές αναφορές για την παραγωγή γ -λινολενικού

οξέος από διάφορα στελέχη μυκήτων, όπως ο *Rhizopus arrhizus* (400 mg/L-Kristofikova et al., 1991), ο *M. ramanniana* (437 mg/L-Hansson and Dostalek, 1988) και ο *Mucor circinelloides* v. Tieghem IPD 155 (690 mg/L-Kennedy et al., 1993). Στον ακόλουθο πίνακα IV.1. εμφανίζονται συγκριτικά αποτελέσματα παραγωγής μικροβιακού λίπους και γ -λινολενικού οξέος (GLA) από διάφορους ελαιογόνους Ζυγομύκητες, στον οποίο περιλαμβάνονται και τα σημαντικότερα αποτελέσματα της παρούσας ερευνητικής εργασίας.

Πίνακας IV.1. Παραγωγή μικροβιακού λίπους και γ -λινολενικού οξέος (GLA) από ελαιογόνους μύκητες κατά την καλλιέργεια τους σε διάφορα υποστρώματα.

Μύκητας	Είδος ζύμωσης	Υπόστρωμα	L (g/L)	$Y_{L/X}$ (g/g)	GLA (mg/L)	Αναφορά
<i>C. echinulata</i>	Shake flasks	Starch	8.0	0.27	964	Chen and Chang, 1996
<i>M. mucedo</i>	Shake flasks	Glucose/oil	12.0	0.62	379	Certik et al., 1997
<i>M. ramanniana</i>	Bioreactor	Glucose	31.3	0.50	5501	Hiruta et al., 1997
<i>M. isabellina</i>	Shake flasks	Glucose	18.1	0.50	801	Papanikolaou et al., 2004a
<i>C. echinulata</i>	Shake flasks	Xylose	6.7	0.54	1119	Fakas et al., 2008b
<i>C. echinulata</i>	Shake flasks	Starch	11.5	0.30	1349	Chen and Liu, 1997
<i>C. echinulata</i>	Shake flasks	Tomato waste	7.0	0.40	800	Fakas et al., 2008a
<i>C. echinulata</i>	Shake flasks	Starch	3.8	0.28	540	Papanikolaou et al., 2007
<i>T. elegans</i>	Shake flasks	Glucose	14.0	0.45	1015	Παρούσα μελέτη
<i>T. elegans</i>	Shake flasks	Glucose/Xylose	10.6	0.40	980	Παρούσα μελέτη
<i>T. elegans</i>	Bioreactor	Glucose	10.6	0.35	742	Παρούσα μελέτη

Αξίζει να τονιστεί, ότι αρκετοί μύκητες της κλάσης των Ζυγομυκήτων που δύνανται να συσσωρεύουν μεγάλες ποσότητες ενδοκυτταρικού λίπους, εμφανίζουν την τάση να παράγουν μικρές ποσότητες γ -λινολενικού οξέος (GLA) και αντίστροφα (Certik and Shimizu, 1999; Kavadia et al., 2001). Το γεγονός αυτό έγκειται στο ότι η παραγωγή του GLA ευνοείται κατά την εκθετική φάση του αυξητικού κύκλου, ενώ η συσσώρευση του ενδοκυτταρικού λίπους λαμβάνει χώρα κατά κανόνα κατά τη διάρκεια της στάσιμης φάσης, ως δευτερογενής μεταβολίτης (προϊόν μη συνδεδεμένο με την κυτταρική αύξηση). Πιθανότατα, οι μικροοργανισμοί αυτοί τείνουν να παράγουν μεγάλες ποσότητες ενδοκυτταρικού λίπους, προκειμένου να παρέχουν την αναγκαία ποσότητα γ -λινολενικού οξέος για την ομαλή λειτουργία της κυτταρικής τους μεμβράνης (Kavadia et al., 2001). Το φαινόμενο αυτό παρατηρείται και στην παρούσα μελέτη σε όλες τις ζυμώσεις βυθού και στο βιοαντιδραστήρα.

Η αύξηση του μύκητα *T. elegans* σε θρεπτικό υπόστρωμα με μόνη πηγή άνθρακα τη ξυλόζη (100 g/L) εμφάνισε ικανοποιητικά αποτελέσματα όσον αφορά την παραγωγή βιομάζας (21.4 g/L)

και τη συσσώρευση ενδοκυτταρικού λίπους (8.9 g/L). Επιπλέον, η μέγιστη ποσότητα παραγωγής GLA ήταν 534.4 mg/L. Αξίζει να σημειωθεί ότι η μελέτη αυτή αποτελεί την πρώτη στη διεθνή βιβλιογραφία που ασχολείται με τη χρήση της ξυλόζης ως υπόστρωμα, είτε ως μόνη πηγή άνθρακα είτε ως μίγμα, για την καλλιέργεια του Ζυγομύκητα *T. elegans*. Ωστόσο, οι Fakas et al. (2008b) χρησιμοποίησαν τη ξυλόζη (μόνη πηγή άνθρακα) ως θρεπτικό μέσο για την ανάπτυξη των μυκήτων *Cunninghamella echinulata* ATHUM 4411 και *Mortierella isabellina* ATHUM 2935. Και οι δύο μύκητες αναπτύχθηκαν αρκετά ικανοποιητικά στη ξυλόζη και ο συντελεστής απόδοσης του λίπους ($Y_{L/X}$) κυμαινόταν μεταξύ 55–65%. Μάλιστα, το στέλεχος *Cunninghamella echinulata* ATHUM 4411 παρήγαγε 1119 mg/L GLA, ενώ η μέγιστη παραγόμενη ποσότητα γ -λινολενικού οξέος από το στέλεχος *M. isabellina* ATHUM 2935 ήταν μόλις 250 mg/L. Είναι λοιπόν εμφανές, ότι ο μύκητας *T. elegans* δεν εμφάνισε το ίδιο ικανοποιητική απόκριση κατά την καλλιέργεια του στη ξυλόζη σε σχέση με το στέλεχος *C. echinulata* ATHUM 4411, ενώ παρήγαγε μεγαλύτερη ποσότητα GLA από το μύκητα *M. isabellina* ATHUM 2935. Σε ό,τι αφορά την κατανάλωση της ξυλόζης ως πηγή άνθρακα στην παρούσα μελέτη, αυτή ξεκινά λίγες ώρες μετά τον εμβολιασμό, ενώ η πηγή άνθρακα εξαντλείται περί τις 430 h. Αξιοσημείωτο γεγονός αποτελεί η παραγωγή ξυλιτόλης κατά την εξέλιξη της ζύμωσης στο εν λόγω υπόστρωμα, η οποία επιτελείται παράλληλα με την κατανάλωση της ξυλόζης. Η ξυλιτόλη είναι ένα αλκοολικό σάκχαρο με 5 άτομα C και με χημικό τύπο $C_5H_{12}O_5$. Απαντάται ευρέως στη φύση σε πολλά φρούτα και λαχανικά, ενώ λόγω της χαμηλής θερμιδικής αξίας της χρησιμοποιείται ως υποκατάστατο της ζάχαρης. Η μικροβιακή παραγωγή ξυλιτόλης αποτελεί μια εναλλακτική μέθοδο αξιοποίησης υποστρωμάτων που έχουν ως κύρια πηγή άνθρακα τη ξυλόζη. Πολλές βιβλιογραφικές μελέτες επικεντρώνονται στην παραγωγή ξυλιτόλης κυρίως από ζύμες, ανήκουσες κυρίως στο γένος *Candida*. Συγκεκριμένα, η ζύμη *Candida* sp. 559-9 βρέθηκε ότι μπορεί να παράγει 30–210 g/L ξυλιτόλης κατά την καλλιέργεια της σε υπόστρωμα ξυλόζης με συγκεντρώσεις από 50–300 g/L (Ikeuchi et al., 1999). Αναφορικά με την παραγωγή ξυλιτόλης από στελέχη μυκήτων, ο μύκητας *Petromyces albertensis* συσσώρευσε 39.8 g/L ξυλιτόλης κατά την καλλιέργεια του για 10 ημέρες σε υπόστρωμα ξυλόζης με συγκέντρωση 100 g/L (Winkelhausen, 1998). Η βιοχημική αυτή απόκριση φαίνεται να επιβεβαιώνεται και στην παρούσα μελέτη, καθώς κατά την καλλιέργεια του μύκητα *T. elegans* στη ξυλόζη (100 g/L), παρήχθησαν 31.3 g/L ξυλιτόλης σε χρονικό διάστημα 240 h (10 ημέρες), ποσότητα που είναι άμεσα συγκρίσιμη με αυτή της βιβλιογραφικής αναφοράς. Εξάλλου η μεταβολική διεργασία που πραγματοποιείται κατά τη μετατροπή της D-ξυλόζης σε D-ξυλουλόζη, με ενδιάμεσο προϊόν τη ξυλιτόλη, είναι η ίδια στους μύκητες και τις ζύμες (Winkelhausen, 1998).

Κατά την αύξηση του μύκητα *T. elegans* στη ξυλόζη, μετά τη μέγιστη παραγωγής ξυλιτόλης και την εξάντληση της πηγής άνθρακα, παρατηρήθηκε ανακατανάλωση της παραχθείσας ξυλιτόλης προς παραγωγής βιομάζας ελεύθερης λίπους (X_f). Ωστόσο, σύμφωνα με τους Ikeuchi et al. (1999),

η ανακατανάλωση της ξυλιτόλης μπορεί να οφείλεται και στη μετατροπή της ξυλιτόλης σε ξυλουλόζη μέσω της αφυδρογονάσης της ξυλιτόλης. Σημειώνεται ότι αναφορικά με τα μίγματα γλυκόζης-ξυλόζης ως υποστρώματα ανάπτυξης διαφόρων στελεχών ζυμών, έχει παρατηρηθεί ότι όταν η συγκέντρωση της γλυκόζης στο υπόστρωμα είναι μεγαλύτερη από αυτή της ξυλόζης, η κυτταρική ανάπτυξη των μικροοργανισμών είναι ταχύτερη, ενώ η συσσώρευση της ξυλιτόλης είναι μικρότερη. Πιθανόν η παρουσία της γλυκόζης στο υπόστρωμα να λειτουργεί παρεμποδιστικά στο μεταβολικό μονοπάτι παραγωγής της ξυλιτόλης. Το φαινόμενο αυτό επιβεβαιώνεται και στην παρούσα ερευνητική μελέτη, καθώς στο μίγμα γλυκόζης-ξυλόζης 50:50 (g/L) η μέγιστη ποσότητα ξυλιτόλης που παράγεται είναι μόλις 3.4 g/L, ενώ στο μίγμα γλυκόζης-ξυλόζης 75:25 (g/L), η μέγιστη παραγόμενη ποσότητα ξυλιτόλης μειώθηκε στα 1.4 g/L. Αντίθετα, στο μίγμα γλυκόζης-ξυλόζης 25:75 (g/L), η μέγιστη παραγόμενη ποσότητα ξυλιτόλης έφτασε τα 10.1 g/L. Παρατηρούμε λοιπόν, ότι ο Ζυγομύκητας *T. elegans* είναι ικανός να συσσωρεύει ξυλιτόλη όταν καλλιεργείται σε υποστρώματα τα οποία περιέχουν ξυλόζη, είτε ως μόνη πηγή άνθρακα ή ως μίγματα, σε ποσότητες που είναι ικανοποιητικές όχι όμως της τάξεως που παράγονται από τις ζύμες (200 g/L). Ωστόσο, η εν δυνάμει ικανότητα του εν λόγω μικροοργανισμού να παράγει μικροβιακή ξυλιτόλη αποτελεί ενδιαφέρον εύρημα και παράλληλα αντικείμενο περαιτέρω μελέτης και διερεύνησης.

Τόσο η γλυκόζη όσο και η ξυλόζη αποτελούν ανανεώσιμα σακχαρούχα υλικά και προκύπτουν από την υδρόλυση των λιγνοκυτταρινούχων υπολειμμάτων, τα οποία υπάρχουν σε αφθονία στη φύση. Επομένως, κρίνεται σημαντική η αξιοποίηση των υλικών αυτών ως μιγμάτων μέσω της βιοτεχνολογικής οδού, για την παραγωγή μικροβιακού λίπους πλούσιο σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFAs). Σε όλα τα μίγματα γλυκόζης-ξυλόζης που χρησιμοποιήθηκαν ως θρεπτικά μέσα, η κυτταρική αύξηση και η συσσώρευση του ενδοκυτταρικού λίπους από το μύκητα *T. elegans* ήταν ιδιαίτερος ικανοποιητική. Ενδεικτικά, η παραγωγή βιομάζας για τις τρεις ζυμώσεις βυθού στα μίγματα γλυκόζης-ξυλόζης, 50:50 (g/L), 75:25 (g/L), 25:75 (g/L), κυμάνθηκε μεταξύ 27.1 και 29.5 g/L, ενώ η συσσώρευση μικροβιακού λίπους ήταν αρκετά σημαντική με ποσότητες μεταξύ 10.8 και 12.6 g/L. Επιπλέον, οι συντελεστές απόδοσης λίπους ($Y_{L/X}$) ήταν αρκετά υψηλοί και έφτασαν το 46% περίπου. Αξίζει να σημειωθεί ότι η παραγόμενη ποσότητα γ -λινολενικού οξέος (GLA) και στις τρεις καλλιέργειες ήταν αξιοσημείωτη (έως 980.0 mg/L), ποσότητα ομοιάζουσα και συγκρίσιμη με την αντιστοίχως παραχθήσα κατά την καλλιέργεια του μύκητα στη γλυκόζη (1014.6 mg/L). Παρά το γεγονός ότι δεν υπάρχει επαρκής ερευνητική βιβλιογραφία που να αναφέρεται στη βιοφυσιολογική συμπεριφορά μυκήτων αναπτυσσόμενων σε μίγματα γλυκόζης-ξυλόζης, εντούτοις υπάρχουν στελέχη μυκήτων, οι οποίοι εμφανίζουν παρόμοια ικανοποιητική αύξηση και σημαντική παραγωγή ενδοκυτταρικού λίπους πλούσιο σε γ -λινολενικό οξύ, κατά την καλλιέργεια τους σε ποικιλία ανανεώσιμων πηγών άνθρακα (γλυκόζη, σακχαρόζη, γλυκερόλη, υδρολύματα παραπροϊόντων οργανικής φύσης, μαλτόζη, λακτόζη κτλ). Συγκεκριμένα, το στέλεχος

Cunninghamella echinulata CCRC 31840 κατά την αύξηση του σε θρεπτικό μέσο με πηγή άνθρακα άμυλο παράγαγε 29.7 g/L βιομάζας, ενώ ο συντελεστής απόδοσης λίπους ($Y_{L/X}$) ήταν 26.9% (Chen and Chang, 1996). Επιπλέον, στελέχη της τάξης των Mucorales εμφάνισαν ικανοποιητική ανάπτυξη και σημαντική συσσώρευση ενδοκυτταρικού λίπους κατά την καλλιέργεια τους σε διάφορα υποστρώματα. Συγκεκριμένα, το στέλεχος *Mucor mucedo* 1384 παράγαγε 21.0 g/L βιομάζας στη γλυκόζη, ενώ η περιεκτικότητα της σε λίπος ήταν 23.7%. Ακόμη καλύτερη κυτταρική αύξηση παρουσίασε ο μύκητας *Mortierella ramanniana* 1022, ο οποίος καλλιεργούμενος στη γλυκόζη παράγαγε 46.1 g/L βιομάζας. Ωστόσο ο συντελεστής απόδοσης λίπους ήταν σχετικά χαμηλός, ήτοι 14.0% w/w (Sajbidor et al., 1988). Σύμφωνα με τους Certik et al. (1993) το στέλεχος *Mortierella isabellina* CCF-14 παρουσίασε ικανοποιητική κυτταρική αύξηση (17.4 g/L) με αρκετά υψηλό συντελεστή απόδοσης λίπους ($Y_{L/X}$) που έφτασε το 30%. Ωστόσο, ο μύκητας *Cunninghamella echinulata* ATHUM 4411, κατά την ανάπτυξη του στη γλυκόζη σε περιοριστικές σε άζωτο συνθήκες παράγαγε μόλις 9.3 g/L βιομάζας, όμως η περιεκτικότητα της σε λίπος ήταν αρκετά ικανοποιητική (35%) (Paranikolaou et al., 2007). Αξίζει να σημειωθεί ότι ο ίδιος μύκητας κατά την αύξηση του σε υδρολύματα παραπροϊόντων τομάτας εμπλουτισμένα με γλυκόζη, εμφάνισε σημαντική κυτταρική αύξηση (περίπου 30.0 g/L), ενώ η παραγόμενη ποσότητα λίπους ήταν μεγαλύτερη από 8.0 g/L (Fakas et al., 2007). Παρόμοια αποτελέσματα με αυτά της παρούσας μελέτης εμφάνισε το στέλεχος *Mortierella isabellina* ATHUM 4411, το οποίο κατά την αύξηση του σε θρεπτικό μέσο με υψηλή συγκέντρωση γλυκόζης (100 g/L), παράγαγε 35.9 g/L βιομάζας και 18.1 g/L ενδοκυτταρικού λίπους (Paranikolaou et al., 2004a).

Τα τελευταία χρόνια γίνεται προσπάθεια αξιοποίησης των ελαιογόνων μικροοργανισμών (μικροφύκη, μύκητες, ζύμες, βακτήρια) για την παραγωγή βιοκαυσίμων εξαιτίας της ραγδαίας αύξησης της τιμής του πετρελαίου και της συνεχούς μείωσης των αποθεμάτων του. Το βιοντήζελ (biodiesel) είναι μίγμα μεθυλεστέρων των λιπαρών οξέων (Fatty Acids Methyl Esters, FAMES) και αποτελεί εναλλακτικό καύσιμο βιολογικής προέλευσης που παραλαμβάνεται από το φυτικό και το ζωϊκό λίπος. Παρόλα αυτά, η παραγωγή βιοντήζελ από τις συμβατικές πηγές απαιτεί υψηλό κόστος και έτσι το μικροβιακό λίπος (Single Cell Oil, SCO) των ελαιογόνων μικροοργανισμών αποτελεί μια εναλλακτική και οικονομική λύση για την παραγωγή αυτού του βιοκαυσίμου (Vicente et al., 2009; Meng et al., 2009). Αξίζει να σημειωθεί ότι το μικροβιακό λίπος που παράγεται από κάθε μικροοργανισμό δεν είναι κατάλληλο για την παραγωγή βιοντήζελ αφού αυτό θα πρέπει να είναι πλούσιο σε ελεύθερα λιπαρά οξέα, σε πολικά λιπίδια (σφιγγο-γλυκολιπίδια και φωσφολιπίδια) και σε τριγλυκερίδια (Vicente et al., 2009). Για το σκοπό αυτό τα τελευταία χρόνια πραγματοποιείται εντατική έρευνα προκειμένου να βελτιωθεί η παραγωγή μικροβιακού λίπους μέσω της ταυτοποίησης των εν δυνάμει ελαιογόνων μικροοργανισμών και τον προσανατολισμό και καθορισμό των γονιδίων και του μεταβολισμού των μικροοργανισμών για την παραγωγή λίπους με

καθορισμένη σύσταση (Meng et al., 2009). Σύμφωνα με τους Vicente et al. (2009) ο μύκητας *Mucor circinelloides*, με απόδοση βιομάζας σε λίπος 25% w/w, παρήγαγε μεθυλέστερες λιπαρών οξέων υψηλής καθαρότητας κατάλληλους για την παραγωγή βιοντήζελ. Ωστόσο, ο προσανατολισμός και έλεγχος της βιοσύνθεσης μικροβιακού λίπους για την παραγωγή βιοντήζελ θα πρέπει να αναπτυχθεί σημαντικά προκειμένου να εφαρμοστεί σε βιομηχανική κλίμακα.

Εκτός από το γεγονός ότι η παρούσα μελέτη αποτελεί μια από τις ελάχιστες που ερευνούν τη βιοφυσιολογική συμπεριφορά του Ζυγομύκητα *T. elegans* κατά την καλλιέργεια του σε ζυμώσεις βυθού, είναι και η μοναδική που μελετά την αύξηση του συγκεκριμένου μικροοργανισμού σε βιοαντιδραστήρα. Με βάση τις κινητικές της κυτταρικής αύξησης και της συσσώρευσης ενδοκυτταρικού λίπους των ζυμώσεων βυθού που προηγήθηκαν στην παρούσα μελέτη, η καλλιέργεια του μύκητα στη γλυκόζη εμφάνισε τα περισσότερα ικανοποιητικά αποτελέσματα και για το λόγο αυτό επιλέχθηκε η συγκεκριμένη ζύμωση για να πραγματοποιηθεί σε βιοαντιδραστήρα. Οι μέχρι σήμερα βιβλιογραφικές αναφορές, που χρησιμοποιούν το μύκητα *T. elegans* για να μελετήσουν την ανάπτυξη του, περιορίζονται σε στερεές ζυμώσεις. Βασικό μέλημα των ερευνών αυτών είναι η κυτταρική αύξηση του μύκητα καθώς και η ικανότητα του να παράγει αξιόλογες ποσότητες γ -λινολενικού οξέος (GLA). Κατά την καλλιέργεια του στελέχους *T. elegans* CCF-1456 σε στερεά ζύμωση, με θρεπτικό υπόστρωμα δημητριακά εμπλουτισμένα με θρεπτικό διάλυμα, ο μικροοργανισμός εμφάνισε ικανοποιητική αύξηση και η απόδοση της βιομάζας σε λίπος ήταν 15.6%. Επιπλέον, η περιεκτικότητα των ολικών λιπιδίων σε γ -λινολενικό οξύ (GLA) ήταν 9.3% (Conti et al., 2001). Ο ίδιος μικροοργανισμός κατά την καλλιέργεια του σε στερεά ζύμωση με θρεπτικό υπόστρωμα από μίγμα μηλοπολτού και υπολείμματα σπόρων βύνης, εμπλουτισμένο με θρεπτικό διάλυμα, εμφάνισε ικανοποιητική απόδοση της βιομάζας σε λίπος (17.2%) και η περιεκτικότητα των ολικών λιπιδίων σε GLA ήταν 7.5%. Αξίζει να σημειωθεί, ότι μετά τον εμπλουτισμό του θρεπτικού μέσου με αραχιδέλαιο, σημειώθηκε αύξηση της περιεκτικότητας της βιομάζας σε λίπος (21.0%), ενώ το ποσοστό του γ -λινολενικού οξέος στο ολικό μικροβιακό λίπος δεν μεταβλήθηκε σημαντικά (7.6%). Ωστόσο, σε μια προσπάθεια αύξησης του ποσοστού του γ -λινολενικού οξέος (GLA), πραγματοποιήθηκε εμπλουτισμός του θρεπτικού μέσου με γλυκόζη και ταυτόχρονη παροχή αέρα. Έτσι, η περιεκτικότητα του μικροβιακού λίπους σε GLA αυξήθηκε και έφτασε στο αρκετά ικανοποιητικό ποσοστό του 11.4% (Stredansky et al., 2000). Παρά το γεγονός ότι οι στερεές ζυμώσεις θεωρείται ότι υπερτερούν σε σχέση με τις ζυμώσεις βυθού, όσον αφορά το αρχικό κόστος της πρώτης ύλης και την εξοικονόμηση ενέργειας (Conti et al., 2001), το στέλεχος *T. elegans* CCF-1465 στην παρούσα μελέτη, κατά την καλλιέργεια του σε ζυμώσεις βυθού, εμφάνισε πολύ καλύτερα αποτελέσματα σε ό,τι αφορά την απόδοση της βιομάζας σε ενδοκυτταρικό λίπος, καθώς και την περιεκτικότητα των λιπιδίων σε γ -λινολενικό οξύ (GLA). Εξάλλου, βάσει πλήθους βιβλιογραφικών αναφορών έχει αποδειχτεί ότι οι ελαιογόνοι μύκητες αποκκρίνονται καλύτερα στις

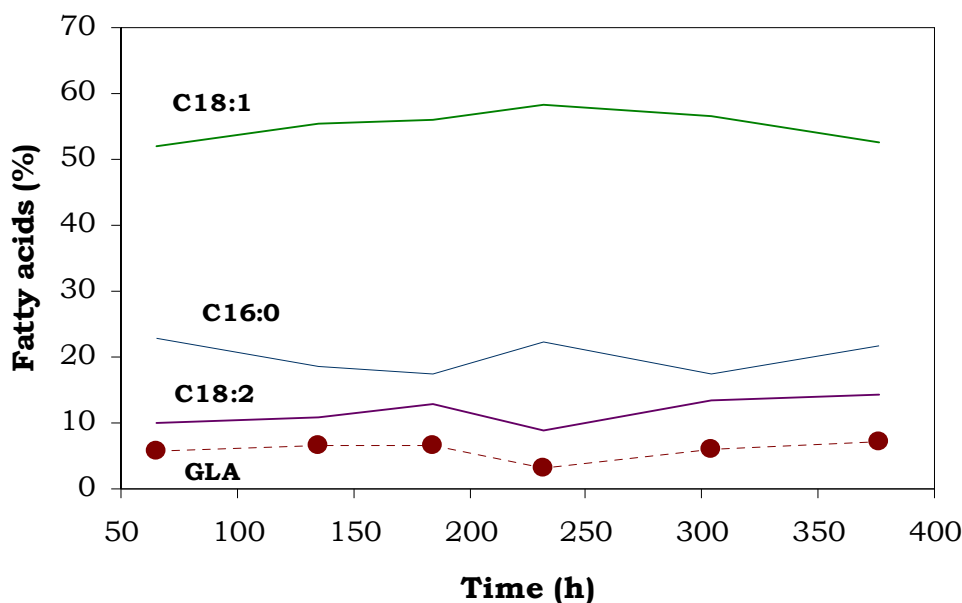
ζυμώσεις βυθού όσον αφορά την παραγωγή γ -λινολενικού οξέος (GLA) (Kennedy et al., 1993; Chen and Chang, 1996; Certik and Shimizu, 1999; Fakas et al., 2008b). Μάλιστα, σύμφωνα με τους Hiruta et al. (1997), ένα μεταλλαγμένο (mutant) στέλεχος του μύκητα *Mortierella ramanniana* καλλιεργούμενο σε βιοαντιδραστήρα υψηλού ιξώδους και όγκου 600L με υψηλή αρχική συγκέντρωση σακχάρων (300 g/L), παρήγαγε 5.5 g/L GLA. Οι καλλιέργειες μικροοργανισμών σε βιοαντιδραστήρα εφαρμόζονται κυρίως στις ζύμες και λιγότερο στους μύκητες, εξαιτίας της ιδιαίτερης μορφολογίας του μυκηλίου τους. Έτσι, σύμφωνα με τους Papanikolaou et al. (2007) η ανάπτυξη των μυκήτων *Mortierella isabellina* ATHUM 2935 και *Cunninghamella echinulata* ATHUM 4411 σε βιοαντιδραστήρα ενεργού όγκου 1.5 L οδήγησε στο σχηματισμό μεγάλου μεγέθους και ιδιαίτερης μορφής μυκηλίου (pellets), με αποτέλεσμα την ανομοιογένεια στο θρεπτικό μέσο. Ωστόσο, στην παρούσα μελέτη ρυθμίστηκαν προσεκτικά όλοι οι εξωγενείς παράγοντες (ταχύτητα ανάδευσης, αερισμός) έτσι ώστε να αποφευχθούν παρόμοιες ανεπιθύμητες δυσκολίες.

Έτσι, ο εν λόγω μύκητας κατά την καλλιέργεια του στο βιοαντιδραστήρα εμφάνισε ιδιαίτερα ικανοποιητική κυτταρική αύξηση, η οποία έλαβε τη μέγιστη τιμή της 158 h μετά τον εμβολιασμό, φτάνοντας τα 30.1 g/L. Η ποσότητα αυτή της παραγόμενης βιομάζας είναι ομοιάζουσα με την αντίστοιχη που παρήγαγε ο μικροοργανισμός κατά την καλλιέργεια του στις φιάλες με το ίδιο θρεπτικό μέσο, όπου ήταν 31.9 g/L. Σε όλες τις υπόλοιπες ζυμώσεις βυθού η κυτταρική αύξηση του μύκητα κυμάνθηκε μεταξύ 21.4 και 29.5 g/L. Ωστόσο, η ζύμωση στο βιοαντιδραστήρα φαίνεται να εξελίσσεται με ταχύτερο ρυθμό, αφού στις φιάλες η μέγιστη παραγωγή βιομάζας σημειώνεται μετά το πέρας των 300 h. Η μέγιστη παραγωγή ενδοκυτταρικού λίπους (L_{max}) ήταν 10.6 g/L με συντελεστή απόδοσης λίπους 35.3%. Ωστόσο, η μέγιστη ποσότητα γ -λινολενικού οξέος (GLA) ήταν ελαφρώς μειωμένη και έφτασε τα 742.0 mg/L. Είναι λοιπόν εμφανές ότι παρά την ιδιαίτερα ικανοποιητική παραγωγή βιομάζας από το μύκητα, η παραγόμενη ποσότητα GLA ήταν λίγο χαμηλότερη συγκριτικά με αυτή που σημειώθηκε στις ζυμώσεις βυθού με το ίδιο θρεπτικό μέσο ($L_{max}=1014.6$ mg/L). Φαίνεται ότι η διατήρηση των βέλτιστων παραμέτρων ζύμωσης στο βιοαντιδραστήρα (αερισμός, ρύθμιση τιμής pH, ανάδευση) είχε σαν αποτέλεσμα τη στροφή του κυτταρικού μεταβολισμού πρωτίστως προς την παραγωγή βιομάζας και δευτερευόντως προς τη συσσώρευση ενδοκυτταρικού λίπους. Ως εκ τούτου, τεκμαίρεται και η μειωμένη παραγωγή γ -λινολενικού οξέος από το μύκητα κατά την καλλιέργειά του στο βιοαντιδραστήρα.

Μετά την παραλαβή και τη μεθυλίωση του ενδοκυτταρικού λίπους από το στέλεχος *T. elegans* CCF-1465 ακολούθησε ανάλυση της σύστασης των λιπιδίων και των κλάσεων αυτών σε λιπαρά οξέα με τη βοήθεια του αέριου χρωματογράφου. Από τα αποτελέσματα των αναλύσεων προκύπτει ότι μικροοργανισμός παρήγαγε σημαντικές ποσότητες γ -λινολενικού οξέος (GLA, C18:3) τις πρώτες ώρες μετά τον εμβολιασμό. Αντίθετα, κατά την εξέλιξη της ζύμωσης, η αύξηση της ποσότητας του ενδοκυτταρικού λίπους συνοδευόταν από τη μείωση της περιεκτικότητάς του σε

γ -λινολενικό οξύ. Ωστόσο, κατά την παρατεταμένη στάσιμη φάση του αυξητικού κύκλου παρατηρήθηκε μικρή αύξηση στην παραγωγή του GLA, λόγω της αύξησης της ποσότητας του παραγόμενου ενδοκυτταρικού λίπους. Το φαινόμενο αυτό παρατηρήθηκε κατά την καλλιέργεια του μύκητα σε όλα τα θρεπτικά υποστρώματα, τόσο κατά την καλλιέργεια του στις φιάλες όσο και στο βιοαντιδραστήρα, και οφείλεται στο ότι η σύνθεση του GLA λαμβάνει χώρα κατά την παραγωγή νέας βιομάζας, ενώ αντιθέτως η βιοσυσσώρευση ενδοκυτταρικού λίπους αποτελεί μια δευτερογενή μεταβολική διεργασία. Το σχήμα IV.1. παρουσιάζει την αυξομείωση της σύστασης των ολικών λιπιδίων (TFA) σε γ -λινολενικό οξύ κατά την καλλιέργεια του μύκητα στη γλυκόζη. Το φαινόμενο αυτό παρατηρήθηκε επίσης κατά την καλλιέργεια του στελέχους *Cunninghamella echinulata* ATHUM 4411 στη γλυκόζη, όπου τις πρώτες ώρες της ζύμωσης η περιεκτικότητα του ενδοκυτταρικού λίπους σε GLA ήταν 13%, στη συνέχεια κατά τη φάση συσσώρευσης λίπους μειώθηκε στο 10%, ενώ περί την ολοκλήρωση της ζύμωσης αυξήθηκε και έφτασε το 16.5% (Paranikolaou et al., 2007). Παράλληλα, κατά την καλλιέργεια του ίδιου στελέχους στη γλυκόζη (40 g/L) σε περιοριστικές σε άζωτο συνθήκες, παρατηρήθηκε το ίδιο ακριβώς φαινόμενο σχετικά με την παραγωγή γ -λινολενικού οξέος κατά την εξέλιξη της ζύμωσης. Τις πρώτες ώρες μετά τον εμβολιασμό το ποσοστό του GLA ήταν αρκετά υψηλό, στη συνέχεια μειώθηκε και μετά την ολοκλήρωση της συσσώρευσης λίπους (περί τις 350 h) σημείωσε και πάλι αύξηση (Paranikolaou et al., 2004b). Ο ίδιος μικροοργανισμός όταν καλλιεργήθηκε στη γλυκόζη και τη ξυλόζη εμφάνισε την ίδια ακριβώς συμπεριφορά αναφορικά με την περιεκτικότητα των ολικών λιπιδίων σε γ -λινολενικό οξύ. Έτσι, στην αρχή της κυτταρικής ανάπτυξης το ποσοστό του GLA ήταν γύρω στο 20% (κ.β. επί των ολικών λιπιδίων), αλλά καθώς εξελισσόταν η ζύμωση μειώθηκε στο 7–11%, μέχρι να αυξηθεί και πάλι στο 15–17% (Fakas et al., 2008b). Ωστόσο, στην παρούσα μελέτη το επικρατέστερο λιπαρό οξύ επί των ολικών λιπιδίων (TFA) ήταν το ελαϊκό οξύ (C18:1) με ποσοστά που κυμαίνονταν μεταξύ 30–60% και ακολούθησε το παλμιτικό (C16:0) και το λινελαϊκό οξύ (C18:2), τα οποία απαντώνταν επίσης σε σημαντικές ποσότητες (Paranikolaou et al., 2007; Kavadia et al., 2001). Επιπλέον, το μυριστικό οξύ (C14:0) και το στεατικό οξύ (C18:0) εντοπίστηκαν σε μικρότερες ποσότητες στο σύνολο των λιπιδίων. Παράλληλα, η ποσοστιαία κατανομή του λινελαϊκού οξέος στα ολικά λιπίδια ήταν ομοιάζουσα με αυτή του γ -λινολενικού οξέος (Σχήμα IV.1). Κατά την καλλιέργεια στη ξυλόζη, ο εν λόγω μύκητας ανακατανάλωσε μέρος του συσσωρευμένου λίπους περί τις 400 h, προς παραγωγή βιομάζας ελεύθερης λίπους (X_f). Η παραγωγή του γ -λινολενικού οξέος (GLA) κατά τη φάση της ανακατανάλωσης του λίπους αυξήθηκε, γεγονός που δεικνύει ότι οι συνθήκες που ευνοούν τη σύνθεση του GLA δεν είναι κατάλληλες για τη βιοσυσσώρευση ενδοκυτταρικού λίπους. Το ίδιο φαινόμενο παρατηρήθηκε κατά την καλλιέργεια του μύκητα *Rhizopus stolonifer* 1676 στη γλυκόζη, όπου μετά την κατανάλωση

της πηγής άνθρακα, το συσσωρευμένο λίπος ανακαταναλώθηκε και παράλληλα σημειώθηκε αύξηση του παραγόμενου GLA (Kavadia et al., 2001).



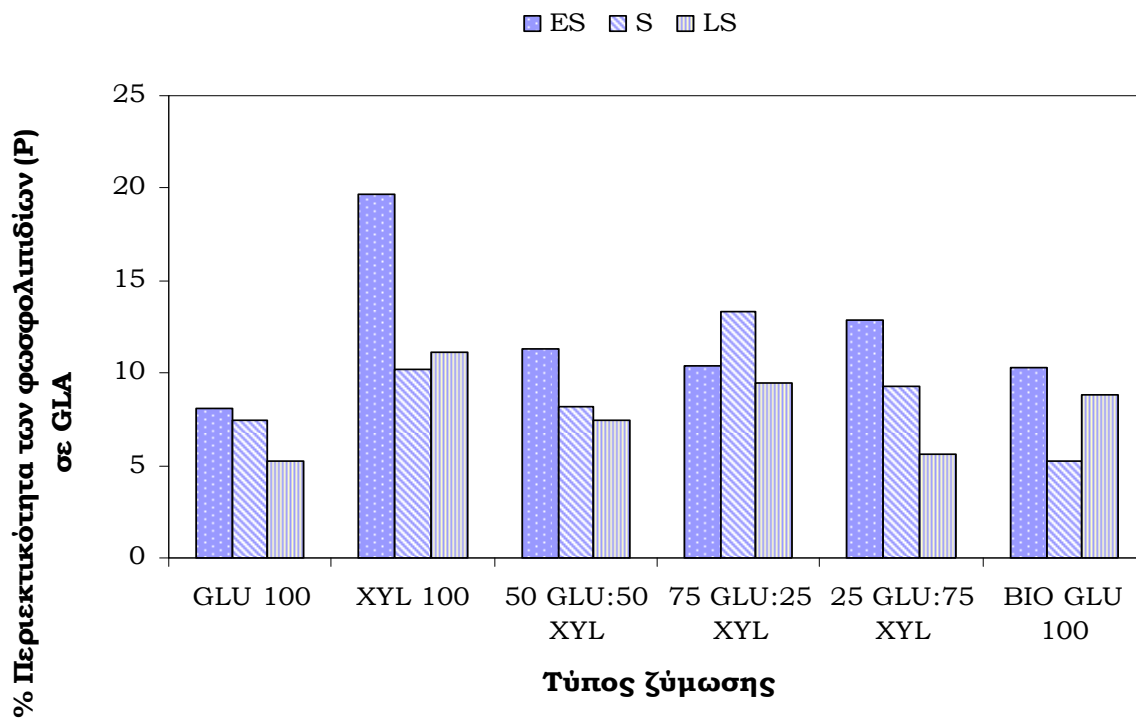
Σχήμα IV.1. Σύνθεση των λιπαρών οξέων του Ζυγομύκητα *Thamnidium elegans* CCF-1465 κατά την καλλιέργεια του στη γλυκόζη (100 g/L).

Η ανάλυση των λιπιδίων του μύκητα *T. elegans* CCF-1465 στα επιμέρους κλάσματα, ουδέτερα (N), σφιγγο-γλυκολιπίδια (SG) και φωσφολιπίδια (P), πραγματοποιήθηκε σε όλες τις υπό μελέτη καλλιέργειες (ζυμώσεις βυθού και βιοαντιδραστήρα) σε δείγματα που αντιπροσωπεύουν τις εξής φάσεις του αυξητικού κύκλου: την πρώιμη στάσιμη, τη στάσιμη και την παρατεταμένη στάσιμη φάση. Από την εν λόγω διεργασία διαπιστώθηκε ότι το κύριο κλάσμα σε όλες τις ζυμώσεις ήταν τα ουδέτερα λιπίδια (N) με ποσοστό που κυμαινόταν μεταξύ 85–95% (κ.β. επί των ολικών λιπιδίων), ενώ τα κλάσματα των σφιγγο-γλυκολιπιδίων (SG) και των φωσφολιπιδίων (P) παρουσίαζαν ποσοστά μεταξύ 2.3–11.7% και 1.6–7.2% αντίστοιχα. Η περιεκτικότητα των ολικών λιπιδίων σε ουδέτερα λιπίδια (N) φαίνεται να αυξάνεται κατά τη στάσιμη φάση αλλά ξαναμειώνεται ελαφρώς κατά την παρατεταμένη στάσιμη φάση. Το φαινόμενο αυτό παρατηρείται στην πλειοψηφία των ζυμώσεων στην παρούσα μελέτη και οφείλεται στο γεγονός ότι με την πάροδο του χρόνου αυξάνεται η βιοσυσσώρευση ενδοκυτταρικού λίπους. Αντίθετα, κατά την παρατεταμένη στάσιμη φάση μειώνεται ελαφρώς το ποσοστό των ουδέτερων λιπιδίων κυρίως λόγω της ολοκλήρωσης της βιοσυσσώρευσης λίπους ή της πιθανής ανακατανάλωσης των λιπιδίων (Fakas et al., 2009). Αυτή η σειρά των γεγονότων αντιπροσωπεύει το φυσιολογικό ρόλο των ουδέτερων λιπιδίων, τα οποία λειτουργούν ως αποθήκες ενέργειας σε συνθήκες αφθονίας και ως παροχείς ενέργειας όταν υπάρχει έλλειψη αυτής στο κυτταρικό περιβάλλον. Αξίζει να σημειωθεί ότι κατά την καλλιέργεια του μύκητα στο βιοαντιδραστήρα η ποσοστιαία κατανομή των ουδέτερων λιπιδίων επί των ολικών λιπιδίων ήταν χαμηλότερη (75–85%) σε σχέση με τις ζυμώσεις βυθού, ενώ τα

σφιγγο-γλυκολιπίδια και τα φωσφολιπίδια φαίνεται να εμφανίζουν αυξημένα ποσοστά, που κυμαίνονται μεταξύ 11.8–20.5% και 2.8–5.7% αντίστοιχα. Η διαφοροποίηση αυτή στην κατανομή των κλάσεων στο σύνολο των λιπιδίων του βιοαντιδραστήρα, πιθανόν δεικνύει την αξιοποίηση των ουδέτερων λιπιδίων (N) ως προς τη σύνθεση πολικών λιπιδίων (σφιγγο-γλυκολιπίδια και φωσφολιπίδια). Τα πολικά λιπίδια (SG και P) αποτελούν αναπόσπαστο κομμάτι της κυτταρικής μεμβράνης και η βιοσύνθεση τους συνδέεται άμεσα με την παραγωγή νεας βιομάζας (Fakas et al., 2007). Επομένως, η μεγάλη περιεκτικότητα των ολικών λιπιδίων (TFA) του μύκητα *T. elegans* σε πολικά λιπίδια στο βιοαντιδραστήρα, σχετίζεται με τη σημαντική κυτταρική ανάπτυξη του εις βάρος της βιοσυσσώρευσης ενδοκυτταρικού λίπους. Το ίδιο φαινόμενο παρατηρήθηκε κατά την ανάπτυξη του στελέχους *Cunninghamella echinulata* ATHUM 4411 σε υδρολυμένα παραπροϊόντα τομάτας (εμπλουτισμένα με γλυκόζη), όπου κατά τη φάση ανακατανάλωσης του ενδοκυτταρικού λίπους σημειώθηκε μείωση του ποσοστού των ουδέτερων λιπιδίων (N) και παράλληλα αυξήθηκαν τα ποσοστά των σφιγγο-γλυκολιπιδίων (SG) και των φωσφολιπιδίων (P) (Fakas et al., 2007). Ωστόσο, στην παρούσα μελέτη κατά την παρατεταμένη στάσιμη φάση του αυξητικού κύκλου η ποσοστιαία κατανομή των ουδέτερων λιπιδίων αυξήθηκε από 74.3% σε 85.4% (κ.β. επί των ολικών λιπιδίων), ενώ παράλληλα τα ποσοστά των σφιγγο-γλυκολιπιδίων και των φωσφολιπιδίων μειώθηκαν από 20.5% σε 11.8% και από 5.1% σε 2.8%, αντίστοιχα. Στη φάση αυτή σημειώθηκε σταθεροποίηση της παραγωγής βιομάζας, ενώ αυξήθηκε ελαφρώς η περιεκτικότητα των ολικών λιπιδίων σε γ -λινολενικό οξύ (GLA).

Μετά την ανάλυση του ενδοκυτταρικού λίπους του στελέχους *T. elegans* CCF-1465 σε δείγματα που προέκυψαν από όλες τις ζυμώσεις που έλαβαν χώρα (ζυμώσεις βυθού και βιοαντιδραστήρα), προσδιορίστηκε η σύσταση των κλασμάτων των ολικών λιπιδίων (TFA) στα επιμέρους λιπαρά οξέα. Το ελαϊκό οξύ (C18:1) απαντάται σε μεγαλύτερη αναλογία στα επιμέρους κλάσματα (N, SG, P) του μικροβιακού λίπους, ενώ ακολουθούν σε σημαντικές ποσότητες το λινελαϊκό οξύ (C18:2) και το παλμιτικό οξύ (C16:0). Σε μικρότερες ποσότητες απαντώνται το γ -λινολενικό (GLA, C18:3), το στεατικό οξύ (C18:0) και το παλμιτελαϊκό οξύ (C16:1). Με την πάροδο του χρόνου, το κλάσμα των ουδέτερων λιπιδίων (N) παρουσιάζει μικρές διακυμάνσεις στη σύσταση του και συγκεκριμένα μεταβάλλεται ελαφρώς η ποσοστιαία κατανομή του στεατικού (C18:0), του παλμιτικού (C16:0) και του λινελαϊκού οξέος (C18:2). Επιπλέον, ο δείκτης ακορεστότητας (UI) φαίνεται να μην μεταβάλλεται σημαντικά καθώς εξελίσσεται η ζύμωση. Η παρατήρηση αυτή συνάδει με τα αποτελέσματα άλλων ερευνητών και συγκεκριμένα κατά την ανάλυση του ενδοκυτταρικού λίπους του στελέχους *Mortierella isabellina* ATHUM 2935, όπου η σύσταση του κλάσματος των ουδέτερων λιπιδίων στα επιμέρους λιπαρά οξέα παρέμεινε σχεδόν αμετάβλητη καθόλη τη διάρκεια της ζύμωσης (Fakas et al., 2009). Την ίδια ακριβώς συμπεριφορά εμφάνισε και το στέλεχος *Cunninghamella echinulata* ATHUM 4411 καλλιεργούμενο σε

υδρολυμένα παραπροϊόντα τομάτας (Fakas et al., 2006). Ωστόσο, κατά τη μελέτη της σύστασης του μικροβιακού λίπους των αναφερθέντων μικροοργανισμών, παρατηρήθηκε στο κλάσμα των σφιγγο-γλυκολιπιδίων (SG) σταδιακή μείωση του λινελαϊκού οξέος (C18:2) με ταυτόχρονη αύξηση του ελαϊκού οξέος (C18:1) κατά την μετάβαση από την μέση εκθετική στη στάσιμη φάση. Αυτό οφείλεται κυρίως στο γεγονός ότι με την πάροδο του χρόνου επιβραδύνεται η διαδικασία μετατροπής του ελαϊκού οξέος σε λινελαϊκό, με αποτέλεσμα να συσσωρεύεται το ελαϊκό οξύ τόσο στα σφιγγο-γλυκολιπίδια όσο και στα φωσφολιπίδια. Η παρούσα μελέτη δεν αποτελεί εξαίρεση και έτσι σε όλες σχεδόν τις ζυμώσεις παρατηρήθηκε η ίδια μείωση και αύξηση του λινελαϊκού και του ελαϊκού οξέος αντίστοιχα, στο κλάσμα των σφιγγο-γλυκολιπιδίων. Παρόλα αυτά, το κλάσμα των φωσφολιπιδίων (P) συγκεντρώνει το μεγαλύτερο ενδιαφέρον, καθώς διαθέτει τη μεγαλύτερη περιεκτικότητα στο υψηλής διατροφικής και φαρμακευτικής αξίας γ -λινολενικό οξύ (GLA, C18:3), η οποία κυμαίνεται μεταξύ 5.2% έως 19.7%. Μάλιστα, κατά την καλλιέργεια του μικροοργανισμού στη ξυλόζη (100 g/L), το κλάσμα των φωσφολιπιδίων ήταν ιδιαίτερα πλούσιο σε GLA (10.2–19.7%). Εξαιτίας της υψηλής περιεκτικότητας των φωσφολιπιδίων σε GLA καθώς και σε λινελαϊκό οξύ (C18:2), τα οποία αποτελούν πολυακόρεστα λιπαρά οξέα, ο δείκτης ακορεστότητας (UI) του εν λόγω κλάσματος ήταν υψηλότερος σε σύγκριση με αυτόν των ουδέτερων λιπιδίων και των σφιγγο-γλυκολιπιδίων. Επίσης, η προσεκτική τη μελέτη της σύστασης του κλάσματος των φωσφολιπιδίων (P) στα επιμέρους λιπαρά οξέα, οδήγησε στο συμπέρασμα ότι η ποσοστιαία κατανομή του γ -λινολενικού οξέος στα φωσφολιπίδια μειώνεται καθώς εξελίσσεται η ζύμωση από την πρώιμη στάσιμη φάση στη παρατεταμένη στάσιμη φάση (Σχήμα IV.2). Ωστόσο, η ζύμωση στο μίγμα γλυκόζης-ξυλόζης 75:25 (g/L) αποτελεί εξαίρεση, αφού κατά τη στάσιμη φάση το κλάσμα των φωσφολιπιδίων περιέχει υψηλότερο ποσοστό γ -λινολενικού οξέος (13.3%) συγκριτικά με αυτό της πρώιμης στάσιμης φάσης (10.4%). Σύμφωνα με τους Fakas et al. (2006), παρατηρείται μείωση του ποσοστού του GLA στο κλάσμα των φωσφολιπιδίων (του στελέχους *Cunninghamella echinulata* ATHUM 4411 καλλιεργούμενο σε υδρολυμένα παραπροϊόντα τομάτας), η οποία συνοδεύεται από ταυτόχρονη αύξηση του γ -λινολενικού οξέος στο κλάσμα των ουδέτερων λιπιδίων (N), καθώς η ζύμωση οδεύει προς την ολοκλήρωση της. Επίσης, στην ίδια μελέτη σημειώνεται ότι ο δείκτης ακορεστότητας (UI) των φωσφολιπιδίων είναι υψηλότερος συγκριτικά με των υπόλοιπων δυο κλασμάτων (SG και P). Και τα δυο αυτά ευρήματα συνάδουν με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης κατά την ανάλυση της σύστασης των κλασμάτων των ολικών λιπιδίων (TFA) στα επιμέρους λιπαρά οξέα.



Σχήμα IV.2. Περιεκτικότητα (%) του κλάσματος των φωσφολιπιδίων (P) του Ζυγομύκητα *Thamnidium elegans* CCF-1465 σε GLA, στις επιμέρους φάσεις του αυξητικού κύκλου (ES: πρώιμη στάσιμη φάση, S: στάσιμη φάση, LS: παρατεταμένη στάσιμη φάση) για όλες τις υπό μελέτη ζυμώσεις.

Η σύσταση των ολικών λιπιδίων (TFA) και των κλασμάτων του στα επιμέρους λιπαρά οξέα, διαφέρει στις περιπτώσεις που παρατηρείται ανακατανάλωση του ενδοκυτταρικού λίπους από τους μικροοργανισμούς που αναπτύσσονται σε θρεπτικά υποστρώματα, μετά την εξάντληση της πηγής άνθρακα. Έτσι, κατά την καλλιέργεια του στελέχους *Cunninghamella echinulata* ATHUM 4411 σε υδρολυμένα παραπροϊόντα τομάτας (εμπλουτισμένα με γλυκόζη) σημειώθηκε ανακατανάλωση του παραγόμενου μικροβιακού λίπους περί τις 300 h (Fakas et al., 2007). Η ανάλυση της σύστασης του λίπους κατά τη φάση της ανακατανάλωσης του παρουσίασε ιδιαίτερο ενδιαφέρον και αξίζει να σημειωθεί ότι το κλάσμα των σφίγγο-γλυκολιπιδίων (SG) μεταβλήθηκε δραστικά, αφού η περιεκτικότητά του σε GLA σχεδόν πενταπλασιάστηκε, ενώ παράλληλα σημειώθηκε σημαντική αύξηση του δείκτη ακορεστότητας (UI). Αντίθετα, η σύσταση του κλάσματος των φωσφολιπιδίων επηρεάζεται σε μικρότερο βαθμό καθώς αυξήθηκε ελαφρώς η περιεκτικότητά του σε γ -λινολενικό οξύ. Είναι λοιπόν εμφανές ότι το κλάσμα των σφίγγο-γλυκολιπιδίων εμπλούτιστηκε σημαντικά σε GLA κατά τη φάση της ανακατανάλωσης του ενδοκυτταρικού λίπους, ενώ στην παρούσα μελέτη τα υψηλότερα ποσοστά GLA εντοπίστηκαν στο κλάσμα των φωσφολιπιδίων (P).

Πολλοί ελαιογόνοι μικροοργανισμοί αποικοδομούν και ανακαταλώνουν το συσσωρευμένο ενδοκυτταρικό λίπος μετά την εξάντληση της πηγής άνθρακα στο θρεπτικό μέσο, με αποτέλεσμα την παραγωγή βιομάζας ελεύθερης λίπους (Kavadia et al., 2001; Papanikolaou et al., 2004b).

Παρόλα αυτά, ορισμένοι μικροοργανισμοί δεν έχουν τη δυνατότητα να αποικοδομούν τα παραγόμενα λιπίδια εξαιτίας της έλλειψης θρεπτικών συστατικών, όπως το άζωτο και το μαγνήσιο. Εφόσον η αποικοδόμηση του ενδοκυτταρικού λίπους ξεκινά μετά την εξάντληση της πηγής άνθρακα, η διεργασία αυτή θεωρείται ότι είναι ανεξάρτητη από τη φύση του θρεπτικού μέσου, ήτοι γλυκόζη ή λίπη (Kavadia et al., 2001). Η βιοχημική αυτή διεργασία έχει παρατηρηθεί σε πολλούς ελαιογόνους μύκητες (π.χ. *Mucor circinelloides*) καθώς επίσης και σε ελαιογόνες ζύμες (π.χ. *Yarrowia (Candida) lipolytica*) (Papanikolaou et al., 2001). Στην παρούσα εργασία σημειώθηκε μικρή, πλην όμως διακριτή ανακατανάλωση των συσσωρευμένων αποθεματικών λιπιδίων, στη ζύμωση με μόνη πηγή άνθρακα τη ξυλόζη. Ο Ζυγομύκητας *T. elegans* περί τις 400 h, και ενώ έχει εξαντληθεί σχεδόν η πηγή άνθρακα και σε περιοριστικές σε άζωτο συνθήκες, ανακαταναλώνει μέρος του παραγόμενου ενδοκυτταρικού λίπους προς παραγωγή βιομάζας ελεύθερης λίπους (X_f). Αξίζει να σημειωθεί, ότι κατά την παρατεταμένη στάσιμη φάση του αυξητικού κύκλου αυξήθηκε ελαφρώς η περιεκτικότητα των ολικών λιπιδίων σε γ -λινολενικό οξύ. Η παρατήρηση αυτή συνάδει με τα αποτελέσματα της μελέτης των Kavadia et al. (2001), σύμφωνα με τους οποίους το στέλεχος *Rhizopus stolonifer* LGAM (9)1 κατά την ανάπτυξη του στη γλυκόζη αποικοδόμησε μέρος του παραγόμενου λίπους και κατά τη διάρκεια της διεργασίας αυτής σημειώθηκαν υψηλά ποσοστά GLA.

Τα αποτελέσματα της παρούσας ερευνητικής μελέτης δεικνύουν ότι ο μύκητας *T. elegans* CCF-1465 κατά την καλλιέργεια του σε σακχαρούχα ανανεώσιμα υποστρώματα (γλυκόζη, ξυλόζη και μίγματα αυτών), δύναται να αναπτυχθεί ικανοποιητικά και να συσσωρεύσει σημαντικές ποσότητες ενδοκυτταρικού λίπους, το οποίο είναι πλούσιο σε γ -λινολενικό οξύ (GLA). Το εν λόγω λιπαρό οξύ συγκεντρώνει ιδιαίτερο ενδιαφέρον εξαιτίας της υψηλής διατροφικής και θεραπευτικής αξίας που διαθέτει. Τόσο η γλυκόζη όσο και η ξυλόζη αποτελούν τα κύρια προϊόντα υδρόλυσης των λιγνοκυτταρινούχων υπολειμμάτων, τα οποία απαντώνται άφθονα στη φύση ως αποτέλεσμα των γεωργικών και δασικών εκμεταλλεύσεων (Peters, 2007). Η αξιοποίηση των υπολειμμάτων αυτών έχει ιδιαίτερη σημασία, καθώς ο συνεχώς αυξανόμενος όγκος τους οδηγεί στην υποβάθμιση του περιβάλλοντος και στην απώλεια ωφέλιμων υλικών, τα οποία μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την παραγωγή προϊόντων προστιθέμενης αξίας (Sánchez, 2009). Αξιόλογο παραγόμενο προϊόν αποτελεί το μικροβιακό λίπος και συγκεκριμένα ορισμένα λιπίδια που περιέχουν πολυακόρεστα λιπαρά οξέα σπανίως απαντώμενα στη φύση (γ -λινολενικό οξύ, GLA) και παράγονται από πλήθος ελαιογόνων μικροοργανισμών (μύκητες και ζύμες). Ακριβώς επειδή τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα, όπως το GLA, χρησιμοποιούνται για θεραπευτικούς και διατροφικούς σκοπούς, ο καθαρισμός και ο εξευγενισμός του παραληφθέντος μικροβιακού λίπους είναι απαραίτητος προκειμένου να απομακρυνθούν ή τουλάχιστον να περιοριστούν, όσο το δυνατόν, οι επιμολυντές του ακατέργαστου λίπους. Σύμφωνα με τους Ahmed et al. (2009) ο καθαρισμός και ο εμπλουτισμός του γ -λινολενικού

οξέος (GLA) με τη μέθοδο της κρυστάλλωσης με ουρία, δίνει ιδιαίτερα ικανοποιητικά αποτελέσματα και το εν λόγω λιπαρό οξύ μπορεί να εμπλουτιστεί έως και 90% μετά από κρυστάλλωση δυο σταδίων.

Συμπερασματικά, η παραγωγή πολύτιμων λιπιδίων με ιδιαίτερες φαρμακευτικές και διατροφικές ιδιότητες από την αξιοποίηση γεωργο-βιομηχανικών παραπροϊόντων καθώς και η δυνατότητα παραγωγής εναλλακτικών βιοκαυσίμων (βιοντήζελ), αποτελεί σημαντικό επίτευγμα για την βιοτεχνολογία των τροφίμων και οδηγεί στην αναβάθμιση του περιβάλλοντος και της οικονομίας.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Ahmed S.U., Reddy K.K., Swathy S.L., Singh S.K., Kanjilal S., Prasad R.B.N., Pandey A. (2009). Enrichment of γ -linolenic acid in the lipid extracted from *Mucor zychnae* MTCC 5420. *Food Research International* 42, 449-453.
2. Aki T., Matsumoto Y., Morigana T., Kawamoto S., Shigeta S., Ono K., Suzuki O. (1998). Lipid composition of a newly isolated polyunsaturated fatty acid-producing fungus, *Achlya* sp. ma-2801. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 86, 504-507.
3. Bae S.M., Park Y.C., Lee T.H., Kweon D.H., Choi J.H., Kim S.K., Ryu Y.W., Seo J.H. (2004). Production of xylitol by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* containing xylose reductase gene in repeated fed-batch and cell-recycle fermentations. *Enzyme and Microbial Technology* 35, 545-549.
4. Bakshi A., Mukherjee D., Bakshi A., Banerji A.K., Das U.N. (2003). γ -Linolenic acid therapy of human gliomas. *Nutrition* 19, 305-309.
5. Certik M., Berhan S., Sajbidor J. (1993). Lipid production and fatty acid composition of selected strains belonging to *Mucorales*. *Acta Biotechnol.* 13, 193-196.
6. Certik M., Baltészová L., Sajbidor J. (1997). Lipid formation and γ -linolenic acid production by *Mucorales* fungi grown on sunflower oil. *Letters in Applied Microbiology* 25, 101-105.
7. Certik M. and Shimizu S. (1999). Biosynthesis and Regulation of Microbial Polyunsaturated Fatty Acid Production. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 87, 1-14.
8. Charnock J.S., Crozier G.L., Woodhouse J. (1994). Gamma linolenic acid, black currant seed and evening primrose oil in the prevention of cardiac arrhythmia in aged rats. *Nutrition Research* 14, 1089-1099.
9. Chen H.C., Chang C.C. (1996). Production of γ -linolenic acid by the fungus *Cunninghamella echinulata* CCRC 31840. *Biotechnology Progress* 12, 338-341.
10. Conti E., Stredansky M., Stredanska S., Zanetti F. (2001). γ -Linolenic acid production by solid-state fermentation of *Mucorales* strains on cereals. *Bioresource Technology* 76, 283-286.
11. Das U.N. (2004). From bench to the clinic: γ -linolenic acid therapy of human gliomas. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 70, 539-552.
12. Dyal S.D., Bouzidi L., Narine S.S. (2005). Maximizing the production of γ -linolenic acid in *Mortierella ramanniana* var. *ramanniana* as a function of pH, temperature and carbon source, nitrogen source, metal ions and oil supplementation. *Food Research International* 38, 815-829.

13. Fakas S., Papanikolaou S., Galiotou-Panayotou M., Komaitis M., Aggelis G. (2006). Lipids of *Cunninghamella echinulata* with emphasis to γ -linolenic acid distribution among lipid classes. *Applied Microbiology and Biotechnology* 73, 676-683.
14. Fakas S., Galiotou-Panayotou M., Papanikolaou S., Komaitis M., Aggelis G. (2007). Compositional shifts in lipid fractions during lipid turnover in *Cunninghamella echinulata*. *Enzyme and Microbial Technology* 40, 1321-1327.
15. Fakas S., Certik M., Papanikolaou S., Aggelis G., Komaitis M., Galiotou-Panayotou M. (2008). γ -Linolenic acid production by *Cunninghamella echinulata* growing on complex organic nitrogen sources. *Bioresource Technology* 99, 5986-5990.
16. Fakas S., Papanikolaou S., Batsos A., Galiotou-Panayotou M., Mallouchos A., Aggelis G. (2008). Evaluating renewable carbon sources as substrates for single cell oil production by *Cunninghamella echinulata* and *Mortierella isabellina*. *Biomass and Bioenergy* 33, 1-8.
17. Fakas S., Bellou S., Makri A., Aggelis G. (2009). Single Cell Oil and gamma linolenic acid production by *Thamnidium elegans* grown on raw glycerol. In: *Microbial Conversions of Raw Glycerol*. Nova Science Publishers Inc, p. 85-99.
18. Fakas S., Makri A., Mavromati M., Tselepi M., Aggelis G. (2009). Fatty acid composition in lipid fractions lengthwise the mycelium of *Mortierella isabellina* and lipid production by solid state fermentation. *Bioresource Technology* 100, 6118-6120.
19. Figueiredo Faria L.F., Pereira N., Nobrega R. (2002). Xylitol production from D-xylose in a membrane bioreactor. *Desalination* 149, 231-236.
20. Folch J., Lees M., Sloane-Stanley G. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry* 199, 833-841
21. Guo X., Ota Y. (2000) Incorporation of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids by a yeast (FO726A). *Journal of Applied Microbiology* 89, 107-115.
22. Hiruta O., Yamamura K., Takebe H., Futamura T., Iinuma K., Tanaka H. (1997). Application of Maxblend fermentor for microbial processes. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 83, 79-86.
23. Horrobin D.F. (1992). Nutritional and medical importance of gamma-linolenic acid. *Progress in Lipid Research* 31, 163-194.
24. Ikeuchi T., Azuma M., Kato J., Ooshima H. (1999). Screening of microorganisms for xylitol production and fermentation behavior in high concentrations of xylose. *Biomass and Bioenergy* 16, 333-339.
25. Jones D.T. (2005). Applied Acetone-Butanol Fermentation. In: *Clostridia*. Wiley-VCH Verlag, p. 125-168.

26. Kavadia A., Komaitis M., Chevalot I., Blanchard F., Marc I., Aggelis G. (2001). Lipid and γ -linolenic acid accumulation in strains of *Zygomycetes* growing on glucose. *Journal of the American Oil Chemical Society* 78, 341-346.
27. Kennedy M.J., Reader S.L., Davies R.J. (1993). Fatty acid production characteristics of fungi with particular emphasis on gamma linolenic acid production. *Biotechnology and Bioengineering* 42, 625-634.
28. Menéndez J.A., Barbacid M.M., Montero S., Sevilla E., Escrich E., Solanas M., Cortés-Funes H., Colomer R. (2001). Effects of gamma linolenic acid and oleic acid on paclitaxel cytotoxicity in human breast cancer cells. *European Journal of Cancer* 37, 402-413.
29. Meng X., Yang J., Xu X., Zhang L., Nie Q., Xian M. Biodiesel production from oleaginous microorganisms. *Renewable Energy* 34, 1-5.
30. Nyssola A., Pihlajaniemi A., Palva A., Weymarn N., Leisola M. (2005). Production of xylitol from D-xylose by recombinant *Lactococcus lactis*. *Journal of Biotechnology* 118, 55-66.
31. Papanikolaou S., Chevalot I., Komaitis M., Aggelis G., Marc I. (2001) Kinetic profile of the cellular lipid composition in an oleaginous *Yarrowia lipolytica* capable of producing a cocoa-butter substitute from industrial fats. *Antonie van Leeuwenhoek*, 80, 215-224.
32. Papanikolaou S., Komaitis M., Aggelis G. (2004). Single cell oil (SCO) production by *Mortierella isabellina* grown on high-sugar content media. *Bioresource Technology* 95, 287-291.
33. Papanikolaou S., Sarantou S., Komaitis M., Aggelis G. (2004). Repression of reserve lipid turnover in *Cunninghamella echinulata* and *Mortierella isabellina* cultivated in multiple-limited media. *Journal of Applied Microbiology* 97, 867-875.
34. Papanikolaou S., Galiotou-Panayotou M., Fakas S., Komaitis M., Aggelis G. (2007). Lipid production by oleaginous *Mucorales* cultivated on renewable carbon sources. *European Journal of Lipid Science and Technology* 109, 1060-1070.
35. Peters D. (2007). Raw Materials. *Advances in Biochemical Engineering/ Biotechnology* 105, 1-30.
36. Ratledge C. (1991). Microorganisms for Lipids. *Acta Biotechnologica* 11, 429-438.
37. 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., Kakuda Y. (Eds.), Blackie academic and professional, London (UK), pp 235–291.
38. Ratledge C. (2002). Regulation of lipid accumulation in oleaginous micro-organisms. *Biochemical Society Transactions* 30, 1047-1050.

39. Ratledge C., Wynn J. (2002). The biochemistry and molecular biology of lipid accumulation in oleaginous microorganisms. *Advances in Applied Microbiology* 51, 1-51.
40. Ratledge C. (2004). Fatty acid biosynthesis in microorganisms being used for Single Cell Oil production. *Biochimie* 86, 807-815.
41. Ratledge C. (2005) Single cell oils for the 21st century. In: *Single cell oils*. Cohen Z., Ratledge C. (Eds), Champaign, Illinois: AOCS Press, p. 1–20.
42. Ratledge C., Wynn J.P. (2006). Microbial production of oils and fats. In: *Food Biotechnology*, Second Edition. Taylor & Fancis, p. 460-481.
43. Rodríguez N.R, Beltrán S., Jaime I., Diego S.M., Sanz M.T., Carballido J.R. (2010). Production of omega-3 polyunsaturated fatty acid concentrates: A review. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 11, 1-12.
44. Roynette C.E., Calder P.C., Dupertuis Y.M., Pichard C. (2004). n-3 Polyunsaturated fatty acids and colon cancer prevention. *Clinical Nutrition* 23, 139-151.
45. Sampaio F.C., Moraes C.A., Faveri D., Perego P., Converti A., Passos F.M.L. (2006). Influence of temperature and pH on xylitol production from xylose by *Debaryomyces hansenii* UFV-170. *Process Biochemistry* 41, 675-681.
46. Sajbidor J., Certik M., Dobronova S. (1988). Influence of different carbon sources on growth, lipid content and fatty acid composition in four strains belonging to *Mucorales*. *Biotechnology Letters* 10, 347-350.
47. Sánchez C. (2009). Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi. *Biotechnology Advances* 27, 185-194.
48. Shimada Y., Sugihara A., Tominaga Y. (2001). Enzymatic purification of polyunsaturated fatty acids. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 91, 529-538.
49. Skoog K., Hahn-Hagerdal B. (1988). Xylose fermentation. *Enzyme and Microbial Technology* 10, 66-80.
50. Stredanska S., Sajbidor J. (1993). Influence of carbon and nitrogen sources of the lipid accumulation and arachidonic acid production by *Mortierella alpina*. *Acta Biotechnologica* 13, 185-191.
51. Stredansky M., Conti E., Stredanska S., Zanetti F. (2000). γ -Linolenic acid production with *Thamnidium elegans* by solid-state fermentation on apple pomace. *Bioresource Technology* 73, 41-45.
52. Vicente G., Bautista L.F., Rodríguez R., Gutiérrez F.J., Sádaba I., Ruiz-Vázquez R.M., Martínez S.T., Garre V. (2009). Biodiesel production from biomass of an oleaginous fungus. *Biochemical Engineering Journal* 48, 22-27.

53. Wallis J.G., Watts J.L., Browse J. (2002). Polyunsaturated fatty acid synthesis: what will they think of next? *Trends in Biochemical Sciences* 27, 467-473.
54. Wilkenhausen E., Kuzmanova S. (1998). Microbial conversion of D-xylose to xylitol. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 86, 1-14.
55. Yahashi Y., Horitsu H., Kawai K., Suzuki T., Takamizawa K. (1996). Production of xylitol from D-xylose by *Candida tropicalis*: the effect of D-glucose feeding. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 81, 148-152.
56. www.napier.ac.uk/randkt/rtcentres/bfrc/PublishingImages/ligno