

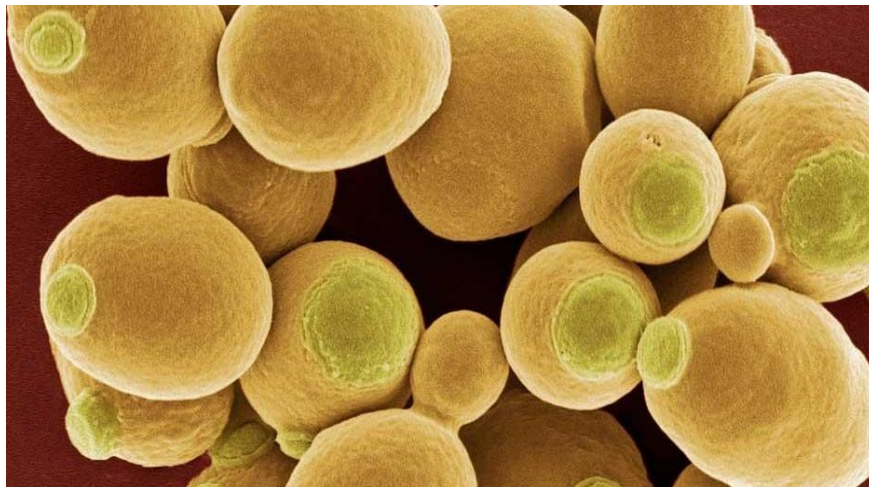


UNIVERSITY OF THE
ΑΕΓΕΑΝ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΑΙΓΑΙΟΥ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

«Μελέτη αύξησης στελεχών του ζυμομύκητα *Kluyveromyces fragilis* σε υπόστρωμα αποβλήτων τυροκομίας κάτω από διαφορετικές συνθήκες θερμοκρασίας για την παραγωγή μονοκυτταρικής πρωτεΐνης»



ΤΑΚΙΔΗΣ ΣΠΥΡΙΔΩΝ

A.M. : 6112017120

ΛΗΜΝΟΣ, ΟΚΤΩΒΡΙΟΣ 2022

Επιβλέπων καθηγητής : Δημήτριος Σαρρής, Επίκουρος καθηγητής Πανεπιστημίου Αιγαίου

Τριμελής εξεταστική επιτροπή

- Δημήτριος Σαρρής : Επίκουρος καθηγητής Πανεπιστημίου Αιγαίου
- Κωνσταντίνος Γκατζιώνης : Αναπληρωτής καθηγητής Πανεπιστημίου Αιγαίου
- Ναζίρη Ελένη : Επίκουρη καθηγήτρια Πανεπιστημίου Αιγαίου

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Για την διεξαγωγή της παρούσας πτυχιακής μελέτης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων του Τμήματος Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Πανεπιστημίου Αιγαίου, για την ανάθεση του θέματος και τη διαρκή παροχή αρωγής και στήριξης κατά μήκος της πειραματικής διαδικασίας. Το πειραματικό κομμάτι έλαβε μέρος στο Εργαστήριο Φυσικοχημικής και Βιοτεχνολογικής Αξιοποίησης Υποπροϊόντων Τροφίμων του Τμήματος Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Πανεπιστημίου Αιγαίου. Παράλληλα θα ήθελα να ευχαριστήσω την Υποψήφιο Διδάκτορα του Τμήματος Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής Δανάη Κουκουμάκη για τον χρόνο που επένδυσε και την καθοδήγηση της για την πραγματοποίηση του πειράματος. Εξίσου σημαντική ήταν η συνεισφορά της Μεταδιδάκτορας Έρης Τσούκο με την βοήθεια της σε διαφορετικά σημεία της μελέτης. Εκτιμώ βαθύτατα την πολύτιμη βοήθεια που μου παρείχε το σύνολο των μελών του Εργαστηρίου Φυσικοχημικής και Βιοτεχνολογικής Αξιοποίησης Υποπροϊόντων Τροφίμων. Καταληκτικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους γονείς μου για την στήριξη τους κατά τη διάρκεια της φοιτητικής μου περιόδου καθώς και κοντινά μου πρόσωπα για τις συμβουλές και την παρουσία τους.

Πίνακας περιεχομένων

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	4
ABSTRACT	5
1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ	6
1.1 Απόβλητα τυροκομίας	6
1.1.1 Βιομηχανία τυροκομίας	6
1.1.2 Διεθνής παραγωγή και αγορά	8
1.1.3 Απόβλητα τυροκομίας	9
1.3 Διατροφική αξία τυρογάλαου	10
1.4 Μέθοδοι διαχείρισης αποβλήτων τυροκομίας	12
1.2 Ζύμες	14
2.1 Μικροβιακή ανάπτυξη και θρέψη ζυμών	14
2.2 <i>Kluyveromyces marxianus</i>	15
1.3 Μεταβολικά μονοπάτια του <i>Kluyveromyces marxianus</i>	17
1.3.1 Φαινόμενο Crabtree	17
1.3.2 Μεταβολισμός λακτόζης	19
1.3.3 Προϊόντα βιοτεχνολογικού ενδιαφέροντος	21
1.3.3.1 Μονοκυτταρική πρωτεΐνη (Single Cell Protein, SCP)	21
1.3.3.2 Παραγωγή ενζύμων	22
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	24
2.1.1 Βιολογικό υλικό	24
2.1.2 Θρεπτικό υπόστρωμα προκαλλιέργειας	24
2.1.3 Θρεπτικό υπόστρωμα κυρίως καλλιέργειας	25
2.2 Αναλύσεις	25
2.2.1 Προσδιορισμός και διόρθωση pH	25
2.2.2 Προσδιορισμός και συλλογή βιομάζας	26
2.2.3 Προσδιορισμός λακτόζης (DNS)	26
2.2.4 Ποσοτικός προσδιορισμός μονοκυτταρικής πρωτεΐνης (Biuret)	27
2.2.5 Προσδιορισμός ελεύθερων αμινομάδων (Free amino acids, FAN)	27
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	28
3.1 Εισαγωγή	28
3.3 Μικροβιακή κινητική κατά την αύξηση του στελέχους EXF-6231 σε υπόστρωμα αποτελούμενο από 20 g/L λακτόζη τυρογάλακτος	31
3.4 Μικροβιακή κινητική κατά την αύξηση του στελέχους EXF-6232 σε υπόστρωμα αποτελούμενο από 20 g/L λακτόζη τυρογάλακτος	33
3.5 Μικροβιακή κινητική κατά την αύξηση του στελέχους EXF-9072 σε υπόστρωμα αποτελούμενο από 20 g/L λακτόζη τυρογάλακτος	34
4.ΣΥΖΗΤΗΣΗ	36
5.ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	Error! Bookmark not defined.
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	44

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στη παρούσα πτυχιακή μελέτη διερευνήθηκε η ικανότητα αύξησης των τριών διαφορετικών στελεχών του ζυμομύκητα *Kluyveromyces marxianus* EXF-6231, EXF-6232 και EXF-9072 αξιοποιώντας ως υπόστρωμα πρωτογενές τυρόγαλο σε συνθήκες χαμηλού pH, καθώς και η ικανότητα παραγωγής μονοκυτταρικής πρωτεΐνης ως μεταβολικό προϊόν της ζύμωσης. Για τον σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκαν αερόβιες ζυμώσεις προκειμένου ο μεταβολισμός του υποστρώματος να στραφεί προς την παραγωγή βιομάζας (μονοκυτταρική πρωτεΐνη) και ταυτόχρονα να αποφευχθεί ο ζυμωτικός μεταβολισμός που θα είχε ως αποτέλεσμα την παραγωγή αιθανόλης.

Η μελέτη χωρίζεται σε τέσσερις σειρές πειραμάτων, όπου μοναδική μεταβλητή αποτελεί η θερμοκρασία της ζύμωσης. Συγκεκριμένα, εφαρμόστηκαν 4 διαφορετικές θερμοκρασίες στην ζύμωση του εκάστοτε στελέχους, δηλαδή πραγματοποιήθηκαν 12 ζυμώσεις συνολικά. Οι διαφορετικές θερμοκρασίες ζυμώσεων ήταν στους 20°C, 25°C, 30°C και 35°C. Ο δείκτης pH παρέμεινε ρυθμισμένος στο 3,5 ενώ η συγκέντρωση της λακτόζης του πρωτογενούς τυρόγαλου ήταν 20±5 g/L. Οι αναλύσεις που πραγματοποιήθηκαν αφορούσαν τον προσδιορισμό της ξηρής βιομάζας, την κατανάλωση της λακτόζης του υποστρώματος, την παραγωγή μονοκυτταρικής πρωτεΐνης (SCP) και την κατανάλωση ελεύθερων αμινομάδων.

Βάσει των αποτελεσμάτων παρατηρήθηκε ικανοποιητική παραγωγή βιομάζας στη πλειονότητα των ζυμώσεων με μέγιστη τιμή αυτή του στελέχους EXF-6231 στους 30°C, $X_{\max}=9.53$ g/L. Αξιοσημείωτες ήταν και οι μέγιστες τιμές των EXF-6231 και EXF-9072 στους 30°C και 20°C αντίστοιχα, οι οποίες ήταν $X_{\max}=8.38$ g/L και $X_{\max}=8.246$ g/L. Η βέλτιστη θερμοκρασία για παραγωγή μονοκυτταρικής πρωτεΐνης (SCP) παρατηρήθηκε στους 30°C για τα στελέχη EXF-6231 και EXF-6232 και στους 25°C για το στέλεχος EXF-9072 με τιμές $SCP_{\max}=3.010$ g/L, $SCP_{\max}=3.436$ και $SCP_{\max}=2.683$, αντίστοιχα.

ABSTRACT

In this thesis, the ability to grow three different strains of the yeast *Kluyveromyces marxianus* EXF-6231, EXF-6232 and EXF-9072 using primary whey as a substrate in low pH conditions, as well as the ability to produce single-cell protein as a metabolic product of fermentation, was investigated. For this purpose, aerobic fermentations were carried out in order to shift the metabolism of the substrate towards the production of biomass (single cell protein) and at the same time to avoid the fermentative metabolism that would result in the production of ethanol.

The study is divided into four series of experiments, where the only variable is the fermentation temperature. Specifically, 4 different temperatures were applied to the fermentation of each strain, i.e. 12 fermentations were carried out in total. The different fermentation temperatures were at 20°C, 25°C, 30°C and 35°C. The pH index remained adjusted at 3.5 while the lactose concentration of the primary whey was 20 ± 5 g/L. The analyzes performed were for the determination of dry biomass, the consumption of the substrate lactose, the production of single cell protein (SCP) and the consumption of free amino groups.

Based on the results, satisfactory biomass production was observed in the majority of fermentations with a maximum value of strain EXF-6231 at 30°C, $X_{\max}=9.53$ g/L. Equally noteworthy were the maximum values of EXF-6232 and EXF-9072 at 30°C and 20°C respectively, which were $X_{\max}=9.38$ g/L and $X_{\max} = 8.246$ g/L. The optimum temperature for single cell protein production was observed in all three different yeast strains at 25°C, with values of $X_{\max}=3.010$ g/L, $X_{\max}=3.436$ and $X_{\max}=10.8323$ for EXF-6231, EXF-6232 and EXF-9072 strains respectively. The efficiency factor YSCP/X showed a satisfactory rate in all three cases with a value $>40\%$.

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Απόβλητα τυροκομίας

1.1.1 Βιομηχανία τυροκομίας

Ανάμεσα στις διάφορες κατηγορίες των συχνά καταναλωθέντων τροφίμων, το τυρί εδώ και αιώνες έχει εγκολλωθεί στην διατροφή του ανθρώπου σε διεθνές επίπεδο, λαμβάνοντας υπόψιν τις αναρρίθμητες διαφορετικές ποικιλίες του ανά τον κόσμο. Η παγκόσμια αποδοχή του δεν είναι σε καμία περίπτωση τυχαία, καθώς τα χαρακτηριστικά της γεύσης, του αρώματος και της διατροφικής αξίας αποτελούν σημαντικά κριτήρια τα οποία και πληρεί. Το εκάστοτε είδος συνδυάζει τους παραπάνω παράγοντες με μοναδικό τρόπο, έτσι η μοναδικότητα του κερδίζει μια θέση στο πολιτισμικό υπόβαθρο της χώρας προέλευσης.

Παρά το ευρύ φάσμα ποικιλιών, οι θεμελιώδεις παραγωγικές διαδικασίες παραμένουν κοινές μεταξύ του συνόλου των βιομηχανιών τυροκομίας. Το γάλα αποτελεί την πρώτη ύλη που αξιοποιείται για τη παραγωγή τυριού καθολικά και μπορεί να είναι πρόβειο, αγελαδινό, κατσικίσιο ή βοδινό.

General composition of milk intended for Gouda

Fat, %	3.4
Protein, %	3.3
Lactose, %	4.7
Total solids, %	12.5

Εικόνα 1.1 Σύσταση γάλακτος προοριζόμενου για παραγωγή τυριού Gouda (Πηγή: Dairy processing handbook)

Οι βασικές διεργασίες κατα μήκος της γραμμής παραγωγής έχουν ως εξής:

Το πρώτο βήμα αφορά την οξίνιση του γάλακτος. Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιούνται γαλακτικά βακτήρια υπο τη μορφή εναρκτήριων καλλιιεργειών. Μερικά παραδείγματα της κατηγορίας αυτής με χρήσεις στη παραγωγή πλήθους διαφορετικών τυριών αποτελούν τα *Streptococcus thermophilus*, *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus lactis* και *Propionibacterium freudenreichii*, τα οποία καταβολίζουν την λακτόζη σε πυροσταφυλικό οξύ και με τη βοήθεια του ενζύμου της γαλακτικής αφυδρογονάσης μετατρέπεται σε γαλακτικό οξύ. Ο αριθμός των εμπορικά διαθέσιμων μικροοργανισμών που μπορούν να μεταβολίζουν τη γλυκόζη και τη γαλακτόζη είναι σημαντικά μεγαλύτερος από τον αριθμό των μικροοργανισμών που μπορούν να χρησιμοποιήσουν απευθείας λακτόζη (Siso, 1996). Η ικανότητα των γαλακτικών βακτηρίων όπως του γένους *Lactobacillus* να καταβολίζουν τον δισακχαρίτη της λακτόζης σε γαλακτόζη και γλυκόζη αξιοποιείται ευρύτατα στη βιομηχανία τυροκομίας. Η διαδικασία οξίνισης είναι καθοριστική, καθώς η πτώση του pH απ' το

γαλακτικό οξύ είναι απαραίτητη για την έκβαση της επόμενης διεργασίας (Carvalho et al.2013)

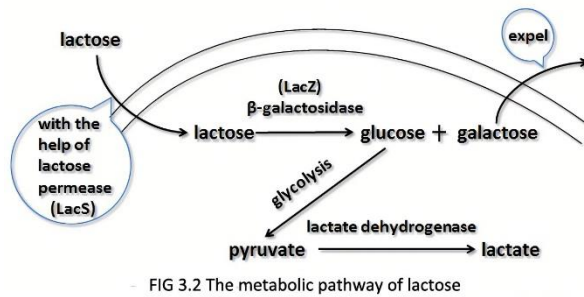
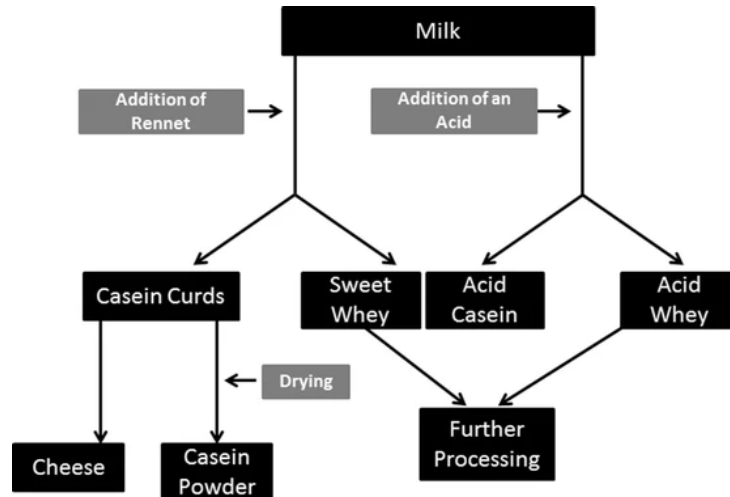


FIG 3.2 The metabolic pathway of lactose

Εικόνα 1.2 Μεταβολισμός λακτόζης από γαλακτικά βακτήρια (Πηγή: Harbin institute of technology)

- Σε επόμενο στάδιο πραγματοποιείται πήξη του γάλακτος. Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιείται η πυτιά, ένα μείγμα πηκτικών ενζύμων, κυρίως πρωτεϊνών και λιπασών. Συγκεκριμένα ένζυμα με πηκτική ικανότητα του γάλακτος αποτελούν η ρεννίνη και η πεψίνη, τα οποία δεν θα μπορούσαν να λειτουργήσουν χωρίς να προηγηθεί η πτώση του pH, καθώς η πήξη της καζεΐνης, δηλαδή της κυρίαρχης πρωτεΐνης του γάλακτος που προκαλείται από την πυτιά συμβαίνει σε pH 6,0–6,5 (Argenta,2019).
- Εφόσον έχουν δράσει τα απαραίτητα ένζυμα προκύπτει το τυρόπυγμα, που αποτελείται από την κύρια μάζα του τυριού και το πρωτογενές τυρόγαλο (Cheese Whey,CW). Στη φάση αυτή πραγματοποιείται διαχωρισμός του τυριού από το πρωτογενές τυρόγαλο μέσω κοπής σε κύβους, στράγγισης και εφαρμογή πίεσης. Σε ορισμένες χώρες όπως η Πορτογαλία, η Ισπανία, η Ιταλία και η Τουρκία, το πρωτογενές τυρόγαλο χρησιμοποιείται για την παραγωγή μαλακών τυριών (Requeijão, Requesón, Ricotta και Lor, αντίστοιχα) και άλλων προϊόντων με θρεπτικές και ιατρικές δυνατότητες (Ryan,2016). Το CW μπορεί να οξινιστεί, όπως στην περίπτωση του Ricotta, ακολουθείται θέρμανση σε θερμοκρασίες περίπου 85–90 °C για 20–30 λεπτά, για να επιτραπεί η πήξη και η επακόλουθη καθίζηση της πρωτεΐνης ορού γάλακτος και ο διαχωρισμός της μάζας τυριού πρωτογενούς τυρογάλακτος (Somella,2016). Η απόδοση παραγωγής τυριών προερχόμενων από CW είναι αρκετά μεταβλητή ανάλογα με την προέλευση του ορού γάλακτος και τη διαδικασία που χρησιμοποιείται, αλλά συνήθως, (εκτός εάν ο ορός γάλακτος έχει συμπυκνωθεί προηγουμένως) είναι χαμηλότερη από 4%. Το υγρό που απομένει μετά την αξιοποίηση του CW για παραγωγή μαλακού τυριού αντιπροσωπεύει περισσότερο από το 90% του αρχικού ορού γάλακτος και ονομάζεται δευτερογενές τυρόγαλο (Second Cheese Whey,SCW) (Pires,2021).

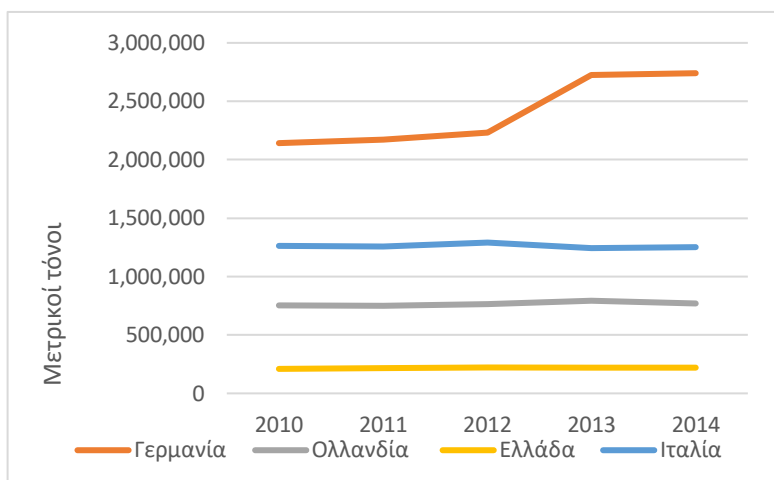


Εικόνα 1.3 Πορεία παραγωγής τυριού/τυρογάλακτος (Whey) (Ryan,2016)

1.1.2 Διεθνής παραγωγή και αγορά

Η βιομηχανία της τυροκομίας αντιπροσωπεύει μια από τις πιο κυρίαρχες αγορές στον κλάδο των τροφίμων, εφόσον τόσο η παραγωγή όσο και η κατανάλωση διατηρούν παγκόσμιο κύρος.

Οι χώρες της Ευρωπαϊκής Ένωσης και συγκεκριμένα η Γερμανία, Ολλανδία και Ιταλία αποτελούν κυρίαρχες χώρες παραγωγής τυριού.. Το 2014, η παραγωγή τυριού από πρόβειο γάλα στην Ευρωπαϊκή Ένωση (ΕΕ) έφτασε τους 329.621 τόνους, περίπου το 48,5% της αντίστοιχης παγκόσμιας παραγωγής τυριού, ενώ την ίδια χρονιά, η Ελλάδα κατείχε την πρώτη θέση παγκοσμίως σε παραγωγή πρόβειου γάλακτος ίση με 125.000 τόνους (FAOSTAT, 2019). Η παγκόσμια παραγωγή τυριού αυξάνεται με ρυθμό περίπου 2% ετησίως και έχει φτάσει πλέον τους 20 εκατομμύρια τόνους. Οι κύριοι παραγωγοί είναι η Ευρωπαϊκή Ένωση με σχεδόν το ήμισυ αυτής της ποσότητας και οι Ηνωμένες Πολιτείες με το ένα τέταρτο του συνόλου (Argenta,2019).



Γράφημα 1. 1 Σύγκριση παραγωγής τυριού μεταξύ Γερμανίας, Ολλανδίας, Ελλάδας και Ιταλίας τη περίοδο 2010-2014 (Πηγή: Nation master)

Πίνακας 1.1 Παραγωγή τυριού στην Ελλάδα την εποχή 2015-2019 (Πηγή: Nation master)

Χώρα	Προϊόν	Έτος	1000 Μετρικοί τόνοι
Ελλάδα	Τυρί	2015	188,3
Ελλάδα	Τυρί	2016	203,8
Ελλάδα	Τυρί	2017	218,8
Ελλάδα	Τυρί	2018	219,3
Ελλάδα	Τυρί	2019	222,37

1.1.3 Απόβλητα τυροκομίας

Κατα μήκος της γραμμής παραγωγής τυριού προκύπτουν απόβλητα σε αρκετά στάδια, καθένα απο τα οποία εμφανίζει διαφορετική σύσταση και ιδιότητες, ωστόσο το σύνολό τους συνοψίζεται κάτω από την έννοια του τυρόγαλου (Whey). Η τυροκομία είναι υπεύθυνη για τρεις κύριους τύπους αποβλήτων. Το πρωτογενές τυρόγαλο-CW (Cheese Whey, που προκύπτει από την παραγωγή τυριού), το δευτερογενές τυρόγαλο-SCW (Second Cheese Whey, που προκύπτει από παραγωγή μαλακού τυριού τύπου cottage) και τα υγρά απόβλητα τυρογάλακτος-CWW (Cheese Whey Wastewaters, νερό πλυσίματος με σύσταση πρωτογενούς και δευτερογενούς τυρογάλακτος σε διαφορετικές αναλογίες). Στη γαλακτοβιομηχανία τα απόβλητα τυροκομίας φέρουν σημαντικές περιβαλλοντικές επιπτώσεις λόγω των φυσικοχημικών χαρακτηριστικών τους (Prazeres, 2012).

Τις τελευταίες δεκαετίες, το τυρόγαλο θεωρείται ο σημαντικότερος ρύπος της γαλακτοβιομηχανίας, καθώς σχετίζεται με σοβαρούς περιβαλλοντικούς κινδύνους στην περίπτωση που δεν εφαρμοστούν οι απαιτούμενες διαδικασίες επεξεργασίας (Larra, 2019). Το κύριο ζήτημα έγκειται στο υψηλό οργανικό φορτίο, κυρίως λόγω της υψηλής περιεκτικότητας σε λακτόζη αλλά και σε δύσκολα βιοαποδομήσιμες

πρωτεΐνες (Yadav, 2015). Αποτελείται κυρίως από νερό, αλλά περιέχει επίσης περίπου το 50% των στερεών του γάλακτος (Lienore, 2015). Η ξηρή του μάζα διατηρεί το μεγαλύτερο μέρος της λακτόζης (66–77%, w/w), 8–15% (w/w) σε πολυάριθμους τύπους σφαιρικών πρωτεϊνών, μαζί με 7–15% (w/w) μεταλλικών αλάτων. Η ποσότητα τυρόγαλου που παράγεται σχετίζεται με την ποσότητα τυριού που παράγεται καθώς και με τον τύπο του γάλακτος, ενώ σημειώνεται ότι κατά μέσο όρο προκύπτουν 9 L τυρογάλακτος ανα 1 kg τυριού (Carvalho, 2013). Πιο συγκεκριμένα, ο δείκτης χημικά απαιτούμενου οξυγόνου (COD) κυμαίνεται μεταξύ 50.000 mg/L και 80.000 mg/L ενώ η τιμή του βιοχημικά απαιτούμενου οξυγόνου (BOD) βρίσκεται μεταξύ 40.000 και 60.000 mg/L (Chatzipraschali, 2012). Συνεπώς, το ρυπαντικό φορτίο του τυρόγαλου ενδέχεται να είναι μέχρι και 100 φορές μεγαλύτερο συγκριτικά με εκείνο των οικιακών λυμάτων. Η ταχεία κατανάλωση οξυγόνου στο έδαφος προκαλείται από τη διάσπαση των πρωτεϊνών και των σακχάρων, δημιουργώντας φαινόμενα ευτροφισμού κατά την απόρριψη σε υδροβιότοπους και στο έδαφος, εφόσον υποβαθμίζονται βιολογικά συστήματα εξαρτώμενα από οξυγόνο. Φαινόμενα ευτροφισμού ελλοχεύουν και εξαιτίας της σύστασης σε άζωτο ($0,2-1,76 \text{ kg/m}^{-3}$) και φωσφόρο ($0,124-0,54 \text{ kg/m}^{-3}$) (Prazeres, 2012). Η παγκόσμια παραγωγή τυρόγαλου το 2016 υπολογίστηκε στα 200 εκατομμύρια τόνους με ετήσια γραμμική αύξηση 3% τα τελευταία 21 χρόνια (Domingos, 2018).

Η ταξινόμηση του τυρόγαλου ως γλυκού ή όξινου εξαρτάται από τη διαδικασία που χρησιμοποιείται για την πήξη του γάλακτος. Το γλυκό τυρόγαλο λαμβάνεται από την πήξη μέσω ενζυματικής δράσης και έχει pH μεταξύ 6,0 και 6,8. Προέρχεται κυρίως από την παρασκευή τυριών Cheddar, provolone, ελβετικού τύπου και μοτσαρέλας μεταξύ άλλων. Ο όξινος ορός γάλακτος, από την άλλη πλευρά, προέρχεται από την αποσταθεροποίηση των καζεϊνών με οξίνιση, συνήθως από τη προσθήκη οξέος. Έχει pH χαμηλότερο από 6,0 και προέρχεται από την παραγωγή, για παράδειγμα, τυριού cottage και καζεΐνης του εμπορίου (Argenta, 2019).

Components	sweet whey	acid whey
Water (%)	93.0–94.0	93.0–95.0
Protein (%)	0.8–1.0	0.7–1.0
Lactose (%)	4.6–5.0	4.2–4.4
Lipids (%)	0.2–0.5	0.05–0.1
Ash (%)	0.5–0.7	0.7–0.8
Lactic acid (%)	0.05–0.2	0.5–0.8
pH	6.0–6.8	4.2–5.8

Εικόνα 1.2 Σύσταση γλυκού και όξινου τυρογάλακτος (Argenta, 2019)

1.3 Διατροφική αξία τυρόγαλου

Παρά την προσέγγιση του τυρόγαλου ως απόβλητο με επιβλαβείς περιβαλλοντικές συνέπειες, αξίζει ταυτόχρονα να αναλυθεί ως προς την διατροφική του σύσταση, καθώς οι προοπτικές αξιοποίησης των συστατικών του εξελίσσονται συνεχώς.

Η λακτόζη υπάρχει στο τυρόγαλο ως το πιο άφθονο συστατικό, αλλά έχει το χαρακτηριστικό ότι δεν χωνεύεται εύκολα από μέρος του ανθρώπινου πληθυσμού. Έτσι, η λακτόζη χρειάζεται να υδρολυθεί από το ένζυμο λακτάση. Η διαδικασία υδρόλυσης της λακτόζης είναι πολύ σημαντική και καλά καθιερωμένη σε βιομηχανική κλίμακα, επειδή επιτρέπει την ανάπτυξη προϊόντων που μπορούν να καταναλωθούν από όσους έχουν δυσανεξία σε αυτόν τον υδατάνθρακα. Επιπλέον, η υδρόλυση της λακτόζης παρέχει ορισμένα τεχνολογικά και αισθητηριακά πλεονεκτήματα, όπως υψηλότερη γλυκαντική ισχύ του υδρολυμένου προϊόντος σε σχέση με τη λακτόζη. Αυτές οι ιδιότητες είναι πολύ χρήσιμες για άλλες βιομηχανίες γαλακτοκομικών προϊόντων, ζαχαροπλαστικής και ποτών. Η υδρόλυση της λακτόζης βελτιώνει επίσης την υφή, προσδίδει κρεμώδη υφή και αποτρέπει την κρυστάλλωση της λακτόζης στα προϊόντα όπως το παγωτό. Επιπλέον, ως συνέπεια της υδρόλυσης, η βιοαποικοδόμηση του τυρογάλακτος είναι καλύτερη (Mlichonά,2006).

Ένα άλλο σημαντικό συστατικό του ορού γάλακτος είναι η πρωτεΐνη, η οποία αντιπροσωπεύει ένα μεγάλο μέρος της πρωτεΐνης αζώτου που βρίσκεται στο γάλα. Οι κύριες πρωτεΐνες του τυρόγαλου είναι η β-λακτοσφαιρίνη, η α-λακταλβουμίνη, η αλβουμίνη ορού βοοειδών, οι ανοσοσφαιρίνες, η πρωτεόζη-πεπτόνη και μερικές άλλες όπως παρουσιάζονται στον Πίνακα 2. Έχουν σημαντική θρεπτική αξία, ειδικά λόγω της υψηλής περιεκτικότητάς τους σε απαραίτητα αμινοξέα και λειτουργικές ιδιότητες που ενδιαφέρουν τη βιομηχανία.

Whey Proteins	Bovine Whey	Ovine Whey	Caprine Whey
β-Lactoglobulin	53.3–66.0	73.1	46.6
α-Lactalbumin	15.0–20.0	17.9	18.3
Serum Albumin (SA)	6.0–7.0	2.7	5
Immunoglobulins	11.0–13.3	-	-
Lactoferrin	0.7-3.3	1.6	2
Lactoperoxidase	0.5–1.0	-	-
Enzymes	0.5	-	-

Εικόνα 1.3 Πρωτεϊνική σύσταση τυρόγαλου βοδινής, πρόβειας και γίδινης προέλευσης

Η θρεπτική ποιότητα των πρωτεϊνών ορού γάλακτος είναι ευρέως γνωστή. Ο ορός γάλακτος έχει βιολογική αξία (Biological Value, BV) 104, η οποία είναι υψηλότερη από τις τιμές για το αυγό, τη σόγια και την πρωτεΐνη του κρέατος (Argenta,2019). Σύμφωνα με τον Smithers (2015), η βιολογική αξία είναι ένας τρόπος μέτρησης της ποιότητας μιας πρωτεΐνης, καθώς σχετίζεται με την ικανότητα του σώματος να αφομοιώνει, να απορροφά και να χρησιμοποιεί τα αμινοξέα της για τη σύνθεση νέων πρωτεϊνών.

Οι πρωτεΐνες ορού γάλακτος έχουν επίσης τη δυνατότητα να μετατραπούν σε βιοενεργά πεπτίδια, τα οποία ορίζονται ως συγκεκριμένα θραύσματα πρωτεΐνης που έχουν θετικό αντίκτυπο στις λειτουργίες του σώματος και μπορούν να προάγουν την καλή υγεία και την πρόληψη ασθενειών (Kitts,2003). Επιπλέον, σύμφωνα με τον Sinha. et al.2007, η κλασμάτωση των πρωτεϊνών σε μικρότερες υπομονάδες μπορεί να αυξήσει τη δυνατότητα εφαρμογής των πρωτεϊνών ορού γάλακτος σε προϊόντα διατροφής μέσω της βελτίωσης των λειτουργικών ιδιοτήτων, όπως η διαλυτότητα, η γαλακτωματοποιητική ισχύς και η υφή.

1.4 Μέθοδοι διαχείρισης αποβλήτων τυροκομίας

Στο παρελθόν, τα περισσότερα τυροκομεία απέρριπταν τα απόβλητα τους με εφαρμογή εδάφους ή απευθείας απόρριψη σε ύδατα υποδοχής (ποτάμια, λίμνες, ωκεανοί κ.λπ.) χωρίς καμία προεπεξεργασία. Άλλες λιγότερο δραματικές λύσεις εξέτασαν την κατασκευή δεξαμενών αποθήκευσης/λιμνοθάλασσες, την απόρριψη στο σύστημα αποχέτευσης ή ακόμα και για τη διατροφή των ζώων (Prazeres,2012). Η αραιώση των λυμάτων τυριού είναι μια εναλλακτική λύση που εξετάζει την ανάμιξη του CW με λιγότερο μολυσμένα λύματα όπως τα οικιακά λύματα. Ωστόσο, ακόμη και τα αραιωμένα λύματα μπορεί να βλάψουν την αποτελεσματικότητα και τη σταθερότητα των μικροοργανισμών που αξιοποιούνται στις εγκαταστάσεις επεξεργασίας αστικών λυμάτων. Σε κάθε περίπτωση, αυτές οι εναλλακτικές λύσεις δεν είναι επαρκώς ελκυστικές, ειδικά για τα μικρομεσαία εργοστάσια, με αποτέλεσμα η διαχείριση των λυμάτων τυριού γίνεται σημαντική πρόκληση λόγω αυστηρών νομικών απαιτήσεων (Farizoglu et al.,2007).

Μπορούν να εξεταστούν δύο κατηγορίες στη διαχείριση των αποβλήτων τυριού:

- Βιοτεχνολογικές μέθοδοι

- Αερόβιες διεργασίες : Κατά τη διάρκεια αερόβιων διεργασιών χρησιμοποιούνται μικροοργανισμοί με ικανότητα αερόβιας ζύμωσης και επακόλουθης αποδόμησης του τυρόγαλου. Η συγκεκριμένη μέθοδος εφαρμόζεται κυρίως για τη παραγωγή βιομάζας και επιθυμητών ενζύμων, ενώ ταυτόχρονα το οξυγόνο που προμηθεύεται ο μικροοργανισμός αξιοποιείται προκειμένου να ελαττωθεί το ρυπαντικό φορτίο του τυρόγαλου μέσω οξειδωσης. Χαρακτηρίζεται από σχετικά υψηλό ρυθμό αποδόμησης οργανικού φορτίου σε θερμοκρασία δωματίου (22-24° C), ωστόσο έχει βρεθεί πως το υψηλό οργανικό φορτίο του CW καθιστά τις διεργασίες αυτές μη-αποδοτικές (Prazeres et al.,2012). Αυτό οφείλεται στον περιορισμό μεταφοράς του οξυγόνου που υφίσταται σε έντονα μολυσματικά απόβλητα (Ozmihi, 2007).

- Αναερόβιες διεργασίες : Η αναερόβια επεξεργασία του τυρόγαλου οδηγεί στη παραγωγή αιθανόλης, κιτρικού, οξικού, γαλακτικού οξέος και υδρογόνου (Yadav et al.,2015). Σε γενικές γραμμές, η συγκεκριμένη επεξεργασία παρουσιάζει υψηλές αποδόσεις απομάκρυνσης οργανικού φορτίου, ωστόσο περιορίζεται σημαντικά εξαιτίας της χαμηλής αλκαλικότητας που απαιτείται για να διεξαχθεί, καθώς και από δυσκολίες αποικοδόμησης των πτητικών λιπαρών οξέων. Προκειμένου να διευκολυνθεί η διεργασία έχουν προταθεί εφαρμογές που περιλαμβάνουν προσθήκη αλκαλικών μέσων (Frigon et al.,2009).

- Φυσικοχημικές μέθοδοι

- Κροκίδωση, πήξη και καθίζηση

Μεταξύ των διαφορετικών διαθέσιμων φυσικοχημικών μεθόδων, η συγκεκριμένη αποτελεί την απλούστερη και πιο οικονομική. Πραγματοποιείται καθίζηση των

πρωτεϊνών του τυρόγαλου (καζεϊνών) μέσω ρύθμισης του pH κοντά στο ισοηλεκτρικό σημείο των καζεϊνών (pH=4,6). Χρησιμοποιούνται πηκτικά μέσα όπως FeSO_4 και FeCl_3 τα οποία μειώνουν το BOD και COD σε αποδεκτές τιμές, ενώ ταυτόχρονα μετά το πέρας της διεργασίας υπάρχει δυνατότητα εφαρμογής αερόβιας επεξεργασίας για περαιτέρω μείωση του ρυπαντικού φορτίου (Rivas et al.,2010).

➤ Οξείδωση

Στη μέθοδο αυτή αξιοποιούνται ισχυρά οξειδωτικά μέσα προκειμένου να αποικοδομηθούν ενώσεις που προσδίδουν το έντονο ρυπαντικό φορτίο του τυρόγαλου. Δεν συνίσταται για την επεξεργασία των CWW. Αναμένονται καλύτερα αποτελέσματα όταν χρησιμοποιείται σε συνέχεια άλλης μεθόδου επεξεργασίας. Συγκεκριμένα, έχουν βρεθεί αποδοτικές εφαρμογές όζοντος με αποδεκτή μείωση του COD (Martins, 2010). Περιοριστικός παράγοντας αποτελεί το υψηλό κόστος (Carvalho et al.,2013).

➤ Τεχνολογίες μεμβράνης

Διεργασίες διαχωρισμού μέσω μεμβράνης χρησιμοποιούνται με σκοπό την ανάκτηση πρωτεϊνών και λακτόζης από το CW και SCW. Η εφαρμογή τους οδηγεί σε μικρότερη παραγωγή των CWW, ενώ το διήθημα είναι διαυγές και παρουσιάζει προοπτικές επαναχρησιμοποίησης. Στις διεργασίες αυτές περιλαμβάνονται οι εφαρμογές μικροδιήθησης(MF), υπερδιήθησης (UF), νανοδιήθησης (NF) και αντίστροφης όσμωσης (RO). Η NF και RO χρησιμοποιούνται για την ανάκτηση λακτόζης σε ποσοστό έως και 89 %, με επακόλουθη απόδοση μείωσης COD έως και 90 %. Αντίθετα, η MF και UF δεν συγκρατούν λακτόζη το ίδιο αποτελεσματικά (<40%), ωστόσο εμφανίζουν καλή ικανότητα συγκράτησης πρωτεϊνών και λιπιδίων (Souza et al.,2010). Εξαιτίας των υψηλών απαιτούμενων πιέσεων, οι τεχνολογίες μεμβράνης εμφανίζουν υψηλό κόστος.

Η διαχείριση του CW έχει επικεντρωθεί στην αξιοποίηση και τις βιολογικές διεργασίες, ενώ ο έλεγχος του CWW έχει εξελιχθεί στην εφαρμογή βιολογικών διεργασιών φυσικοχημικής διαχείρισης ή του συνδυασμού βιολογικών και φυσικοχημικών τεχνολογιών (Gannoun et al., 2008). Το κόστος που σχετίζεται με τις τεχνολογίες αξιοποίησης δεν είναι συνήθως ανεκτές σε μικρά και μεσαία εργοστάσια, επομένως οι βιολογικές και/ή φυσικοχημικές επεξεργασίες αποτελούν μια βιώσιμη και πιο ελκυστική εναλλακτική λύση. Στον πίνακα 2 συνοψίζονται οι διαφορετικές φύσεως διαδικασίες επεξεργασίας του τυρόγαλου.

1.2 Ζύμες

Οι ζύμες (ή ζυμομύκητες) είναι ευκαρυωτικοί μονοκύταροι μικροοργανισμοί που ανήκουν στο βασίλειο των μυκήτων. Το βασίλειο των μυκήτων ταξινομείται σε τέσσερα βασικά φύλα : *Chytridiomycota*, *Zygomycota*, *Ascomycota* και *Basidiomycota*. Τα φύλα αυτά έχουν κοινό πρόγονο ωστόσο διαφοροποιήθηκαν εξελικτικά πριν από εκατομμύρια χρόνια. Ζύμες περιλαμβάνονται μόνο στα φύλα *Ascomycota* και *Basidiomycota*. Πρόκειται για χημειοετερότροφους μικροοργανισμούς ενώ σπανίως εμφανίζουν παθογονικότητα. Κατά κανόνα δεν διαθέτουν ικανότητα αυτόνομης κίνησης και αναπτύσσονται υπο μορφή διακλαδιζόμενων νηματίων που ονομάζονται υφές (Aggelis, 2017). Υφές των *Ascomycota* και *Basidiomycota* παρουσιάζουν εγκάρσιες διατομές που αποκαλούνται σέπτα, οι οποίες τις χωρίζουν σε κύτταρα. Οι ζύμες έχουν την ικανότητα να διασπούν τα απλά σάκχαρα (γλυκόζη, φρουκτόζη κτλ.) προς CO₂ και αλκοόλη ενώ εκλύεται μικρή ποσότητα θερμότητας.

Υπολογίζεται ότι οι Αιγύπτιοι, πριν από 4000 περίπου χρόνια, γνώριζαν και χρησιμοποιούσαν τη ζύμωση για τη παραγωγή ζύθου, οίνου και άρτου, όπως συνάγεται από τις παραστάσεις ζυθοποιείων και αρτοποιείων που είναι σκαλισμένες στους τοίχους των τάφων του Φαραώ. Το αίτιο της ζυμώσεως, δηλαδή τα κύτταρα της ζύμης, ως μικροσκοπικά φυτά γνώρισε και μελέτησε ο άνθρωπος σε πολύ μεταγενέστερους χρόνους, αφορμή υπήρξαν ουσιαστικές εξελίξεις στον τομέα των μεγεθυντικών φακών και των σύνθετων μικροσκοπίων. Αξίζει να επισημανθεί το γεγονός ότι οι πρώτοι μικροοργανισμοί που παρατηρήθηκαν χρησιμοποιώντας την τεχνολογία αυτή από τον πρωτεργάτη Antony van Leeuwenhoek το έτος 1680 ήταν κύτταρα ζύμης (κατά πάσα πιθανότητα του γένους *Saccharomyces*) (Μπαλατσούρας, 2006).

Οι ζύμες ως μικροοργανισμοί συγκεντρώνουν ολοένα και μεγαλύτερο ενδιαφέρον ανά τον κόσμο, καθώς η δράση τους επηρεάζει βαθύτατα τη ζωή του ανθρώπου. Αρκεί να σημειωθεί ότι οι μεγαλύτερες βιομηχανίες τροφίμων, όπως η αρτοποιία και η βιομηχανία των αλκοολούχων ποτών έχουν ως ακρογωνιαίους λίθους τη μεταβολιστική δραστηριότητα των ζυμών (Μπαλατσούρας, 2006). Στο σημείο όμως αυτό θα πρέπει να επισημανθεί ότι οι δραστηριότητες της ομάδας αυτής περιορίζονται και εξαντλούνται στην αλκοολική ζύμωση ζαχαρούχων πρώτων υλών για την παραγωγή αλκοολούχων ποτών και άλλων εμπορικά διαθέσιμων προϊόντων. Πολλές πτυχές των μικροοργανισμών αυτών παραμένουν ανεκμετάλλευτες, οι οποίες εφόσον μελετηθούν και βρουν κατάλληλη εφαρμογή από εξειδικευμένους επιστήμονες μπορούν να προσφέρουν πολύτιμο έργο στον άνθρωπο.

2.1 Μικροβιακή ανάπτυξη και θρέψη ζυμών

Υπόστρωμα για την έκβαση επιθυμητών βιοδιεργασιών μέσω ζυμομυκήτων μπορεί να αποτελεί τόσο ένα υγιές υλικό εργαστηριακής προέλευσης, όσο και κατάλοιπα της βιομηχανίας ή υποπροϊόντα υπο τη μορφή απόβλητων που παραμένουν ανεκμετάλλευτα ή χρήζουν επεξεργασίας. Παρά τις διαφορετικές φύσεις των υποστρωμάτων, η περιεκτικότητά τους σε απαραίτητα συστατικά είναι κρίσιμη για την ανάπτυξη τους και έχει ως εξής :

- **Νερό** : Το νερό πρέπει να καταλαμβάνει τουλάχιστον 30% του θρεπτικού μέσου
- **Πηγή άνθρακα** : Οι ζύμες προσλαμβάνουν άνθρακα και κατα συνέπεια ενέργεια απο χημικές ενώσεις και κυρίως σάκχαρα. Η γλυκόζη μεταβολίζεται απο όλα τα είδη, ενώ αρκετές ζύμες προτιμούν δισακχαρίτες ως πηγή άνθρακα. Τέλος, το CO₂ μπορεί να καλύψει περίπου το 5% των απαιτήσεων και χρησιμοποιείται για βιοσύνθεση δομικών στοιχείων όπως αμινοξέα, πουρίνες, πυριμιδίνες και λιπαρά οξέα.
- **Πηγή αζώτου**
- **Οξυγόνο** : Σε πλήρη απουσία οξυγόνου οι ζύμες δεν αναπτύσσονται. Αποτελεί απαραίτητο στοιχείο για τα ένζυμα της αναπνοής και τη σύνθεση στερολών και λιπαρών οξέων.
- **Στοιχεία απαραίτητα για τη κυτταρική σύνθεση**: Σε αυτά συγκαταλέγονται το θείο, ο φώσφορος, το μαγνήσιο. Αξίζει να σημειωθεί πως τα ιόντα υδρογόνου έχουν ιδιαίτερη σημασία για την ανάπτυξη των ζυμών, διότι ρυθμίζουν το ενδοκυττάριο και εξωκυττάριο pH. Οι ζύμες αναπτύσσονται τα μέγιστα σε τιμές pH μεταξύ 4.0 και 6.0
- **Βιταμίνες, ιχνοστοιχεία, αυξητικοί παράγοντες**

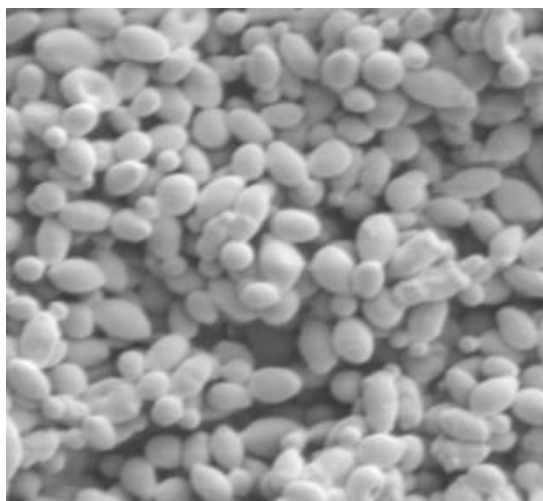
Η εξέλιξη του κύκλου ζωής των ζυμών έχει ως εξής:

1. Λανθάνουσα φάση : Λαμβάνει χώρα η προσαρμογή των κυττάρων στις νέες συνθήκες χωρίς να παρατηρείται αύξηση του πληθυσμού.
2. Φάση επιτάχυνσης : Αρχή πολλαπλασιασμού των κυττάρων.
3. Εκθετική φάση: Σε αυτή τη φάση τα κύτταρα αναπτύσσονται με ραγδαίο ρυθμό, με αποτέλεσμα η καμπύλη ανάπτυξης να παρουσιάζει απότομη αύξηση.
4. Φάση επιβράδυνσης: Η ταχύτητα ανάπτυξης των κυττάρων μειώνεται.
5. Στατική φάση: Ο πληθυσμός των κυττάρων είναι μεταβολικά ενεργός, ωστόσο δεν παρατηρείται κυτταρική αύξηση. Απόρροια αυτού είναι η καμπύλη να εμφανίζεται οριζόντια.
6. Φάση θανάτου: Λαμβάνει χώρα λύση των κυττάρων και απελευθέρωση των ενδοκυτταρικών συστατικών τους. Η μείωση του πληθυσμού εμφανίζεται με απότομη καθοδική πορεία της καμπύλης ανάπτυξης.

2.2 *Kluyveromyces marxianus*

Ο ζυμομύκητας *Kluyveromyces marxianus* είναι ασκομύκητας που ανήκει στην οικογένεια *Saccharomycetaceae*. Περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1888 από τον E.C. Hansen, ο οποίος εκείνη την εποχή ονομαζόταν *Saccharomyces marxianus* από τον Marx, το πρόσωπο που αρχικά τον απομόνωσε από σταφύλια (Lodder and Kreger-van Rij 1952). Έκτοτε, το γένος *Kluyveromyces* περιλαμβάνει 6 είδη ζυμομυκήτων (Lachance, 2007). Αυτά είναι *Kluyveromyces aestaurii*, *nonfermentans*, *wikerhamii*, *lactis*,

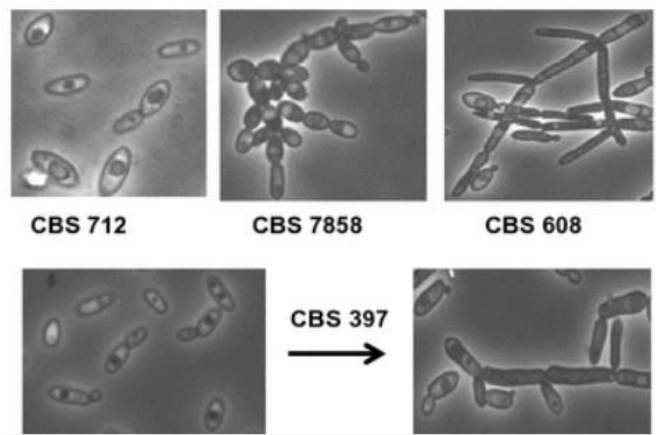
marxianus και *dobzhanskii*. Ο ζυμομύκητας είναι ευρέως γνωστός λόγω της συχνής αξιοποίησης του κατά τη παραγωγή παραδοσιακών γαλακτοκομικών προϊόντων όπως το κεφίρ, το γιαούρτι, το τυρί και ούτω καθεξής (Coloretti et al., 2017). Πρόσφατα έχει κεντρίσει ιδιαίτερο ερευνητικό ενδιαφέρον, λόγω των ευεργετικών του χαρακτηριστικών που τον καθιστούν υποψήφιο για πλήθος βιομηχανικών εφαρμογών. Αυτά τα χαρακτηριστικά περιλαμβάνουν κυρίως την ικανότητα χρήσης ενός ευρέως φάσματος σακχάρων, συμπεριλαμβανομένης της λακτόζης και της ινουλίνης, την θερμοανεκτικότητα, την έκκριση λυτικών ενζύμων, τον υψηλότερο ρυθμό ανάπτυξης από άλλους ευκαρυώτες και την παραγωγή βιο-αιθανόλης με ζύμωση (Lane and Morrissey, 2010 Varela et. al., 2017). Συγκεκριμένα η ιδιαίτερη θερμοανεκτικότητα σε θερμοκρασίες μεταξύ 44 και 52 °C καθώς και ο γρήγορος ρυθμός ανάπτυξης, διπλάσιος από αυτόν του *S. cerevisiae* καλλιεργούμενο σε πλούσιο θρεπτικό μέσο (Morrissey, 2017), προσδίδουν μεγάλες προοπτικές αξιοποίησης σε βιοδιεργασίες βιομηχανικής κλίμακας. Παράλληλα, αξίζει να αναφερθεί η ανθεκτικότητά του σε χαμηλές τιμές pH, όπως για παράδειγμα η ανάπτυξη του σε pH 3.5 στην μελέτη των Yadav et al. (2014).



Εικόνα 1.6 *Kluyveromyces marxianus*

Επιπλέον, έχει εξασφαλίσει τον τίτλο GRAS (Generally Regarded As Safe) στην Ευρωπαϊκή Ένωση και στις Ηνωμένες Πολιτείες, λαμβάνοντας υπόψιν την χρήση του στη βιομηχανία γαλακτοκομικών προϊόντων, γεγονός που τον καθιστά ιδιαίτερα κατάλληλο για την παραγωγή φαρμακευτικών προϊόντων και πρωτεϊνών για τρόφιμα (Karim, 2020). Γενικά απομονώνεται από ευρέως φάσματος φυσικούς οικοτόπους, παραδοσιακά γαλακτοκομικά προϊόντα που έχουν υποστεί ζύμωση όπως κεφίρ, απόβλητα από βιομηχανίες ζάχαρης, αποσυντιθέμενα φρούτα και φυτά (Morrissey, 2017). Ο *K. marxianus* μπορεί να μεταβολίσει ποικιλία υποστρωμάτων χαμηλού κόστους, συμπεριλαμβανομένου του τυρόγαλου ή άλλων γαλακτοκομικών αποβλήτων λόγω των μοναδικών φυσιολογικών χαρακτηριστικών του και έχει την ικανότητά να παράγει μονοκυτταρική πρωτεΐνη ή SCP (Single Cell Protein). Αυτή η ικανότητα το καθιστά υποψήφιο για εμπορικές εφαρμογές στις βιομηχανίες φαρμακευτικών προϊόντων, τροφίμων και ζωοτροφών (Löser et al., 2013· Morrissey et al., 2015). Ωστόσο, παρά τις εκτεταμένες βιοτεχνολογικές του εφαρμογές, συμπεριλαμβανομένης της παραγωγής βιοαιθανόλης από τυρόγαλο, της συσσώρευσης βιομάζας, της παραγωγής πολύτιμων ενζύμων όπως η ινουλινάση και η β-γαλακτοσιδάση κ.λπ., δεν έχει μελετηθεί στον ίδιο βαθμό συγκριτικά με άλλα είδη

ζυμομυκήτων παρόμοιας φυσιολογίας και χρησιμότητας όπως τα είδη *Kluyveromyces lactis* και *Saccharomyces cerevisiae* (Lane and Morrissey, 2010) και έχει αναφερθεί εκτεταμένη φυσιολογική διαφοροποίηση (Lane et al. 2011). Πρόκειται για μια πολυμορφική ζύμη και ανάλογα με το στέλεχος και τις περιβαλλοντικές συνθήκες, μπορεί να αναπτυχθεί σε μορφή κυττάρων ζυμομύκητα, ψευδοϋφών ή και υφών, όπως φαίνεται στην Εικόνα 2.

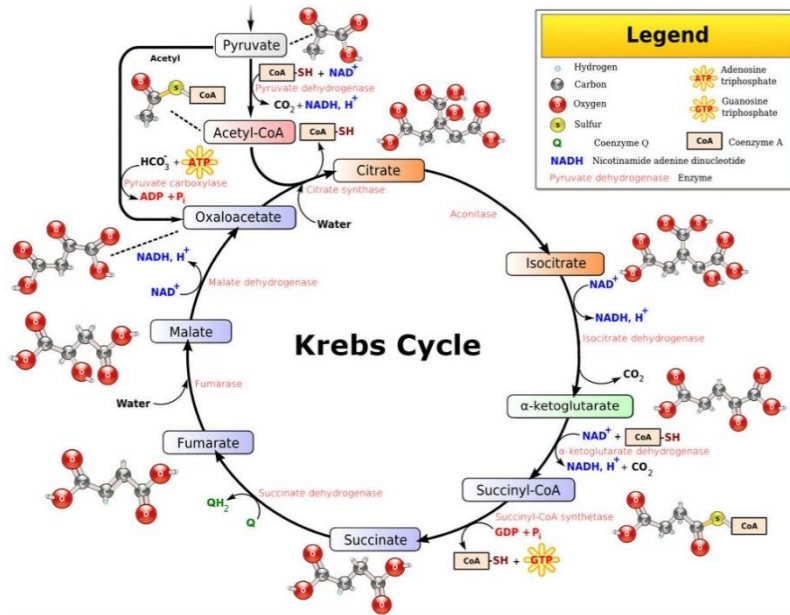


Εικόνα 1.7 Διαφοροποίηση κυτταρικής ανάπτυξης του *K. marxianus* ανάλογα με το εκάστοτε στέλεχος και το περιβάλλον, CBS 712: Ζυμομύκητας, CBS 7858 : Ψευδοϋφές, CBS 608: Υφές, CBS 397: Το στέλεχος εμφανίζει διαφορετική μορφολογία κυττάρων σε δύο διαφορετικά περιβάλλοντα (Morrissey, 2017)

1.3 Μεταβολικά μονοπάτια του *Kluyveromyces marxianus*

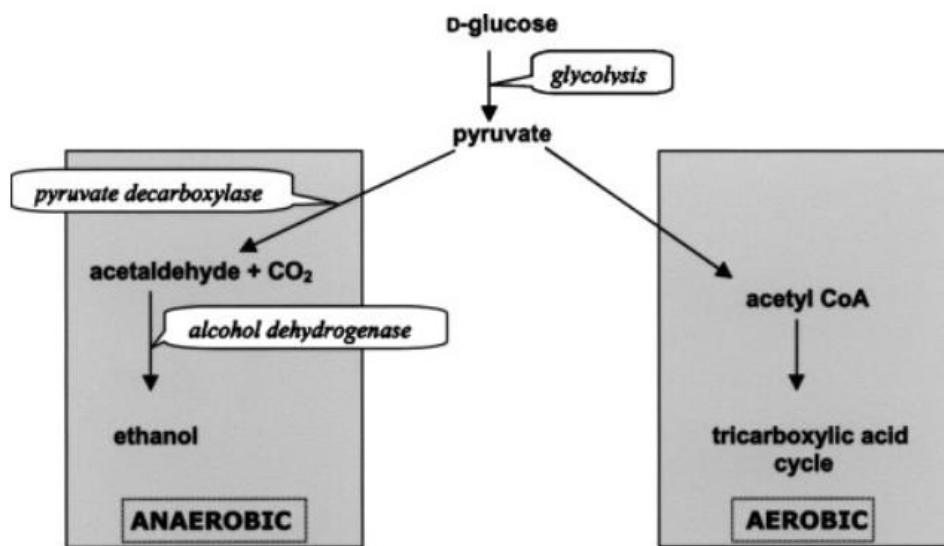
1.3.1 Φαινόμενο Crabtree

Ο *K. marxianus* είναι ζυμομύκητας του οποίου ο μεταβολισμός είναι αναπνευστικού-ζυμωτικού τύπου, παρόμοιος με αυτόν του *S. cerevisiae*. Έτσι, δύναται να παράγει ενέργεια μέσω του κύκλου του Krebs έπειτα από οξειδωτική φωσφορυλίωση, καθώς και από τη ζύμωση των σακχάρων σε αιθανόλη. Ως σημείο αναφοράς, ο *S. cerevisiae* ακολουθεί έντονα την πορεία της ζύμωσης ακόμη και υπό αερόβιες συνθήκες, υπονοώντας ότι το κύτταρο κατευθύνει κατά προτίμηση το πυροσταφυλικό οξύ προς την παραγωγή αιθανόλης. Συγκεκριμένα, οι J.A. Barnett et al. 2005, αναφέρουν ότι σε συγκέντρωση 5,6 % ο *Saccharomyces cerevisiae* ζυμώνει τη γλυκόζη έως ότου εξαντληθεί. Αυτό το φαινόμενο ονομάζεται φαινόμενο Crabtree. Λόγω των ισχυρών «θετικών στο Crabtree» χαρακτηριστικών του *S. cerevisiae*, συνήθως χρειάζεται μια ρυθμισμένη παροχή της πηγής άνθρακα για να αποφύγει τον ζυμωτικό μεταβολισμό, ο οποίος είναι εξαιρετικά ανεπιθύμητος σε εφαρμογές που κατευθύνονται στη παραγωγή βιομάζας.



Εικόνα 1.8 Κύκλος του Krebs

Αντίθετα, ο *K. marxianus* κατηγοριοποιείται ως Crabtree-αρνητικός, που σημαίνει μερική ή πλήρης ανικανότητα για αποτελεσματική ζύμωση των σακχάρων σε αιθανόλη (Fonseca et al., 2008; Lane et al., 2011). Οι επικρατούσες αναφορές εφαρμογής στην παραγωγή αιθανόλης υποδηλώνουν ότι και τα δύο είδη φέρουν τα γονίδια που απαιτούνται για την παραγωγή αιθανόλης και θα μπορούσαν να υιοθετήσουν την μεταβολική πορεία της ζύμωσης υπό ορισμένες συνθήκες (Merico et al., 2007). Ωστόσο, έχει αποδειχθεί ότι ο *K. marxianus* παρουσιάζει μια ισχυρή «αρνητική για το Crabtree» ιδιότητα και αυτό υποστηρίχθηκε από το γεγονός ότι δεν παράγει αιθανόλη, σε αντίθεση με αυτό που παρατηρείται σε μεγάλο βαθμό στην περίπτωση του *S. cerevisiae* που είναι γνωστός ως ισχυρός παραγωγός αιθανόλης (Merico et al., 2009). Αυτό το φαινομενικά αντικρουόμενο εύρημα οφείλεται πιθανώς στη μεταβλητότητα μεταξύ διαφορετικών στελεχών, καθώς οι περισσότερες συγκριτικές μελέτες ζυμομύκητα χρησιμοποιούν μόνο ένα αντιπροσωπευτικό στέλεχος για κάθε είδος και το επίπεδο φυσιολογικής διακύμανσης ανά στέλεχος δεν αξιολογείται. Μπορεί να συναχθεί το συμπέρασμα ότι υπάρχει υψηλός βαθμός ενδοειδικής διαφοροποίησης για αυτή τη ζύμη, όχι μόνο από την άποψη της γενετικής της, αλλά και της φυσιολογίας της (Lane et al., 2011).

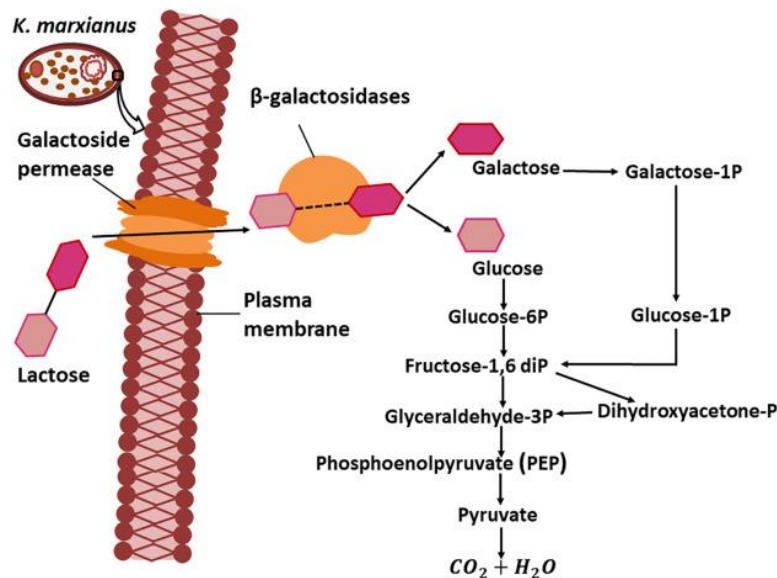


Εικόνα 1.9 Πορεία μεταβολισμού του πυροσταφυλικού οξέος υπό αερόβιες και αναερόβιες συνθήκες

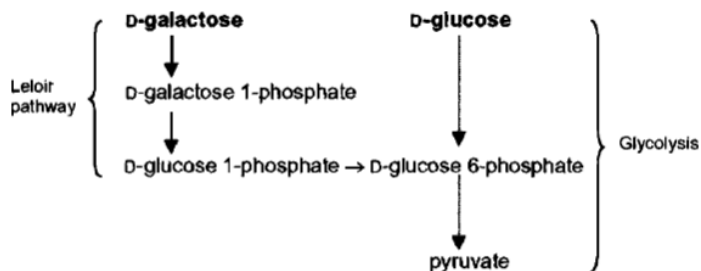
Για εφαρμογές όπου η βιομάζα είναι σημαντική, αυτή η διαφορά μεταξύ των ειδών ζύμης είναι κρίσιμη. Πρέπει επίσης να ληφθεί υπόψη, ότι το φαινόμενο Crabtree προκύπτει από διάφορους παράγοντες/επιδράσεις και μπορεί να μην διακρίνεται εξίσου σε όλα τα είδη. Έτσι, υπάρχει ένα φάσμα μεταξύ των ακραίων Crabtree θετικών και Crabtree αρνητικών ζυμών και η ισχύς του αποτελέσματος μπορεί να επηρεαστεί από εξωγενείς παράγοντες. Όπως αναφέρθηκε, η διακύμανση της ισχύος του αποτελέσματος εμφανίζεται ακόμη και εντός των ειδών, γεγονός που εξηγεί γιατί ορισμένα, αλλά όχι όλα, στελέχη του *K. marxianus* είναι πολύ αποτελεσματικοί παραγωγοί αιθανόλης (Hong et al., 2007, Nonklang et al., 2008). Η μηχανιστική βάση του φαινομένου Crabtree δεν είναι ακόμα πλήρως κατανοητή, αλλά πιθανώς προκύπτει από έναν συνδυασμό κορεσμού ενζύμων υπό υψηλή γλυκολυτική ροή, καταστολής γλυκόζης των ενζύμων TCA και έκφρασης ειδικών μεταβολικών αντιδράσεων εξισορρόπησης οξειδοαναγωγής (Merico et al., 2007).

1.3.2 Μεταβολισμός λακτόζης

Το κύριο μεταβολικό χαρακτηριστικό του *K. marxianus* είναι η ικανότητά του να αφομοιώνει τη λακτόζη και να χρησιμοποιεί αυτό το σάκχαρο ως πηγή άνθρακα. Αυτό είναι ένα από τα πιο σημαντικά χαρακτηριστικά που τον ξεχωρίζουν από το *S. cerevisiae*, το οποίο στερείται αυτού του φαινοτύπου (Lane and Morrissey, 2010). Ως αποτέλεσμα, θεωρείται θετικός στη λακτόζη και φέρει ζεύγος γονιδίων LAC12-LAC4 που είναι υπεύθυνο για την πρόσληψη και την επακόλουθη διάσπαση της λακτόζης σε γαλακτόζη και γλυκόζη (Vigneault et al., 2007).



Εικόνα 1.10 Αναπαράσταση εισαγωγής και μεταβολισμού της λακτόζης από τον *Kluyveromyces marxianus* (Karim,2020)



Εικόνα 1.11 Μετατροπή της γαλακτόζης σε γλυκόζη και εισαγωγή στον γλυκολυτικό κύκλο (Barnett,2005)

Οι ζύμες με την ικανότητα ζύμωσης των δισακχαριτών όπως η λακτόζη είναι περιορισμένες. Προκειμένου ο *K. Marxianus* να ζυμώσει τη λακτόζη θα πρέπει το κύτταρο να εκκρίνει β-γαλακτοσιδάση. Το ένζυμο αυτό είναι εντοπισμένο στο εσωτερικό του κυττάρου της ζύμης, με αποτέλεσμα ο δισακχαρίτης να περνά ανέπαφος την κυτταρική μεμβράνη και να υφίσταται υδρόλυση μέσα στο κύτταρο (Μπαλατσούρας,2005). Αφού δράσει η β-γαλακτοσιδάση, η λακτόζη υδρολύεται προς ισομοριακό μείγμα γλυκόζης και γαλακτόζης. Απο τους δύο μονοσακχαρίτες που προκύπτουν, προκειμένου να χρησιμοποιηθεί η γαλακτόζη μέσω του γλυκολυτικού κύκλου εκκρίνεται το ένζυμο της γαλακτοζο-βαλντινάσης, το οποίο αντιστρέφει το Η και το ΟΗ στο τέταρτο μόριο του άνθρακα. Με αυτή τη μοριακή μετατροπή η γαλακτόζη μετατρέπεται σε γλυκόζη και αφού διεξαχθεί γλυκόλυση Embden-Meyerhoff-Parnas, το πυροσταφυλικό οξύ κατευθύνεται είτε προς ζύμωση είτε προς τον κύκλο του Krebs εάν οι συνθήκες είναι αναερόβιες ή αερόβιες, αντίστοιχα. Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι δεν μπορεί να αναπτυχθεί κάτω από αυστηρά αναερόβιες συνθήκες και ότι η παραγωγή αιθανόλης συνδέεται σχεδόν αποκλειστικά με τον περιορισμό του οξυγόνου (Visser et al. 1990; van Dijken et al. 1993; Bellaver et al. 2004). Οι Blank et al. (2005) απέδειξαν ότι ο *K. marxianus* παρουσιάζει την υψηλότερη ροή κύκλου του Krebs κατά την ανάπτυξη καλλιέργειας σε γλυκόζη μεταξύ των 14 ημιασκομυκήτων ζυμών που μελετήθηκαν στην κοινοπραξία Génolevures.

1.3.3 Προϊόντα βιοτεχνολογικού ενδιαφέροντος

1.3.3.1 Μονοκυτταρική πρωτεΐνη (Single Cell Protein, SCP)

Οι μονοκυτταρικές πρωτεΐνες (SCP) παράγονται από μονοκύτταρους μικροοργανισμούς των οποίων η βιομάζα ή τα εκχυλίσματα πρωτεΐνης προέρχονται από καθαρά ή μικτά μικροφύκη, ζυμομύκητες, ανώτερους μύκητες ή βακτηριακές καλλιέργειες. Αυτοί οι μικροοργανισμοί μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως τρόφιμα πλούσια σε πρωτεΐνες ή συστατικά τροφίμων ή συμπληρώματα διατροφής για ανθρώπινη και ζωική κατανάλωση (Ritala et al., 2017). Επομένως, η μεγάλης κλίμακας παραγωγή μικροβιακής βιομάζας θα μπορούσε να είναι επωφελής για την αντικατάσταση πρωτεϊνών γεωργικής προέλευσης (φυτικές και ζωικές πρωτεΐνες) για τρόφιμα ή ζωοτροφές λόγω του υψηλού ρυθμού πολλαπλασιασμού και της υψηλής περιεκτικότητας σε πρωτεΐνες (30-80% πρωτεΐνη σε ξηρό βάρος) των μικροοργανισμών, την ικανότητα χρήσης του μεγάλου αριθμού διαφορετικών πηγών άνθρακα χαμηλού κόστους, συμπεριλαμβανομένων των βιομηχανικών αποβλήτων (Karimi et al., 2018). Σε αυτές τις πηγές άνθρακα συγκαταλλέγονται το τυρόγαλο, φλούδες φρούτων και απόβλητα καλλιεργειών. Συγκεκριμένα οι Jach et al., 2022 κατέγραψαν την ικανότητα του *K. Marxianus* να αξιοποιεί ως υπόστρωμα μείγμα αποβλήτων αποτελούμενου από φλούδες πορτοκαλιών, τυρόγαλου και κορεσμένη βύνη προς παραγωγή SCP. Επιπλέον, οι SCPs θα μπορούσαν να ληφθούν σε συντομότερο χρόνο σε σύγκριση με τις πρωτεΐνες γεωργικής προέλευσης λόγω του σύντομου κύκλου ζωής των μικροοργανισμών και της σχετικά μικρότερης ποσότητας χώρου και εργασίας που απαιτείται. Το πιο σημαντικό είναι ότι δεν χρειάζεται τεράστια καλλιεργήσιμη γη, επομένως οι συγκρούσεις με την παγκόσμια παραγωγή τροφίμων θα μπορούσαν να αποφευχθούν (Karim et al., 2018). Σε μελέτη των Yadav et al., 2014 παρατηρήθηκε παραγωγή SCP σε μέγιστη συγκέντρωση 5 g/L αξιοποιώντας μείγμα τυρογάλακτος σαν υπόστρωμα.

Παρακάτω παρουσιάζονται απόβλητα με προοπτικές αξιοποίησης ως υποστρώματα προς παραγωγή μονοκυτταρικής πρωτεΐνης :

- **Μελάσα**

Η μελάσα είναι μια πλούσια πηγή υδατανθράκων κατάλληλη για την καλλιέργεια διαφόρων μικροοργανισμών χωρίς την ανάγκη προεπεξεργασίας των αποβλήτων). Η μελάσα είναι κυρίως υποπροϊόν της παραγωγής ζάχαρης από ζαχαροκάλαμο και ζαχαρότευτλα ή υποπροϊόν από την παραγωγή συμπυκνώματος πρωτεΐνης σόγιας. Από όλες τις πιθανές πηγές η μελάσα σόγιας, ένα υποπροϊόν της παραγωγής συμπυκνωμένης πρωτεΐνης σόγιας (SPC), έχει γίνει πιο προσιτή τα τελευταία χρόνια λόγω της ταχείας αύξησης της παραγωγής SPC. Ανάλογα με τη μέθοδο εκχύλισης, τα είδη φυτών και την ηλικία των φυτών, η μελάσα συνήθως περιέχει περίπου 45-60% ζυμώσιμους υδατάνθρακες, 10% ενώσεις αζώτου, 20% λίπος και 10% μέταλλα. Η χρήση της μελάσας στην παραγωγή SCP καθορίζεται από τη διαθεσιμότητα, την τιμή, τη σύνθεσή της και το κατά πόσο περιέχει ακαθαρσίες αναστολέων ζύμωσης και τοξικές ενώσεις που θα μπορούσαν να μεταφερθούν από το μέσο καλλιέργειας στο τελικό προϊόν SCP (Bekatorou et al., 2006· Aggelopoulos et al., 2006 al., 2014).

- **Απόβλητα γαλακτοκομικών**

Ο ορός γάλακτος και άλλα γαλακτοκομικά απόβλητα έχουν υψηλά επίπεδα απαίτησης χημικού οξυγόνου (COD) και βιοχημικής απαίτησης οξυγόνου (BOD), καθώς και υψηλές συγκεντρώσεις ελαίων και λιπών και ενώσεων αζώτου και φωσφόρου, το οποίο μπορεί να οδηγήσει σε οικολογικά προβλήματα εάν τέτοια απόβλητα εισέλθουν σε τοπικά περιβάλλοντα χωρίς προηγούμενη επεξεργασία. Μόνο από την παραγωγή τυριού, η παγκόσμια γαλακτοκομική βιομηχανία παράγει περίπου 139 εκατομμύρια τόνους ορού γάλακτος κάθε χρόνο (Yadav et al., 2013; Yadav et al., 2014), εκ των οποίων περίπου το 50% απλώς απορρίπτεται σε συστήματα αποχέτευσης ή σε τοπικά υδατικά συστήματα (Yadav et al., 2014). Η βιομηχανία πρέπει να αναπτύξει αποτελεσματικές λύσεις για την επεξεργασία ορού γάλακτος και άλλων απορριμμάτων, προκειμένου να αφαιρεθούν οργανικές και αζωτούχες ενώσεις από τα απόβλητα. Ανάλογα με την τεχνολογία που χρησιμοποιείται στην επεξεργασία του γάλακτος, τα γαλακτοκομικά απόβλητα μπορεί να έχουν υψηλά επίπεδα είτε λακτόζης είτε πρωτεΐνης (Singh et al., 2011; Aggelopoulos et al., 2014), επομένως ο ορός γάλακτος μπορεί να κατηγοριοποιηθεί ως πλούσια πηγή μονοσακχαριτών και δισακχαριτών ή πηγή πλούσια σε πρωτεΐνες ή λιπίδια. Εάν τα γαλακτοκομικά απόβλητα έχουν υψηλή περιεκτικότητα σε λακτόζη, αυτά τα παραπροϊόντα μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως κατάλληλο υπόστρωμα για την παραγωγή SCP χρησιμοποιώντας μικροοργανισμούς ικανούς να ζυμώνουν τη λακτόζη (Singh et al., 2011).

- **Απόβλητα φρούτων**

Η περιεκτικότητα των υπολειμμάτων επεξεργασίας φρούτων εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τον τύπο του καρπού και το τμήμα του φρούτου που αποτελεί την κύρια μάζα των απορριμμάτων. Εάν τα απόβλητα είναι κυρίως ολόκληρα φρούτα, τότε μεγάλη ποσότητα μονοσακχαριτών και δισακχαριτών θα είναι διαθέσιμη στα απόβλητα, όπως συμβαίνει στην περίπτωση των απορριμμάτων μπανάνας, όπου το 5 έως 30% των συγκομισμένων μπανανών απορρίπτονται ως απόβλητα λόγω των εξαγωγικών κανονισμών. Παρόμοια κατάσταση υπάρχει και για τα σύκα όπου, λόγω εσφαλμένης μεταφοράς, αποθήκευσης και αλλαγών στην αγορά, μεγάλες ποσότητες σύκων δεν πραγματοποιούνται και πρέπει να απορριφθούν όταν αρχίσουν να αλλοιώνονται

1.3.3.2 Παραγωγή ενζύμων

Το ερευνητικό ενδιαφέρον για τον *K. marxianus* αναμφίβολα καθοδηγείται από εφαρμογές στη βιομηχανία της βιοτεχνολογίας. Αυτό αντικατοπτρίζεται στην επιστημονική βιβλιογραφία, όπου υπάρχουν περισσότερες εργασίες που ασχολούνται με βιοτεχνολογικές εφαρμογές από τον μεταβολισμό, τη μοριακή βιολογία ή άλλες θεμελιώδεις πτυχές αυτής της ζύμης. Εμπορικά, η πιο σημαντική τρέχουσα εφαρμογή είναι η παραγωγή φυσικών ενζύμων, όπως η ινουλινάση, οι β-γαλακτοσιδάσες και οι πηκτινάσες.

- **β-γαλακτοσιδάσες**

Οι β-γαλακτοσιδάσες είναι από τα πλέον χρησιμοποιούμενα ένζυμα στις βιομηχανίες επεξεργασίας τροφίμων. Γενικά συνοψίζονται ως λακτάση και καταλύουν την υδρόλυση της λακτόζης παράγοντας ένα μείγμα γαλακτόζης και γλυκόζης. Συγκεκριμένα, οι β-γαλακτοσιδάσες έχουν σημαντικές εφαρμογές στις βιομηχανίες τροφίμων και φαρμακευτικών προϊόντων καθώς χρησιμοποιούνται για τη σακχαροποίηση του τυρόγαλου και στην επεξεργασία του γάλακτος για τη μείωση της περιεκτικότητας σε λακτόζη (Singh et al., 2016). Η τελευταία χρήση σχετίζεται κυρίως με τους πληθυσμούς με γενετική ανεπάρκεια για το μεταβολισμό της λακτόζης, όπως οι ορισμένοι πληθυσμοί στη Βραζιλία, τις

Ηνωμένες Πολιτείες και την Κεντρική Αφρική (Bayless et al., 2017; Belem and Lee, 1998). Διάφορα στελέχη *Kluyveromyces* αναφέρθηκαν ως αποτελεσματικά για τη βιομηχανική παραγωγή β-γαλακτοσιδασών (Hensing et al., 1994· Oliveira et al., 2011). Χρησιμοποιήθηκαν διάφορες προσεγγίσεις με διαφορετικές στρατηγικές καλλιέργειας για την παραγωγή β-γαλακτοσιδασών από βιομηχανικά μέσα όπως η μελάσα (Morrissey et al., 2015) και το τυρόγαλο (Padilla et al., 2015; Rech et al., 1999). Οι υδρολυτικές δραστηριότητες, οι οποίες είναι απαραίτητες στην επεξεργασία τροφίμων, εκτελούνται συνήθως χρησιμοποιώντας εμπορικές β-γαλακτοσιδάσες (Pivarnik et al., 1995). Η υδρολυτική δραστηριότητα χρησιμοποιείται για τη μείωση της περιεκτικότητας σε λακτόζη στο γάλα στη βιομηχανία τροφίμων, ενώ η δραστηριότητα διαγαλακτοζυλίωσης εκτελείται για τη σύνθεση της γαλακτόζης (Oliveira et al., 2011). Εκτός από τη συγκέντρωση του υποστρώματος, άλλες λειτουργικές παράμετροι όπως το pH, ο χρόνος επώασης, η θερμοκρασία, το μέγεθος του εμβολίου επηρέασαν σημαντικά τη δραστηριότητα της β-γαλακτοσιδάσης. Η βέλτιστη ανάπτυξη και η υψηλότερη δραστηριότητα β-γαλακτοσιδασών παρατηρήθηκαν σε θερμοκρασία 37 °C και pH 5,5, χρησιμοποιώντας *K. marxianus* CBS6556 και CBS712 σε τυρόγαλο (Rech et al., 1999).

ο **Ινουλινάση**

Η ινουλινάση έχει κερδίσει ενδιαφέρον καθώς χρησιμοποιείται ευρέως για την υδρόλυση ινουλίνης, ενός πολυσακχαρίτη που ελάχιστοι μικροοργανισμοί είναι ικανοί να ζυμώσουν, για την παραγωγή βιοαιθανόλης, φρουκτόζης και φρουκτο-ολιγοσακχαριτών, τα οποία είναι όλα σημαντικά συστατικά στη βιομηχανία τροφίμων και φαρμακευτικών προϊόντων (Gao et al., 2009· Hoshida et al., 2018). Τα ένζυμα αυτά έχουν παραχθεί από πλήθος διαφορετικών μικροοργανισμών όπως ζυμομύκητες *Cryptococcus aureus*, *K. marxianus*, νηματώδεις μύκητες *Aspergillus niger*, *Penicillium* sp., *Rhizopus* sp., και τα βακτήρια *Streptomyces* sp., *Bacillus* sp., *Staphylococcus* sp., *Xanthomonas* και *Pseudomonas* (Kalil et al., 2005). Ωστόσο, τα στελέχη του *A. niger* και του *K. marxianus*, έχουν περιγραφεί ως οι πιο πολλά υποσχόμενοι μικροοργανισμοί μεταξύ των διαφορετικών ειδών μικροβιακών στελεχών για παραγωγή ινουλινάσης (Zhang et al., 2012). Ωστόσο, το *K. marxianus* θεωρείται ως το πιο πιθανό να παράγει ινουλινάση σε εμπορικά αποδεκτές αποδόσεις (Kalil et al., 2005; Zhou et al., 2014). Μια μελέτη με δεκατέσσερα στελέχη ζυμομύκητα ορισμένων γενών όπως τα *Kluyveromyces*, *Debaryomyces*, *Candida* και *Schizosaccharomyces* αποκάλυψε ότι το στέλεχος *K. marxianus* ATCC 36907 έχει υψηλή δυνατότητα παραγωγής ινουλινάσης. Σε μια άλλη μελέτη, το *K. marxianus* CBS 6556 επέδειξε ανώτερες ιδιότητες από άλλα στελέχη όσον αφορά την υψηλή θερμοκρασία, την ειδικότητα του υποστρώματος και την παραγωγή ινουλινάσης (Rouwenhorst et al., 1988). Η υψηλότερη παραγωγή ενζύμου παρατηρήθηκε σε θερμοκρασίες μεταξύ 37 και 42 °C, που αντιστοιχούσε στη βέλτιστη θερμοκρασία για την ανάπτυξη του *K. marxianus*. Η υψηλή θερμοκρασία βέλτιστης ανάπτυξης παρουσιάζει προοπτικές για εμπορική εφαρμογή, καθώς επιτρέπει την ψύξη κατά τη διάρκεια της μεγάλης κλίμακας διαδικασίας ζύμωσης όπου η μεταφορά θερμότητας είναι περιοριστικός παράγοντας.

ο **Πηκτινάση**

Οι ενδο-πολυγαλακτουρονάσες, κοινώς γνωστές ως πηκτινάσες, υδρολύουν τις πηκτίνες. Οι πηκτίνες είναι ετεροπολυσακχαρίτες που αποτελούν τα κύρια δομικά στοιχεία των φυτικών κυτταρικών τοιχωμάτων. Οι πηκτινάσες έχουν χρησιμοποιηθεί στην παρασκευή χυμού και κρασιού λόγω της ικανότητάς τους να υποβαθμίζουν το κυτταρικό τοίχωμα (Alimardani-Theuil et al., 2011). Αυτά τα ένζυμα παράγονται κυρίως από φυτά και διαφορετικούς μικροοργανισμούς, συμπεριλαμβανομένων των βακτηρίων, των ζυμομυκήτων και των νηματωδών μυκήτων. Μεταξύ αυτών, οι πηκτινάσες

ζυμομύκητα παρουσιάζουν μεγάλο ενδιαφέρον την τελευταία δεκαετία (Alimardani-Theuil et al., 2011). Με βάση το περιβαλλοντικό και γενετικό υπόβαθρο, οι πηκτολυτικές ζύμες μπορούν να παράγουν διαφορετικά είδη ενζύμων. Τέσσερα είδη ζυμομύκητα, και συγκεκριμένα το *Torulopsis kefir*, *S. fragilis*, *S. cerevisiae*, *K. marxianus* έχουν αξιοποιηθεί ευρέως για πηκτολυτική δράση. Παράγουν πολυγαλακτουρονάσες (PG), πηκτινολυάσες (PL), πηκτινεστεράση (PE) ή πηκτική λυάση (PaL), ανάλογα με τη θερμοκρασία, το pH και τη διαθεσιμότητα του υποστρώματος. Για παράδειγμα, οι *Candida*, *Sacharomyces* και *Kluyveromyces* παράγουν PG (κυρίως ενδοπολυγαλακτουρονάση), ενώ η *Rhodotorula* παράγει τόσο PG όσο και PE (Alimardani-Theuil et al., 2011; Blanco et al., 1999)

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1.1 Βιολογικό υλικό

Για τη διεξαγωγή της παρούσας πτυχιακής μελέτης χρησιμοποιήθηκε ο ζυμομύκητας *Kluyveromyces marxianus* στα τρία διαφορετικά στελέχη EXF-6231, EXF-6232 και EXF-9072 από το εργαστήριο Φυσικοχημικής και Βιοτεχνολογικής επεξεργασίας του Πανεπιστημίου Αιγαίου. Για την ανάπτυξη του μύκητα το στερεό θρεπτικό μέσο που χρησιμοποιήθηκε αποτελούνταν από 20 g/L γλυκόζη, 10 g/L yeast extract, 20 g/L πεπτόνη και 20 g/L άγαρ και διατηρήθηκε σε κεκλιμένους δοκιμαστικούς σωλήνες (slant). Αξίζει να αναφερθεί πως πριν την έναρξη κάθε ζύμωσης γινόταν ανανέωση του στελέχους για περίπου 24 με 48 ώρες στους 28-30 °C σε επωαστικό κλίβανο.

2.1.2 Θρεπτικό υπόστρωμα προκαλλιέργειας

Η χρήση προκαλλιέργειας δημιουργεί ευνοϊκές συνθήκες ανάπτυξης για τον μικροοργανισμό και αποτελείται από 20 g/L γλυκόζη, 10 g/L yeast extract και 20 g/L πεπτόνη. Για κάθε ζύμωση χρησιμοποιούνταν 2 με 3 κωνικές φιάλες Erlenmeyer των 250 mL, οι οποίες περιείχαν 50 mL προκαλλιέργειας. Στη συνέχεια αποστειρώνονταν στους 121 °C για περίπου 20 λεπτά και έπειτα γινόταν εμβολιασμός με το στέλεχος υπό ασηπτικές συνθήκες. Οι φιάλες τοποθετούνταν σε ανακινούμενο επωαστικό θάλαμο LABWIT ZWY-211C, με τις συνθήκες ανάδευσης να είναι οι 180 στροφές ανα λεπτό (rpm) στους 20 °C, 25°C, 30°C και 35°C. Μετά από 24 ώρες οι φιάλες ελέγχονται με τη χρήση μικροσκοπίου ώστε να αποφευχθεί πιθανή επιμόλυνση και επιλέγεται η κατάλληλη φιάλη για τον εμβολιασμό της κυρίως καλλιέργειας.

2.1.3 Θρεπτικό υπόστρωμα κυρίως καλλιέργειας

Το CW που χρησιμοποιήθηκε προέρχεται από τοπικές βιομηχανίες τυριού της Λήμνου. Η αρχική τους συγκέντρωση σε λακτόζη ήταν 100 g/L ενώ για το παρών πείραμα πραγματοποιήθηκε αραίωση με απιονισμένο νερό μέχρι τα 20 g/L λακτόζη, η οποία ήταν και η πηγή άνθρακα. Προτού χρησιμοποιηθεί ως υπόστρωμα το CW υποβλήθηκε σε προ-επεξεργασία με σκοπό την αφαίρεση των πρωτεϊνών ορού του CW. Για τον σκοπό αυτό το αρχικό CW αποστειρώθηκε σε κλίβανο υγρής αποστείρωσης για 20' στους 121 °C, έπειτα πραγματοποιήθηκε φυγοκέντριση στα 9000 RPM και 4°C για 10 λεπτά ώστε να απομονωθούν τα στερεά του CW. Το τελικό στάδιο της προ-επεξεργασίας περιλάμβανε την χρήση διηθητικού χαρτιού με σκοπό τον περαιτέρω διαχωρισμό του CW από τα στερεά συστατικά. Ως πηγή αζώτου χρησιμοποιήθηκε 2.2 g/L ουρία. Τέλος, τα μεταλλικά άλατα που προστέθηκαν στην κυρίως καλλιέργεια παρουσιάζονται παρακάτω:

- KH_2PO_4 (7, 00 g/L)
- $\text{NaHPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ (2, 50 g/L)
- $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ (1, 50 g/L)
- $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ (0, 06 g/L)
- $\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ (0, 02 g/L)
- $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$ (0, 15 g/L)
- $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ (0, 15 g/L)

Οι συγκεντρώσεις των αναγραφόμενων συστατικών παρέμειναν ίδιες σε όλες τις σειρές πειραμάτων, ενώ το pH παρέμεινε ρυθμισμένο στο 3.5. Κάθε κωνική φιάλη πληρώνεται με 50 mL θρεπτικού υλικού και έπειτα γίνεται αποστείρωση στους 121°C για περίπου 40 λεπτά. Εν συνεχεία γίνεται εμβολιασμός, υπο ασηπτικές συνθήκες, κάθε κωνικής φιάλης με 1 mL απο την προεπιλεγμένη προκαλλιέργεια και έπειτα οι φιάλες μεταφέρονται σε ανακινούμενο επωαστικό θάλαμο στους 20°C, 25°C, 30°C και 35°C ανάλογα με την εκάστοτε σειρά πειράματος και 180 rpm. Πριν τη χρήση κάθε φιάλης γινόταν μικροσκοπικός έλεγχος για τον εντοπισμό τυχόν επιμολύνσεων.

2.2 Αναλύσεις

2.2.1 Προσδιορισμός και διόρθωση pH

Σε όλες τις σειρές πειραμάτων το pH παρέμεινε ρυθμισμένο στο 3.5. Για την επίτευξη αυτού, πριν τη χρήση κάθε κωνικής φιάλης γινόταν προσδιορισμός του pH με πεχάμετο Consort C50xx. Εάν η ένδειξη

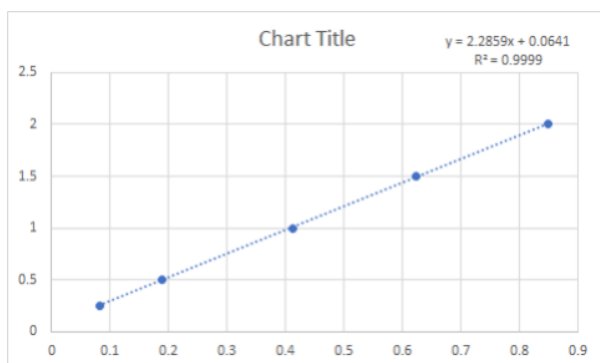
απέκλινε από την ιδανική τιμή τότε γινόταν διόρθωση του pH σε όλες τις φιάλες είτε με καυστικό νάτριο NaOH 5M είτε με HCl 5M υπό ασηπτικές συνθήκες.

2.2.2 Προσδιορισμός και συλλογή βιομάζας

Ο προσδιορισμός βιομάζας πραγματοποιείται με τη μέτρηση του ξηρού βάρους. Το υγρό της κωνικής φιάλης μεταφέρεται σε ογκομετρικό κύλινδρο και προστίθεται απιονισμένο νερό μέχρι τη χαραγή που αντιστοιχεί στα 50 mL. Έπειτα ακολουθούν δύο φυγοκεντρήσεις σε φυγόκεντρο τύπου Universal 320R-Hettich σε συνθήκες 9000 rpm για 10 λεπτά και θερμοκρασία στους 4 °C. Απο την πρώτη φυγοκέντρηση το υπερκείμενο μεταφέρεται σε falcon tubes των 15 mL για περαιτέρω αναλύσεις. Έπειτα, αφού γίνει έκπλυση με απιονισμένο νερό, η βιομάζα φυγοκεντρείται για 2^η φορά. Μετά το πέρας των δύο φυγοκεντρήσεων, η βιομάζα συλλέγεται σε προζυγισμένο φιαλίδιο McCartney το οποίο μεταφέρεται σε φούρνο στους 80° C για περίπου 72 ώρες με σκοπό την ξήρανση. Μετά την ξήρανση τα φιαλίδια ζυγίζονται και η βιομάζα εκφράζεται σε g/L.

2.2.3 Προσδιορισμός λακτόζης (DNS)

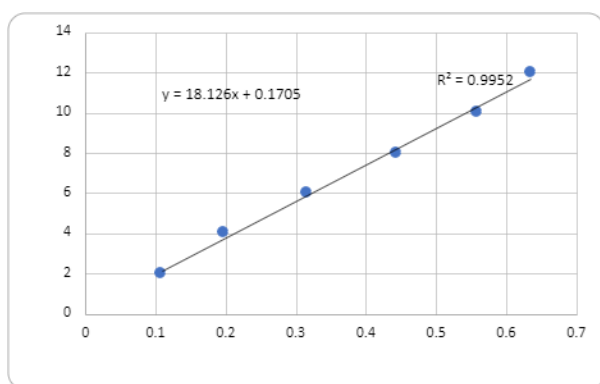
Για τον προσδιορισμό της λακτόζης της εκάστοτε καλλιέργειας εφαρμόστηκε φασματοφωτομετρική μέθοδος αναγόντων σακχάρων DNS, κατά την οποία χρησιμοποιήθηκε φασματοφωτόμετρο Shimadzu UV-1900i. Για τη μέτρηση λήφθηκε δείγμα υπερκείμενου υγρού διατηρητέου στη κατάψυξη, εφόσον είχε διαχωρισθεί προηγουμένως κατά τη συλλογή της βιομάζας. Λαμβάνεται 0.5 mL για κάθε δείγμα και προστείνεται 0.5 mL αντιδραστηρίου DNS. Εάν πρόκειται για δείγμα που αντιστοιχεί στις 0 ή 24 ώρες της ζύμωσης γίνονται οι κατάλληλες αραιώσεις. Εφόσον τα δείγματα βραστούν στους 100° C για 5 λεπτά και αφεθούν να κρυώσουν πραγματοποιείται vortex και μέτρηση τους σε μήκος κύματος 540 nm (Miller,1953).



Γράφημα 2.1 Πρότυπη καμπύλη λακτόζης

2.2.4 Ποσοτικός προσδιορισμός μονοκυτταρικής πρωτεΐνης (Biuret)

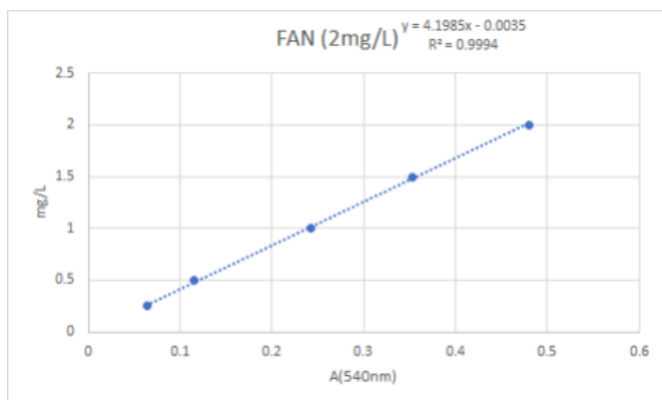
Για τον προσδιορισμό της μονοκυτταρικής πρωτεΐνης πραγματοποιήθηκε η φασματοφωτομετρική μέθοδος Biuret. Η αρχή της πειραματικής διαδικασίας περιλάμβανε λήψη 0.01 g ξηρής βιομάζας σε 1 mL απιονισμένο νερό. Εν συνεχεία γίνεται προσθήκη 0.75 mL KH_2HPO_4 καθώς και 3 mL NaOH στο κάθε δείγμα, και έπειτα από βρασμό στους 100°C για 5 λεπτά και ψήξη σε θερμοκρασία δωματίου προστείνονται 0.125 mL CuSO_4 και ακολουθεί vortex των δειγμάτων ανα 2 λεπτά. Τελικά, τα δείγματα φυγοκεντρώνονται και το υπερκείμενο υγρό τοποθετείται σε φασματοφωτόμετρο ρυθμισμένο στα 540 nm (Gornall,1948).



Γράφημα 1.2 Πρότυπη καμπύλη αναφοράς μονοκυτταρικής πρωτεΐνης

2.2.5 Προσδιορισμός ελεύθερων αμινομάδων (Free amino acids, FAN)

Για τον προσδιορισμό των ελεύθερων αμινομάδων χρησιμοποιήθηκε η φασματοφωτομετρική μέθοδος FAN. Αρχικά, προστείνεται ποσότητα δείγματος που αντιστοιχεί σε επαρκή αραιώση με προσθήκη απιονισμένου νερού. Ακολούθως, προστείνεται 0.5 mL αντιδραστηρίου χρώσης στο κάθε δείγμα και αναδεύονται ελαφρώς. Πραγματοποιείται βρασμός στους 100°C και αφού τα δείγματα κρυώσουν σε θερμοκρασία δωματίου για 20 λεπτά γίνεται προσθήκη 2.5 mL αντιδραστηρίου αραιώσης ενώ ακολουθεί έντονη ανάδευση σε συσκευή vortex. Εν τέλει τα δείγματα τοποθετούνται στο φωτόμετρο σε μήκος κύματος 570 nm. Στη συνέχεια παρουσιάζονται οι πρότυπες καμπύλες που χρησιμοποιήθηκαν (Lie,1973).



Γράφημα 2.3 Πρότυπη καμπύλη αναφοράς ελεύθερων αμινομάδων (FAN)

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Εισαγωγή

Στη συγκεκριμένη πτυχιακή μελετήθηκε η ικανότητα των τριών στελεχών ζυμομύκητα *Kluyveromyces fragilis* EXF-6231, EXF-6232 και EXF-9072 για κυτταρική αύξηση αξιοποιώντας πρωτογενές τυρόγαλο (CW) με συγκέντρωση λακτόζης 20 g/L ως υπόστρωμα. Ερευνήθηκε η ικανότητα παραγωγής μονοκυτταρικής πρωτεΐνης (SCP) στους 20° C, 25° C, 30° C και 35° C για καθένα από τα παραπάνω στελέχη.

Η κινητική των ζυμώσεων ελέγχθηκε μέσω της μέτρησης του pH της καλλιέργειας, της παραγωγής βιομάζας (X g/L), της κατανάλωσης υποστρώματος ($Glac_{cons}$ g/L) και της παραγωγής μονοκυτταρικής πρωτεΐνης (SCP g/L). Οι παράμετροι μικροβιακής αύξησης που υπολογίζονται αναφέρονται παρακάτω:

- Συντελεστής απόδοσης παραγωγής μονοκυτταρικής πρωτεΐνης προς την βιομάζα $Y_{SCP/X}$ (g παραχθείσης μονοκυτταρικής πρωτεΐνης /g ξηρής κυτταρικής μάζας)
- Συντελεστής απόδοσης παραγωγής βιομάζας προς καταναλωθέν υπόστρωμα $Y_{X/Lactcons}$ (g παραχθείσης ξηρής κυτταρικής μάζας/g αναλωθέντος υποστρώματος)

3.2 Γενική παρουσίαση αποτελεσμάτων

Πίνακας 3.1 : Συγκενρωτικός πίνακας αποτελεσμάτων. Αναγράφονται οι μέγιστες τιμές βιομάζας και μονοκυτταρικής πρωτεΐνης (SCP) για κάθε στέλεχος σε θερμοκρασίες 20, 25, 30 και 35° C.

Στέλεχος	Θερμοκρασία (°C)	Ώρες	X (g/L)	SCP (g/L)	Lact _{cons} (g/L)	Y _{X/Lactcons} (g/g)	Y _{X/SCP} (g/g)
EXF-6231	20° C	96 ^a	6.78	0.89	12.9	0.53	0.13
		120 ^b	7.11		12.91	0.55	
	25° C	144 ^{a,d}	5.21	2.32	12.05	0.43	0.44
		72 ^b	6.25		12.06	0.52	
	30° C	144 ^a	9.10	3.43	12.80	0.71	0.38
		48 ^{a,c}	9.53		12.84	0.74	
35° C	205 ^a	4.05	1.70	14.78	0.27	0.42	
	139 ^b	4.12		15	0.27		
EXF-6232	20° C	144 ^a	6.65	1.60	12.93	0.51	0.24
		72 ^b	7.15		12.91	0.55	
	25° C	96 ^{a,b,d}	7.89	2.88	12.00	0.66	0.37
		48 ^{a,b,c,d}	9.38	3.44	12.68	0.74	0.37
35° C	144 ^{a,b}	3.64	0.98	14.79	0.25	0.27	
EXF-9072	20° C	144 ^a	5.272	2.44	19.59	0.27	0.46
		96 ^b	8.246		19.53	0.42	
	25° C	119 ^a	5.594	2.68	11.88	0.47	0.48
		72 ^{b,c}	6.67		11.84	0.56	
	30° C	144 ^a	4.684	2.05	24.30	0.19	0.44
		96 ^b	4.732		24.39	0.19	
35° C	48 ^{a,b,d}	3.17	1.57	13.48	0.24	0.49	

X (g/L) : Παραγόμενη ξηρή βιομάζα

Lact_{cons} (g/L) : Καταναλωθέν υπόστρωμα

SCP (g/L) : Παραχθείσα μονοκυτταρική πρωτεΐνη επί ξηρής βιομάζας

Y_{X/Lactcons} (g/L) : Συντελεστής απόδοσης παραγωγής βιομάζας προς καταναλωθέν υπόστρωμα

Y_{SCP/X} : Συντελεστής απόδοσης παραγωγής μονοκυτταρικής πρωτεΐνης προς παραχθείσα ξηρή βιομάζα

a : Μέγιστη τιμή ξηρής βιομάζας

b : Μέγιστη τιμή μονοκυτταρικής πρωτεΐνης (SCP)

c : Μέγιστη τιμή συντελεστή απόδοσης παραχθείσας ξηρής βιομάζας προς καταναλωθέν υπόστρωμα Y_{X/Lactcons} (g/g)

d : Μέγιστη τιμή συντελεστή απόδοσης παραχθείσας SCP προς παραχθείσα βιομάζα Y_{SCP/X} (g/g)

Με βάση τα δεδομένα που καταγράφονται στον παραπάνω συγκεντρωτικό πίνακα εντοπίζονται διαφορετικές μέγιστες τιμές βιομάζας και μονοκυτταρικής πρωτεΐνης οι οποίες επηρεάζονται από την διαφορετική θερμοκρασία της εκάστοτε κινητικής. Συγκεκριμένα, εντοπίζεται μέγιστη συγκέντρωση βιομάζας 9.53 g/L στους 30°C και στις 48 ώρες για το στέλεχος EXF-6231, 9.38 g/L στις 48 ώρες και στους 30°C για το στέλεχος EXF-6232, 8.24 g/L στους 20°C και 96 ώρες για το στέλεχος EXF-9072. Όσον αφορά την SCP, τα στελέχη EXF-6231 και EXF-6232 εμφάνισαν μέγιστη συγκέντρωση στους 30°C οι οποίες ήταν 3.43 g/L και 3.44 g/L αντίστοιχα, ενώ το στέλεχος EXF-9072 έδειξε μέγιστη τιμή στους 25°C με συγκέντρωση 2.68 g/L. Παρατηρήθηκαν μέγιστες τιμές απόδοσης βιομάζας $Y_{X/Lactcons}$ στους 30°C για τα στελέχη EXF-6231 και EXF-6232 οι οποίες ήταν 0.74 g/g και στις δύο περιπτώσεις, ενώ υπήρξε συγκριτικά μικρότερη απόδοση $Y_{X/Lactcons}$ για το στέλεχος EXF-9072 με μέγιστη απόδοση στους 25°C και τιμή 0.56 g/g. Παράλληλα, αναλύοντας τα δεδομένα του παραπάνω πίνακα διακρίνεται μοτίβο για το σύνολο του βιολογικού υλικού, όπου η αύξηση της θερμοκρασίας οδηγεί σε σημαντικά μικρότερες τιμές στη συγκέντρωση της βιομάζας και της SCP, λαμβάνοντας υπόψιν τις μετρήσεις των ζυμώσεων στους 35°C. Η μέγιστη απόδοση $Y_{X/SCP}$ εμφανίζεται στους 25°C για το EXF-6231 με τιμή 0.44, στους 30°C για το EXF-6232 με τιμή 0.36 και στους 35°C για το EXF-9072 με τιμή 0.49, αν και η $Y_{SCP/X}$ του τελευταίου στελέχους δείχνει να μην επηρεάζεται από την θερμοκρασία της ζύμωσης, εφόσον οι τιμές της έχουν μικρή απόκλιση για τις διαφορετικές θερμοκρασίες των ζυμώσεων.

Όσον αφορά τη κατανάλωση ελεύθερων αμινομάδων και λακτόζης, η ποσοστιαία κατανάλωση τους για τις πρώτες 48 ώρες της ζύμωσης περιγράφεται στους πίνακες 2 και 3 αντίστοιχα. Με εξαίρεση τις περιπτώσεις των EXF-6231 και EXF-6232 στους 35°C όπου φαίνεται σχεδόν ολοκληρωτική κατανάλωση των ελεύθερων αμινομάδων, στη πλειοψηφία των σειρών του πειράματος φαίνεται να έχει καταναλωθεί προσεγγιστικά το ήμισυ των ελεύθερων αμινομάδων στις 48 ώρες της ζύμωσης. Παράλληλα, διακρίνεται ολοκληρωτική κατανάλωση της λακτόζης του υποστρώματος εντός των 48 ωρών της ζύμωσης, για το σύνολο του βιολογικού υλικού και για τις διαφορετικές θερμοκρασίες ζύμωσης.

Πίνακας 3.2 :Ποσοστό κατανάλωσης ελεύθερων αμινομάδων (FAN) ανά στέλεχος για τις πρώτες 48 ώρες.

Στέλεχος	Θερμοκρασία (°C)	Κατανάλωση (%)
EXF-6231		
	20°C	48.06
	25°C	83.51
	30°C	35.21
	35°C	59.33
EXF-6232		
	20°C	56.12
	25°C	45.30
	30°C	45.63
	35°C	93.21
EXF-9072		
	20°C	64.93
	25°C	53.81
	30°C	44.22
	35°C	55.96

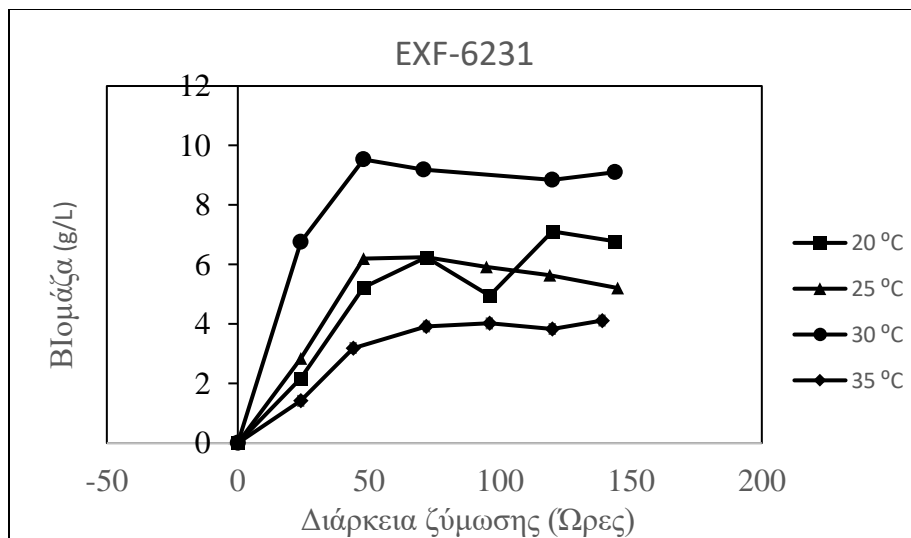
Στέλεχος	Θερμοκρασία (°C)	Κατανάλωση υποστρώματος (%)
EXF-6231	20°C	94.71
	25°C	99.04
	30°C	98.35
	35°C	98.34
EXF-6232	20°C	95.39
	25°C	98.70
	30°C	97.14
	35°C	98.75
EXF-9072	20°C	96.91
	25°C	97.68
	30°C	94.83
	35°C	98.93

Πίνακας 3.3 : Ποσοστό κατανάλωσης λακτόζης ανά στέλεχος για τις πρώτες 48 ώρες

3.3 Μικροβιακή κινητική κατά την αύξηση του στελέχους EXF-6231 σε υπόστρωμα αποτελούμενο από 20 g/L λακτόζη τυρογάλακτος.

➤ Προσδιορισμός βιομάζας

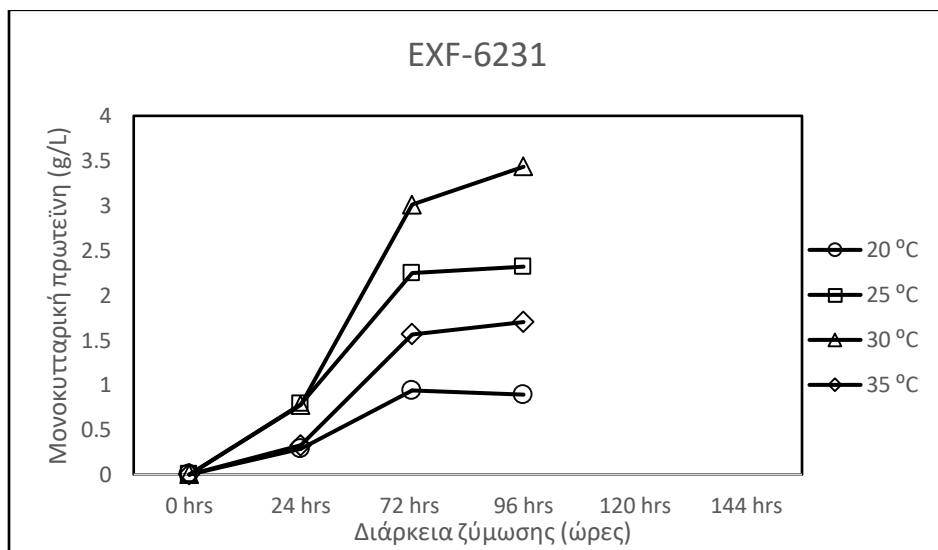
Παρατηρήθηκε αξιοσημείωτη συγκέντρωση βιομάζας στις περιπτώσεις των 20° C, 25° C και 30° C με μέγιστες τιμές 7.114 g/L, 6.248 g/L και 9.53 g/L αντίστοιχα ενώ στους 35° C παρατηρείται σημαντικά μικρότερη παραγωγή βιομάζας με μέγιστη τιμή τα 4.118 g/L. Στο σύνολο των ζυμώσεων παρατηρήθηκε απότομη αύξηση της συγκέντρωσης βιομάζας εντός των πρώτων 48 ωρών με την μεγαλύτερη να εμφανίζει η ζύμωση στους 30°C, με επικείμενη σταθεροποίηση της συγκέντρωσης μετά από το συγκεκριμένο διάστημα. Η ζύμωση των 20°C εμφάνισε μείωση συγκέντρωσης στις 96 ώρες ακολουθούμενη από αύξηση της στις 120 ώρες. Επισημαίνεται ότι στους 30° C το συγκεκριμένο στέλεχος παρουσίασε την μέγιστη παραγωγή βιομάζας για το σύνολο του πειράματος, καθώς και τη μέγιστη τιμή απόδοσης $Y_{X/Lactcons}$ στο σύνολο του πειράματος η οποία ήταν 0.74.



Γράφημα 3.1 Κινητική ζύμωσης του στελέχους EXF-6231. Περιγράφονται συγκεντρώσεις βιομάζας για τις 4 διαφορετικές συνθήκες θερμοκρασίας

➤ Προσδιορισμός SCP

Σημειώθηκε σημαντικά μεγαλύτερη μέγιστη παραγωγή SCP στους 30° C και 25° C με τιμές 3.432 g/L και 2.31 g/L αντίστοιχα και χαμηλότερη μέγιστη συγκέντρωση στους 35° C και 20° C με τιμές 1.7 g/L και 0.89 g/L αντίστοιχα. Στο σύνολο των ζυμώσεων παρατηρείται αύξηση στην παραγωγή SCP μέχρι τις 72 ώρες και επακόλουθη σταθεροποίηση της συγκέντρωσης από το διάστημα αυτό και έπειτα, με εξαίρεση τη ζύμωση των 30° C, όπου παρατηρήθηκε μικρή αύξηση στις 96 ώρες. Η μέγιστη απόδοση $Y_{SCP/X}$ παρατηρήθηκε στους 25° C με τιμή 0.44 g/g. Στους 30° C και 35° C παρατηρήθηκαν παρόμοιες αποδόσεις $Y_{SCP/X}$ με τιμές 0.38 και 0.42 αντίστοιχα. Φαίνεται ότι στους 20° C η απόδοση $Y_{SCP/X}$ είναι σημαντικά μικρότερη συγκριτικά με τις υπόλοιπες θερμοκρασίες, με τιμή 0.13.

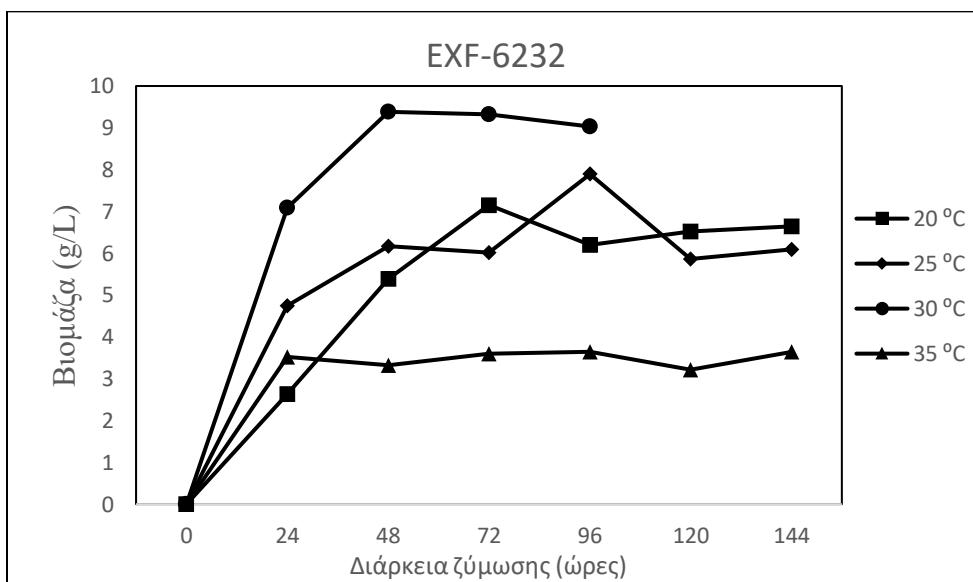


Γράφημα 3.2 Κινητική ζύμωσης του στελέχους EXF-6231. Περιγράφονται συγκεντρώσεις SCP για τις 4 διαφορετικές συνθήκες θερμοκρασίας

3.4 Μικροβιακή κινητική κατά την αύξηση του στελέχους EXF-6232 σε υπόστρωμα αποτελούμενο από 20 g/L λακτόζη τυρογάλακτος.

➤ Προσδιορισμός βιομάζας

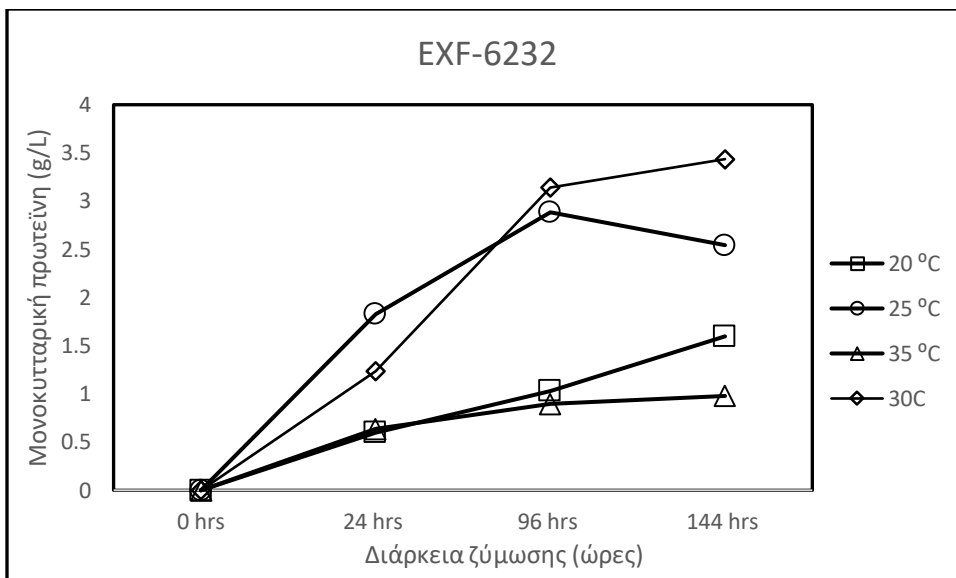
Καταγράφεται υψηλή παραγωγή βιομάζας στις θερμοκρασίες των 20°C, 25°C και 30°C με μέγιστες συγκεντρώσεις 7.154 g/L, 7.892 g/L και 9.382 g/L αντίστοιχα, ενώ στην περίπτωση των 35°C υπήρξε χαμηλότερη παραγωγή βιομάζας με μέγιστη τιμή 3.64 g/L. Η ζύμωση των 30°C κατέγραψε απότομη αύξηση στην συγκέντρωση βιομάζας μέχρι τις 48 ώρες καθώς και την υψηλότερη συγκέντρωση του συγκεκριμένου στελέχους. Οι συγκεντρώσεις στους 20°C και 25°C φαίνεται να σταθεροποιούνται στις 96 και 120 ώρες, αντίστοιχα. Στους 35°C η συγκέντρωση σταθεροποιήθηκε νωρίτερα από τις υπόλοιπες ζυμώσεις, διατηρώντας συγκριτικά χαμηλότερες τιμές από τις 24 ώρες.



Γράφημα 3.3 Κινητική ζύμωσης του στελέχους EXF-6232. Περιγράφονται συγκεντρώσεις βιομάζας για τις 4 διαφορετικές συνθήκες θερμοκρασίας

➤ Προσδιορισμός SCP

Το συγκεκριμένο στέλεχος εμφάνισε ικανοποιητική παραγωγή SCP στους 30°C και 25°C με μέγιστη συγκέντρωση 3.43 g/L και 2.88 g/L αντίστοιχα, ενώ υπήρξαν χαμηλότερες συγκεντρώσεις στους 20°C και 35°C με μέγιστες τιμές 1.59 g/L και 0.97 g/L αντίστοιχα. Οι ζυμώσεις των 25°C και 30°C παρουσίασαν σταθερή αύξηση εντός των 96 ωρών, ενώ παρατηρήθηκε μικρή αύξηση μέχρι τις 144 ώρες στους 30°C και μείωση στους 25°C. Στους 35°C δεν παρατηρήθηκε σημαντική παραγωγή SCP κρίνοντας ότι η συγκέντρωση παρέμεινε χαμηλή από τις πρώτες 24 ώρες της ζύμωσης. Διακρίνονται μέγιστες αποδόσεις $Y_{SCP/X}$ στους 25°C και 30°C με τιμές 0.37 και στις δύο περιπτώσεις. Στους 20°C και 35°C η απόδοση $Y_{SCP/X}$ εμφανίζεται σε χαμηλότερες τιμές 0.24 g/g και 0.27 g/g αντίστοιχα.

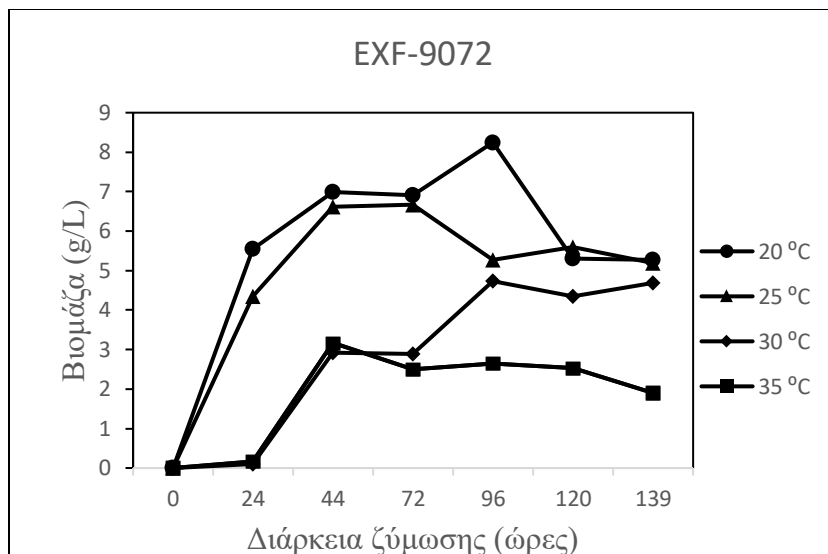


Γράφημα 3.4 Κινητική ζύμωσης του στελέχους EXF-6232. Περιγράφονται συγκεντρώσεις SCP για τις 4 διαφορετικές συνθήκες θερμοκρασίας

3.5 Μικροβιακή κινητική κατά την αύξηση του στελέχους EXF-9072 σε υπόστρωμα αποτελούμενο από 20 g/L λακτόζη τυρογάλακτος.

➤ Προσδιορισμός βιομάζας

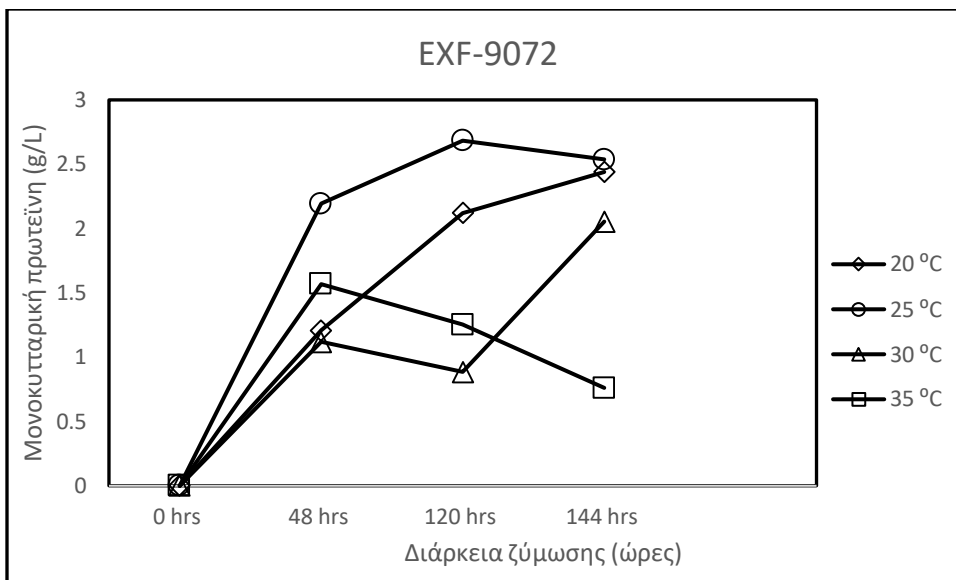
Παρατηρήθηκε υψηλή παραγωγή βιομάζας στους 20° C και 25° C με μέγιστες τιμές 8.246 g/L και 6.67 g/L αντίστοιχα ενώ υπήρξε συγκριτικά χαμηλότερη παραγωγή βιομάζας στους 30° C και 35° C με μέγιστες τιμές 4.732 g/L και 3.17 g/L. Εντός των πρώτων 24 ωρών παρατηρείται απότομη αύξηση στην παραγωγή βιομάζας για τις ζυμώσεις των 20°C και 25°C, σε αντίθεση με εκείνες των 30°C, και 35°C όπου η συγκέντρωση της βιομάζας παραμένει ελάχιστη για το ίδιο διάστημα. Οι ζυμώσεις των 20°C και 25°C έδειξαν σταθερή τιμή στις 72 ώρες προσωρινά, ακολουθεί σημαντική αύξηση στους 20°C και μείωση στους 25°C, ενώ τελικά οι δύο ζυμώσεις καθώς και αυτή των 30°C καταλήγουν σε παρόμοιες συγκεντρώσεις βιομάζας. Στη περίπτωση της ζύμωσης στους 35°C η μέγιστη τιμή εμφανίζεται στις 48 ώρες ενώ παρατηρήθηκε μείωση στη συγκέντρωση της βιομάζας με το πέρας της ζύμωσης στις 139 ώρες.



Γράφημα 3.5 Κινητική ζύμωσης του στελέχους EXF-9072. Περιγράφονται συγκεντρώσεις βιομάζας για τις 4 διαφορετικές συνθήκες θερμοκρασίας

➤ Προσδιορισμός SCP

Απο την κινητική ζύμωσης του συγκεκριμένου στελέχους παρατηρήθηκε μέγιστη συγκέντρωση στους 25° C και 20° C με τιμές 2.68 g/L και 2.43g/L ενώ παρατηρήθηκε μικρότερη μέγιστη συγκέντρωση στους 30° C και 35° C με τιμές 2.05 g/L και 1.567 g/L. Στις ζυμώσεις των 20° C και 25° C παρατηρήθηκε αύξηση στη συγκέντρωση της SCP μέχρι και στις 120 ώρες, στους 35° C διακρίνεται απότομη μείωση απο τις 48 ώρες και μετά, ενώ στους 30° C υπήρξε απότομη αύξηση στις τελευταίες 24 ώρες της ζύμωσης. Το συγκεκριμένο στέλεχος εμφανίζει τις υψηλότερες αποδόσεις $Y_{X/SCP}$ για το σύνολο του πειράματος, σε όλες τις θερμοκρασίες. Πιο αναλυτικά, στους 35° C παρατηρήθηκε μέγιστη τιμή $Y_{SCP/X}$ ίση με 0.49 g/g η οποία υπερβαίνει όλες τις υπόλοιπες. Οι υπόλοιπες θερμοκρασίες εμφανίζουν εξίσου υψηλές $Y_{X/SCP}$ στους 20° C, 25° C και 30° C με τιμές 0.46, 0.48 και 0.44 αντίστοιχα. Άξιο παρατήρησης αποτελεί το γεγονός ότι το συγκεκριμένο στέλεχος κατανάλωσε υποστρώματα τυρόγαλου με διαφορετική συγκέντρωση λακτόζης στην εκάστοτε θερμοκρασία, ωστόσο η απόδοση $Y_{SCP/X}$ διατηρήθηκε εξίσου υψηλή στην κάθε περίπτωση, συνεπώς η απόδοση $Y_{X/SCP}$ δεν δείχνει να επηρεάζεται από τη ποσότητα της λακτόζης που καταναλώθηκε $Lact_{cons}$ από τον ζυμομύκητα.



Γράφημα 3.6 Κινητική ζύμωσης του στελέχους EXF-9072. Περιγράφονται συγκεντρώσεις SCP για τις 4 διαφορετικές συνθήκες θερμοκρασίας

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Σκοπός της παρούσας πτυχιακής μελέτης υπήρξε η ανάδειξη της βέλτιστης θερμοκρασίας για την παραγωγή μονοκυτταρικής πρωτεΐνης αξιοποιώντας ως υπόστρωμα καλλιέργειας πρωτογενές τυρόγαλο συγκέντρωσης 20 ± 5 g/L. Κρίνοντας από τα αποτελέσματα της μελέτης επιβεβαιώθηκε πως ιδανική θερμοκρασία για την παραγωγή SCP ήταν οι 30°C για τα στελέχη EXF-6231 και EXF-6232 και οι 25°C για το στέλεχος EXF-9072. Όσον αφορά την ιδανική θερμοκρασία για την παραγωγή βιομάζας, ταυτίζεται με τις ιδανικές θερμοκρασίες παραγωγής SCP για το εκάστοτε στέλεχος.

Με το πέρας των πειραμάτων παρατηρήθηκε ολοκληρωτική κατανάλωση του υποστρώματος εντός των πρώτων 48 ωρών. Ο γρήγορος ρυθμός κατανάλωσης του υποστρώματος επιβεβαιώνεται και από την μελέτη των Yadav et al. (2014) όπου χρησιμοποιήθηκε υπόστρωμα τυρόγαλου με συγκέντρωση 140 g/L το οποίο και καταναλώθηκε έως και 30 ώρες από την έναρξη της ζύμωσης. Κατανάλωση υποστρώματος λακτόζης με συγκέντρωση 50 g/L σε ποσοστό 99% παρατηρήθηκε και στην μελέτη των Ghaly et al. 2004, σε χρονικό διάστημα 28 ωρών, όπου χρησιμοποιήθηκε fed-batch βιοαντιδραστήρας με όγκο καλλιέργειας 4.8 L και επακόλουθη ποσότητα λακτόζης 240 g. Στην συγκεκριμένη έρευνα καταγράφηκαν αποδόσεις παραχθείσας βιομάζας επι καταναλωθέντος υποστρώματος $Y_{X/S}$ στις 26 και 48 ώρες, με τιμές 0.50 g/g και 0.23 g/g, αντίστοιχα. Συγκρίνοντας με τα δεδομένα της παρούσας μελέτης, η απόδοση $Y_{X/S}$ εμφανίστηκε μεγαλύτερη στο σύνολο των σειρών του πειράματος. Συγκεκριμένα, τόσο στις 24 ώρες και 30°C όπου καταγράφηκε απόδοση $Y_{X/S}$ με τιμές 0.53 και 0,66 για τα στελέχη EXF-6231 και EXF-6232, αντίστοιχα, όσο και στις 48 ώρες με τιμές $Y_{X/S} = 0.74$ και για τις δύο περιπτώσεις των στελεχών. Οι Ghaly et al. 2004 παρατήρησαν πως η εκθετική φάση του ζυμομύκητα εκδηλώθηκε μεταξύ των 3 ωρών και των 16 ωρών της ζύμωσης, με επακόλουθη αύξηση των κυττάρων

του ζυμομύκητα, κατανάλωση της λακτόζης από 50 g/L στα 8 g/L και αύξηση της θερμοκρασίας με μέγιστη τιμή τους 31.6 °C.

Λαμβάνοντας υπόψη τα διαγράμματα 3.1,3.3 και 3.5 όπου περιγράφεται η παραγωγή βιομάζας στα τρία στελεχη της παρούσας μελέτης, διακρίνονται διαφορετικά χρονικά διαστήματα για την εκθετική φάση, την στάσιμη φάση και τη φάση θανάτου των ζυμωτικών διαδικασιών. Στο στέλεχος EXF-6231 παρατηρείται εκθετική φάση στις πρώτες 48 ώρες της ζύμωσης για το σύνολο των θερμοκρασιών που εφαρμόστηκαν. Το στέλεχος EXF-6232 εμφάνισε εκθετική φάση μέχρι και στις 48 ώρες της ζύμωσης, με εξαίρεση τις θερμοκρασίες των 20°C και 35°C, όπου εμφανίστηκαν μέχρι και στις 72 και 24 ώρες, αντίστοιχα. Στη περίπτωση του EXF-9072, η εκθετική φάση στους 20°C και 25°C καταγράφεται μέχρι και στις 44 ώρες, ενώ στους 30°C και 35°C διακρίνεται μεταξύ των 24 και 44 ωρών. Η φάση προσαρμογής δεν ενδείκνυται στα διαγράμματα αυτά καθώς διαρκεί σχετικά μικρό χρονικό διάστημα για να ολοκληρωθεί. Σύμφωνα με τις παρατηρήσεις του Burgess et al. 1977, ο συγκεκριμένος ζυμομύκητας εμφανίζει μικρή κατανάλωση λακτόζης σε ποσοστό 10% εντός των πρώτων δύο ωρών της ζύμωσης, το οποίο αντιστοιχεί στη φάση προσαρμογής του. Έχει προηγουμένως αναφερθεί η θερμοανθεκτικότητα του ζυμομύκητα μέχρι και σε 52°C ως ένα ελκυστικό χαρακτηριστικό για ζυμώσεις σε υψηλές θερμοκρασίες. Πρέπει να επισημανθεί ότι το ιδανικό εύρος θερμοκρασίας για την ανάπτυξη και παραγωγή βιομάζας διαφέρει από την θερμοκρασία όπου παρατηρείται επιβίωση του ζυμομύκητα. Επιπλέον, η θερμοκρασία για ιδανική ανάπτυξη πολλές φορές διαφέρει από την βέλτιστη θερμοκρασία για παραγωγή βιομάζας (Reihani,2019). Συγκεκριμένα, παρατηρείται στο σύνολο των τριών στελεχών σημαντικά μικρότερη παραγωγή βιομάζας και μονοκυτταρικής πρωτεΐνης στην ανώτερη θερμοκρασία ζύμωσης των 35°C. Η συγκεκριμένη συμπεριφορά συμβαδίζει με τις παρατηρήσεις του Verduyn (1991) όπου σε καλλιέργεια του *K. marxianus* παρατηρήθηκε ο ιδανικός ρυθμός ανάπτυξης του ζυμομύκητα στους 40°C , ενώ ταυτόχρονα σε συνεχή καλλιέργεια η απόδοση παραγωγής βιομάζας στους 38°C ήταν χαμηλότερη συγκριτικά με αυτή στους 30°C, 0.42 g/g και 0.48 g/g αντίστοιχα. Η αύξηση της θερμοκρασίας προάγει τη δημιουργία μεταλλαγμένων μορφών του ζυμομύκητα των οποίων το κυτταρόπλασμα διαθέτει μη-λειτουργικά μιτοχόνδρια καθώς και πλασματική μεμβράνη με μειωμένη διαπερατότητα. Η αλλαγή στη διαπερατότητα της πλασματικής μεμβράνης μπορεί να οδηγήσει σε μείωση της απόδοσης παραγωγής ενέργειας και σε αύξηση ενεργειακής δαπάνης για σκοπούς διατήρησης των κυττάρων. Κατά συνέπεια η αυξημένη ανάγκη διατήρησης των κυττάρων οδηγεί σε σημαντική μείωση στην απόδοση παραγωγής βιομάζας επι υποστρώματος (Yadav,2015).

Παράλληλα, οι Nayeem et al. 2017 αξιοποίησαν σε ερευνά τους τον συγκεκριμένο ζυμομύκητα για batch ζυμώσεις σε υποστρώματα τυρόγαλου διαφορετικής συγκέντρωσης λακτόζης και σε pH από 4 έως 9. Πρέπει να σημειωθεί ότι οι συνθήκες θερμοκρασίας που εφαρμόστηκαν ήταν παρόμοιες με αυτές της παρούσας πτυχιακής μελέτης, με τιμές, 25°C, 30°C, 35°C και 40°C προκειμένου να διαπιστωθεί ο καταλληλότερος συνδυασμός συγκέντρωσης υποστρώματος, pH και θερμοκρασίας. Τα αποτελέσματα απέδειξαν ότι ιδανικές συνθήκες της ζύμωσης υπήρξε τιμή pH ίση με 7, ενώ ταυτόχρονα παρατηρήθηκε μέγιστη παραγωγή βιομάζας στη θερμοκρασία των 30°C όπως καταγράφεται στο γράφημα 11, κάτι το οποίο συμβαδίζει με τις περιπτώσεις των στελεχών EXF-6231 και EXF-6232 της παρούσας μελέτης. Η βιβλιογραφία φαίνεται να υποστηρίζει την παρατήρηση αυτή, όπου στην έρευνα των Kundu et al. 2012 σημειώθηκε ιδανική θερμοκρασία ανάπτυξης του *K. Marxianus* στους 30°C.

Χρησιμοποιώντας υπόστρωμα τυρογάλακτος σε διαφορετικές συγκεντρώσεις λακτόζης, οι Nayeem et al. 2017 διαπίστωσαν τον βέλτιστο συνδυασμό πηγής άνθρακα και αζώτου σε συγκεντρώσεις λακτόζης 4% w/v και πεπτόνης 0.5% w/v καθώς και αξιοπρόσεκτη απόδοση παραχθείσας βιομάζας προς καταναλωθέν υπόστρωμα $Y_{X/S}$ εντός των πρώτων 24 ωρών της ζύμωσης με υψηλή περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη. Συγκεκριμένα, στον χρόνο αυτό καταγράφηκε $Y_{X/S}$ με τιμή 36 mg/ml όπου ποσοστό 83.33% αποτελούσε η SCP. Λαμβάνοντας υπόψη την συγκέντρωση του υποστρώματος τυρογάλου σε λακτόζη η οποία ήταν 40 g/L, η απόδοση $Y_{X/S}$ μπορεί να εκφραστεί σε g παραχθείσας βιομάζας προς γραμμάρια καταναλωθέντος υποστρώματος, με τιμή $Y_{X/S}=0.9$. Συγκρίνοντας με τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης πτυχιακής μελέτης στη θερμοκρασία των 30°C παρατηρήθηκε ελαφρώς χαμηλότερη τιμή απόδοσης $Y_{X/S}=0.74$ για το στέλεχος EXF-6231, $Y_{X/S}=0.73$ για το στέλεχος EXF-6232 και σημαντικά χαμηλότερη για το στέλεχος EXF-9072 με $Y_{X/S}=0.19$. Όσον αφορά την απόδοση παραχθείσας πρωτεΐνης προς παραχθείσα βιομάζα $Y_{SCP/X}$, εμφανίζεται σημαντικά χαμηλότερη για το σύνολο του βιολογικού υλικού στους 30°C, με τιμές $Y_{SCP/X}=0.38$ για το EXF-6231, $Y_{SCP/X}=0.37$ για το EXF-6232 και $Y_{SCP/X}=0.44$ για το EXF-9072. Παρά τις μικρότερες αποδόσεις $Y_{X/SCP}$ σημειώνεται ότι οι μέγιστες τιμές τις εκδηλώνονται στην θερμοκρασία των 30°C, όπως κατέγραψαν οι Nayeem et al. 2017.

Σχετική μελέτη αποτελεί και το έργο των Lukondeh et al. 2005, οι οποίοι αξιοποίησαν το στέλεχος FRR-1586 του *K. Marxiopus* για ζυμώσεις τύπου batch και fed-batch σε δεύτερη σειρά πειραμάτων, σε θερμοκρασία 30°C, pH ίσο με 7 και ως υπόστρωμα αποπρωτεϊνωμένη σκόνη λακτόζης. Στη πρώτη σειρά πειραμάτων εφαρμόστηκαν διαφορετικές συγκεντρώσεις λακτόζης με τιμές 10 g/L, 20 g/L, 40 g/L και 60 g/L. Με την κατανάλωση της λακτόζης στις διαφορετικές συγκεντρώσεις που περιγράφονται παρατηρήθηκαν οι εκάστοτε συγκεντρώσεις βιομάζας και αποδόσεις $Y_{X/S}$. Συγκεκριμένα οι συγκεντρώσεις βιομάζας είχαν τιμές 4.70 g/L, 9 g/L, 15 g/L, 23 g/L, με αύξουσα συγκέντρωση λακτόζης. Οι αποδόσεις παραχθείσας βιομάζας επί καταναλωθέντος υποστρώματος $Y_{X/S}$ είχαν τιμές 0.47 g/g, 0.45 g/g, 15 g/g και 23.0 g/g, με την ίδια αντιστοίχιση. Παρατηρήθηκε σταθερή αύξηση στην συγκέντρωση της βιομάζας με την αύξηση της λακτόζης του υποστρώματος, ενώ η απόδοση $Y_{X/S}$ φαίνεται να παραμένει σταθερή μέχρι συγκέντρωση λακτόζης 20 g/L, όπου αρχίζει να διακρίνεται μείωση της. Η μικρή μείωση στην απόδοση $Y_{X/S}$ γίνεται αντιληπτή και από την έναρξη παραγωγής αιθανόλης σε μικρές συγκεντρώσεις των 3.20 g/L και 3.48 g/L για τις συγκεντρώσεις λακτόζης των 40 g/L και 60 g/L, αντίστοιχα. Η τάση αυτή εξηγείται με την επίδραση του φαινομένου Crabtree, όπως έχει αναφερθεί προηγουμένως. Συγκρίνοντας με τις συγκεντρώσεις βιομάζας της παρούσας μελέτης για την θερμοκρασία των 30°C, παρατηρούνται ελάχιστα μεγαλύτερες στις περιπτώσεις των στελεχών EXF-6231 και EXF-6232 με τιμές 9.53 g/L και 9.38 g/L, ενώ στο στέλεχος EXF-9072 εμφανίζεται σημαντικά μικρότερη με τιμή 4.732 g/L. Όσον αφορά την απόδοση $Y_{X/S}$, εμφανίζεται σημαντικά μεγαλύτερη με τιμή 0.74 για τα στελέχη EXF-6231 και EXF-6232 και μικρότερη για το στέλεχος EXF-9072 με τιμή 0.19. Οι Lukondeh et al. 2005 εξέτασαν και την περίπτωση ενός up-scale της ζύμωσης σε κατηγορία fed-batch με σκοπό τη μεγιστοποίηση της παραγωγής βιομάζας και της αποφυγής παραγωγής αιθανόλης μέσω ρυθμιζόμενης παροχής λακτόζης, με αρχική συγκέντρωση λακτόζης 40 g/L. Τα αποτελέσματα έδειξαν μέγιστη συγκέντρωση 105 g/L στις 35 ώρες της ζύμωσης, μια σημαντική αύξηση συγκριτικά με την batch ζύμωση της οποίας η μέγιστη συγκέντρωση βιομάζας ήταν 15 g/L, ενώ η απόδοση $Y_{X/S}$ παρέμεινε ίδια, με τιμή 0.38. Στην παρούσα πτυχιακή μελέτη η συγκέντρωση της λακτόζης ρυθμίστηκε έτσι ώστε ο ζυμομύκητας να μην επηρεαστεί από το φαινόμενο Crabtree, κάτι που επιβεβαιώνεται από την έρευνα των Lukondeh et al. 2005, όπου δεν παρατηρείται αξιοπρόσεκτη παραγωγή αιθανόλης μέχρι

συγκέντρωση λακτόζης των 40 g/L και άνω. Επι του παρόντος θέματος, οι Yadav et al. 2014 μελέτησαν ζυμώσεις του *K. Marxianus* αξιοποιώντας υπόστρωμα τυρόγαλου σε τρεις διαφορετικές σειρές πειραμάτων, οι οποίες ήταν Batch καλλιέργεια του *K. Marxianus*, batch μικτή καλλιέργεια του *K. Marxianus* και του ζυμομύκητα *Candida krusei* και τελικά συνεχή καλλιέργεια του *K. Marxianus* και *Candida krusei*. Οι συνθήκες θερμοκρασίας ήταν υψηλές (40°C) και ο δείκτης pH όξινος, για αποτροπή τυχόν επιμολύνσεων, ενώ η συγκέντρωση της λακτόζης στις ζυμώσεις κατηγορίας batch ήταν 30 g/L. Στην πρώτη σειρά η συγκέντρωση της βιομάζας σημείωσε μέγιστη τιμή 6.6 g/L στις 20 ώρες της ζύμωσης, η οποία είχε διάρκεια 30 ώρες. Παράλληλα, παρατηρήθηκε μέγιστη απόδοση βιομάζας επι καταναλωθέντος υποστρώματος $Y_{x/s} = 0.26$ g/g. Η τιμή αυτή εμφανίζεται σημαντικά μικρότερη συγκριτικά με την μελέτη των Lukondeh et al. 2005 των οποίων η απόδοση ήταν $Y_{x/s} = 0.37$ g/g, των Ghaly et al. 2004 με απόδοση $Y_{x/s} = 0.44$ g/g, αλλά και με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης. Η εμφανώς χαμηλότερη απόδοση $Y_{x/s}$ δικαιολογείται επαρκώς από την εφαρμογή ακραίων συνθηκών θερμοκρασίας και pH. Ως αποτέλεσμα, τα κύτταρα του ζυμομύκητα κατανάλωσαν μεγαλύτερο μέρος ενέργειας από τον μεταβολισμό της λακτόζης για σκοπούς αυτοσυντήρησης των υπάρχοντων κυττάρων η οποία θα καταναλωνόταν για σκοπούς αύξησης των κυττάρων του ζυμομύκητα. Η συμπεριφορά αυτή έγινε αντιληπτή και στη παρούσα μελέτη, συγκεκριμένα σε ζυμώσεις με θερμοκρασία 35°C, όπου η συγκέντρωση βιομάζας και η απόδοση $Y_{x/s}$ εμφανίστηκαν σημαντικά χαμηλότερες. Σε επόμενη φάση, οι Yadav et al. 2014 προχώρησαν σε batch μικτή καλλιέργεια των προαναφερθέντων ζυμομυκήτων προκειμένου να βελτιωθεί η απόδοση απομάκρυνσης COD (Χημικά απαιτούμενο οξυγόνο) και μείωση μολυσματικής δράσης σε συνθήκες υψηλής θερμοκρασίας και όξινου pH. Διαπιστώθηκε ταχύτερη ανάπτυξη του *K. Marxianus* από τον *Candida krusei*, κάτι που εξηγείται από την αδυναμία του *Candida krusei* να αξιοποιήσει την λακτόζη ως πηγή άνθρακα. Παρ' όλα αυτά σημειώθηκε ανάπτυξη του, που εξηγείται από την αξιοποίηση ενδιάμεσων μεταβολιτών ως πηγή ενέργειας, ως αποτέλεσμα της μεταβολικής δράσης του *K. Marxianus*. Η παρατήρηση αυτή υποστηρίχθηκε από την αδυναμία του *Candida krusei* να αναπτυχθεί μεμονωμένα σε υπόστρωμα τυρόγαλου, αλλά παρατηρήθηκε πολλαπλασιασμός του στο υπερκείμενο υγρό προερχόμενο από καλλιέργεια του *K. Marxianus* στο ίδιο υπόστρωμα, επιβεβαιώνοντας συμβιωτική αλληλεπίδραση μεταξύ των δύο ζυμομυκήτων. Τα αποτελέσματα έδειξαν μεγαλύτερη συνολική παραγωγή βιομάζας με τιμή 6.1 g/L συγκριτικά με εκείνη της μονο-καλλιέργειας με τιμή 4.7 g/L. Παράλληλα, σημειώθηκε μεγαλύτερη απόδοση $Y_{x/s} = 0.31$ g/g. Οι παρατηρήσεις αυτές επιβεβαιώνουν την προοπτική για τον *C. Krusei* για δημιουργία μικτής καλλιέργειας με τον *K. Marxianus*. Στο τελικό στάδιο του πειράματος εφαρμόστηκε ένα scale-up της μικτής καλλιέργειας σε κατηγορία συνεχούς ζύμωσης. Διαπιστώθηκε η ιδανική απομάκρυνση COD παράλληλα με επαρκή απόδοση $Y_{x/s}$. Παράλληλα, οι συνθήκες υψηλής θερμοκρασίας και χαμηλού pH περιορίζουν σημαντικά τη πιθανότητα επιμολύνσεων, δημιουργώντας προοπτική εφαρμογής συνεχούς ζύμωσης υπό μη-ασηπτικές συνθήκες.

Το οργανικό άζωτο που απαρτίζει το τυρόγαλο οφείλεται στη παρουσία αμινοξέων, πολυπεπτιδίων και πρωτεϊνών. Παράλληλα, η αύξηση του οργανικού αζώτου σχετίζεται με την βιοσύνθεση νέων κυττάρων, ενώ η μείωση του σηματοδοτεί την μείωση των κυττάρων. Συνεπώς, η μέτρηση του οργανικού αζώτου απεικονίζει την άνοδο ή κάθοδο στον πληθυσμό των κυττάρων κατά τη διάρκεια της ζύμωσης (Ghaly et al. 2004). Σύμφωνα με τα δεδομένα που καταγράφονται στην έρευνα αυτή, το ανόργανο άζωτο υπό τη μορφή νιτρικού αμμωνίου μειώθηκε κατά τη διάρκεια της ζύμωσης, σε σημείο που καταναλώθηκε πλήρως στις 18 ώρες της ζύμωσης, όπου και αντιστοιχεί το πέρας της εκθετικής

φάσης. Κατά τη διάρκεια της εκθετικής φάσης πραγματοποιείται μετατροπή του ανόργανου αζώτου σε οργανικό, καθώς πραγματοποιείται βιοσύνθεση νέων κυττάρων και αύξηση του κυτταρικού πληθυσμού με εκθετικό ρυθμό. Εφόσον ολοκληρώθηκε η εκθετική φάση, ξεκινά η στάσιμη φάση και στη συνέχεια η φάση θανάτου, κατά τις οποίες παρατηρείται λύση των κυττάρων και επακόλουθη απελευθέρωση του οργανικού αζώτου, το οποίο επιστρέφει στην ανόργανη μορφή του. Έτσι, με το πέρας της ζύμωσης στις 48 ώρες, καταγράφεται αύξηση στην ποσότητα του ανόργανου αζώτου και αντίστοιχη μείωση του οργανικού.

Με βάση τα δεδομένα του Πίνακα 3.2, όπου καταγράφεται η ποσοστιαία κατανάλωση των ελεύθερων αμινομάδων (FAN), κατά προσέγγιση παρατηρείται κατανάλωση του μισού ανόργανου αζώτου. Αυτό εξηγείται από το γεγονός ότι η πλειοψηφία των ζυμώσεων βρίσκονται στη στάσιμη φάση τους από τις 48 ώρες μέχρι και το πέρας της ζύμωσης, όπου το ανόργανο άζωτο υπό τη μορφή ουρίας 0.22 % καταναλώνεται για σκοπούς σύνθεσης νέων κυττάρων και βιομάζας με παρόμοιο ρυθμό που το οργανικό άζωτο των λυμένων κυττάρων μετατρέπεται σε ανόργανο. Ξεχωριστές περιπτώσεις αποτελούν οι ζυμώσεις των EXF-6231 στους 25°C και του EXF-6232 στους 35°C. Στην πρώτη περίπτωση διακρίνεται φάση θανάτου μετά τις 48 ώρες, με επακόλουθη κατανάλωση ανόργανου αζώτου σε ποσοστό 83 %, και στη δεύτερη η φάση θανάτου ξεκινά πολύ νωρίτερα από τις υπόλοιπες θερμοκρασίες, δηλαδή στις 24 ώρες της ζύμωσης.

5.ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Με την ολοκλήρωση των πειραμάτων και την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων για το σύνολο των τριών στελεχών του ζυμομύκητα *Kluyveromyces marxianus* EXF-6231, EXF-6232 και EXF-9072 προέκυψαν τα εξής συμπεράσματα:

- Πλήρης κατανάλωση του υποστρώματος εντός των πρώτων 48 ωρών της ζύμωσης για το σύνολο του βιολογικού υλικού στις διαφορετικές θερμοκρασίες που εφαρμόστηκαν. Λαμβάνοντας υπόψη ότι το επιθυμητό προϊόν της ζύμωσης αποτελούσε η βιομάζα, η συγκέντρωση 20 ± 5 g/L λακτόζης ήταν κατάλληλη για τον σκοπό αυτό, εφόσον δεν παρατηρήθηκε σημαντική παραγωγή αιθανόλης κατά τη διάρκεια των ζυμώσεων. Πιθανώς να υπάρχει ασφαλές περιθώριο αξιοποίησης υποστρώματος τυρόγαλου με υψηλότερη συγκέντρωση σε λακτόζη, με τιμή έως και 40 g/L χωρίς ο ζυμομύκητας να επηρεαστεί από το φαινόμενο Crabtree και κατ' επέκταση κατευθύνοντας την ζύμωση προς παραγωγή αιθανόλης. Προϋπόθεση για κάτι τέτοιο αποτελεί και η επαρκής παροχή O_2 , προκειμένου οι συνθήκες να είναι κατάλληλες για αερόβια αναπνοή, αποφεύγοντας την αναερόβια ζύμωση.

- Όσον αφορά τη θερμοκρασία, έχει γίνει γνωστή ως ο μοναδικός μεταβλητός παράγοντας κατά μήκος της πειραματικής διαδικασίας, συνεπώς τα διαφορετικά αποτελέσματα οφείλονται στην εκάστοτε θερμοκρασία που εφαρμόστηκε:
 - Διαπιστώθηκε στο σύνολο των διαφορετικών στελεχών του *Kluyveromyces marxianus* χαμηλότερη παραγωγή βιομάζας και SCP στη θερμοκρασία των 35°C. Τόσο οι συγκεντρώσεις βιομάζας όσο και η απόδοση $Y_{X/S}$ εμφανίζονται με σημαντικά χαμηλότερες τιμές στις συνθήκες αυτές, κάτι το οποίο επιβεβαιώνεται και από τη βιβλιογραφία. Η παρατήρηση αυτή οδηγεί στο συμπέρασμα πως τα συγκεκριμένα στελέχη του *Kluyveromyces marxianus* παρά τη θερμοανθεκτικότητά τους, δεν θεωρούνται κατάλληλα για καλλιέργεια σε μη-ασηπτικό περιβάλλον με παράλληλη εφαρμογή συνθηκών υψηλής θερμοκρασίας και όξινου pH, τα οποία μειώνουν τις πιθανότητες επιμολύνσεων, καθώς δεν προκύπτουν επαρκείς συγκεντρώσεις βιομάζας και SCP.
 - Για τις θερμοκρασίες από 20°C έως 30°C παρατηρήθηκαν αποδόσεις παραχθείσας βιομάζας επι καταναλωθέντος υποστρώματος $Y_{X/S}$ με ποσοστά που υπερβήκαν το 50% σε πολλές περιπτώσεις. Φαίνεται ότι οι ιδανικές συνθήκες για παραγωγή βιομάζας ταυτόχρονα επιφέρουν μεγαλύτερες πιθανότητες για τυχόν επιμολύνσεις, συνεπώς κρίνεται αναγκαία η εξισσορόπηση τους, ανάλογα με τους στόχους της εκάστοτε βιοτεχνολογικής εφαρμογής.
 - Η συγκέντρωση SCP σύμφωνα με τα αποτελέσματα των πειραμάτων, ήταν μεγαλύτερη στο εύρος των 25°C - 30°C, με τις μέγιστες τιμές να εμφανίζονται στους 30°C για τα στελέχη EXF-6231 και EXF-6232, και στους 25°C στη περίπτωση EXF-9072. Πρέπει να επισημανθεί ότι το στέλεχος EXF-9072, παρ'ότι εμφάνισε μικρότερες μέγιστες συγκεντρώσεις SCP συγκριτικά με τα υπόλοιπα δύο στελέχη, έδειξε παρόμοιες συγκεντρώσεις SCP ανάμεσα στις διαφορετικές θερμοκρασίες στις οποίες καλλιεργήθηκε. Αυτό διαπιστώθηκε και από τις αποδόσεις παραχθείσας SCP επί παραχθείσας βιομάζας $Y_{SCP/X}$, των οποίων οι τιμές ήταν εξίσου υψηλές προσεγγίζοντας ποσοστό 50% στο σύνολο τους. Στο πλαίσιο αυτό μπορεί να διεξαχθεί το συμπέρασμα ότι το στέλεχος EXF-9072 μπορεί να καλλιεργηθεί σε μεγαλύτερο εύρος θερμοκρασίας, διατηρώντας εξίσου καλή ικανότητα παραγωγής SCP.
- Για σκοπούς πιο αποτελεσματικής αντιμετώπισης του ρυπαντικού φορτίου των συστατικών του τυρόγαλου, συνίσταται εφαρμογή μεικτής καλλιέργειας, όπου ο δεύτερος μικροοργανισμός επωφελείται από την μεταβολική δραστηριότητα του *K. Marxianus*, απομακρύνοντας ταυτόχρονα το COD που καθιστά το τυρόγαλο επιβλαβές. Σε αυτή την περίπτωση, τα ιδανικά αποτελέσματα όσον αφορά βιομάζα και SCP επιτυγχάνονται σε συνθήκες συνεχούς ζύμωσης με ρυθμιζόμενη παροχή υποστρώματος και παράλληλη απομάκρυνση ανεπιθύμητων παρα-προϊόντων.

Βιβλιογραφία

1. Alimardani-Theuil P, Gainvors-Claisse A, Duchiron F. Yeasts: An attractive source of pectinases - From gene expression to potential applications: A review. *Process Biochem.* 2011;46(8):1525–37.
2. Anvari M, Khayati G. Submerged yeast fermentation of cheese whey for protein production and nutritional profile analysis. *Adv J Food Sci Technol.* 2011;3(2):122–6.
3. Argenta AB, Scheer ADP. Membrane Separation Processes Applied to Whey: A Review. *Food Rev Int.* 2020;36(5):499–528.
4. Barnett JA, Entian K-D. A history of research on yeasts 9: Regulation of sugar metabolism. *Yeast.* 2005;22(11):835–94.
5. Belem MAF, Lee BH. Production of bioingredients from *Kluyveromyces marxianus* grown on whey: An alternative. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 1998;38(7):565–98.
6. Ben-Hassan RM, Ghaly AE, Ben-Abdallah N. Heat generation during batch and continuous production of single cell protein from cheese whey. *Biomass and Bioenergy.* 1993;4(3):213–25.
7. Ben-Hassan RM, Ghaly AE, Ben-Abdallah N. Metabolism of cheese whey lactose by *kluyveromyces fragilis* for energy and growth under batch condition. *Appl Biochem Biotechnol.* 1992;33(2):97–116.
8. Ben-Hassan RM. Cheese whey fermentation for single cell protein production and pollution potential reduction. *Tech Univ Nov Scotia.* 1991;
9. Burgess KJ. Production of yeast protein from lactose permeate in a tower fermenter. *J Food Sci Technol [Internet].* 1977; Available from: <https://www.jstor.org/stable/25557939>
10. Carvalho F, Prazeres AR, Rivas J. Cheese whey wastewater: Characterization and treatment. *Sci Total Environ.* 2013;445–446:385–96.
11. Castrillo JI, Ugalde UO. Patterns of energy metabolism and growth kinetics of *Kluyveromyces marxianus* in whey chemostat culture. *Appl Microbiol Biotechnol.* 1993;40(2–3):386–93.
12. Chatzipaschali AA, Stamatis AG. Biotechnological utilization with a focus on anaerobic treatment of cheese whey: Current status and prospects. *Energies.* 2012;5(9):3492–525.
13. Cristiani-Urbina E, Netzahuatl-Muñoz AR, Manriquez-Rojas FJ, Juárez-Ramírez C, Ruiz-Ordaz N, Galíndez-Mayer J. Batch and fed-batch cultures for the treatment of whey with mixed yeast cultures. *Process Biochem.* 2000;35(7):649–57.

14. Darvishi F, Fathi Z, Ariana M, Moradi H. *Yarrowia lipolytica* as a workhorse for biofuel production. *Biochem Eng J.* 2017;127:87–96.
15. Domingos JMB, Puccio S, Martinez GA, Amaral N, Reis MAM, Bandini S, et al. Cheese whey integrated valorisation: Production, concentration and exploitation of carboxylic acids for the production of polyhydroxyalkanoates by a fed-batch culture. *Chem Eng J.* 2018;336:47–53.
16. Feng H, Wang H, Zhang Y, Yan B, Shen G, Yu R. A direct electrochemical biosensing platform constructed by incorporating carbon nanotubes and gold nanoparticles onto redox poly(thionine) film. *Anal Sci.* 2007;23(2):235–9.
17. Finnegan W, Yan M, Holden NM, Goggins J. A review of environmental life cycle assessment studies examining cheese production. *Int J Life Cycle Assess.* 2018;23(9):1773–87.
18. Fonseca GG, Heinzle E, Wittmann C, Gombert AK. The yeast *Kluyveromyces marxianus* and its biotechnological potential. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2008;79(3):339–54.
19. Ghaly AE, Ben-Hassan RM, Ben-Abdallah N. Utilization of cheese whey lactose by *kluyveromyces fragilis* for energy and growth under continuous fermentation. *Appl Biochem Biotechnol Part A Enzym Eng Biotechnol.* 1992;36(1):13–34.
20. Ghaly AE, Kamal MA. Submerged yeast fermentation of acid cheese whey for protein production and pollution potential reduction. *Water Res.* 2004;38(3):631–44.
21. GIEC A, KOSIKOWSKI FV. Activity of Lactose Fermenting Yeasts in Producing Biomass from Concentrated Whey Permeates. *J Food Sci.* 1982;47(6):1892–4.
22. González Siso MI. The biotechnological utilization of cheese whey: A review. *Bioresour Technol.* 1996;57(1):1–11.
23. Gupta M, Kumar N. Scope and opportunities of using glycerol as an energy source. *Renew Sustain Energy Rev.* 2012;16(7):4551–6.
24. Jach M.E., Serefko A., Ziaja M. KM. Yeast Protein as an Easily Accessible Food Source. *Metabolites* [Internet]. 2022;12(1). Available from: <https://www.mdpi.com/2218-1989/12/1/63>
25. Karim A, Aider M. Bioconversion of electro-activated lactose, whey and whey permeate to produce single cell protein, ethanol, aroma volatiles, organic acids and fat by *Kluyveromyces marxianus*. *Int Dairy J.* 2022;129.
26. Karim A, Gerliani N, Aider M. *Kluyveromyces marxianus*: An emerging yeast cell factory for applications in food and biotechnology. *Int J Food Microbiol.* 2020;333.

27. Khan FA. Biotechnology fundamentals, second edition. *Biotechnology Fundamentals, Second Edition*. 2015. 1–649 p.
28. Kitts DD, Weiler K. Bioactive proteins and peptides from food sources. Applications of bioprocesses used in isolation and recovery. *Curr Pharm Des*. 2003;9(16):1309–23.
29. Lachance M-A. Current status of *Kluyveromyces* systematics. *FEMS Yeast Res*. 2007;7(5):642–5.
30. Lane MM, Morrissey JP. *Kluyveromyces marxianus*: A yeast emerging from its sister's shadow. *Fungal Biol Rev*. 2010;24(1–2):17–26.
31. Lappa IK, Papadaki A, Kachrimanidou V, Terpou A, Koulougliotis D, Eriotou E, et al. Cheese whey processing: Integrated biorefinery concepts and emerging food applications. *Foods*. 2019;8(8).
32. Lievore P, Simões DRS, Silva KM, Drunkler NL, Barana AC, Nogueira A, et al. Chemical characterisation and application of acid whey in fermented milk. *J Food Sci Technol*. 2015;52(4):2083–92.
33. Litchfield JH. Single-cell proteins. *Science* (80-). 1983;219(4585):740–6.
34. Löser C, Urit T, Stukert A, Bley T. Formation of ethyl acetate from whey by *Kluyveromyces marxianus* on a pilot scale. *J Biotechnol*. 2013;163(1):17–23.
35. Lukondeh T, Ashbolt NJ, Rogers PL. Fed-batch fermentation for production of *Kluyveromyces marxianus*FII 510700 cultivated on a lactose-based medium. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 2005;32(7):284–8.
36. Merico A, Sulo P, Piškur J, Compagno C. Fermentative lifestyle in yeasts belonging to the *Saccharomyces* complex. *FEBS J*. 2007;274(4):976–89.
37. Mlichová Z, Rosenberg M. Current trends of β -galactosidase application in food technology. *J Food Nutr Res*. 2006;45(2):47–54.
38. Morrissey JP, Varela JA, Gethins L, Stanton C, Ross P. Applications of *kluyveromyces marxianus* in biotechnology. *Yeast Diversity in Human Welfare*. 2017. 439–453 p.
39. Nasser AT, Rasoul-Amini S, Morowvat MH, Ghasemi Y. Single cell protein: Production and process. *Am J Food Technol*. 2011;6(2):103–16.
40. Nayeem, M., Chauhan, K., Khan, S., Rattu, G., Dhaka, R. K., & Siddiqui H. Optimization of low-cost substrate for the production of single cell protein using *Kluyveromyces marxianus*. *Pharma J*. 2017;6(8):22–5.

41. Oreopoulou V, Russ W. Utilization of by-products and treatment of waste in the food industry. *Utilization of By-Products and Treatment of Waste in the Food Industry*. 2007. 1–316 p.
42. Pires AF, Marnotes NG, Rubio OD, Garcia AC, Pereira CD. Dairy by-products: A review on the valorization of whey and second cheese whey. *Foods*. 2021;10(5).
43. Prazeres AR, Carvalho F, Rivas J. Cheese whey management: A review. *J Environ Manage*. 2012;110:48–68.
44. Rech R, Cassini CF, Secchi A, Ayub MAZ. Utilization of protein-hydrolyzed cheese whey for production of β -galactosidase by *Kluyveromyces marxianus*. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 1999;23(2):91–6.
45. Reihani SFS, Khosravi-Darani K. Influencing factors on single-cell protein production by submerged fermentation: A review. *Electron J Biotechnol*. 2019;37:34–40.
46. Ritala A, Häkkinen ST, Toivari M, Wiebe MG. Single cell protein-state-of-the-art, industrial landscape and patents 2001-2016. *Front Microbiol*. 2017;8(OCT).
47. Rubio-Teixeira M. Endless versatility in the biotechnological applications of *Kluyveromyces* LAC genes. *Biotechnol Adv*. 2006;24(2):212–25.
48. Ryan MP, Walsh G. The biotechnological potential of whey. *Rev Environ Sci Biotechnol*. 2016;15(3):479–98.
49. Schultz N, Chang L, Hauck A, Reuss M, Syldatk C. Microbial production of single-cell protein from deproteinized whey concentrates. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2006;69(5):515–20.
50. Singh R, Kumar M, Mittal A, Mehta PK. Microbial enzymes: industrial progress in 21st century. *3 Biotech*. 2016;6(2).
51. Sinha R, Radha C, Prakash J, Kaul P. Whey protein hydrolysate: Functional properties, nutritional quality and utilization in beverage formulation. *Food Chem*. 2007;101(4):1484–91.
52. Smithers GW. Whey-ing up the options - Yesterday, today and tomorrow. *Int Dairy J*. 2015;48:2–14.
53. Sommella E, Pepe G, Ventre G, Pagano F, Conte GM, Ostacolo C, et al. Detailed peptide profiling of “Scotta”: from a dairy waste to a source of potential health-promoting compounds. *Dairy Sci Technol*. 2016;96(5):763–71.
54. Van Uden N. Temperature Profiles of Yeasts. Vol. 25, *Advances in Microbial Physiology*. 1985. 195–251 p.

55. Verduyn C. Physiology of yeasts in relation to biomass yields. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 1991;60(3–4):325–53.
56. Yadav, J.S.S., Bezawada J., Ajila C.M., Yan S. TRD. Mixed culture of *Kluyveromyces marxianus* and *Candida krusei* for single-cell protein production and organic load removal from whey. *Bioresour Technol* [Internet]. 2014;164:119–27. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0960852414006099?via%3Dihub>
57. Yadav JSS, Bezawada J, Elharche S, Yan S, Tyagi RD, Surampalli RY. Simultaneous single-cell protein production and COD removal with characterization of residual protein and intermediate metabolites during whey fermentation by *K. marxianus*. *Bioprocess Biosyst Eng*. 2014;37(6):1017–29.
58. Yadav JSS, Yan S, Pilli S, Kumar L, Tyagi RD, Surampalli RY. Cheese whey: A potential resource to transform into bioprotein, functional/nutritional proteins and bioactive peptides. *Biotechnol Adv*. 2015;33(6):756–74.
59. Yunus F-U-N, Nadeem M, Rashid F. Single-cell protein production through microbial conversion of lignocellulosic residue (wheat bran) for animal feed. *J Inst Brew*. 2015;121(4):553–7.
60. Zhang S, Yang F, Wang Q, Hua Y, Zhao ZK. High-level secretory expression and characterization of the recombinant *Kluyveromyces marxianus* inulinase. *Process Biochem*. 2012;47(1):151–5.