

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

*«Αξιοποίηση βιομηχανικών παραπροϊόντων προς
παραγωγή φουμαρικού οξέος»*

Εξεταστική επιτροπή:

Σεραφείμ Παπανικολάου, Επίκουρος καθηγητής

Αποστόλης Κουτίνας, Επίκουρος καθηγητής

Νικόλαος Στοφόρος, Αναπληρωτής καθηγητής

Επιβλέπων καθηγητής:

Σεραφείμ Παπανικολάου, Επίκουρος καθηγητής

Νικόλαος Ι. Ανδρουτσόπουλος

ΑΘΗΝΑ 2015

«Η ολοκλήρωση της διπλωματικής εργασίας συγχρηματοδοτήθηκε μέσω του Έργου «Υποτροφίες ΙΚΥ» από πόρους του ΕΠ «Εκπαίδευση και Δια Βίου Μάθηση», του Ευρωπαϊκού Κοινωνικού Ταμείου (ΕΚΤ) του ΕΣΠΑ 2007-2013».

Ευχαριστίες

Η παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας, του τμήματος Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου της σχολής Τροφίμων, Βιοτεχνολογίας & Ανάπτυξης του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών. Θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους μαζί και καθένα ξεχωριστά όσους βοήθησαν να γίνει άλλος ένας στόχος μου πραγματικότητα.

Πρωτίστως, θα ήθελα να εκφράσω τις βαθύτερες ευχαριστίες μου στον επιβλέποντα της μεταπτυχιακής μελέτης Κο Σεραφείμ Παπανικολάου, Επίκουρος καθηγητής του Γ.Π.Α, για την καθοδήγησή του στη σύλληψη και υλοποίηση του θέματος, καθώς και για τις πολύτιμες επισημάνσεις του.

Θα ήθελα, επίσης, να ευχαριστήσω τα μέλη της επιτροπής, τον Επίκουρο καθηγητή Κο Αποστόλη Κουτίνα και του Αναπληρωτή καθηγητή Νικόλαο Στοφόρο για την ουσιαστική βοήθεια τους κατά την εκπόνηση της μελέτης και για την τιμή που μου έκαναν να συμμετέχουν στην κρίση της.

Ιδιαίτερα θερμά θα ήθελα να ευχαριστήσω την υποψήφια διδάκτορα Κατερίνα Παπαδάκη για τις εύστοχες συμβουλές, την καθοδήγηση και για την συνεργασία της κατά την διεξαγωγή της πειραματικής διαδικασίας της μεταπτυχιακής διατριβής.

Πιο πολύ ευχαριστώ όλους τους συμφοιτητές του Π.Μ.Σ., τους υποψήφιους διδάκτορες και μεταδιδάκτορες καθώς και το προσωπικό των εργαστηρίων: Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων & Μηχανικής Τροφίμων, Επεξεργασίας & Συντήρησης Γ. Προϊόντων, για την συνεργασία και το ευχάριστο κλίμα που επικράτησε στον χώρο του εργαστηρίου.

Πάνω από όλους και ξεχωριστά ευχαριστώ τους δικούς μου ανθρώπους, που αν και μακριά μου, τους ένιωθα πολύ κοντά, τους γονείς μου Ιωάννη και Αλεξάνδρα και τον αδελφό μου Ηλία.

Περίληψη

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη της επίδρασης της μορφολογίας του μύκητα *Rhizopus arrhizus* NRRL 2582 στην παραγωγή προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας κατά την υγρή καλλιέργειά του σε υπόστρωμα γλυκόζης παρουσία εμπορικών πηγών αζώτου. Τα πειράματα στόχευσαν στην δημιουργία δύο διαφορετικών μορφολογιών εκείνης των συνεκτικών σφαιριδίων βιομάζας (pellets) και του ομοιόμορφα διάσπαρτου μυκηλίου (dispersed mycelia). Τέλος, μελετήθηκε η δυνατότητα παραγωγής ενζυμικά υδρολυμένου σογιάλευρου και η αξιοποίησή του, ως πηγή αζώτου και ιχνοστοιχείων στις μικροβιακές ζυμώσεις.

Αρχικά, μελετήθηκε η επίδραση της βιομάζας σε μορφή σφαιριδίων, του μύκητα *Rhizopus arrhizus* NRRL 2582, σε 25 g/L αρχική συγκέντρωση γλυκόζης. Η διάρκεια επώασης του εμβολίου της προκαλλιέργειας ήταν 7 και 24 ώρες. Στο μέσο της ζύμωσης προστέθηκαν, θειϊκό αμμώνιο σε δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις (0.2 και 0.04 g/L) και ανθρακικό ασβέστιο ως παράγοντας ρύθμισης του pH και παραγωγής φουμαρικού οξέος. Διαπιστώθηκε ότι οι καλύτερες συνθήκες για την βιοτεχνολογική παραγωγή φουμαρικού οξέος με τη χρήση βιομάζας υπό μορφή σφαιριδίων, ήταν η προκαλλιέργεια με διάρκεια επώασης 24 ωρών σε συνδυασμό με αρχική συγκέντρωση 0.2 g/L θειϊκού αμμωνίου. Σε αυτές τις συνθήκες παράχθηκαν 14.7 g/L φουμαρικού οξέος, η απόδοση ήταν 0.6 g φουμαρικού οξέος ανά g συνολικών σακχάρων και η παραγωγικότητα του μύκητα ανήλθε στα 0.2 g/L/h.

Στη συνέχεια των πειραμάτων, μελετήθηκε η επίδραση της μορφολογίας αυτή τη φορά με το σχηματισμό διάσπαρτου μυκηλίου του μύκητα *Rhizopus arrhizus* NRRL 2582 για την παραγωγή φουμαρικού οξέος. Συγκεκριμένα, μελετήθηκε η επίδραση της αρχικής συγκέντρωσης, του υποστρώματος 25 και 50 g/L γλυκόζης και του θειϊκού αμμωνίου (0.2 και 0.04 g/L), στο υγρό θρεπτικό μέσο της κύριας καλλιέργειας. Η μεγαλύτερη συγκέντρωση φουμαρικού οξέος (30.1 g/L) επιτεύχθηκε όταν η αρχική συγκέντρωση της γλυκόζης ήταν 50 g/L και 0.04 g/L θειϊκό αμμώνιο. Η μεγαλύτερη απόδοση της παρούσας μελέτης (0.84 g/g) επιτεύχθηκε με την ίδια αρχική συγκέντρωση θειϊκού αμμωνίου (0.04 g/L) ενώ η αρχική συγκεντρωση γλυκόζης ήταν 25 g/L στο υγρό της ζύμωσης. Η μεγαλύτερη παραγωγικότητα της

εργασίας ήταν 0.27 g/L/h με αρχική συγκέντρωση 25 g/L γλυκόζης και 0.2 g/L θειϊκό αμμώνιο.

Όσον αφορά στα μορφολογικά χαρακτηριστικά της βιομάζας τα καλύτερα αποτελέσματα επιτεύχθηκαν όταν ο αριθμός των κυττάρων ήταν μεγαλύτερο από 10^4 κύτταρα και η μέση διάμετρος αυτών ήταν 0.5 mm ανεξάρτητα από τη σύσταση της προκαλλιέργειας.

Στο επόμενο πειραματικό στάδιο πραγματοποιήθηκε υδρόλυση του σογιαλεύρου με τη χρήση των πρωτεολυτικών ενζύμων που παρήχθησαν από το μύκητα *Aspergillus oryzae* κατά την καλλιέργεια του σε υπόστρωμα στερεής κατάστασης. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι, ο καλύτερος χρόνος επώασης για την παραγωγή πρωτεολυτικών ενζύμων (197.63 U/g) του εν λόγω μύκητα, ήταν οι 70 ώρες ενώ η βέλτιστη θερμοκρασία υδρόλυσης ήταν οι 45 °C. Υπό αυτές τις συνθήκες, η μέγιστη παραγωγή αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων αμινοξέων κι πεπτιδίων (Free Amino Nitrogen ή FAN) που επιτεύχθηκε ήταν 1363 mg/L και του ανόργανου φωσφόρου (Inorganic Phosphorus ή IP) ήταν 105 mg/L στο υδρόλυμα μετά από 48 ώρες.

Τέλος, μελετήθηκε η αντικατάσταση των εμπορικών πηγών αζώτου της προκαλλιέργειας (στην περίπτωση που παράγεται διάσπαρτο μυκήλιο) με το υδρόλυμα σογιαλεύρου σε δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις, 200 και 400 mg/L FAN. Η μεγαλύτερη συγκεντρωση φουμαρικού οξέος (33 g/L) και η μεγαλύτερη απόδοση (0.69 g/g) επιτεύχθηκαν όταν το αρχικό FAN της προκαλλιέργειας ήταν 200 mg/L. Η μεγαλύτερη παραγωγικότητα που επιτεύχθηκε ήταν 0.22 g/L/h όταν στην προκαλλιέργεια χρησιμοποιήθηκε αρχική συγκέντρωση FAN ίση με 400 mg/L ως πηγή αζώτου.

Λέξεις κλειδιά: *Rhizopus arrhizus* NRRL 2582, φουμαρικό οξύ, μορφολογία, ενζυμικό υδρόλυμα σογιαλεύρου.

Abstract

The aim of the present thesis was to study the effect of fungal morphology of *Rhizopus arrhizus* NRRL 2582 in order to produce high added value chemicals (platform chemicals) using glucose as carbon source and commercial nitrogen sources. The impact of two different cell morphologies - pellets and dispersed mycelia - on fumaric acid production was evaluated. Moreover, the production and utilization of enzymatic soybean meal hydrolysate as nitrogen source in the preculture broth was assessed.

Fumaric acid production was initially studied by using pellets of the fungal strain *R. arrhizus* NRRL 2582 at an initial concentration of 25 g/L glucose. The preculture used as inoculum was incubated for 7 and 24 hours. The fermentation medium contained ammonium sulfate at two different concentrations (0.2 and 0.04 g/L) and calcium carbonate as neutralizing agent and for induction of succinic acid production. The results indicate that the best conditions for the biotechnological production of fumaric acid was observed when the inoculum was incubated for 24 hours in combination with an initial concentration of 0.2 g/L ammonium sulfate. The fumaric acid concentration produced was 14.7 g/L, the yield achieved was 0.6 g fumaric acid per g total sugars and the productivity was 0.2 g/L/h.

The effect of dispersed mycelia of fungal strain *R. arrhizus* NRRL 2582 for the production of fumaric acid was also assessed. In particular, the effect of initial concentrations of glucose (25 and 50 g/L) and ammonium sulfate (0.2 and 0.04 g/L) was evaluated. The highest concentration of fumaric acid (30.1 g/L) produced by using commercial nitrogen sources was achieved at 50 g/L of initial glucose concentration and 0.04 g/L of initial ammonium sulfate concentration. The highest yield (0.84 g/g) was achieved at 0.04 g/L of initial ammonium sulfate concentration and 25 g/L of initial glucose concentration. The highest productivity (0.27 g/L/h) was achieved at an initial glucose concentration of 25 g/L and an initial ammonium sulfate concentration of 0.2 g/L.

Regarding the morphological characteristics of fungal biomass, the best results were achieved when the number of cells was higher than 10^4 and the average diameter thereof was 0.5 mm, regardless the nutrient composition of the preculture medium.

Hydrolysis of soybean meal using proteolytic enzymes was achieved after production of the enzymes via solid state fermentation using the fungal strain *Aspergillus oryzae*. Results showed that the incubation time leading to the highest production of proteolytic enzymes (197.63 U/g) was 70 hours and the optimal hydrolysis temperature was 45 °C, producing a fermentation nutrient supplement rich in free amino nitrogen (FAN) and inorganic phosphorus (IP). The highest concentrations achieved were 1363 mg/L FAN and 105 mg/L IP at 48 hours.

It was also investigated the potential of utilize the soybean meal hydrolysate as nitrogen source in order to substitute the commercial nitrogen sources in the preculture medium. Two different FAN concentrations were used, 200 and 400 mg/L FAN, in dispersed mycelia preculture. The highest concentration of fumaric acid (33 g/L) and the highest yield (0.69 g/g) were achieved when the FAN concentration in the preculture medium was 200 mg/L. The highest productivity (0.22 g/L/h) was achieved when a FAN concentration of 400 mg/L was used in the preculture medium.

Key words: *Rhizopus arrhizus* NRRL 2582, fumaric acid, morphology, enzymatic soybean meal hydrolysate.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

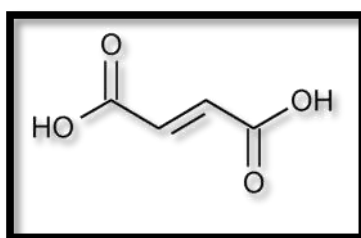
1	ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
1.1	Φουμαρικό οξύ	2
1.2	Ιδιότητες & Εφαρμογές	2
1.3	Παραγωγή φουμαρικού οξέος με χημικές μεθόδους	4
1.4	Ενζυμική παραγωγή φουμαρικού οξέος	5
1.5	Μικροβιακή παραγωγή φουμαρικού οξέος.....	5
1.5.1	Στελέχη που παράγουν φουμαρικό οξύ	5
1.5.2	Μορφολογία μυκήτων του γένους <i>Rhizopus</i>	6
1.5.3	Βιοχημικό μονοπάτι.....	7
1.6	Αξιοποίηση παραπροϊόντων της βιομηχανίας βιοντήζελ	9
1.7	Σκοπός παρούσας μελέτης.....	13
2	ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ.....	14
2.1	Βιολογικό υλικό.....	14
2.1.1	Ανανέωση των μικροοργανισμών	14
2.1.2	Παραγωγή σπορίων	15
2.2	Θρεπτικά υποστρώματα	17
2.3	Προκαλλιέργειες ανάπτυξης του μύκητα <i>Rhizopus arrhizus</i>	19
2.3.1	Προκαλλιέργεια για την παραγωγή σφαιριδίων βιομάζας (pellets)	19
2.3.2	Προκαλλιέργεια για την παραγωγή διάσπαρτου μυκηλίου (dispersed mycelia).....	19
2.4	Ζυμώσεις υγρής κατάστασης για την παραγωγή φουμαρικού οξέος.....	20
2.5	Παραγωγή υδρολύματος σογιαλεύρου	21
2.5.1	Παραγωγή πρωτεολυτικών ενζύμων μέσω ζύμωσης στερεής κατάστασης.....	21
2.5.2	Υδρόλυση σογιαλεύρου	22
2.6	Αναλύσεις	22
2.6.1	Προσδιορισμός του φουμαρικού οξέος.....	23
2.6.2	Ανάλυση εικόνας για την αξιολόγηση της μορφολογίας του μύκητα <i>Rhizopus arrhizus</i>	23
2.6.3	Προσδιορισμός παραγόμενης βιομάζας.....	24
2.6.4	Προσδιορισμός σακχάρων και οξέων	24
2.6.5	Προσδιορισμός αναγόντων σακχάρων	24

2.6.6	Προσδιορισμός του αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων.....	25
2.6.7	Προσδιορισμός ανόργανου φωσφόρου.....	25
2.6.8	Προσδιορισμός pH	26
2.6.9	Προσδιορισμός της δραστηριότητας των πρωτεολυτικών ενζύμων	26
3	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ & ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	27
3.1	Επίδραση της μορφολογίας του μύκητα <i>Rhizopus arrhizus</i> NRRL 2582 στην παραγωγή φουμαρικού οξέος.....	27
3.1.1	Παραγωγή βιομάζας υπό μορφή σφαιριδίων (pellet)	28
3.1.2	Παραγωγή βιομάζας υπό μορφή ομοιόμορφων διάσπαρτων μυκηλιακών υφών (dispersed mycelia).....	41
3.2	Παραγωγή υδρολύματος σογιαλεύρου με την χρήση πρωτεολυτικών ενζύμων του μύκητα <i>Aspergillus oryzae</i>	54
3.2.1	Παραγωγή των πρωτεολυτικών ενζύμων.....	54
3.2.2	Βελτιστοποίηση της υδρόλυσης του σογιαλεύρου.....	56
3.3	Αξιοποίηση υδρολύματος σογιαλεύρου από τον μύκητα <i>Rhizopus arrhizus</i> NRRL 2582 για την παραγωγή φουμαρικού οξέος	59
3.4	Παράθεση βιβλιογραφικών δεδομένων & σύγκριση των αποτελεσμάτων με εκείνα της παρούσας μελέτης.....	62
4	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	64
5	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	66

1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τα τελευταία χρόνια το ενδιαφέρον των ερευνητών έχει εστιαστεί στην παραγωγή χημικών ουσιών όπως αλκοόλες και οργανικά οξέα μέσω της βιοτεχνολογικής οδού. Η παραγωγή οργανικών οξέων, συμπεριλαμβανομένου του φουμαρικού οξέος με τη χρήση μυκήτων, όπως τα στελέχη του γένους *Rhizopus*, ανά τακτά χρονικά διαστήματα γίνεται θέμα για βιβλιογραφικές ανασκοπήσεις (Magnuson & Lasure, 2004; Goldberg et al., 2006; Roa-Engel et al., 2008; Koutinas et al., 2014). Μαζί με το ηλεκτρικό και το μηλικό οξύ, το φουμαρικό οξύ αξιολογήθηκε από τους Werpy & Patersen (2004) ως ένα από τα δώδεκα πιο σημαντικά και ευρέως χρησιμοποιούμενες χημικές ουσίες (platform chemicals).

Κατά τη δεκαετία του 1940, το φουμαρικό οξύ παραγόταν σε βιομηχανική κλίμακα, στις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής, μέσω μικροβιακών ζυμώσεων. Αργότερα όμως, με την αύξηση του κόστους παραγωγής, λόγω της χαμηλής απόδοσης (< 70 g/L) και της παραγωγικότητας (< 1 g/L/h) της βιοτεχνολογικής διεργασίας, αυτή αντικαταστάθηκε από τη πετροχημική σύνθεση. Δεδομένου, όμως, ότι τα τελευταία χρόνια παράλληλα με την αύξηση της τιμής του πετρελαίου αυξήθηκαν και οι τιμές των παραγώγων του, επικεντρώθηκε εκ νέου το ενδιαφέρον στην βιοτεχνολογική παραγωγή του φουμαρικού οξέος από ανανεώσιμες πρώτες ύλες (Roa-Engel, 2010). Τέλος, ιδιαίτερο ενδιαφέρον εστιάζεται στην δυνατότητα χρήσης διοξειδίου του άνθρακα ως επιπλέον πηγή άνθρακα για την παραγωγή του φουμαρικού οξέος (Zhou, 1999).



Σχήμα 1.1-1 Χημική δομή του φουμαρικού οξέος (http://www.pharmacopeia.cn/v29240/usp29nf24s0_m34490.html).

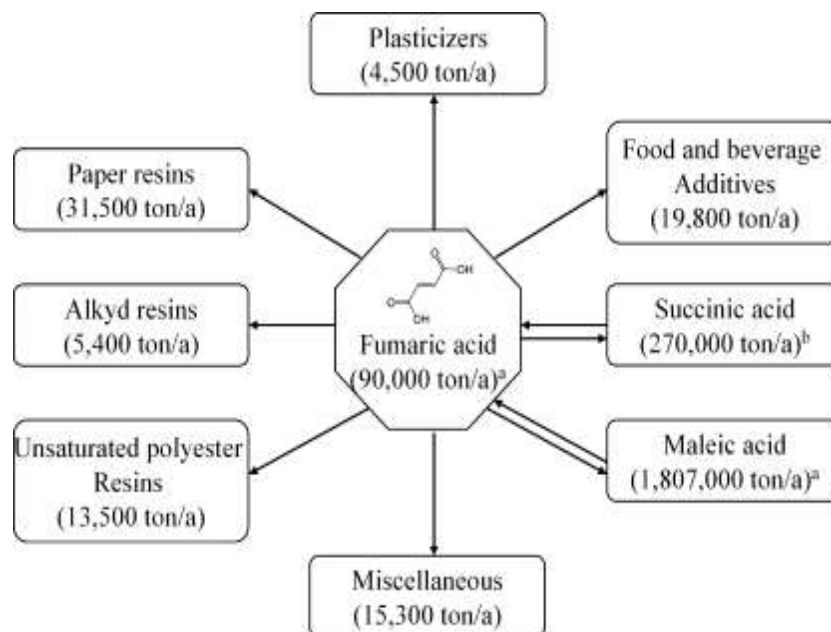
1.1 Φουμαρικό οξύ

Το φουμαρικό οξύ ($\text{HO}_2\text{CCH}=\text{CHCO}_2\text{H}$) είναι ένα φυσικό δικαρβοξυλικό οργανικό οξύ. Απομονώθηκε για πρώτη φορά από το φυτό *Fumaria officinalis* (Goldberg, 2006). Επίσης, συναντάται στη βιβλιογραφία με τις ονομασίες, (E)-2-βουτενοδιοϊκό οξύ (IUPAC ID) ή trans-1,2-αιθυλενο-δικαρβοξυλικό οξύ. Ως ενδιάμεσος μεταβολίτης του κύκλου του Krebs δύναται να παραχθεί σε μικρές ποσότητες από πολλούς μικροοργανισμούς.

Απαντάται σε στερεά μορφή, λευκού χρώματος, με μοριακό βάρος 116.07 g/mol και χαρακτηρίζεται από ιδιαίτερα χαμηλή διαλυτότητα (6-7 g/L σε θερμοκρασία 25 °C, ενώ στους 80 °C ανέρχεται στα 50 g/L) (Weiss & Downs, 1923a; Lange & Sinks, 1930; Stephen, 1965). Παρουσιάζει τιμές pK_a ίσες με 3.1 και 4.64 (Das et al., 1980; Lohbeck et al., 2005).

1.2 Ιδιότητες & Εφαρμογές

Ο διπλός δεσμός του φουμαρικού οξέος μαζί με τις δύο όξινες καρβοξυλικές ομάδες που περιέχει, το καθιστούν χρήσιμο και με πολλές βιομηχανικές εφαρμογές (Σχήμα 1.2-1). Μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως υλικό εκκίνησης για την δημιουργία πολυμερών, π.χ. ακόρεστες πολυεστερικές ρητίνες ή σε αντιδράσεις εστεροποίησης. Οι ακόρεστες πολυεστερικές ρητίνες προστίθενται σε υαλόνημα για την παραγωγή υψηλής αντοχής πλαστικού (fiberglass reinforced plastic, FRP), χρήσιμο για την κατασκευή πλοίων, δεξαμενών και σωληνώσεων. Το πιο σύνηθες υλικό εκκίνησης γι' αυτές τις εφαρμογές είναι ο μηλεϊνικός ανυδρίτης, χημική ουσία η οποία είναι πιο φθηνή από το φουμαρικό οξύ, αλλά το τελευταίο προτιμάται λόγω της αντοχής της δομής των πολυμερών του και επειδή είναι μη τοξικό-φυσικό υλικό (Straathof & van Gulik, 2012).



Σχήμα 1.2-1 Ετήσια παραγωγή και εφαρμογές του φουμαρικού οξέος (Roa-Engel, 2010).

Χρησιμοποιείται ως πρόσθετο τροφίμων και ποτών (E297) από το 1946 προσδίδοντας ποιότητα στα προϊόντα και μειώνοντας παράλληλα το κόστος. Στις μέρες μας βρίσκει εφαρμογή σε πληθώρα προϊόντων, όπως tortillas (είδος λεπτού ψωμιού) σιταριού και καλαμποκιού, ζύμες μπισκότου που διατίθενται σε θερμοκρασία ψυγείου, χυμούς φρούτων, επιδόρπιο ζελέ, πρόσθετα πηκτινών και στο κρασί μεταξύ άλλων (Straathof & van Gulik, 2012).

Επίσης, βρίσκει σημαντική εφαρμογή ως συμπλήρωμα διατροφής των αγροτικών ζώων. Μελέτη έδειξε ότι, μεγάλη μείωση, περίπου 70%, στην εκπομπή μεθανίου στα βοοειδή επιτυγχάνεται προσθέτοντας το φουμαρικό οξύ στη διατροφή των ζώων (McGinn et al., 2004) και συμπληρώνει ότι αυξάνει την απόδοση της τροφής στα πουλερικά και στους χοίρους.

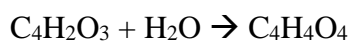
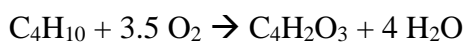
Επιπρόσθετα, άλατα του φουμαρικού οξέος μπορούν να μετατραπούν ενζυμικά σε L-ασπαρτικό οξύ και L-μηλικό οξύ από την ασπαρτάση και τη φουμαράση, αντίστοιχα. Οι βιομηχανικές διεργασίες για την παραγωγή των προϊόντων αυτών περιγράφονται από τους Liese et al. (2006).

Τέλος, μια εντελώς διαφορετική εφαρμογή του φουμαρικού οξέος είναι η χρήση του στην ιατρική επιστήμη. Αρκετές μελέτες εδώ και αρκετά χρόνια αναφέρουν την συνεισφορά στην θεραπεία της ψωρίασης (Altmeyer et al., 1994;

Mrowietz et al., 1998; Reichet al., 2009), σύμφωνα με τις οποίες η μακροχρόνια θεραπεία ασθενών που πάσχουν από μέτρια ή οξεία ψωρίαση με δι-μεθυλεστέρες του φουμαρικού οξέος έδειξαν μια καλή και σταθερή κλινική αποτελεσματικότητα. Επίσης, οι δι-μεθυλεστέρες του φουμαρικού οξέος, είναι πολλά υποσχόμενοι στη θεραπεία της σκλήρυνσης κατά πλάκας (Killestein et al., 2011).

1.3 Παραγωγή φουμαρικού οξέος με χημικές μεθόδους

Για την χημική σύνθεση του φουμαρικού οξέος, χρησιμοποιείται το βενζόλιο ως υλικό εκκίνησης, αλλά τα τελευταία χρόνια οι χημικές μέθοδοι εστιάζουν στην οξείδωση του *n*-βουτανίου ή μείγματα *n*-βουτανίου-*n*-βουτενίου. Αναλυτικά, από την καταλυτική οξείδωση του βενζολίου σχηματίζεται ο μηλεϊνικός ανυδρίτης, ενώ από την αντίδραση της οξείδωσης του βουτανίου παράγεται, όπως και πριν, μηλεϊνικός ανυδρίτης. Η αντίδραση καταλύεται από οξείδια φωσφόρου ή βαναδίου. Κατά τη διεργασία παράγεται νερό ως παραπροϊόν της αντίδρασης, το οποίο υγροποιείται από την δράση του αερίου με μερική συμπύκνωση. Στη συνέχεια, οργανικοί διαλύτες προσροφούν τον μηλεϊνικό ανυδρίτη της αέριας φάσης (η απόδοση της διεργασίας είναι > 98%). Στο μείγμα διαλύτη-μηλεϊνικού ανυδρίτη γίνεται κλασματική απόσταξη για τον διαχωρισμό τους και ο διαλύτης επιστρέφεται στη στήλη προσρόφησης. Τέλος, μέσω είτε *cis-trans* ισομερίωσης, είτε με θέρμανση το μηλεϊνικό οξύ μετατρέπεται σε φουμαρικό οξύ (Roa-Engel et al, 2008). Η αντίδραση είναι η ακόλουθη:



Οι υψηλές θερμοκρασίες που απαιτούνται για την μετατροπή του μηλεϊνικού οξέος σε φουμαρικό οξύ, δημιουργεί παραπροϊόντα κατά τη διεργασία με αποτέλεσμα η απόδοση να είναι μικρή. Ίδια εικόνα παρατηρείται και από τον ισομερισμό του μηλεϊνικού σε φουμαρικό οξύ λόγω περιορισμού κατά την ισορροπία της καταλυτικής αντίδρασης (Goto et al., 1998).

1.4 Ενζυμική παραγωγή φουμαρικού οξέος

Αναζητήθηκαν ένζυμα τα οποία έχουν την δυνατότητα να μετατρέψουν το μηλεϊνικό σε φουμαρικό οξύ χωρίς την παραγωγή παραπροϊόντων. Ως γνωστόν το ένζυμο μηλεϊνική ισομεράση (μηλεϊκή cis-trans-ισομεράση) καταλύει στους μικροοργανισμούς την αντίδραση σχηματισμού του φουμαρικού οξέος από το μηλεϊνικό οξύ. Αυτοί που δύναται να παράξουν μηλεϊνική ισομεράση είναι στελέχη του γένους *Pseudomonas* (Otsuka, 1961), *Alcaligenes faecalis* (Takamura et al., 1969) και *Pseudomonas fluorescens* (Scher & Lennarz et al., 1969). Όμως, η παραγόμενη μηλεϊνική ισομεράση ήταν ασταθής σε αυξημένες θερμοκρασίες, οπότε έγινε απαραίτητη η εύρεση ενός μικροοργανισμού που να παράγει ένα θερμοανθεκτικό ένζυμο ικανό να αντέξει σε υψηλότερες θερμοκρασίες. Σύμφωνα με τη μελέτη των Goto et al. (1998), θερμοάντοχη μηλεϊνική ισομεράση δύναται να παραχθεί από τα στελέχη *Bacillus stearotherophilus*, *Bacillus brevis* και *Bacillus sp.* MI-105.

Επίσης, σε μελέτη που έγινε το 1997 από τους NakajimaKamber et al. με χρήση του στελέχους *Pseudomonas alcaligenes* XD-1 επιτεύχθηκε μεγάλου βαθμού μετατροπή μηλεϊνικού οξέος σε φουμαρικό οξύ, με την παραγωγικότητα να ανέρχεται στα 6.98 g/L/h. Υπό φυσιολογικές συνθήκες, ο μικροοργανισμός αυτός δεν συσσωρεύει φουμαρικό οξύ, αλλά με τη θέρμανση της βιομάζας του στους 70 °C για μια ώρα η φουμαράση έχανε την δραστηριότητά της, αλλά έμενε άθικτη η δραστηριότητα της μηλεϊνικής ισομεράσης. Τέλος, με την προσθήκη ιόντων ασβεστίου κατά τη διεργασία αυξάνεται η θερμική σταθερότητα της μηλεϊνικής ισομεράσης.

Σε άλλη μελέτη του οι Ichikawa et al. (2013) κατάφεραν με το ίδιο στέλεχος *Pseudomonas alcaligenes* XD-1 να αυξήσουν την απόδοση της διεργασίας στο 95%.

1.5 Μικροβιακή παραγωγή φουμαρικού οξέος

1.5.1 Στελέχη που παράγουν φουμαρικό οξύ

Μετά την ανακάλυψη της βιοτεχνολογικής παραγωγής του φουμαρικού οξέος το 1911 από τον Felix Ehrlich με το στέλεχος *Rhizopus nigricans*, το 1939 οι Foster et al., καλλιέργησαν 41 στελέχη από 8 διαφορετικά γένη για την ταυτοποίηση αποδοτικών στελεχών. Τα καλύτερα στελέχη που ταυτοποιήθηκαν για την παραγωγή

φουμαρικού οξέος ανήκαν στα γένη *Rhizopus*, *Mucor*, *Cunninghamella* και *Circinella*. Μεταξύ των στελεχών αυτών, οι μύκητες του γένους *Rhizopus* (*nigricans*, *arrhizus* και *oryzae*) ανήκουν στα πιο παραγωγικά στελέχη (Foster & Waksman, 1938; Romano et al., 1967; Kenealy et al., 1986; Moresi et al., 1991; Xu et al., 2010), και μεταξύ αυτών και το στέλεχος *Rhizopus arrhizus* NRRL 2582, που χρησιμοποιήθηκε στη παρούσα μελέτη. Τέλος, άλλοι μύκητες που έχουν την ικανότητα να παράγουν φουμαρικό οξύ αλλά σε μικρότερες ποσότητες, είναι τα είδη *Aspergillus niger* και *Aspergillus flavus* (Goldberg et al., 2006).

Αξίζει να σημειωθεί ότι το φουμαρικό οξύ δεν παράγεται βιοτεχνολογικά μονό με τη χρήση μυκήτων αλλά δύναται να χρησιμοποιηθούν και βακτηριακά στελέχη για την παραγωγή του. Ενδεικτικά, οι Donnelly et al., (2001) πρότειναν τη χρήση ενός γενετικά τροποποιημένου στελέχους του γένους *Lactobacillus* για την παραγωγή φουμαρικού οξέος (Roa-Engel et al., 2008).

1.5.2 Μορφολογία μυκήτων του γένους *Rhizopus*

Η μορφολογία των μυκήτων έχει μεγάλη σημασία στις καλλιέργειες υγρής κατάστασης (Ciriacy, 1997). Οι μύκητες έχουν την ικανότητα να αναπτύσσουν διαφορετική μορφολογία όταν βρίσκονται σε υγρό περιβάλλον, όπως παρατηρείται στην *Εικόνα 1.5-1*: α) ομοιόμορφα διάσπαρτο μυκήλιο (dispersed mycelia), β) συνεκτικά σφαιρίδια βιομάζας (pellets) και γ) ακανόνιστα συσσωματώματα (clumps) (Gibbs et al., 2000; Znidarsic & Pavko, 2001).



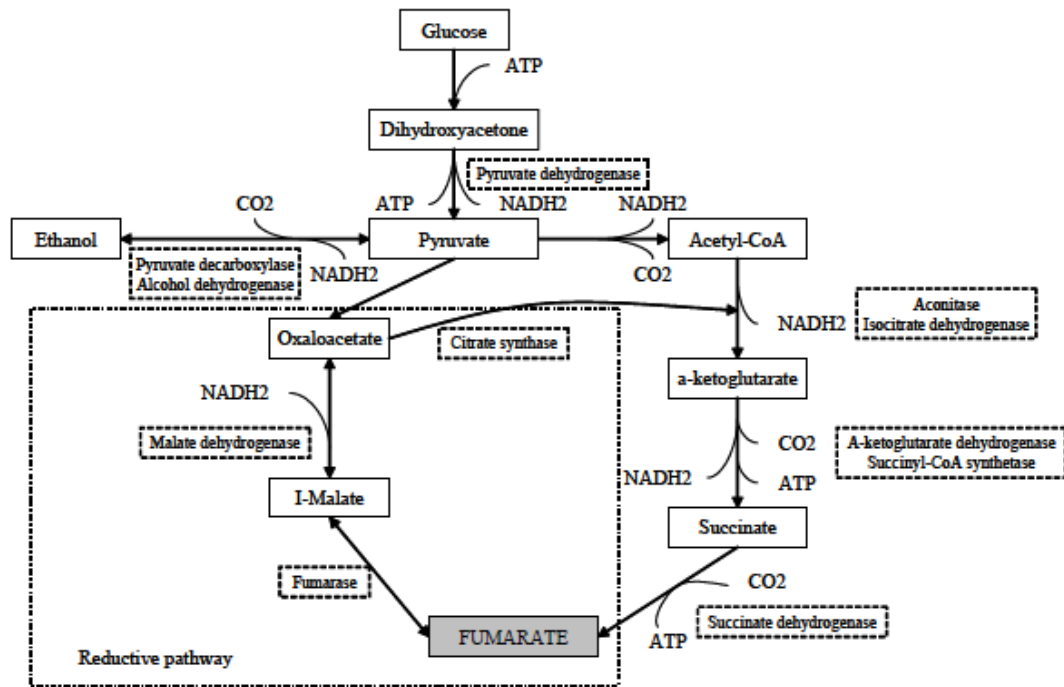
Εικόνα 1.5-1 Διαφορετικές μορφολογίες της μάζας του μύκητα *Rhizopus arrhizus* NRRL 2582 (από αριστερά προς τα δεξιά): α) ομοιόμορφα διάσπαρτο μυκήλιο (dispersed mycelia), β) συνεκτικά σφαιρίδια βιομάζας (pellets) και γ) συσσωματώματα (clumps) (Παρούσα μελέτη).

Η μορφολογία του μύκητα επηρεάζει τις ρεολογικές ιδιότητες του υγρού ζύμωσης, καθώς και την μεταφορά μάζας και ενέργειας κατά την ζύμωση σε βιοαντιδραστήρες. Η βιομάζα υπό μορφή διάσπαρτου μυκηλίου αυξάνει το ιξώδες του υγρού της καλλιέργειας, αυξάνοντας έτσι και τις ενεργειακές απαιτήσεις της διεργασίας (Gibbs et al., 2000). Αντίθετα, η βιομάζα υπό μορφή συνεκτικών σφαιριδίων δεν αυξάνει το ιξώδες, αλλά λόγω της ανομοιόμορφης κατανομής των υφών στην επιφάνεια των σφαιριδίων παρατηρείται παρεμπόδιση κατά τη μεταφορά μάζας. Οι μορφολογικές διαφορές των μυκήτων έχουν άμεση επίδραση στη μεταφορά θρεπτικών συστατικών αλλά και αερίων στο μυκήλιο (Buyukkileci, 2007). Ως εκ τούτου, οι παραγόμενοι μεταβολίτες και οι αποδόσεις τους εξαρτώνται σημαντικά από τον σχηματισμό και την μορφολογία της βιομάζας του μύκητα (Gibbs et al., 2000; Znidarsic & Pavko, 2001).

Ανάμεσα στους παράγοντες που επιδρούν στη μορφολογία της βιομάζας του μύκητα βρίσκονται το pH, η ανάδευση, η σύσταση του θρεπτικού μέσου της ζύμωσης, το μέγεθος του εμβολίου, η θερμοκρασία, η αρχική συγκέντρωση του υποστρώματος και ο αερισμός μεταξύ άλλων (Byrne & Ward, 1989a; 1989b; Morrin & Ward, 1990; Zhou et al., 2000; Znidarsic & Pavko, 2000; Znidarsic et al., 2001; Liao et al., 2006).

1.5.3 Βιοχημικό μονοπάτι

Το φουμαρικό οξύ είναι ενδιάμεσος μεταβολίτης του κύκλου του Krebs, αλλά παράλληλα εμπλέκεται και σε άλλα μεταβολικά μονοπάτια. Όπως γίνεται αντιληπτό από το Σχήμα 1.5-1, η βιοσύνθεση του φουμαρικού οξέος λαμβάνει χώρα τόσο στο μιτοχόνδριο, μέσω του κύκλου του Krebs, όσο και στο κυτταρόπλασμα. Τα ένζυμα που εμπλέκονται στην βιοσύνθεση του φουμαρικού οξέος είναι τρία, η καρβοξυλάση του πυροσταφυλικού που απαντάται αποκλειστικά στο κυτταρόπλασμα, ενώ η NAD-μηλική αφυδρογονάση και η φουμαράση βρίσκονται τόσο στο κυτταρόπλασμα όσο και στα μιτοχόνδρια (Osmani & Scrutton, 1985).



Σχήμα 1.5-1 Σχηματική απεικόνιση της βιοχημικής οδού για την βιοτεχνολογική παραγωγή του φουμαρικού οξέος με χρήση μυκήτων του γένους *Rhizopus* (Liao, 2005).

Αρχικά η γλυκόζη ακολουθεί το μεταβολικό μονοπάτι της γλυκόλυσης μέχρι την παραγωγή πυροσταφυλικού οξέος. Στη συνέχεια, ακολουθεί το αναγωγικό μονοπάτι όπου με την κατανάλωση διοξειδίου του άνθρακα το πυροσταφυλικό οξύ μετατρέπεται σε οξαλοξικό, μέσω της πυροσταφυλικής καρβοξυλάσης. Μετέπειτα, το οξαλοξικό οξύ με την δράση της NAD-μηλικής αφυδρογονάσης σχηματίζει μηλικό οξύ και τέλος δρα η φουμαράση παράγοντας φουμαρικό οξύ (Straathof & van Gulik, 2012).

Όταν το άζωτο αποτελεί το περιοριστικό στοιχείο της αύξησης, η αύξηση του μικροοργανισμού σταματά και η γλυκόζη και το διοξειδίου του άνθρακα προορίζονται για τον σχηματισμό οξέων με 4 άτομα άνθρακα. Το γεγονός αυτό καθιστά το φουμαρικό οξύ ως μεταβολίτη μη συνδεδεμένο με την μικροβιακή αύξηση (δευτερογενής μεταβολίτης).

Η μέγιστη θεωρητική απόδοση όταν ο μικροοργανισμός δεν βρίσκεται πλέον στη φάση αύξησης είναι 2 moles φουμαρικού οξέος ανά 1 mol καταναλωθείσας γλυκόζης (1.29 g/g), με τη κατανάλωση 2 moles διοξειδίου του άνθρακα μέσω της καρβοξυλίωσης του πυροσταφυλικού στο αναγωγικό κομμάτι του βιοχημικού

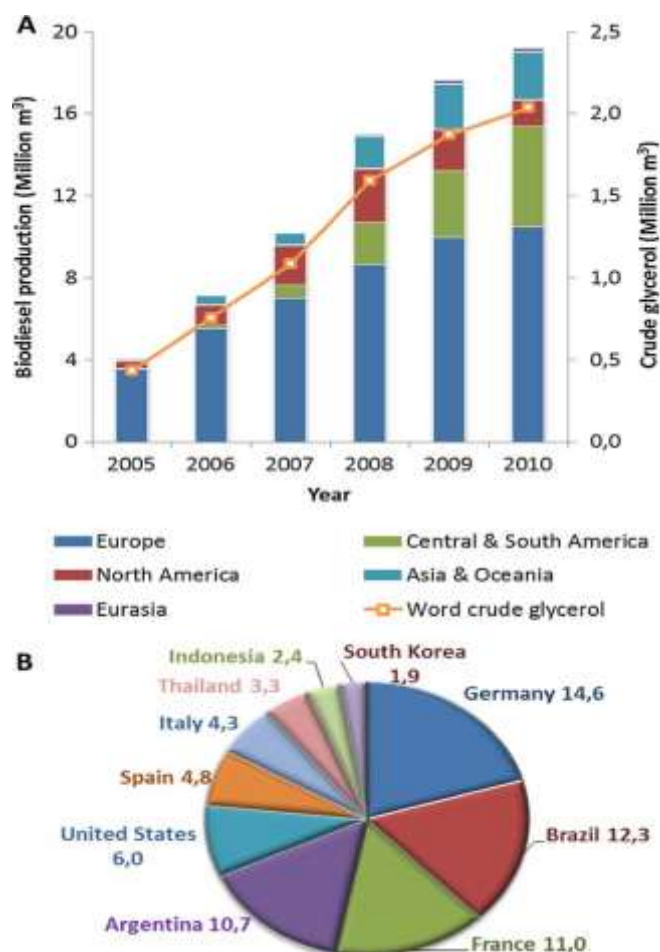
μονοπατιού. Στο αναγωγικό τμήμα δεν παράγεται ATP για τις ενεργειακές ανάγκες συντήρησης και μεταφοράς. Η παραγωγή ATP πραγματοποιείται μέσω της οξειδωτικής οδού στο κύκλο του Krebs, παρουσία οξυγόνου (Rhodes et al., 1959; Kenealy et al., 1986), όπου είναι αναγκαία η παροχή του ενώ μπορεί να παραχθεί και αναερόβια με απόρροια τον σχηματισμό αιθανόλης. Όποια από τα δύο ακολουθήσει, είναι εις βάρος της απόδοσης του φουμαρικού οξέος.

1.6 Αξιοποίηση παραπροϊόντων της βιομηχανίας βιοντήζελ

Το βιοντήζελ είναι το προϊόν της μετεστεροποίησης φυτικών ελαίων και ζωικών λιπών, μέσω της αντίδρασης που πραγματοποιείται μεταξύ τριγλυκεριδίων και μίας πρωτογενούς (μικρού μήκους) αλκοόλης, (πχ μεθανόλη, αιθανόλη), παρουσία ενός καταλύτη (όξινου, βασικού ή ενζυμικού), ή απουσία αυτού, το οποίο εν τέλει οδηγεί στον σχηματισμό των αλκυλεστέρων των λιπαρών οξέων (Shahid & Jamal, 2011). Οι προδιαγραφές του βιοντήζελ για την χρήση του σε κινητήρες ντήζελ στην Ευρωπαϊκή Ένωση ακολουθεί τα πρότυπα σύμφωνα με την οδηγία (European Normalization, EN 14214) και της αντίστοιχης Αμερικανικής Εταιρίας Δοκιμών και Υλικών (American Society for Testing and Materials, ASTM D6751-08).

Η παγκόσμια παραγωγή βιοντήζελ έχει αυξηθεί σημαντικά τα τελευταία χρόνια. Χαρακτηριστικό είναι ότι το 2005 η παραγωγή του άγγιζε τα 4 εκατομμύρια κυβικά μέτρα παγκοσμίως και το ποσό αυτό αυξήθηκε δραματικά φτάνοντας το 2010 τα 19.21 εκατομμύρια κυβικά μέτρα βιοντήζελ. Παρατηρείται επίσης ότι παράλληλα με την παραγωγή βιοντήζελ αυξάνεται και η παραγόμενη ακατέργαστη γλυκερόλη όπου από 0.5 εκατομμύρια κυβικά μέτρα το 2005 η παραγωγή της αυξήθηκε περίπου στα 2 εκατομμύρια κυβικά μέτρα το 2010.

Όπως φαίνεται από το *Σχήμα 1.6-1*, οι χώρες με τη μεγαλύτερη παραγωγή βιοντήζελ παγκοσμίως είναι, η Γερμανία με ποσοστό 14.6% του συνόλου του παραγόμενου βιοντήζελ, η Βραζιλία με ποσοστό 12.3%, η Γαλλία με 11% και η Αργεντινή με 10.7%. Είναι αξιοσημείωτο το γεγονός ότι, οι πρώτες δέκα χώρες παράγουν το 71.3% του παραγόμενου βιοντήζελ παγκοσμίως (Almeida et al., 2012).



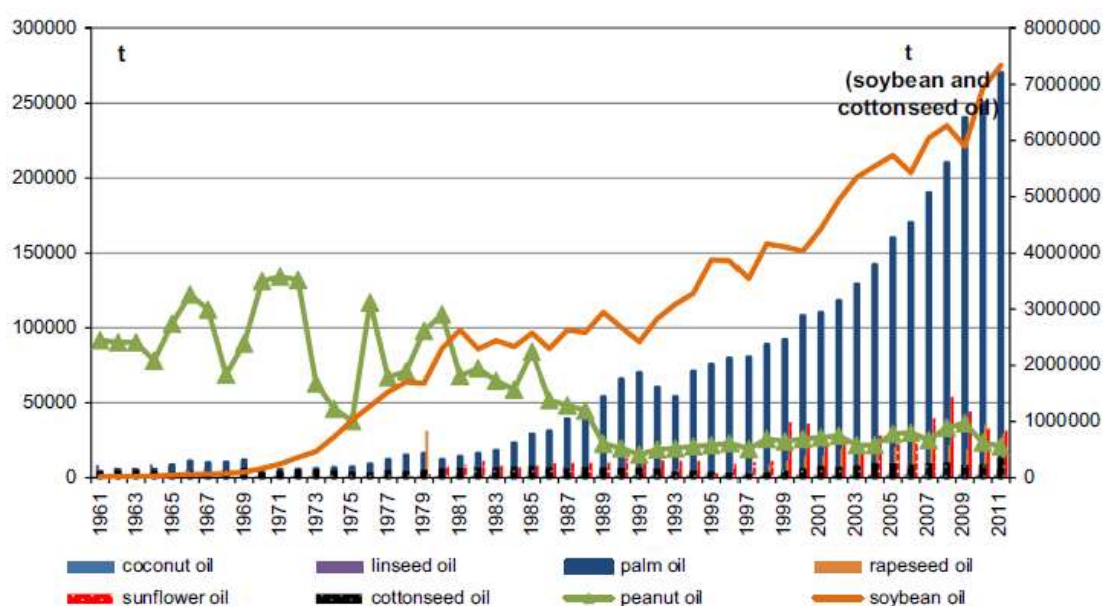
Σχήμα 1.6-1 Παγκόσμια παραγωγή βιοντήζελ (στήλες) και ακάθαρτης γλυκερόλης (γραμμές) για τα έτη 2005-2010, (Almeida et al., 2012).

Ως πρώτη ύλη για την παραγωγή βιοντήζελ παγκοσμίως χρησιμοποιούνται συνήθως υποστρώματα όπως εδάδιμα έλαια. (παραδείγματος χάριν το σογιέλαιο, η ελαιοκράμβη, ο ηλίανθος, το φοινικέλαιο, το σησαμέλαιο, το φιστικέλαιο) καθώς και υποστρώματα τύπου μη εδάδιμων ελαίων, όπως το έλαιο από το φυτό *Jatropha*, το βαμβακέλαιο και έλαια των φυτών *Pongamia*, *Mahua*, *Neem* και *Jojoba*.

Η σόγια είναι ένα μονοετές φυτό, το οποίο προέρχεται από την Ασία. Ταξινομικά, ανήκει στην οικογένεια *Fabaceae*, υποοικογένεια *Papilionoideae*, γένος *Glycine* και υπογένος *Soja* (Hymowitz, 2004). Ένα από τα πιο σημαντικά χαρακτηριστικά της σόγιας είναι η ικανότητα να δεσμεύει το ατμοσφαιρικό άζωτο και να το μετατρέπει σε θρεπτικά συστατικά για το φυτό, μέσω της συμβιωτικής σχέσης του με το αζωτοβακτήριο *Rhizobium japonicum*. Επίσης, η δέσμευση του ατμοσφαιρικού αζώτου μειώνει τις ανάγκες της καλλιέργειας σε θρεπτικά συστατικά,

μειώνοντας παράλληλα το κόστος καθιστώντας την καλλιέργεια ανταγωνιστική (Erickson, 1995).

Είναι το πιο σημαντικό ελαιογόνο φυτό παγκοσμίως λόγω της υψηλής ποιότητας των πρωτεϊνών που παράγει αλλά και του εδωδιμου ελαίου του. Η παγκόσμια παραγωγή σπορέλαιου το 2009-2010 ανήλθε στα 400 εκατομμύρια κυβικά μέτρα, εκ των οποίων το σογιέλαιο κατείχε το 60%, ακολουθώντας η ελαιοκράμβη 14%, το βαμβακέλαιο 10%, το φιστικέλαιο και ηλιέλαιο 8% (Soya & Oilseed Bluebook, 2010).



Σχήμα 1.6-2 Παραγωγή σπορέλαιων από το 1961-2011 στη Βραζιλία (FAO, 2013).

Στο Σχήμα 1.6-2 είναι εμφανής η αυξανόμενη τάση της παραγωγής σογιέλαιου στην Βραζιλία τα τελευταία 50 χρόνια, από το έτος 1961 έως το έτος 2011 (Rico & Sauer, 2015). Στον Πίνακα 1.6-1 παρουσιάζεται η παραγωγή βιοντήζελ κατά τα έτη 2013 και 2014 σε διαφορετικές χώρες, η έκταση γης που καταλαμβάνει η καλλιέργεια, το είδος της καλλιέργειας, οι παραγόμενες ποσότητες ελαίου, οι τιμές πώλησης του ελαίου και το κόστος παραγωγής του βιοντήζελ (Rico, 2015).

Πίνακας 1.6-1 Φυτική πρώτη ύλη για την παραγωγή βιοντήζελ παγκοσμίως (Rico, 2015).

Country	Biodiesel estimated production 2014 vs production 2013 (10 ⁶ t)	Area planted main feedstock (10 ³ ha)	% Biodiesel produced - main feed stock 2014	Production feedstock 2014 (10 ⁶ t)	Export feed stock 2014 (10 ⁶ t)	Oil production 2014 (10 ⁶ t)	Oil exports 2014 (10 ⁶ t)	Oil vegetable prices (US\$/t)	Diesel retail prices (US\$/kg)	Biodiesel cost/biodiesel price (US\$/t)
United States	4.3-4.53	33.7	52.7% Soybean	107	46.8	9.3	0.95	721	0.84	616/924
Germany	2.75-2.70	1.5	89% Rapeseed	4.82	0.23	3.2	0.47	835	1.35	700/1250
Argentina	2.05-2.0	20	100% Soybean	55	8.2	7.2	4.35	842	1.32	704/826
Brazil	3.0-2.56	30	72% Soybean	86.7	46.7	7.2	1.27	873	1	545/700
Indonesia	3.8-2.63	8.1	100% Palm Fruit	113	-	33.5	22	574	0.83	430/720
Malaysia	0.63-0.47	5	100% Palm fruit	97	-	21.2	18	606	0.56-0.9	460/560-900

* δεδομένα του έτους 2012.

** τιμή επιδοτούμενη από το κράτος & μη.

Από τη διεργασία παραγωγής βιοντήζελ (αξιοποίηση του ελαίου) από το φυτό της σόγιας, παράγεται σογιάλευρο σε μεγάλες ποσότητες ως παραπροϊόν της διεργασίας. Το σογιάλευρο περιέχει 44-50% πρωτεΐνες, οι οποίες αποτελούν σημαντική πηγή αζώτου στις ζωοτροφές (Smith & Baldwin, 1986). Για να είναι κατάλληλο για χρήση ως ζωοτροφή, αρχικά αφαιρούνται οι διαλύτες και καβουρδίζεται, στη συνέχεια αποξηραίνεται και ψύχεται και στο τέλος αλέθεται και κοσκινίζεται (Medina-Juarez & Gamez-Meza, 2011).

Το σογιάλευρο λόγω της υψηλής συγκέντρωσης σε πρωτεΐνες μπορεί να χρησιμοποιηθεί εναλλακτικά, ως πηγή αζώτου και σε μικροβιακές ζυμώσεις (Xiao et al., 2007). Για τη διάσπαση της ακατέργαστης πρωτεΐνης σε μορφή που να είναι αφομοιώσιμη από τους μικροοργανισμούς εφαρμόζεται υδρόλυση (χημική ή ενζυμική). Πρόσφατη μελέτη από τους Zhang et al., (2015) εφάρμοσαν χημική υδρόλυση για την επεξεργασία του σογιαλεύρου. Στη συνέχεια χρησιμοποίησαν το υδρόλυμα σογιαλεύρου για την παραγωγή φουμαρικού οξέος με τη χρήση του μύκητα *Rhizopus oryzae* ATCC 20344, μελέτη η οποία είχε ενθαρρυντικά αποτελέσματα.

1.7 Σκοπός παρούσας μελέτης

Στην παρούσα μελέτη επιλέχθηκε να μελετηθεί η μορφολογία του μύκητα *Rhizopus arrhizus* NRRL 2582, λαμβάνοντας υπόψη το γεγονός ότι δεν υπάρχει αντίστοιχη βιβλιογραφία για τους παράγοντες εκείνους που επηρεάζουν την μορφολογία του εν λόγω μύκητα. Συγκεκριμένα, τα πειράματα στόχευσαν στην δημιουργία δύο διαφορετικών μορφολογιών εκείνης των συνεκτικών σφαιριδίων βιομάζας (pellets) και του ομοιόμορφα διάσπαρτου μυκηλίου (dispersed mycelia) και στην επίδρασή τους στην παραγωγή φουμαρικού οξέος κατά την υγρή καλλιέργεια σε γλυκόζη παρουσία εμπορικών πηγών αζώτου.

Στη συνέχεια, μελετήθηκε η δυνατότητα αξιοποίησης του ενζυμικά υδρολυμένου σογιάλευρου, ως πηγή αζώτου και ιχνοστοιχείων, για την βιοτεχνολογική παραγωγή φουμαρικού οξέος.

Τέλος, δόθηκε έμφαση και στην επίδραση της αρχικής συγκέντρωσης του θειϊκού αμμωνίου κατά την κύρια καλλιέργεια του μύκητα *Rhizopus arrhizus* NRRL 2582 προς την παραγωγή φουμαρικού οξέος.

2 ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Βιολογικό υλικό

Χρησιμοποιήθηκαν συνολικά δύο διαφορετικά στελέχη για την πραγματοποίηση των πειραμάτων: α) ο μύκητας *Rhizopus arrhizus* NRRL 2582 για την παραγωγή φουμαρικού οξέος, με μοναδική πηγή άνθρακα την εμπορική γλυκόζη και β) ο μύκητας *Aspergillus oryzae* για την ενζυμική υδρόλυση του πρωτεϊνικού μέρους του σογιάλεου προς παραγωγή υδρολύματος πλούσιο σε άζωτο. Ο μύκητας *Rhizopus arrhizus* ανήκε στη συλλογή NRRL, (Agricultural Research Services, USDA, USA) και ο μύκητας *Aspergillus oryzae* απομονώθηκε από εργοστάσιο παραγωγής σάλτσας σόγιας (Amoy Food Ltd., Hong Kong).

Οι μύκητες φυλάσσονται στο Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών σε αφυδατωμένη κατάσταση, υπό μορφή σπορίων, σε γυάλινα φιαλίδια με Silica gel στους 4 ± 1 °C (Wang et al., 2005). Η ανανέωση των μυκήτων γινόταν ανά τακτά χρονικά διαστήματα, τουλάχιστον μια φορά το μήνα.

Όλοι οι χειρισμοί γινόταν υπό ασηπτικές συνθήκες σε θάλαμο κάθετης νηματικής ροής και τα θρεπτικά υποστρώματα, καθώς και οι πρώτες ύλες παρασκευάζονταν την στιγμή που θα χρησιμοποιούνταν και τοποθετούνταν σε αυτόκλειστο όπου και αποστειρώνονταν (121 °C, 20 min).

2.1.1 Ανανέωση των μικροοργανισμών

Σε δοκιμαστικό σωλήνα πληρωμένο με 10 mL Phosphate-Buffered Saline (PBS) τοποθετούνταν περίπου 1 g silica gel με σπόρια των μυκήτων, αναδεύονταν έντονα δημιουργώντας ένα ομοιόμορφο εναιώρημα σπορίων. Το PBS αποτελούνταν από 1 g/L όξινο φωσφορικό νάτριο, 0.24 g/L δις όξινο φωσφορικό νάτριο και 8 g/L χλωριούχο νάτριο. Με στόχο τη δημιουργία μοναδικής αποικίας σε τρυβλίο με τη μέθοδο streaking (100 μ L εναιωρήματος ανά τρυβλίο), πραγματοποιήθηκαν διαδοχικές αραιώσεις με 1 mL εναιωρήματος, σε δοκιμαστικούς σωλήνες πληρωμένους με 9 mL PBS. Τα τρυβλία ήταν πληρωμένα με 20 mL θρεπτικό υπόστρωμα, το οποίο αποτελούνταν από 3% w/v ηλιόπιτα, 2% w/v πίτυρο σίτου και 2% w/v άγαρ.

Στη συνέχεια, επωάζονταν σε επωαστικό θάλαμο (ZHWHY-211C Series Floor Model Incubator, PR China) σε θερμοκρασία 30 ± 1 °C για 6 ημέρες, επιλέχθηκαν τα τρυβλία όπου είχαν αναπτυχθεί μοναδικές αποικίες των μυκήτων ώστε να εξασφαλισθεί η καθαρότητά τους. Με τη βοήθεια μικροβιολογικού κρίκου εμβολιάζονταν κεκλισμένοι δοκιμαστικοί σωλήνες πληρωμένοι με 5 mL θρεπτικό υπόστρωμα. Στην περίπτωση του μύκητα *Aspergillus oryzae*, η σύσταση ήταν ίδια με αυτή των άνω τρυβλίων, ενώ για τον μύκητα *Rhizopus arrhizus* το υλικό πλήρωσης ήταν PDA (39 g/L). Τέλος, επωάζονταν σε επωαστικό θάλαμο για 5 ημέρες σε θερμοκρασία 30 ± 1 °C και αποθηκεύονταν στους 4 ± 1 °C.

2.1.2 Παραγωγή σπορίων

Η διαδικασία παραγωγής σπορίων είναι παρόμοια και για τους δύο μύκητες. Η θερμοκρασία επώασης ήταν 30 ± 1 °C. Οι διαφορές αφορούσαν κυρίως το είδος του θρεπτικού υποστρώματος και τον χρόνο επώασης των μικροοργανισμών. Στην περίπτωση του μύκητα *Aspergillus oryzae*, το θρεπτικό υπόστρωμα αποτελούνταν από 3% w/v ηλιόπιτα, 2% w/v πίτυρο σίτου και 2% w/v άγαρ και ο χρόνος επώασης ήταν 5 ημέρες. Αντίθετα για τον μύκητα *Rhizopus arrhizus*, το θρεπτικό υπόστρωμα αποτελούνταν από 5% w/v σογιάλευρο και 2% w/v άγαρ και ο χρόνος επώασης ήταν 6 ημέρες.

Αρχικά στους κεκλισμένους σωλήνες πεπληρωμένους με το θρεπτικό υπόστρωμα προστέθηκαν 5 mL απιονισμένο νερό με γαλακτωματοποιητή, για ομοιόμορφη διασπορά των σπορίων, και με βοήθεια μικροβιολογικού κρίκου γινόταν απελευθέρωση των σπορίων. Στη συνέχεια 2 mL από το ομοιόμορφο εναιώρημα των σπορίων που είχε δημιουργηθεί στους σωλήνες μεταφερόταν σε κωνική φιάλη των 250 mL πεπληρωμένη με 50 mL θρεπτικό υπόστρωμα ηλιόπιτας-πίτυρο-άγαρ. (Kachrimanidou et al., 2013).

Τέλος, για την παραλαβή των σπορίων από τις κωνικές φιάλες, προστέθηκαν 50 mL απιονισμένο νερό με γαλακτωματοποιητή και γυάλινα αδρανή σφαιρίδια, ακολούθησε έντονη ανάδευση. Πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός του αριθμού των σπορίων στο εναιώρημα. Η μέτρηση των σπορίων του εναιωρήματος έγινε με αιματοκυττόμετρο τύπου Thoma (Fein-Optic, Bad Blankenburg, Germany). Στη συνέχεια, στην περίπτωση του μύκητα *Rhizopus arrhizus*, το εναιώρημα με γνωστό

αριθμό σπορίων [10^7 σπόρια/L, (Liao et al., 2007)] αποθηκεύονταν σε φιαλίδια (cryovials) με γλυκερόλη σε θερμοκρασία -20 ± 1 °C, ενώ τα σπόρια του μύκητα *Aspergillus oryzae* χρησιμοποιούνταν απευθείας.

2.2 Θρεπτικά υποστρώματα

Στον ακόλουθο Πίνακα 2.2-1 περιγράφεται αναλυτικά η σύσταση των θρεπτικών υποστρωμάτων, προκαλλιέργειες και καλλιέργειες υγρής κατάστασης, που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα της παρούσας μελέτης.

Πίνακας 2.2-1 Σύσταση των θρεπτικών υποστρωμάτων που χρησιμοποιήθηκαν για την παραγωγή φουμαρικού οξέος

Συστατικό (g/L)	Προκαλλιέργειες				Καλλιέργεια
	Σφαιρίδια	Rhodes ^a et al. (1959)	Τροποποιημένη Rhodes ^a et al. (1959)	Υδρόλυμα Rhodes ^a et al. (1959)	
Γλυκόζη	10	25	25	25	25/50
Πεπτόνη	2	-	1.6	-	-
Ουρία	-	1	1	-	-
FAN ^b	-	-	-	200/400	-
Θειικό αμμώνιο	-	-	-	-	0.04/0.2
CSL ^c	-	3 ^d	3 ^d	3 ^d	3 ^d
Ανθρακικό ασβέστιο	-	-	-	-	0.8/1.6
Δις όξινο φωσφορικό κάλιο	-	0.6	0.6	0.6	0.6
Θειικό μαγνήσιο	-	0.4	0.4	0.4	0.4
Θειικό ψευδάργυρο	-	0.044	0.044	0.044	0.044
Χλωριούχο σίδηρο	-	0.016	0.016	0.016	0.016
Τρυγικό οξύ	-	0.0075	0.0075	0.0075	0.0075
Άγαρ	-	1	1	1	-
Άμυλο αραβοσίτου	-	30	30	30	-
Μεθανόλη	-	-	-	-	15 ^d

a Διάσπαρτου μυκηλίου

b Άζωτο ελεύθερων αμινομάδων.

c Corn Steep Liquor.

d Μονάδες: mL/L.

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν κατά την εκπόνηση της μελέτης περιγράφονται στον Πίνακα 2.2-2:

Πίνακας 2.2-2 Προέλευση των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν στη παρούσα μελέτη.

Αντιδραστήρια	Προέλευση
Θειικό αμμώνιο	Acros organics
Πεπτόνη, Άγαρ, Potato Dextrose Agar (PDA)	Conda
Υδροχλωρικό οξύ	Fisher Chemicals
Ουρία, Θειικό μαγνήσιο, Υπερχλωρικό οξύ	Fluka
Μεθανόλη	Macron
Θειικό ψευδάργυρο	Mallinckrodt
Καζεΐνη, Όξινο φωσφορικό νάτριο, Γλυκίνη, Κιτρικό οξύ, L-ασκορβικό οξύ, Δις όξινο φωσφορικό νάτριο	Merck
Γλυκόζη, Τρυγικό οξύ	Panreac AppliChem
Καυστικό νάτριο, Φρουκτόζη, Δις όξινο φωσφορικό κάλιο	Penta
Όξινο φωσφορικό κάλιο, Silica gel	Scharlau
Θειικό οξύ, Ανθρακικό ασβέστιο, Νινυδρίνη, Φουμαρικό οξύ, Γαλακτωματοποιητής Tween 80 (0.01% v/v), Τριχλωροξικό οξύ (TCA), Χλωριούχο σίδηρο, Αμμωνιακό μόλυβδο, Corn Steep Liquor (CSL), Αιθανόλη, Γλυκερόλη, Χλωριούχο νάτριο, Ιωδικό κάλιο	Sigma Chemicals

Τα βιομηχανικά παραπροϊόντα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν: α) άμυλο αραβοσίτου, (εμπορικό σκεύασμα της εταιρίας Γιώτης Α.Ε.), β) Ηλιάνθος (Ηλιόπιτα), παραπροϊόν της παραγωγής βιοντήζελ, (Πέττας Α.Β.Ε.Ε., Ελλάδα) , γ) Σογιάλευρο, παραπροϊόν της παραγωγής βιοντήζελ, (Petrobras, Βραζιλία) και δ) Πίτουρο σίτου, ζωοτροφή. Στον Πίνακα 2.2-3 περιγράφεται η σύσταση του σογιάλεου που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη.

Πίνακας 2.2-3 Σύσταση σογιάλεου

Σύσταση	%, επί ξηρού βάρους
Ολικό Άζωτο (Kjeldahl)	47
Φυτικές ίνες (NDF)	44
Τέφρα	7
Λίπος (Soxhlet)	2
Υγρασία	13

2.3 Προκαλλιέργειες ανάπτυξης του μύκητα *Rhizopus arrhizus*

Δοκιμάστηκαν δύο διαφορετικής σύστασης προκαλλιέργειας, η σύσταση των οποίων περιγράφεται σε προηγούμενο κεφάλαιο. Ο εμβολιασμός των προκαλλιεργειών έγινε με σπόρια του μύκητα *Rhizopus arrhizus*, τα οποία ήταν αποθηκευμένα σε φιαλίδια με γλυκερόλη σε συνθήκες κατάψυξης (-20 °C). Το εμβόλιο αποτελούσε το 10% (v/v) της κύριας καλλιέργειας. Η ανάπτυξη των σπορίων έλαβε χώρα σε κωνικές φιάλες των 250 mL τύπου Erlenmeyer και σε κωνικές φιάλες με διαφράγματα (τύπου baffled) του 1 L. Μετά τον εμβολιασμό η προκαλλιέργεια τοποθετούνταν σε περιστροφική επωαστική τράπεζα σε θερμοκρασία 30 °C στις 180 rpm για 7 με 24 ώρες.

2.3.1 Προκαλλιέργεια για την παραγωγή σφαιριδίων βιομάζας (pellets)

Ο μύκητας *Rhizopus arrhizus* καλλιεργήθηκε σε υγρό θρεπτικό μέσο για την εκβλάστηση των σπορίων. Η σύσταση του θρεπτικού μέσου περιγράφεται αναλυτικά στον Πίνακα 2.2-1. Η ανάπτυξη των σπορίων έλαβε χώρα σε κωνικές φιάλες των 250 mL τύπου Erlenmeyer και σε κωνικές φιάλες με διαφράγματα (τύπου baffled) του 1 L. Οι κωνικές φιάλες των 250 mL (Erlenmeyer) και του 1 L (baffled) ήταν πληρωμένες με 50 mL υγρού θρεπτικό μέσο, και στις δυο περιπτώσεις, και επωάστηκαν σε περιστροφική επωαστική τράπεζα σε θερμοκρασία 30 °C στις 180 rpm για 7 ώρες και 24 ώρες, αντίστοιχα. Τα υλικά και τα θρεπτικά μέσα που χρησιμοποιήθηκαν αποστειρώθηκαν σε αυτόκλειστο στους 121 °C για 20 min.

2.3.2 Προκαλλιέργεια για την παραγωγή διάσπαρτου μυκηλίου (dispersed mycelia)

Ο μύκητας *Rhizopus arrhizus* καλλιεργήθηκε σε υγρό θρεπτικό μέσο για την εκβλάστηση των σπορίων. Η σύσταση του θρεπτικού μέσου περιγράφεται αναλυτικά στον Πίνακα 2.2-1. Αρχικά ως πηγή αζώτου στη προκαλλιέργεια χρησιμοποιήθηκε 1 g/L ουρία, στη συνέχεια προστέθηκαν 1 g/L ουρία και 1.6 g/L πεπτόνη, ενώ στο τέλος αντικαταστάθηκαν από υδρόλυμα σογιαλεύρου σε δυο διαφορετικές συγκεντρώσεις 200 και 400 mg/L FAN.

Οι κωνικές φιάλες των 250 mL ήταν πληρωμένες με 50 mL υγρού θρεπτικό μέσο και επωάστηκαν σε περιστροφική επωαστική τράπεζα σε θερμοκρασία 30 °C στις 180 rpm για 24 ώρες. Οι πηγές αζώτου αποστειρώνονταν ξεχωριστά και

προστέθηκαν στο υγρό θρεπτικό μέσο σε θάλαμο κάθετης νηματικής ροής υπό ασηπτικές συνθήκες.

2.4 Ζυμώσεις υγρής κατάστασης για την παραγωγή φουμαρικού οξέος

Η κύρια ζύμωση για την παραγωγή φουμαρικού οξέος είχε την ακόλουθη σύσταση: 25 και 50 g/L γλυκόζη και δυο διαφορετικές συγκεντρώσεις θειϊκού αμμωνίου 0.2 και 0.04 g/L. Τα υπόλοιπα συστατικά περιγράφονται αναλυτικά στον Πίνακα 2.2-1.

Οι κωνικές φιάλες των 250 mL ήταν πληρωμένες με 50 mL υγρού θρεπτικό μέσο (Εικόνα 2.4-1) και επώαστηκαν σε περιστροφική επωαστική τράπεζα σε θερμοκρασία 30 °C στις 180 rpm. Τα υλικά και τα θρεπτικά μέσα που χρησιμοποιήθηκαν αποστειρώθηκαν σε αυτόκαυστο στους 121 °C για 20 min. Οι πηγές αζώτου αποστειρώνονταν ξεχωριστά. Η μεθανόλη φιλτραρίστηκε με φίλτρο 0.2 μm και προστέθηκαν στο υγρό θρεπτικό μέσο σε θάλαμο κάθετης νηματικής ροής υπό ασηπτικές συνθήκες.



Εικόνα 2.4-1 Κύρια καλλιέργεια υγρής κατάστασης, μετά την αποστείρωση, του μύκητα *Rhizopus arrhizus* NRRL 2582 για την παραγωγή φουμαρικού οξέος.

2.5 Παραγωγή υδρολύματος σογιαλεύρου

Η δυνατότητα αξιοποίησης βιομηχανικών παραπροϊόντων και συγκεκριμένα του σογιαλεύρου, μελετήθηκε με σκοπό την αντικατάσταση των συνθετικών πηγών αζώτου στις μικροβιακές ζυμώσεις παραγωγής φουμαρικού οξέος.

2.5.1 Παραγωγή πρωτεολυτικών ενζύμων μέσω ζύμωσης στερεής κατάστασης

Η καλλιέργεια στερεής κατάστασης (Solid State Fermentation, SSF) του μύκητα *Aspergillus oryzae* σε υπόστρωμα σογιαλεύρου πραγματοποιήθηκε σε κωνικές φιάλες των 250 mL, στις οποίες προστέθηκαν συνολικά 5 g ξηρού στερεού.

Η ποσότητα του εμβολίου καθορίστηκε από τον επιθυμητό τελικό ποσοστό υγρασίας (65%). Μετά τον εμβολιασμό οι φιάλες τοποθετούνταν σε επωαστικό θάλαμο στους 30 °C. Η διαδικασία παραγωγής σπορίων περιγράφεται στο κεφ. 2.1.2.

Για τη βελτιστοποίηση της διεργασίας μελετήθηκε η επίδραση της ηλικίας του μύκητα. Συγκεκριμένα, μελετήθηκε η δραστικότητα των πρωτεολυτικών ενζύμων σε διαφορετικούς χρόνους ζύμωσης.

2.5.2 Υδρόλυση σογιαλεύρου

Με τις βέλτιστες συνθήκες ζύμωσης στερεής κατάστασης του μύκητα *Aspergillus oryzae* σε σογιάλευρο, το στερεό αποικισμένο υπόστρωμα της ζύμωσης τοποθετήθηκε σε φιάλη Duran που περιείχε πρόσθετη ποσότητα ξηρού σογιαλεύρου. Σκοπός των υδρολύσεων ήταν να παραχθεί υδατικό μέσο καλλιέργειας, πλούσιο σε άζωτο και ιχνοστοιχεία τα οποία είναι απαραίτητα για την μικροβιακή ανάπτυξη και παραγωγή προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας και πιο συγκεκριμένα φουμαρικού οξέος.

Το περιεχόμενο δυο κωνικών φιαλών από την καλλιέργεια στερεής κατάστασης του μύκητα τοποθετήθηκαν μαζί με 500 mL απιονισμένο νερό, σε μπλέντερ κουζίνας για 2 min. Το μείγμα ακατέργαστων ενζύμων-σογιαλεύρου μεταφέρθηκε σε φιάλη Duran του 1 L που περιείχε συνολικά 45 g/L σογιάλευρο, το οποίο στη συνέχεια επώαστηκε για 48 ώρες. Στη συνέχεια η φιάλη Duran τοποθετήθηκε σε υδατόλουτρο υπό ανάδευση και λήφθηκε δείγμα για τη χρονική στιγμή t_0 , ενώ δείγματα λαμβάνονταν ανά τακτά χρονικά διαστήματα ώστε να παρακολουθείται ο ρυθμός μεταβολής, του αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων πεπτιδίων και αμινοξέων (FAN) και του ανόργανου φωσφόρου (IP).

Η διεργασία της ενζυμικής υδρόλυσης έλαβε χώρα στους 45, 50 και 55 ± 1 °C, με αρχικό pH 5.5 (μη ελεγχόμενο) για 48 ώρες περίπου. Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν. Η περαιτέρω αξιοποίηση του υδρολύματος, ως θρεπτικό υγρό μικροβιακής ζύμωσης, απαιτεί φυγοκέντρηση για 15 min (9000 rpm, 5 °C). Το υπερκείμενο υγρό δύναται να αποθηκευτεί σε συνθήκες κατάψυξης μέχρι τη χρησιμοποίησή του.

2.6 Αναλύσεις

Οι αναλύσεις της παρούσας πτυχιακής αφορούσαν τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης α) της παραγόμενης βιομάζας, β) των οργανικών οξέων, γ) των

σακχάρων, ε) του αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων αμινοξέων και πεπτιδίων, στ) του ανόργανου φωσφόρου ζ) του pH της καλλιέργειας και η) της ενζυμικής δραστηριότητας.

2.6.1 Προσδιορισμός του φουμαρικού οξέος

Όπως περιγράφουν οι Goldberg et al. (1983), λόγω της καθίζησης του φουμαρικού οξέος στο μέσο της καλλιέργειας υπό μορφή φουμαρικού ασβεστίου απαιτούνταν προεργασία του δείγματος. Οπότε σε κωνική φιάλη των 500 mL τοποθετούνταν όλο το υγρό της ζύμωσης (50 mL), το οποίο είχε ογκομετρηθεί, στη συνέχεια προστίθονταν απιονισμένο νερό και διάλυμα θειϊκού οξέος 3 M, ακολουθώντας έντονη ανάδευση και θέρμανση όπου χρειαζόταν. Σημειώνεται ότι, με την προσθήκη του θειϊκού οξέος στο υγρό της καλλιέργειας το pH μεταβαλλόταν δραστικά (~1) προκαλώντας την διαλυτοποίηση του φουμαρικού ασβεστίου απελευθερώνοντας το φουμαρικό οξύ και προκαλώντας την καθίζηση του θειϊκού ασβεστίου. Το υπερκείμενο συλλέγονταν μετά από εσχαρισμό με τη χρήση ανοξειδωτού κόσκινου (\varnothing 106 μ m), με σκοπό τη συλλογή της βιομάζας, και φυγοκεντρώνταν (15 min, 9000 rpm, 5 °C) σε φυγόκεντρο τύπου Hettich Universal 320-R, Germany.

2.6.2 Ανάλυση εικόνας για την αξιολόγηση της μορφολογίας του μύκητα *Rhizopus arrhizus*

Η ψηφιοποίηση της βιομάζας (την χρονική στιγμή που η ζύμωση ήταν 48 ωρών) επιτυγχάνονταν με τη βοήθεια σαρωτή τύπου HP LaserJet Professional (M1132 MFP, USA), όπου ο αισθητήρας ανίχνευσης ρυθμίζονταν ώστε να σαρώνει στις 600 κουκίδες ανά ίντσα (Dots Per Inch, DPI). Στη συνέχεια με τη χρήση του λογισμικού Image Pro Analysis 7.0 επεξεργάστηκαν οι ψηφιακές εικόνες της βιομάζας, λαμβάνοντας πληροφορίες για τον συνολικό αριθμό κυττάρων, την σφαιρικότητα καθώς και την μέση διάμετρο της βιομάζας στην καλλιέργεια. Τέλος, με τη βοήθεια στατιστικής εφαρμογής του λογισμικού Microsoft Excel 2013 υπολογίστηκε η κατανομή της βιομάζας.

2.6.3 Προσδιορισμός παραγόμενης βιομάζας

Ο προσδιορισμός της βιομάζας έγινε με μέτρηση του ξηρού βάρους ολόκληρης της καλλιέργειας. Μετά τη προεργασία, για τον προσδιορισμό του φουμαρικού οξέος, η βιομάζα μεταφερόταν σε προζυγισμένα φιαλίδια και στη συνέχεια σε φούρνο προς ξήρανση σε θερμοκρασία 100 °C μέχρι σταθεροποίησης του βάρους. Το ξηρό υπόλειμμα ζυγίζοταν σε ζυγό ακριβείας τύπου Kern ABJ (4 δεκαδικών ψηφίων) και εκφραζόταν σε g/L.

2.6.4 Προσδιορισμός σακχάρων και οξέων

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης της γλυκόζης, του φουμαρικού οξέος, της αιθανόλης και των παραπροϊόντων της ζύμωσης έγινε με χρήση υγρής χρωματογραφίας υψηλής αποδόσεως (HPLC) (Shimadzu, Japan), εξοπλισμένη με ανιχνευτή διαφορικού διαθλασίμετρου (RID-10A, Shimadzu). Η ταυτοποίηση των μεταβολικών προϊόντων βασίστηκε στον χρόνο κατακράτησης, ο οποίος συγκρίθηκε με δείγματα αναφοράς (πρότυπα). Ως κινητή φάση χρησιμοποιήθηκε αραιό υδατικό διάλυμα θειϊκού οξέος 10 mM με ροή 0.6 mL/min. Η στήλη με την οποία έγινε ο διαχωρισμός του μίγματος ήταν τύπου Aminex HPX-87H (300 mm x 7.8 mm, Bio-Rad, USA) σε θερμοκρασία 45 °C.

2.6.5 Προσδιορισμός αναγόντων σακχάρων

Ο προσδιορισμός των αναγόντων σακχάρων πραγματοποιήθηκε με την φωτομετρική μέθοδο του δινιτρο-σαλικυλικού οξέος, DNS (Miller 1959). Η μέθοδος στηρίζεται στην αναγωγή του DNS προς 3-αμινο-5-νιτροσαλικυλικό οξύ παρουσία NaOH και την ταυτόχρονη οξειδωση της γλυκόζης προς γλυκονικό οξύ. Το αντιδραστήριο που χρησιμοποιήθηκε ήταν: 10 g/L 3,5 δινιτρο-σαλικυλικό οξύ, 300 g/L τρυγικό καλιονάτριο και 200 mL/L Καυστικό νάτριο 2 N. Αρχικά σε 0.5 mL κατάλληλα αραιωμένου δείγματος προστέθηκαν άλλα 0.5 mL αντιδραστηρίου DNS και αναδευόταν. Στη συνέχεια μεταφέρθηκαν σε υδατόλουτρο στους 100±1 °C για 5 min, ακολουθώντας ψύξη των δειγμάτων μέσα σε νερό στους 20±1 °C (3 min). Τέλος έγινε προθήκη 5 mL απιονισμένου νερού και μετρήθηκε η απορρόφηση σε φασματοφωτόμετρο (Hitachi U-2000 Spectrophotometer, Japan) στα 540 nm. Το τυφλό δείγμα περιείχε 0.5 mL απιονισμένο νερό αντί για δείγμα, και η απορρόφησή

του αφαιρέθηκε από τις απορροφήσεις των δειγμάτων. Για την πρότυπη καμπύλη αναφοράς ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία, χρησιμοποιώντας διαφορετικές γνωστές αραιώσεις πρότυπου διαλύματος γλυκόζης.

2.6.6 Προσδιορισμός του αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων

Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό του αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων (FAN, Free Amino Nitrogen) είναι η φωτομετρική μέθοδος της νινυδρίνης (Lie 1973). Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν αντιδραστήριου χρώσης (color reagent) και αντιδραστήριου αραιώσης (dilution reagent). Το αντιδραστήριο χρώσης αποτελούνταν από 49.71 g/L όξινο φωσφορικό νάτριο, 0.5 g/L νινυδρίνη, 3 g/L φρουκτόζη και 60 g/L δις όξινο φωσφορικό κάλιο. Ενώ για το αντιδραστήριο αραιώσης διαλύουμε 2 g ιωδικό κάλιο σε 616 mL απιονισμένο νερό και 384 mL καθαρής αιθανόλης και συμπληρώνονταν με απιονισμένο νερό μέχρι το 1 L.

Συγκεκριμένα, σε δοκιμαστικό σωλήνα προστέθηκαν 1 mL κατάλληλα αραιωμένου δείγματος και 0.5 mL αντιδραστήριου χρώσης. Οι δοκιμαστικοί σωλήνες πωματίστηκαν και μεταφέρθηκαν σε υδατόλουτρο στους 100 ± 1 °C για 16 min, ακολουθώντας ψύξη των δειγμάτων μέσα σε νερό στους 20 ± 1 °C (20 min). Έπειτα, προστέθηκαν 2.5 mL αντιδραστήριου αραιώσης και αναδεύτηκαν για 20 sec ακριβώς μέχρι την αλλαγή χρώματος. Τέλος, μετρήθηκε η απορρόφηση σε φασματοφωτόμετρο (Hitachi U-2000 Spectrophotometer, Japan) στα 570 nm. Το τυφλό δείγμα περιείχε 1 mL απιονισμένο νερό αντί για δείγμα, και η απορρόφηση του αφαιρέθηκε από τις απορροφήσεις των δειγμάτων. Η συγκέντρωση του δείγματος σε άζωτο υπολογίστηκε από την πρότυπη καμπύλη αναφοράς εκφρασμένη σε mg/L FAN. Για την πρότυπη καμπύλη αναφοράς ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία, χρησιμοποιώντας διαφορετικές αραιώσεις πρότυπου διαλύματος γλυκίνης.

2.6.7 Προσδιορισμός ανόργανου φωσφόρου

Αραιώθηκαν κατάλληλα, με απιονισμένο νερό, το δείγμα σε δοκιμαστικούς σωλήνες (εις διπλούν), τελικός όγκος δείγματος 5 mL. Το τυφλό δείγμα περιείχε απιονισμένο νερό αντί για δείγμα, και η απορρόφηση του αφαιρέθηκε από τις απορροφήσεις των δειγμάτων. Αρχικά, προστέθηκαν σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα

0.4 mL 60 % (v/v) διαλύματος υπερχλωρικού οξέος και ανακινήθηκαν για 10 sec. Στη συνέχεια, προστέθηκαν ακόμα 0.3 mL διαλύματος ασκορβικού οξέος 1% (w/v) και ανακινήθηκαν ξανά για 10 sec και τέλος 0.4 mL διαλύματος αμμωνιακού μολύβδου 5% (w/v) και ξανά ανακινήθηκαν για 10 sec. Αναμονή για 10 min ώστε να αναπτυχθεί μπλε χρώμα. Η απορρόφηση μετρήθηκε σε φασματοφωτόμετρο (Hitachi U-2000 Spectrophotometer, Japan) στα 730 nm (Harland 1980). Για την πρότυπη καμπύλη αναφοράς ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία, χρησιμοποιώντας διαφορετικές αραιώσεις πρότυπου διαλύματος όξινου φωσφορικού καλίου.

2.6.8 Προσδιορισμός pH

Το pH της καλλιέργειας μετρήθηκε με pH-μετρο τύπου HI 2211 pH/ORP Meter, Hanna Instruments.

2.6.9 Προσδιορισμός της δραστηκότητας των πρωτεολυτικών ενζύμων

Για τον προσδιορισμό της πρωτεολυτικής δραστηκότητας, ακολουθήθηκε η διαδικασία που περιγράφεται από τους Wang et al. (2008) με μικρές τροποποιήσεις. Συγκεκριμένα 2.5 g ομογενοποιημένου δείγματος, από την κωνική φιάλη ζύμωσης στερεάς κατάστασης, αναμείχθηκαν με 50 mL ρυθμιστικού διαλύματος κιτρικού οξέος 100 mM-όξινου φωσφορικού νατρίου 200 mM, pH 6 σε μπλέντερ κουζίνας για 2 min. Το μείγμα που προέκυψε φυγοκεντρήθηκε για 15 min, στις 9000 rpm και στους 5 °C. Ακολούθησε φιλτράρισμα του υπερκείμενου με φιλτράκια Whatman 0.2 μm και το υγρό που προέκυψε αποτελούσε το ακατέργαστο ένζυμο.

Στη συνέχεια 5 mL ακατέργαστου ενζύμου τοποθετήθηκαν σε δοκιμαστικό σωλήνα μαζί με 5 mL καζεΐνης ($C_{\text{casein}} = 7.5 \text{ g/L}$), μέσα σε υδατόλουτρο στους 55 ± 1 °C για 30 min (εις διπλούν). Δείγματα 0.8 mL ελήφθησαν στο χρόνο t_0 (πριν την υδρόλυση με καζεΐνη) και στον τελικό χρόνο t_{30} , μετά την υδρόλυση, στα οποία προστέθηκε αμέσως ίση ποσότητα TCA 5% w/v, και στις δυο περιπτώσεις, για την αδρανοποίηση των ενζύμων. Η πρωτεολυτική δραστηκότητα προσδιορίστηκε μετρώντας το άζωτο των ελεύθερων αμινομάδων (FAN) και εκφράστηκε σε μονάδα δραστηκότητας (U). Μία μονάδα (U) ορίστηκε ως η ποσότητα πρωτεασών που απαιτείται για την παραγωγή 1 mg FAN ανά min, στις παρούσες συνθήκες του πειράματος (Kachrimanidou et al., 2013).

3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ & ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η επίδραση διαφορετικών παραμέτρων στη παραγωγή φουμαρικού οξέος μέσω της βιοτεχνολογικής οδού έχει μελετηθεί στο παρελθόν και τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η μορφολογία του μύκητα είναι ένας από τους πιο σημαντικούς παράγοντες. Μελέτες στη μορφολογία των μυκήτων *R. oryzae* ATCC 20344 και *R. oryzae* NRRL 1526 έχουν ήδη πραγματοποιηθεί από διάφορες ερευνητικές ομάδες (Byrne et al., 1989a; 1989b; Zhou et al., 2000; Liao et al., 2007a; 2007b; Zhang et al., 2015). Ο μύκητας *Rhizopus arrhizus* NRRL 2582 είναι ένα αρκετά σημαντικό στέλεχος για την παραγωγή φουμαρικού οξέος (Rhodes et al., 1959), ωστόσο δεν υπάρχουν βιβλιογραφικές αναφορές για την μελέτη της μορφολογίας του και την επίδραση αυτής κατά την ζύμωση.

3.1 Επίδραση της μορφολογίας του μύκητα *Rhizopus arrhizus* NRRL 2582 στην παραγωγή φουμαρικού οξέος

Για την επίτευξη διαφορετικών μορφολογιών του μύκητα *Rhizopus arrhizus* NRRL 2582 χρησιμοποιήθηκαν προκαλλιέργειες διαφορετικής σύστασης. Ειδικότερα, για την παραγωγή συνεκτικών σφαιριδίων βιομάζας, χρησιμοποιήθηκε υπόστρωμα με σύσταση όπως έχει αναφερθεί από τους Byrne & Ward (1989a). Η δημιουργία αυτής της μορφολογίας ήταν εφικτή μόνον στην περίπτωση που η κύρια καλλιέργεια εμβολιάζονταν με προκαλλιέργεια που είχε επωαστεί για 7 ώρες περίπου, καθώς μεγαλύτερης διάρκειας επώαση είχε ως αποτέλεσμα την συσσωμάτωση του μύκητα σε μία άμορφη μάζα. Ουσιαστικά, σε αυτήν την περίπτωση η «προκαλλιέργεια» ήταν χαμηλής πυκνότητας καθώς εμπεριείχε εκβλαστημένα σπόρια κι όχι πλήρως ανεπτυγμένη βιομάζα. Τούτο, ήταν δυνατό να ξεπεραστεί στη συνέχεια εφαρμόζοντας την ίδια σύστασης προκαλλιέργεια μειώνοντας τον ενεργό όγκο ζύμωσης στην κωνική φιάλη. Σε αυτή την περίπτωση η προκαλλιέργεια είχε διάρκεια επώασης περί των 24 ωρών και η βιομάζα (υπό μορφή σφαιριδίων) ήταν πλήρως ανεπτυγμένη.

Μία άλλη μορφολογία που μελετήθηκε ήταν αυτή των ομοιόμορφα διεσπαρμένων μυκηλιακών υφών, η οποία ήταν δυνατόν να παραχθεί με χρήση ενός άλλου υποστρώματος, των Rhodes et al. (1959) (διάρκεια επώασης 24 ώρες). Το εν λόγω υπόστρωμα είχε αυξημένο ιξώδες, λόγω της παρουσίας υψηλής συγκέντρωσης

άμυλου καλαμποκιού. Με αυτόν τον τρόπο ήταν εφικτό να ελεγχθεί η μορφολογία του μύκητα, καθώς το αυξημένο ιξώδες του μέσου δεν επέτρεπε την συσσωμάτωσή του.

Ο αριθμός των σπορίων παίζει σημαντικό ρόλο στην μορφολογία του μύκητα. Αρκετές βιβλιογραφικές μελέτες χρησιμοποιούν $< 10^7$ σπόρια/L (Liao et al., 2007). Στη παρούσα μελέτη ο αριθμός των σπορίων που χρησιμοποιήθηκαν κατά των εμβολιασμό των προκαλλιιεργειών, σε όλα τα πειράματα που έγιναν, ήταν 10^7 σπόρια/L.

Ως παράγοντας εξουδετέρωσης των παραγόμενων οξέων κατά τη ζύμωση με σκοπό την διατήρηση του pH στο μέσο της καλλιέργειας, χρησιμοποιήθηκε το ανθρακικό ασβέστιο. Η αντίδραση μεταξύ του παραγόμενου φουμαρικού οξέος με το προστιθέμενο ανθρακικό ασβέστιο δημιουργεί φουμαρικό ασβέστιο (ίζημα) απελευθερώνοντας διοξείδιο του άνθρακα στο μέσο της ζύμωσης. Το διοξείδιο του άνθρακα χρησιμοποιείται στο αναγωγικό μονοπάτι της βιοσύνθεσης του φουμαρικού οξέος. Άλλοι παράγοντες εξουδετέρωσης που έχουν χρησιμοποιηθεί είναι το ανθρακικό νάτριο, το όξινο ανθρακικό νάτριο και το ανθρακικό αμμώνιο, μεταξύ άλλων (Gangl et al., 1990; Riscaldati et al., 2000; Zhou et al., 2002). Η καλύτερη απόδοση στην παραγωγή φουμαρικού οξέος επιτεύχθηκε με τη χρήση ανθρακικού ασβεστίου.

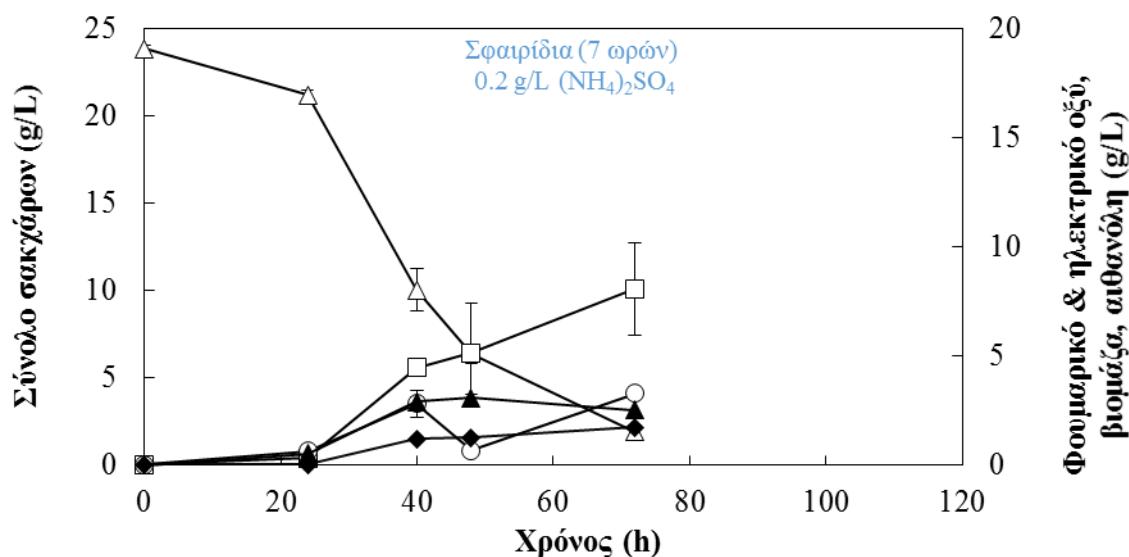
3.1.1 Παραγωγή βιομάζας υπό μορφή σφαιριδίων (pellet)

Αρχικά, μελετήθηκε η επίδραση της βιομάζας σε μορφή σφαιριδίων, του μύκητα *Rhizopus arrhizus* NRRL 2582, στην βιοτεχνολογική παραγωγή φουμαρικού οξέος. Σύμφωνα με βιβλιογραφικές μελέτες, η βιομάζα υπό μορφή σφαιριδίων ενισχύει την παραγωγή φουμαρικού οξέος του μύκητα *Rhizopus oryzae* ATCC 20344 (Liao et al., 2007) και του μύκητα *Rhizopus delemar* (Zhou et al., 2011). Για τον σκοπό αυτό, δοκιμάστηκε προκαλλιέργεια σε κωνικές φιάλες Erlenmeyer των 250 mL πληρωμένες με 50 mL διαλύματος γλυκόζης-πεπτόνης, όπως αυτή περιγράφεται στο κεφ. 2.3.1.

3.1.1.1 Ζύμωση υγρής κατάστασης για παραγωγή φουμαρικού οξέος

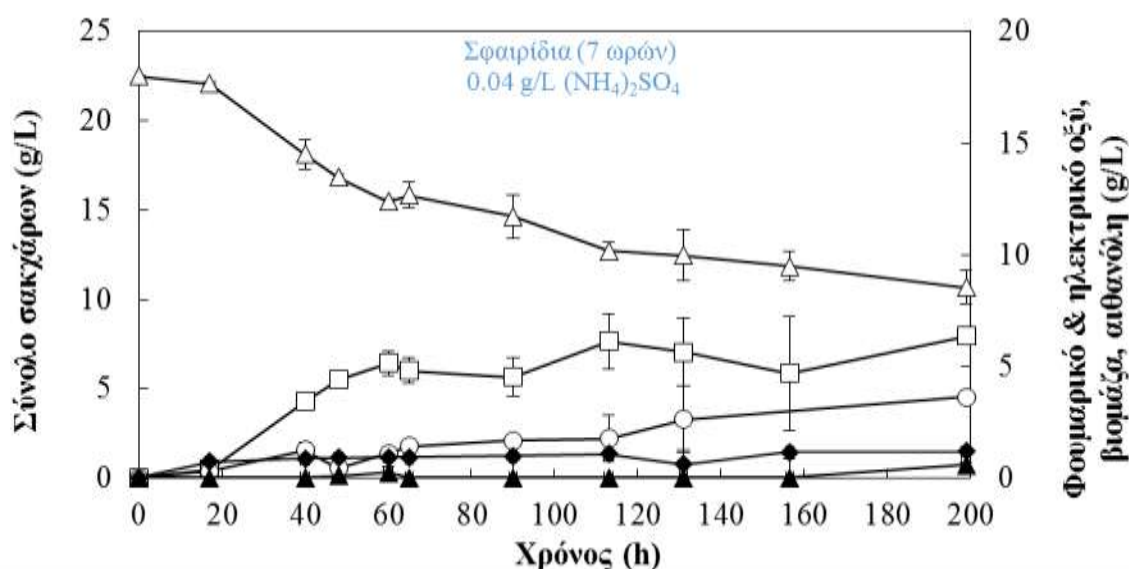
Η αρχική συγκέντρωση των σακχάρων της κύριας καλλιέργειας ήταν 25 g/L εμπορικής γλυκόζης. Επίσης, προστέθηκε στο υγρό ζύμωσης 0.2 g/L θειϊκό αμμώνιο και ανθρακικό ασβέστιο ως παράγοντας εξουδετέρωσης των παραγόμενων οξέων (Rhodes et al., 1959 & Ling et al., 1989). Τέλος, η ζύμωση πραγματοποιήθηκε σε κωνικές φιάλες των 250 mL πληρωμένες με 50 mL θρεπτικό μέσο, στους 30 °C και στις 180 rpm (η σύσταση περιγράφεται στο κεφ. 2.2).

Στο Διάγραμμα 3.1-1 παρουσιάζεται η κινητική αύξησης του μύκητα και η παραγωγή φουμαρικού οξέος κατά την υγρή ζύμωσή του σε κωνικές φιάλες, με τη χρήση σφαιριδίων βιομάζας (επώαση προκαλλιέργειας 7 ώρες) ως εμβόλιο και με αρχική συγκέντρωση 0.2 g/L θειϊκού αμμωνίου. Αρχικά, παρατηρήθηκε ότι ο μύκητας κατανάλωσε το 92% της πηγής άνθρακα με μέγιστη τιμή βιομάζας τα 3.3 g/L. Όσον αφορά στην παραγωγή φουμαρικού οξέος η τιμή έφτασε τα 8.1 g/L στις 72 ώρες ζύμωσης, ενώ τα παραπροϊόντα της ζύμωσης ανήλθαν στα 2.5 g/L η παραγόμενη αιθανόλη και 1.7 g/L το ηλεκτρικό οξύ. Η παραγωγικότητα του φουμαρικού οξέος ήταν χαμηλή 0.11 g φουμαρικού οξέος /L/h και η απόδοση ήταν επίσης αρκετά χαμηλή 0.34 g φουμαρικού οξέος ανά g σακχάρων.



Διάγραμμα 3.1-1 Κινητική αύξησης του μύκητα *Rhizopus arrhizus* NRRL 2582, κατανάλωση γλυκόζης (Δ) και της παραγωγής φουμαρικού οξέος (□), αιθανόλης (▲), ηλεκτρικού οξέος (●) καθώς και της παραγόμενης βιομάζας (○) σε θρεπτικό μέσο αρχικής συγκέντρωσης 25 g/L γλυκόζης και 0.2 g/L θειϊκού αμμωνίου με χρήση σφαιριδίων βιομάζας, από προκαλλιέργεια επωασμένη για 7 ώρες, ως εμβόλιο.

Όπως είναι αντιληπτό παράχθηκε υπολογίσιμη ποσότητα αιθανόλης (31% του κύριου προϊόντος), η οποία έχει αναφερθεί από τους Rhodes et al. (1959) ως παραπροϊόν της ζύμωσης. Μελέτες έδειξαν ότι η πηγή αζώτου επιδρά σημαντικά στη μορφολογία του στελέχους *Rhizopus chinensis* για την παραγωγή αντιβιοτικών (Du et al., 2002), αλλά και από τους Pirt & Callow (1959) με τη χρήση *P. chrysogenum*. Οι αναφερόμενοι ερευνητές παρατήρησαν ότι όταν το θειϊκό αμμώνιο χρησιμοποιήθηκε ως πηγή αζώτου τα σφαιρίδια ήταν μεγαλύτερης διαμέτρου, πιο συμπαγή και σχημάτισαν λεία επιφάνεια επιδρώντας αρνητικά στην παραγωγικότητα των παραγόμενων προϊόντων.



Διάγραμμα 3.1-2 Κινητική αύξησης του μύκητα *Rhizopus arrhizus* NRRL 2582, κατανάλωση γλυκόζης (Δ) και της παραγωγής φουμαρικού οξέος (□), αιθανόλης (▲), ηλεκτρικού οξέος (◆) καθώς και της παραγόμενης βιομάζας (○), σε θρεπτικό μέσο αρχικής συγκέντρωσης 25 g/L γλυκόζης, 0.04 g/L θειϊκού αμμωνίου με χρήση σφαιριδίων βιομάζας, από προκαλλιέργεια επωασμένη για 7 ώρες, ως εμβόλιο.

Λαμβάνοντας υπόψη την βιβλιογραφία, δοκιμάστηκε εκ νέου ζύμωση χρησιμοποιώντας σφαιρίδια βιομάζας από προκαλλιέργεια επωασμένη για 7 ώρες, αλλά μειώνοντας την ποσότητα θειϊκού αμμωνίου στην κύρια καλλιέργεια από τα 0.2 g/L στα 0.04 g/L και στο *Διάγραμμα 3.1-2* παρουσιάζεται η κινητική αύξησης του μύκητα.

Παρατηρήθηκε ότι ο μύκητας δεν ήταν σε θέση να καταναλώσει την πηγή άνθρακα, ενδεικτικά αφομοιώθηκε μόλις το 52% της γλυκόζης. Η βιομάζα ήταν

περίπου η ίδια (3.6 g/L στις 199 ώρες ζύμωσης) με την προηγούμενη ζύμωση, ήτοι όταν χρησιμοποιήθηκαν 0.2 g/L θειϊκού αμμωνίου ως πηγή αζώτου. Όσον αφορά στην παραγωγή φουμαρικού οξέος η συγκέντρωση έφτασε τα 6.3 g/L. Τα παραπροϊόντα της ζύμωσης ανήλθαν στα 0.6 g/L η παραγόμενη αιθανόλη και 1.2 g/L το ηλεκτρικό οξύ.

Η παραγωγικότητα του φουμαρικού οξέος ήταν ιδιαίτερα χαμηλή (0.06 g φουμαρικού οξέος /L/h) ενώ συγκριτικά με τα προηγούμενα αποτελέσματα η απόδοση παρέμεινε σχεδόν σταθερή (0.29 g φουμαρικού οξέος ανά g συνολικών σακχάρων). Σημειώνεται ότι η παραγωγικότητα 0.06 g φουμαρικού οξέος /L/h αποτελεί τον μέσο όρο των μετρήσεων, καθώς στις πρώτες ώρες ήταν 0.09 και προς το τέλος της ζύμωσης μειώθηκε στο 0.03 g/L/h.

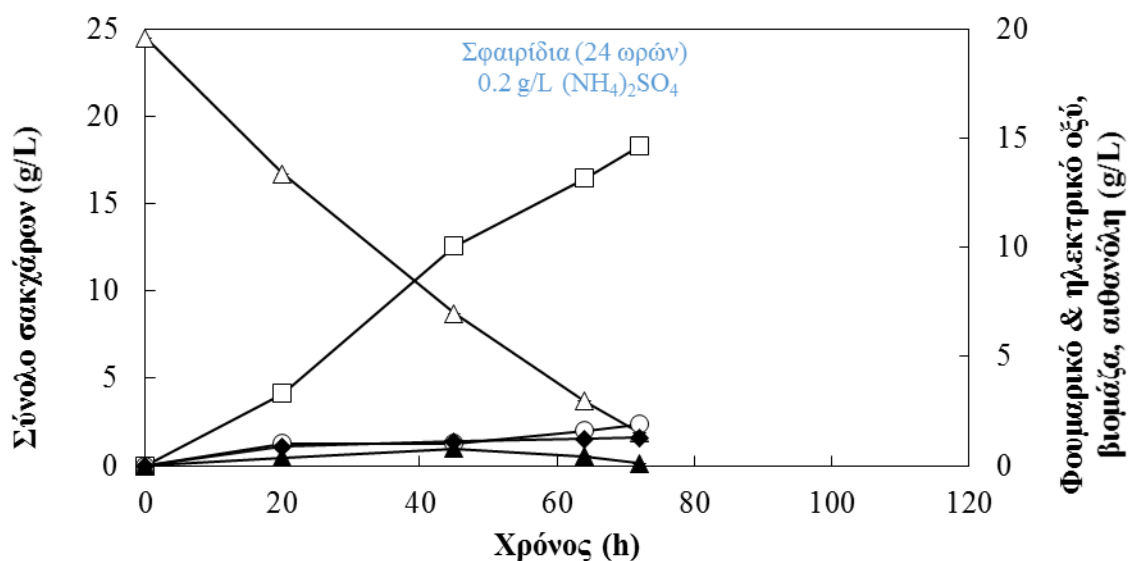
Λόγω της μεγάλης φάσης προσαρμογής που παρατηρήθηκε στην ζύμωση όταν χρησιμοποιήθηκε εμβόλιο από προκαλλιέργεια επωασμένη για 7 ώρες, καθώς και την αδυναμία που έδειξε ο μύκητας να καταναλώσει την πηγή άνθρακα στη δεύτερη περίπτωση (0.04 g/L θειϊκό αμμώνιο) έγιναν επιπλέον δοκιμές ώστε να παραχθεί εμβόλιο υψηλότερης πυκνότητας και πλήρως ανεπτυγμένη βιομάζα σε μορφή σφαιριδίων κατά την φάση της προκαλλιέργειας. Δοκιμάστηκε η χρήση εμβολίου από προκαλλιέργεια επωασμένη για 24 ώρες με τις ίδιες συνθήκες ζύμωσης. Το αποτέλεσμα όμως δεν ήταν το αναμενόμενο και στο υγρό της ζύμωσης σχηματίστηκε συσσωμάτωμα της βιομάζας καθιστώντας αδύνατη τη ομοιογενή μεταφορά στη κύρια καλλιέργεια. Επίσης, η αύξηση των στροφών της επωαστικής τράπεζας από 180 σε 200 rpm, έδωσε το ίδιο αποτέλεσμα (συσσωμάτωση της βιομάζας). Στη συνέχεια, μελετήθηκε η αύξηση του όγκου του υγρού για μεγαλύτερη διασπορά των σπορίων, από 50 mL σε 100 και 200 mL υγρού πλήρωσης σε κωνικές φιάλες των 500 και 1000 mL, αντίστοιχα, χωρίς όμως να επιτευχθούν τα επιθυμητά αποτελέσματα. Τέλος, δοκιμάστηκε η χρήση κωνικής φιάλης του 1 L που περιείχε baffles πληρωμένη με 50 mL διαλύματος γλυκόζης-πεπτόνης, διαδικασία η οποία εν τέλει είχε ως αποτέλεσμα την παραγωγή σφαιριδίων βιομάζας μετά από 24 ώρες επώασης.

Στα πειράματα που ακολούθησαν μελετήθηκε η αύξηση του μύκητα με τη χρήση σφαιριδίων βιομάζας από προκαλλιέργεια επωασμένη για 24 ώρες ως εμβόλιο

και χρήση δύο διαφορετικών συγκεντρώσεων 0.04 και 0.2 g/L θειϊκού αμμωνίου στην κύρια καλλιέργεια (Διαγράμματα 3.1-3 και 3.1-4).

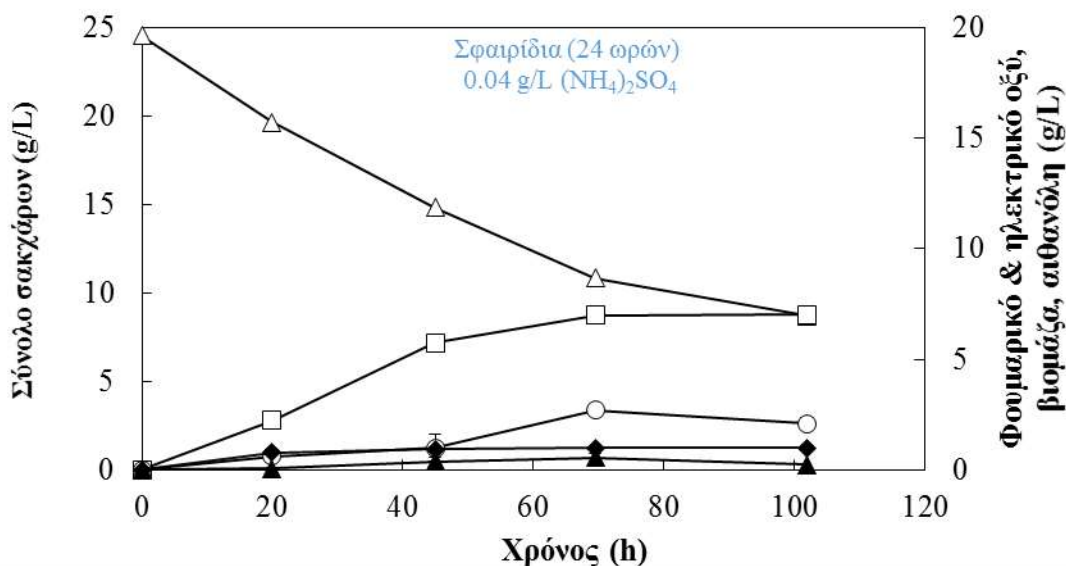
Στα Διαγράμματα 3.1-3 και 3.1-4 παρουσιάζονται οι κινητικές αύξησης του μύκητα και η παραγωγή φουμαρικού οξέος κατά την υγρή ζύμωσή του σε κωνικές φιάλες, σε δύο αρχικές συγκεντρώσεις θειϊκού αμμωνίου (0.04 και 0.2 g/L). Αρχικά, όσον αφορά στην κατανάλωση της πηγής άνθρακα παρατηρήθηκαν παρόμοια αποτελέσματα με την ζύμωση (σφαιρίδια από προκαλλιέργεια επωασμένη για 7 ώρες) του προηγούμενου πειράματος, δεδομένου ότι στα 0.04 g/L θειϊκού αμμωνίου καταναλώθηκε το 65% της γλυκόζης και στα 0.2 g/L θειϊκού αμμωνίου καταναλώθηκε το 92%. Η βιομάζα δεν είχε σημαντική διαφορά στις δυο περιπτώσεις, ήτοι 2.1 και 1.9 g/L αντίστοιχα. Το παραγόμενο φουμαρικό ήταν 7.0 και 14.7 g/L στις περιπτώσεις που χρησιμοποιήθηκαν 0.04 και 0.2 g/L θειϊκού αμμωνίου, αντίστοιχα. Τα παραπροϊόντα της ζύμωσης παρέμειναν σε χαμηλές τιμές, ήτοι η αιθανόλη 0.2 και 0.1 g/L και το ηλεκτρικό οξύ 1 και 1.3 g/L, στις περιπτώσεις που χρησιμοποιήθηκαν 0.04 και 0.2 g/L θειϊκού αμμωνίου, αντίστοιχα.

Αξιοσημείωτη ήταν η μεταβολή στην τιμή της παραγωγικότητας, όταν χρησιμοποιήθηκαν 0.2 g/L θειϊκού αμμωνίου, η οποία σχεδόν διπλασιάστηκε (0.2 g/L/h), σε σύγκριση με αυτή που παρατηρήθηκε κατά την ζύμωση με τη χρήση σφαιριδίων βιομάζας από προκαλλιέργεια επωασμένη για 7 ώρες. Επίσης, αυξήθηκε σημαντικά η απόδοση του παραγόμενου φουμαρικού οξέος από 0.34 στα 0.6 g/g. Αντίστοιχη εικόνα παρατηρήθηκε και στην περίπτωση που προστέθηκαν 0.04 g/L θειϊκού αμμωνίου, όπου η παραγωγικότητα αυξήθηκε από τα 0.06 στα 0.1 g/L/h, ενώ η απόδοση του φουμαρικού οξέος παρέμεινε σχεδόν σταθερή (από 0.28 g/g στα 0.29 g/g). Παρατηρήθηκε, όπως και στις προηγούμενες ζυμώσεις (με εμβόλιο σφαιριδίων βιομάζας επωασμένο για 7 ώρες), μια πτώση στην τιμή της παραγωγικότητας, όπου στις πρώτες ώρες ήταν 0.11 και προς το τέλος 0.07 g/L/h, το 0.1 g/L/h αποτελεί τον μέσο όρο των μετρήσεων.



Διάγραμμα 3.1-3 Κινητική αύξησης του μύκητα *Rhizopus arrhizus* NRRL 2582, κατανάλωση γλυκόζης (Δ) και της παραγωγής φουμαρικού οξέος (\square), αιθανόλης (\blacktriangle), ηλεκτρικού οξέος (\blacklozenge) καθώς και της παραγόμενης βιομάζας (\circ) σε θρεπτικό μέσο αρχικής συγκέντρωσης 25 g/L γλυκόζης, 0.2 g/L θειϊκού αμμωνίου με χρήση σφαιριδίων βιομάζας, από προκαλλιέργεια επωασμένη για 24 ώρες, ως εμβόλιο.

Τέλος, όπως ήταν αναμενόμενο με την χρήση εμβολίου, επωασμένου για 24 ώρες, δεν παρατηρήθηκε ιδιαίτερα μεγάλη φάση προσαρμογής, καθώς η βιομάζα ήταν πλήρως ανεπτυγμένη.



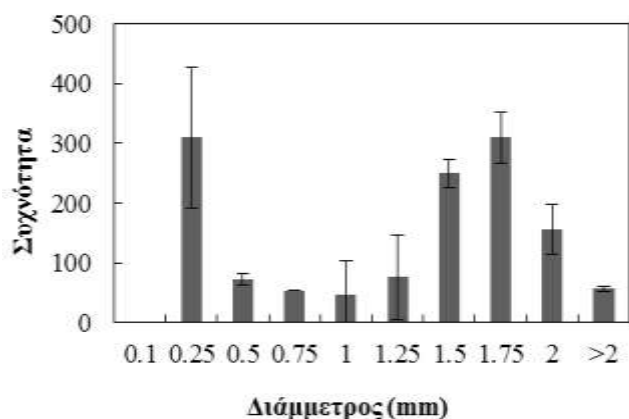
Διάγραμμα 3.1-4 Κινητική αύξησης του μύκητα *Rhizopus arrhizus* NRRL 2582, κατανάλωση γλυκόζης (Δ) και της παραγωγής φουμαρικού οξέος (\square), αιθανόλης (\blacktriangle), ηλεκτρικού οξέος (\blacklozenge) καθώς και της παραγόμενης βιομάζας (\circ) σε θρεπτικό μέσο αρχικής συγκέντρωσης 25 g/L γλυκόζης, 0.04 g/L θειϊκού αμμωνίου με χρήση σφαιριδίων βιομάζας, από προκαλλιέργεια επωασμένη για 24 ώρες ως εμβόλιο.

Μελέτες στη διεθνή βιβλιογραφία έχουν γίνει για την ανάλυση της μορφολογίας των μυκήτων *Rhizopus delemar* (Zhou et al., 2011), *Rhizopus oryzae* ATCC 20344 (Liao et al., 2007a), ενώ για τον μύκητα *Rhizopus arrhizus* NRRL 2582 δεν υπάρχουν δεδομένα για την ανάλυση της μορφολογίας της βιομάζας του. Στο κεφάλαιο που ακολουθεί παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης στην μορφολογική ανάλυση των σφαιριδίων της βιομάζας του μύκητα *Rhizopus arrhizus* NRRL 2582 (μέτρηση κυττάρων, σφαιρικότητα και κατανομή) και η επίδραση στην παραγωγή φουμαρικού οξέος.

3.1.1.2 Ανάλυση εικόνας - Μορφολογία του μύκητα

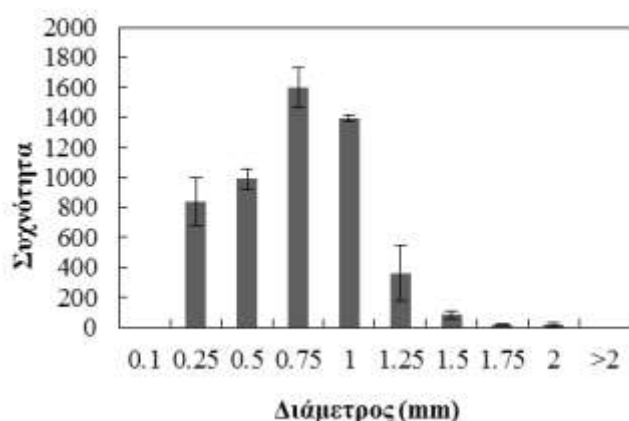
Η ανάλυση εικόνας εφαρμόστηκε και στις τέσσερις περιπτώσεις που εξετάστηκαν προηγουμένως για την παραγωγή σφαιριδίων (προκαλλιέργειες με διάρκεια επώασης 7 και 24 ωρών και αρχικές συγκεντρώσεις θειϊκού αμμωνίου 0.2 και 0.04 g/L στη κύρια ζύμωση). Όταν η διάρκεια της κύριας ζύμωσης ήταν 48 ώρες και ο μεταβολισμός είχε στραφεί πλήρως στην παραγωγή του φουμαρικού οξέος, η παραγόμενη βιομάζα της καλλιέργειας, μετά την προεργασία της με διάλυμα θειϊκού οξέος, σαρώθηκε καταλλήλως για την λήψη της φωτογραφίας και οι εικόνες επεξεργάστηκαν με τη βοήθεια του λογισμικού Image Pro Analysis ώστε να αναλυθεί η μορφολογία του μύκητα.

Αρχικά, αναλύθηκε η εικόνα της βιομάζας που προέκυψε με χρήση εμβολίου επωασμένου για 7 ώρες για την παραγωγή σφαιριδίων και με αρχική συγκέντρωση 0.2 g/L θειϊκού αμμωνίου στο μέσο της κύριας ζύμωσης. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι στο υγρό της ζύμωσης υπήρχαν 1333 κύτταρα, κατανεμημένα σε ένα εύρος τιμών διαμέτρου από 0.25 έως 2 mm, με μέση διάμετρο των σφαιριδίων 1.13 mm και ο λόγος της σφαιρικότητας ήταν 1.19. Στην *Εικόνα 3.1-1* παρουσιάζεται η κατανομή των τιμών της μέσης διαμέτρου των κυττάρων της βιομάζας ανά 0.25 mm.



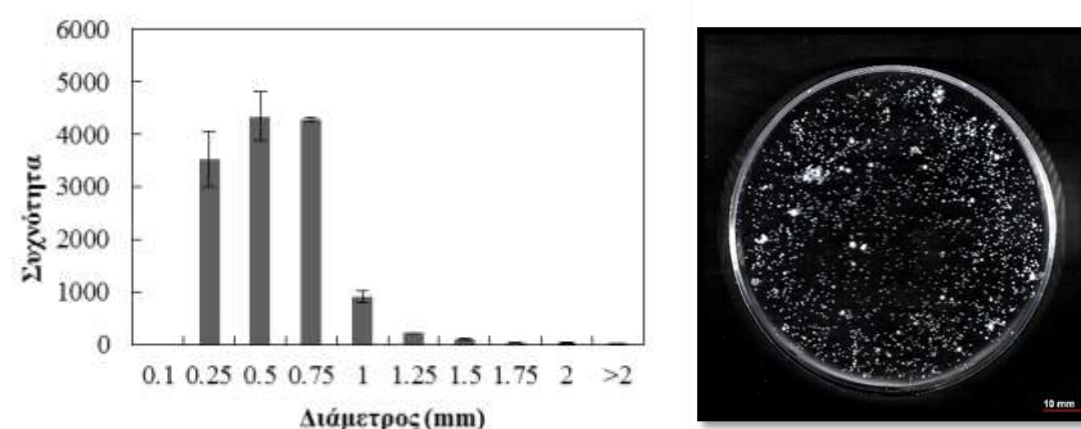
Εικόνα 3.1-1 Κατανομή των σφαιριδίων της βιομάζας του μύκητα *Rhizopus arrhizus* NRRL 2582 στις 48 ώρες ζύμωσης σε 25 g/L αρχική συγκέντρωση σακχάρων και 0.2 g/L θειϊκού αμμωνίου, με χρήση σφαιριδίων βιομάζας από προκαλλιέργεια επωασμένη για 7 ώρες. Στα δεξιά παρουσιάζεται η ψηφιακή εικόνα της καλλιέργειας.

Στην περίπτωση που προστέθηκαν 0.04 g/L θειϊκού αμμωνίου παρατηρήθηκε ότι ο αριθμός των κυττάρων στο υγρό της ζύμωσης αυξήθηκε, 5300 κύτταρα, από τα οποία τα περισσότερα ήταν κατανεμημένα σε ένα εύρος τιμών διαμέτρου από 0.25 έως 1.25 mm. Η μέση διάμετρος των σφαιριδίων μειώθηκε περίπου κατά 50% (0.57 mm), σε σχέση με την ζύμωση στα 0.2 g/L θειϊκού αμμωνίου, ενώ ο λόγος της σφαιρικότητας ήταν 1.26. Στην *Εικόνα 3.1-2* παρουσιάζεται η κατανομή των τιμών της μέσης διαμέτρου των κυττάρων της βιομάζας ανά 0.25 mm.



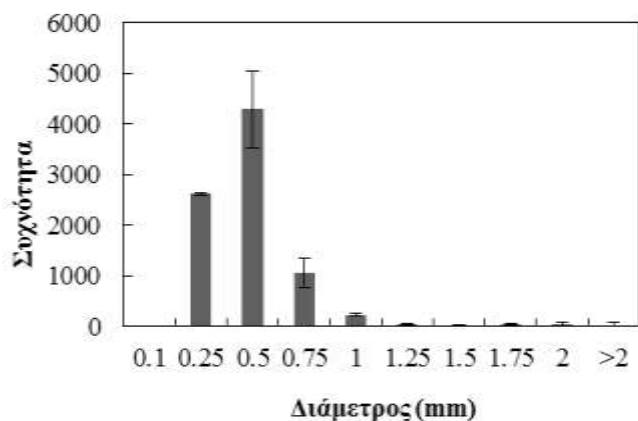
Εικόνα 3.1-2 Κατανομή των σφαιριδίων της βιομάζας του μύκητα *Rhizopus arrhizus* NRRL 2582 στις 48 ώρες ζύμωσης σε 25 g/L αρχική συγκέντρωση σακχάρων και 0.04 g/L θειϊκού αμμωνίου, με χρήση σφαιριδίων βιομάζας από προκαλλιέργεια επωασμένη για 7 ώρες. Στα δεξιά παρουσιάζεται η ψηφιακή εικόνα της καλλιέργειας.

Στη συνέχεια, επεξεργάστηκαν οι εικόνες σφαιριδίων βιομάζας που προήλθαν από εμβόλιο επωασμένο για 24 ώρες και με αρχική συγκέντρωση 0.2 και 0.04 g/L θειϊκού αμμωνίου στο υγρό της ζύμωσης. Στη πρώτη περίπτωση που εξετάστηκε (0.2 g/L θειϊκό αμμώνιο) παρατηρήθηκε ότι, ο αριθμός των κυττάρων στο υγρό της ζύμωσης αυξήθηκε στα 13420 κύτταρα, συγκεκριμένα ο αριθμός των κυττάρων δεκαπλασιάστηκε από την αντίστοιχη ζύμωση με χρήση εμβολίου επωασμένο για 7 ώρες (1333 κύτταρα).



Εικόνα 3.1-3 Κατανομή των σφαιριδίων της βιομάζας του μύκητα *Rhizopus arrhizus* NRRL 2582 στις 48 ώρες ζύμωσης σε 25 g/L αρχική συγκέντρωση σακχάρων και 0.2 g/L θειϊκού αμμωνίου, με χρήση σφαιριδίων βιομάζας από προκαλλιέργεια επωασμένη για 24 ώρες. Στα δεξιά παρουσιάζεται η ψηφιακή εικόνα της καλλιέργειας.

Τα κύτταρα ήταν κατανεμημένα σε ένα εύρος τιμών διαμέτρου από 0.25 έως 1 mm και η μέση διάμετρος των σφαιριδίων ήταν μικρότερη από 0.46 mm (1.13 στην αντίστοιχη περίπτωση με χρήση σφαιριδίων, προερχόμενα από προκαλλιέργεια επωασμένη για 7 ώρες), ενώ ο λόγος της σφαιρικότητας αυξήθηκε και ήταν 1.27. Στην *Εικόνα 3.1-3* παρουσιάζεται η κατανομή των τιμών της μέσης διαμέτρου της βιομάζας ανά 0.25 mm.



Εικόνα 3.1-4 Κατανομή των σφαιριδίων της βιομάζας του μύκητα *Rhizopus arrhizus* NRRL 2582 στις 48 ώρες ζύμωσης σε 25 g/L αρχική συγκέντρωση σακχάρων και 0.04 g/L θειϊκού αμμωνίου, με χρήση σφαιριδίων βιομάζας από προκαλλιέργεια επωασμένη για 24 ώρες. Στα δεξιά παρουσιάζεται η ψηφιακή εικόνα της καλλιέργειας.

Τέλος, στην περίπτωση που χρησιμοποιήθηκε προκαλλιέργεια με διάρκεια επώασης 24 ωρών για την παραγωγή σφαιριδίων και με αρχική συγκέντρωση 0.04 g/L θειϊκού αμμωνίου στο υγρό ζύμωσης (Εικόνα 3.1-4) βρέθηκε ότι ο αριθμός των κυττάρων μειώθηκε στα 8403 κύτταρα (από 13420 κύτταρα), όπως επίσης μειώθηκε και η μέση διάμετρος 0.37 mm (από 0.46 mm) σε σχέση με την ζύμωση αρχικής συγκέντρωσης 0.2 g/L θειϊκού αμμωνίου, ενώ ο λόγος της σφαιρικότητας ανήλθε στο 1.19.

3.1.1.3 Συγκριτική αξιολόγηση της παραγωγής φουμαρικού οξέος με χρήση βιομάζας υπό μορφή σφαιριδίων

Σε αυτή τη σειρά πειραμάτων μελετήθηκε η δυνατότητα παραγωγής φουμαρικού οξέος από τον μύκητα *Rhizopus arrhizus* NRRL 2582, με χρήση βιομάζας υπό μορφή σφαιριδίων, ενώ παράλληλα μελετήθηκε η μορφολογία της βιομάζας.

Από τα αποτελέσματα του Πίνακα 3.1-1 φαίνεται ότι ο μύκητας *R. arrhizus* NRRL 2582 κατανάλωσε ικανοποιητικά την πηγή άνθρακα (~92%) όταν η αρχική συγκέντρωση του θειϊκού αμμωνίου ήταν 0.2 g/L ανεξάρτητα από τη διάρκεια επώασης της προκαλλιέργειας. Αντιθέτως, όταν η αρχική συγκέντρωση του θειϊκού αμμωνίου ήταν 0.04 g/L κατανάλωσε μόλις το 52.4 και 64.5% με χρήση σφαιριδίων

με διάρκεια επώασης 7 και 24 ώρες, αντίστοιχα. Στις τιμές της βιομάζας παρατηρήθηκε ότι το θειϊκό αμμώνιο δεν είχε σημαντικό ρόλο σε σχέση με τη διάρκεια επώασης της προκαλλιέργειας, αναλυτικά στα σφαιρίδια επωασμένα για 7 ώρες ήταν παρόμοια, 3.3 και 3.6 g/L, όταν η αρχική συγκέντρωση θειϊκού αμμωνίου ήταν 0.2 και 0.04 g/L, αντίστοιχα, ενώ όταν τα σφαιρίδια είχαν διάρκεια επώασης 24 ωρών οι τιμές της βιομάζας μειώθηκαν φτάνοντας τα 1.9 και 2.1 g/L, όταν η αρχική συγκέντρωση θειϊκού αμμωνίου ήταν 0.2 και 0.04 g/L, αντίστοιχα.

Πίνακας 3.1-1 Αποτελέσματα της ζύμωσης του μύκητα *Rhizopus arrhizus* NRRL 2582 σε υπόστρωμα εμπορικής γλυκόζης αρχικής συγκέντρωσης 25 g/L, με χρήση προκαλλιέργειας για παραγωγή σφαιριδίων, επωασμένη για 7 και 24 ώρες, και αρχική συγκέντρωση 0.2 και 0.04 g/L θειϊκού αμμωνίου.

Προκαλλιέργεια σφαιριδίων	Χρόνος (h)	Γλυκόζη (g/L)	Φουμαρικό οξύ (g/L)	Βιομάζα (g/L)	Ηλεκτρικό οξύ (g/L)	Αιθανόλη (g/L)
7 ώρες 0.2 g/L θειϊκό αμμώνιο	0	23.8±0.2	0	0	0	0
	72	1.9±0.4	6.9±2.1	3.3±0.2	1.7±0.1	2.5±0.9
7 ώρες 0.04 g/L θειϊκό αμμώνιο	0	22.5±0.1	0	0	0	0
	199	10.7±1	6.4±0.3	3.6±0.2	1.2±0.1	0.4±0.1
24 ώρες 0.2 g/L θειϊκό αμμώνιο	0	24.5	0	0.4	0	0
	72	1.9	14.7	1.9	1.3	0.1
24 ώρες 0.04 g/L θειϊκό αμμώνιο	0	24.5	0	0.4	0	0
	102	8.7	7	2.1	1.0	0.2

Αναφορικά με το κύριο μεταβολικό προϊόν της ζύμωσης, το φουμαρικό οξύ, παρόμοια χαμηλή απόδοση παρατηρήθηκε όταν χρησιμοποιήθηκαν προκαλλιέργειες με διάρκεια επώασης 7 ώρες ανεξάρτητα με τη αρχική συγκέντρωση θειϊκού αμμωνίου, καθώς και στην προκαλλιέργεια με διάρκεια επώασης 24 ώρες με 0.2 g/L θειϊκό αμμώνιο. Εν αντιθέσει, όταν χρησιμοποιήθηκε προκαλλιέργεια με διάρκεια επώασης 24 ώρες και με 0.2 g/L θειϊκό αμμώνιο κατά την κύρια ζύμωση, η παραγόμενη συγκέντρωση του φουμαρικό οξύ σχεδόν διπλασιάστηκε φτάνοντας τα 14.7 g/L. Ο συνολικός χρόνος ζύμωσης ήταν μικρότερος όταν η αρχική συγκέντρωση θειϊκού αμμωνίου ήταν 0.2 g/L (72 ώρες), ανεξάρτητα από την διάρκεια επώασης της

προκαλλιέργειας, ενώ όταν η συγκέντρωση του θειϊκού αμμωνίου ήταν 0.04 g/L η ζύμωση ήταν αρκετά αργή δείχνοντας αδυναμία του μύκητα να αφομοιώσει τα εναπομείναντα σάκχαρα.

Τα κύρια παραπροϊόντα της ζύμωσης ήταν η αιθανόλη και το ηλεκτρικό οξύ. Όταν χρησιμοποιήθηκε προκαλλιέργεια με διάρκεια επώασης 7 ώρες και 0.2 g/L θειϊκού αμμωνίου παράχθηκε η μεγαλύτερη ποσότητα αιθανόλης φτάνοντας τα 2.5 g/L, ενώ στις άλλες περιπτώσεις ήταν ελάχιστη η παραγωγή του παραπροϊόντος (0.1-0.4 g/L). Διαφορετική ήταν η εικόνα της παραγωγής του ηλεκτρικού οξέος, ενδεικτικά όταν αυξήθηκε το θειϊκό αμμώνιο κατά την κύρια καλλιέργεια (από 0.04 σε 0.2 g/L), παρατηρήθηκε μικρή αύξηση του ηλεκτρικού οξέος, ανεξάρτητα από την διάρκεια επώασης της προκαλλιέργειας.

Πίνακας 3.1-2 Αποτελέσματα της ανάλυσης της μορφολογίας του μύκητα *Rhizopus arrhizus* NRRL 2582 σε υπόστρωμα εμπορικής γλυκόζης αρχικής συγκέντρωσης 25 g/L, με χρήση προκαλλιέργειας για παραγωγή σφαιριδίων, επωασμένη για 7 και 24 ώρες, και αρχική συγκέντρωση 0.04 και 0.2 g/L θειϊκού αμμωνίου.

Προκαλλιέργεια σφαιριδίων	Φουμαρικό οξύ (g/L)	Απόδοση (g/g)	Παραγωγικότητα (g/L/h)	Αριθμός κυττάρων	Μέση διάμετρος (mm)	Σφαιρικότητα
7 ώρες 0.2 g/L θειϊκό αμμώνιο	6.9±2.1	0.34	0.11	1333±236	1.13±0.11	1.19±0.04
7 ώρες 0.04 g/L θειϊκό αμμώνιο	6.4±0.3	0.28	0.06	5300±189	0.57±0.08	1.26±0.01
24 ώρες 0.2 g/L θειϊκό αμμώνιο	14.7	0.6	0.2	13420±94	0.46±0.01	1.27±0.01
24 ώρες 0.04 g/L θειϊκό αμμώνιο	7	0.29	0.1	8403±1089	0.37±0.02	1.19±0.02

Στον Πίνακα 3.1-2 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της ανάλυσης της μορφολογίας του μύκητα, σε σχέση με τις αποδόσεις και την παραγωγικότητα του φουμαρικού οξέος στις διαφορετικές συνθήκες που μελετήθηκαν. Η μέγιστη απόδοση που επιτεύχθηκε ήταν 0.6 g φουμαρικού οξέος ανά g συνολικών σακχάρων με χρήση σφαιριδίων, με διάρκεια επώασης 24 ωρών, και 0.2 g/L θειϊκού αμμωνίου. Οι τιμές της απόδοσης στις άλλες τρεις συνθήκες ήταν αρκετά χαμηλές, σχεδόν υποδιπλάσιες

0.34, 0.28 και 0.29 g/g. Αξίζει να σημειωθεί ότι, αντίστοιχα αποτελέσματα παρατηρήθηκαν και στην παραγόμενη ποσότητα φουμαρικού οξέος αλλά και στην παραγωγικότητα.

Αντικρουόμενα αποτελέσματα παρατηρούνται στον αριθμό των κυττάρων της βιομάζας. Ειδικότερα, όταν χρησιμοποιήθηκαν σφαιρίδια, από προκαλλιέργεια με διάρκεια επώασης 7 ωρών, ως εμβόλιο στη ζύμωση παρατηρήθηκε ότι με την αύξηση του θειϊκού αμμωνίου υπήρξε μείωση του αριθμού των κυττάρων από 5300 κύτταρα (0.04 g/L) σε 1333 κύτταρα (0.2 g/L), ενώ με χρήση σφαιριδίων από προκαλλιέργεια επωασμένη για 24 ώρες, παρατηρήθηκε αύξηση από 8403 κύτταρα σε 13420 κύτταρα. Η μέση διάμετρος των σφαιριδίων αυξήθηκε με την αύξηση του θειϊκού αμμωνίου (από 0.04 στα 0.2 g/L), ανεξάρτητα από τη διάρκεια επώασης της προκαλλιέργειας. Τέλος, ο λόγος της σφαιρικότητας δεν φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο στην παραγωγή του φουμαρικού οξέος.

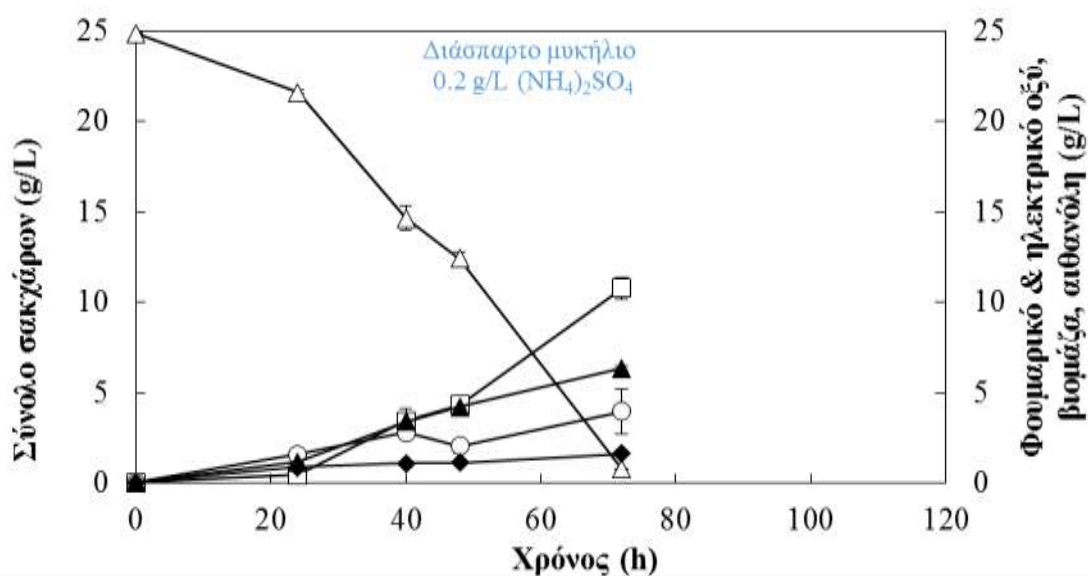
Συνοψίζοντας τα ως άνω, διαπιστώνουμε ότι οι καλύτερες συνθήκες για την βιοτεχνολογική παραγωγή φουμαρικού οξέος με τη χρήση βιομάζας υπό μορφή σφαιριδίων, ήταν η προκαλλιέργεια που ήταν επωασμένη για 24 ώρες σε συνδυασμό με αρχική συγκέντρωση 0.2 g/L θειϊκού αμμωνίου. Τέλος, όσον αφορά στα μορφολογικά χαρακτηριστικά της βιομάζας θα πρέπει ο αριθμός των κυττάρων να είναι μεγαλύτερος από 10^4 κύτταρα και η μέση διάμετρος αυτών να είναι 0.5 mm. Ωστόσο, πρέπει να σημειωθεί ότι η τεχνική αύξησης των σφαιριδίων της βιομάζας του εν λόγω μύκητα σε κωνικές φιάλες τύπου baffled 1L δεν ήταν επαναλήψιμη.

3.1.2 Παραγωγή βιομάζας υπό μορφή ομοιόμορφων διάσπαρτων μυκηλιακών υφών (dispersed mycelia)

Στη συνέχεια των πειραμάτων, μελετήθηκε η επίδραση της μορφολογίας, αυτή τη φορά με το σχηματισμό διάσπαρτου μυκηλίου του μύκητα *Rhizopus arrhizus* NRRL 2582, ως προς την βιοτεχνολογική παραγωγή φουμαρικού οξέος. Σύμφωνα με βιβλιογραφικές μελέτες η βιομάζα υπό μορφή διάσπαρτου μυκηλίου ενισχύει την παραγωγή φουμαρικού οξέος από τον μύκητα (Rhodes et al, 1959; Gangl, 1990). Για τον σκοπό αυτό, δοκιμάστηκε προκαλλιέργεια σε κωνικές φιάλες Erlenmeyer των 250 mL πληρωμένες με 50 mL, όπως αυτή περιγράφεται στο κεφ. 2.3.2.

3.1.2.1 Ζύμωση υγρής κατάστασης για παραγωγή φουμαρικού οξέος

Η αρχική συγκέντρωση των σακχάρων της κύριας καλλιέργειας ήταν 25 g/L εμπορικής γλυκόζης. Επίσης, προστέθηκε στο υγρό ζύμωσης 0.2 g/L θειϊκό αμμώνιο και ανθρακικό ασβέστιο ως παράγοντας εξουδετέρωσης των παραγόμενων οξέων.



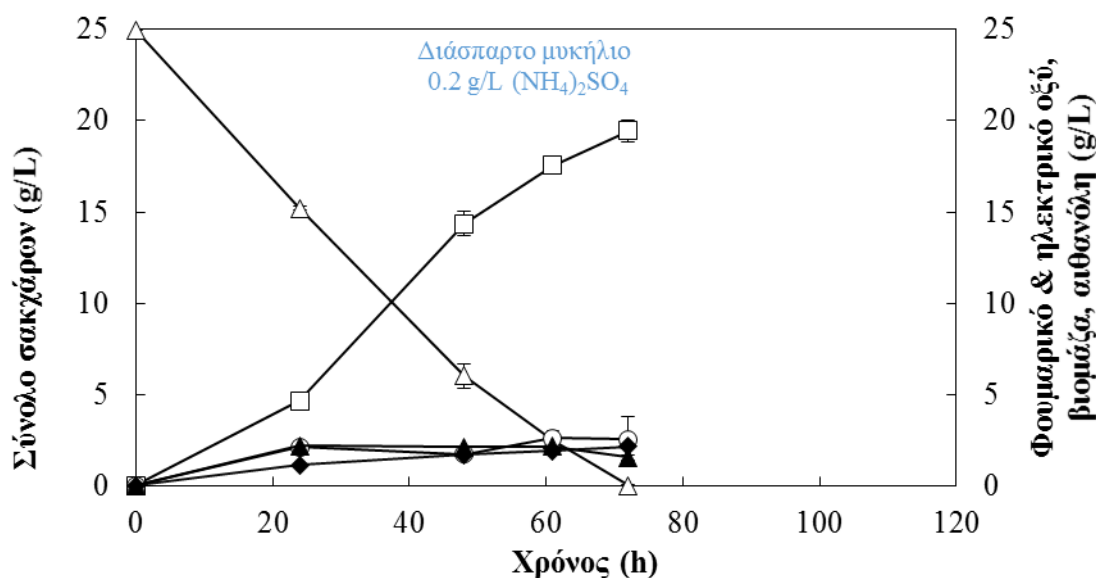
Διάγραμμα 3.1-5 Κινητική αύξησης του μύκητα *Rhizopus arrhizus*, κατανάλωση γλυκόζης (Δ) και της παραγωγής φουμαρικού οξέος (□), αιθανόλης (▲), ηλεκτρικού οξέος (◆) καθώς και της παραγόμενης βιομάζας (○) σε θρεπτικό μέσο αρχικής συγκέντρωσης 25 g/L γλυκόζης και 0.2 g/L θειϊκού αμμωνίου και με τη χρήση διάσπαρτου μυκηλίου ως εμβόλιο. Σύσταση προκαλλιέργειας κατά Rhodes et al. (1959).

Στο *Διάγραμμα 3.1-5* παρουσιάζεται η κινητική αύξησης του μύκητα και η παραγωγή φουμαρικού οξέος κατά την υγρή ζύμωσή του σε κωνικές φιάλες, με τη χρήση βιομάζας υπό μορφή διάσπαρτου μυκηλίου ως εμβόλιο και αρχική συγκέντρωση 0.2 g/L θειϊκού αμμωνίου. Παρατηρήθηκε ότι η πηγή άνθρακα καταναλώθηκε σχεδόν κατά 96.8%. Η βιομάζα ανήλθε στα 4 g/L και η συγκέντρωση του φουμαρικού οξέος έφτασε τα 10.8 g/L στις 72 ώρες ζύμωσης. Τα παραπροϊόντα της ζύμωσης ανήλθαν στα 6.3 g/L η παραγόμενη αιθανόλη και 1.6 g/L το ηλεκτρικό οξύ. Η παραγωγικότητα του φουμαρικού οξέος ήταν 0.15 g φουμαρικού οξέος /L/h, ενώ η απόδοση ανήλθε στα 0.43 g φουμαρικού οξέος ανά g συνολικών σακχάρων.

Συγκριτικά με τα προηγούμενα αποτελέσματα (με τη χρήση βιομάζας υπό μορφή σφαιριδίων με διάρκεια επώασης 24 ώρες με 0.2 g/L θειϊκό αμμώνιο στην κύρια καλλιέργεια) παρατηρήθηκε μείωση τόσο στην παραγόμενη συγκέντρωση φουμαρικού οξέος (από 14.7 σε 10.8 g/L), όσο και στην παραγωγικότητα (από 0.2 σε 0.15 g/L/h) και στην απόδοση (από 0.6 σε 0.43 g/L).

Λαμβάνοντας υπόψη τα αποτελέσματα των προηγούμενων πειραμάτων και με βάση την βιβλιογραφία που αναφέρει την θετική επίδραση της πεπτόνης (Paragianni, 2004), επιλέχθηκε στα επόμενα πειράματα να προστεθεί πεπτόνη μαζί με την ουρία ως πηγές αζώτου στην προκαλλιέργεια. Έτσι, δοκιμάστηκε προκαλλιέργεια για παραγωγή βιομάζας υπό μορφή διάσπαρτου μυκηλίου με επιπλέον προσθήκη 1.6 g/L πεπτόνης. Η ποσότητα αυτή είχε χρησιμοποιηθεί από τους Rhodes et al. (1959) σε προηγούμενο στάδιο ανάπτυξης του μύκητα. Σημειώνεται ότι η ποσότητα του θειϊκού αμμωνίου που χρησιμοποιήθηκε στην κύρια καλλιέργεια ήταν 0.2 g/L. Από τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στο *Διάγραμμα 3.1-6* διαπιστώνεται ότι, εν αντιθέσει με τη προηγούμενη περίπτωση, ο συνδυασμός των δύο πηγών αζώτου κατά την προκαλλιέργεια ευνόησε την παραγωγή φουμαρικού οξέος εις βάρος της παραγωγής αιθανόλης. Αναλυτικά, η πηγή άνθρακα καταναλώθηκε πλήρως με την παραγόμενη βιομάζα να είναι 2.5 g/L. Το παραγόμενο φουμαρικό οξύ έφτασε τα 19.4 g/L, ενώ τα παραπροϊόντα της ζύμωσης παρέμειναν σε χαμηλά επίπεδα, ήτοι 1.6 g/L και 2.2 g/L αιθανόλη και ηλεκτρικό οξύ, αντίστοιχα στις 72 ώρες ζύμωσης. Τέλος, οι τιμές της παραγωγικότητας και της απόδοσης του φουμαρικού οξέος ήταν υψηλότερες από όλες τις άλλες περιπτώσεις που έχουν εξεταστεί μέχρι τώρα, ήτοι 0.27 g φουμαρικού οξέος /L/h και 0.78 g φουμαρικού οξέος ανά g συνολικών σακχάρων, αντίστοιχα. Λόγω αυτών των ενθαρρυντικών αποτελεσμάτων, τα επόμενα

πειράματα για την παραγωγή εμβολίου υπό μορφή διάσπαρτων μυκηλιακών υφών βασίστηκαν στην σύνθεση της προκαλλιέργειας εμπλουτισμένη με πεπτόνη, που από εδώ και στο εξής θα αναφέρεται ως τροποποιημένη σύσταση προκαλλιέργειας κατά Rhodes et al. (1959).

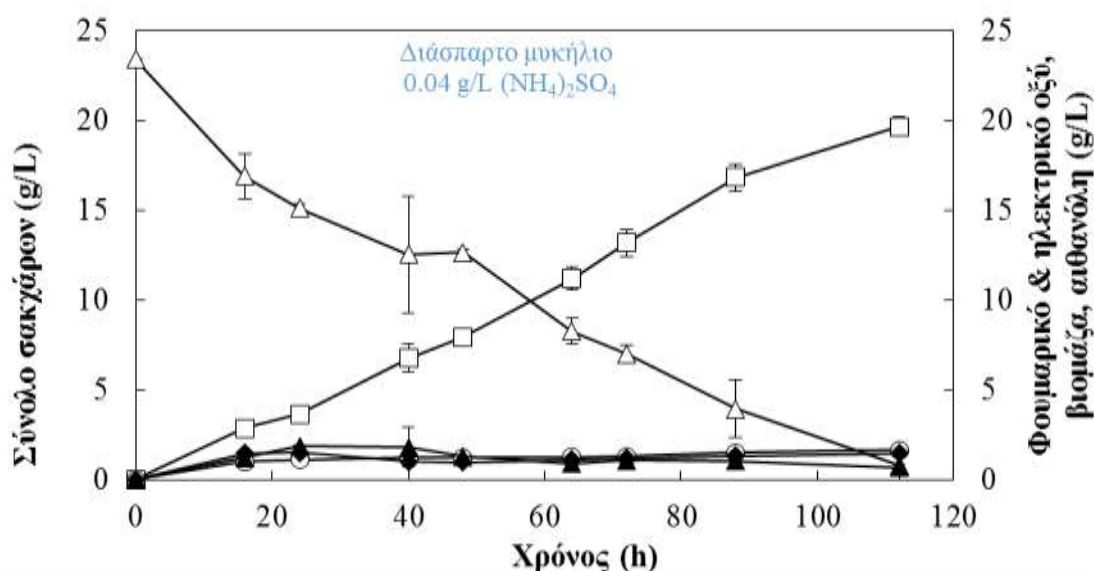


Διάγραμμα 3.1-6 Κινητική αύξησης του μύκητα *Rhizopus arrhizus* NRRL 2582, κατανάλωση γλυκόζης (Δ) και της παραγωγής φουμαρικού οξέος (\square), αιθανόλης (\blacktriangle), ηλεκτρικού οξέος (\blacklozenge) καθώς και της παραγόμενης βιομάζας (\circ) σε θρεπτικό μέσο αρχικής συγκέντρωσης 25 g/L γλυκόζης και 0.2 g/L θειϊκού αμμωνίου και με τη χρήση διάσπαρτου μυκηλίου ως εμβόλιο. Τροποποιημένη σύσταση προκαλλιέργειας κατά Rhodes et al. (1959).

Στο *Διάγραμμα 3.1-7* που ακολουθεί παρουσιάζεται η ίδια ζύμωση, όπως προηγουμένως, αλλά με προσθήκη 0.04 g/L θειϊκού αμμωνίου. Διαπιστώνεται ότι τα σάκχαρα καταναλώθηκαν κατά 96.6% της συνολικής ποσότητας, ενώ η βιομάζα που παράχθηκε ήταν 1.7 g/L. Το παραγόμενο φουμαρικό οξύ ήταν ελαφρά αυξημένο (19.7 g/L) σε σχέση με το προηγούμενο πείραμα (σε 0.2 g/L θειϊκό αμμώνιο). Τα παραπροϊόντα της ζύμωσης, όπως και στο προηγούμενο πείραμα, παρέμειναν σε χαμηλά επίπεδα και μειωμένα σε σχέση με αυτό, ενδεικτικά η αιθανόλη ήταν 0.7 g/L και το ηλεκτρικό οξύ που παρήχθη ήταν 1.5 g/L.

Συγκρίνοντας τα πειράματα με τις διαφορετικές συγκεντρώσεις θειϊκού αμμωνίου, η παραγωγικότητα του φουμαρικού οξέος μειώθηκε από 0.27 (0.2 g/L θειϊκό αμμώνιο) στα 0.17 g φουμαρικού οξέος /L/h, ενώ η απόδοση αυξήθηκε ακόμα περισσότερο από 0.78 (0.2 g/L θειϊκό αμμώνιο) στα 0.84 g φουμαρικού οξέος ανά g

συνολικών σακχάρων. Αξίζει να σημειωθεί ότι η απόδοση (0.84 g/g) που επιτεύχθηκε στο πείραμα αυτό αποτελεί τη μέγιστη απόδοση του μύκητα στην παρούσα μελέτη. Παρόμοια υψηλές αποδόσεις 0.97 & 0.81 g φουμαρικού οξέος ανά g σακχάρων, έχουν αναφερθεί από τους Ling & Ng (1989) και τους Kenealy et al. (1986) αντίστοιχα, σε πειράματα με υπόστρωμα γλυκόζης.

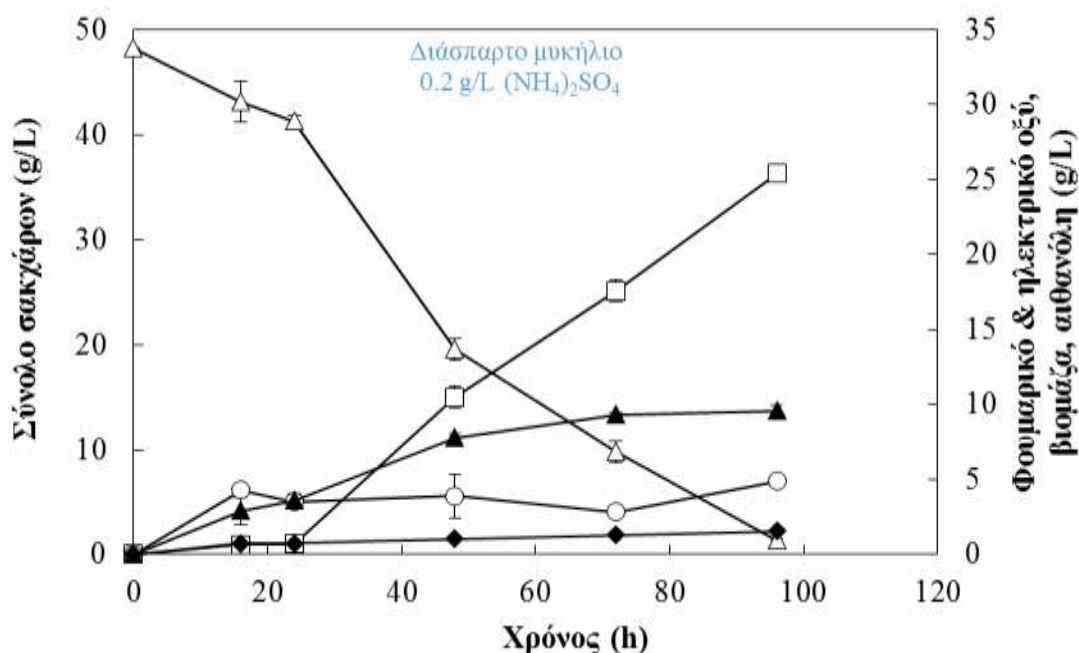


Διάγραμμα 3.1-7 Κινητική αύξησης του μύκητα *Rhizopus arrhizus* NRRL 2582, κατανάλωση γλυκόζης, (Δ) και της παραγωγής φουμαρικού οξέος (\square), Αιθανόλης (\blacktriangle), Ηλεκτρικού οξέος (\blacklozenge) καθώς και της παραγόμενης βιομάζας (\circ) σε θρεπτικό μέσο αρχικής συγκέντρωσης 25 g/L γλυκόζης και 0.04 g/L θειϊκού αμμωνίου και με τη χρήση διάσπαρτου μυκηλίου ως εμβόλιο. Τροποποιημένη σύσταση προκαλλιέργειας κατά Rhodes et al. (1959).

Έπειτα από την αξιολόγηση των μέχρι τώρα αποτελεσμάτων και λαμβάνοντας υπόψη τις ικανοποιητικές τιμές απόδοσης και παραγωγικότητας, αποφασίστηκε να δοκιμαστεί η επίδραση της αρχικής συγκέντρωσης της πηγής άνθρακα για την παραγωγή φουμαρικού οξέος. Για τον σκοπό αυτό, αυξήθηκε η αρχική συγκέντρωση της γλυκόζης από τα 25 στα 50 g/L, ενώ χρησιμοποιήθηκαν 0.2 και 0.04 g/L θειϊκού αμμωνίου στο υγρό μέσο της κύριας ζύμωσης.

Στο *Διάγραμμα 3.1-8* παρουσιάζεται η κινητική αύξησης του μύκητα και η παραγωγή φουμαρικού οξέος. Χρησιμοποιήθηκε προκαλλιέργεια για παραγωγή βιομάζας υπό μορφή διάσπαρτου μυκηλίου με διάρκεια επώασης 24 ώρες και αρχική συγκέντρωση 0.2 g/L θειϊκού αμμωνίου στη κύρια ζύμωση. Παρατηρήθηκε ότι η πηγή άνθρακα καταναλώθηκε πλήρως (97.1% της αρχικής συγκέντρωσης). Η

βιομάζα στις 96 ώρες ζύμωσης σχεδόν διπλασιάστηκε σε σχέση με τα 20 g/L (ήταν 2.5 g/L) και ανήλθε στα 4.9 g/L. Όσον αφορά στην παραγωγή φουμαρικού οξέος, η συγκέντρωση έφτασε τα 25.4 g/L, ενώ τα παραπροϊόντα της ζύμωσης ανήλθαν στα 9.6 g/L η παραγόμενη αιθανόλη και 1.6 g/L το ηλεκτρικό οξύ. Η παραγωγικότητα του φουμαρικού οξέος παρέμεινε σχεδόν σταθερή 0.26 g φουμαρικού οξέος /L/h, ενώ η απόδοση μειώθηκε αισθητά στα 0.53 g φουμαρικού οξέος ανά g συνολικών σακχάρων, σε σχέση με την αντίστοιχη ζύμωση με αρχική συγκέντρωση γλυκόζης 25 g/L.

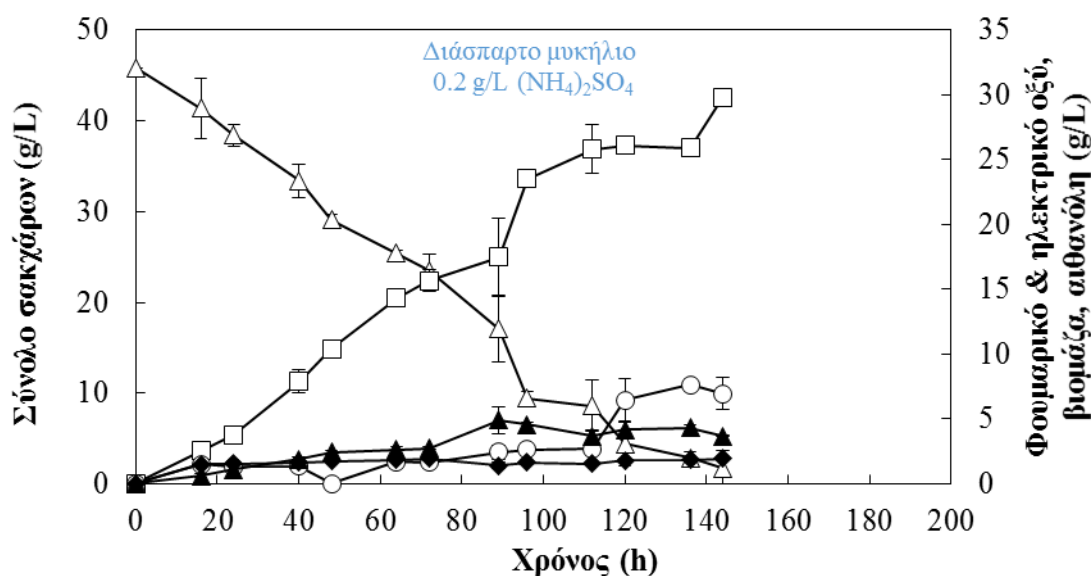


Διάγραμμα 3.1-8 Κινητική αύξησης του μύκητα *Rhizopus arrhizus* NRRL 2582, κατανάλωση γλυκόζης (Δ) και της παραγωγής φουμαρικού οξέος (□), Αιθανόλης (▲), Ηλεκτρικού οξέος (◆) καθώς και της παραγόμενης βιομάζας (○) σε θρεπτικό μέσο αρχικής συγκέντρωσης 50 g/L γλυκόζης και 0.2 g/L θειϊκού αμμωνίου και με τη χρήση διάσπαρτου μυκηλίου ως εμβόλιο. Τροποποιημένη σύσταση προκαλλιέργειας κατά Rhodes et al. (1959).

Τέλος, πραγματοποιήθηκε υγρή ζύμωση του μύκητα με αρχική συγκέντρωση γλυκόζης 50 g/L και θειϊκό αμμώνιο 0.04 g/L και τα αποτελέσματα της ζύμωσης παρουσιάζονται στο *Διάγραμμα 3.1-9* που ακολουθεί. Όπως παρατηρήθηκε σε όλες τις προηγούμενες ζυμώσεις με χρήση διάσπαρτου μυκηλίου (διάρκειας επώασης 24 ωρών), έτσι και σε αυτήν την περίπτωση η γλυκόζη καταναλώθηκε σε μεγάλο βαθμό (96.3%). Η παραγόμενη συγκέντρωση φουμαρικού οξέος ανήλθε στα 30.1 g/L στις 144 ώρες. Η βιομάζα ανήλθε στα 6.9 g/L, ενώ όσον αφορά στην παραγωγή αιθανόλης

αυτή μειώθηκε (3.7 g/L) σε σχέση με την αντίστοιχη ζύμωση με αρχική συγκέντρωση θειϊκού αμμωνίου 0.2 g/L.

Σε σύγκριση με τα αντίστοιχα πειράματα με αρχική συγκέντρωση 25 g/L γλυκόζης, η παραγωγικότητα του φουμαρικού οξέος μειώθηκε από 0.26 (0.2 g/L θειϊκό αμμώνιο) στα 0.21 g φουμαρικού οξέος /L/h, ενώ η απόδοση αυξήθηκε από 0.53 (0.2 g/L θειϊκό αμμώνιο) στα 0.66 g φουμαρικού οξέος ανά g συνολικών σακχάρων. Αξίζει να σημειωθεί ότι, η παραγόμενη συγκέντρωση φουμαρικού οξέος (30.1 g/L) που επιτεύχθηκε στο πείραμα αυτό αποτελεί τη μέγιστη παραγόμενη συγκέντρωση που επιτεύχθηκε με εμπορική πηγή αζώτου στην παρούσα μελέτη.



Διάγραμμα 3.1-9 Κινητική αύξησης του μύκητα *Rhizopus arrhizus* NRRL 2582, κατανάλωση γλυκόζης (Δ) και της παραγωγής φουμαρικού οξέος (□), Αιθανόλης (▲), Ηλεκτρικού οξέος (◆) καθώς και της παραγόμενης βιομάζας (○) σε θρεπτικό μέσο αρχικής συγκέντρωσης 50 g/L γλυκόζης και 0.04 g/L θειϊκού αμμωνίου και με τη χρήση διάσπαρτου μυκηλίου ως εμβόλιο. Τροποποιημένη σύσταση προκαλλιέργειας κατά Rhodes et al. (1959).

3.1.2.2 Ανάλυση εικόνας - Μορφολογία του μύκητα

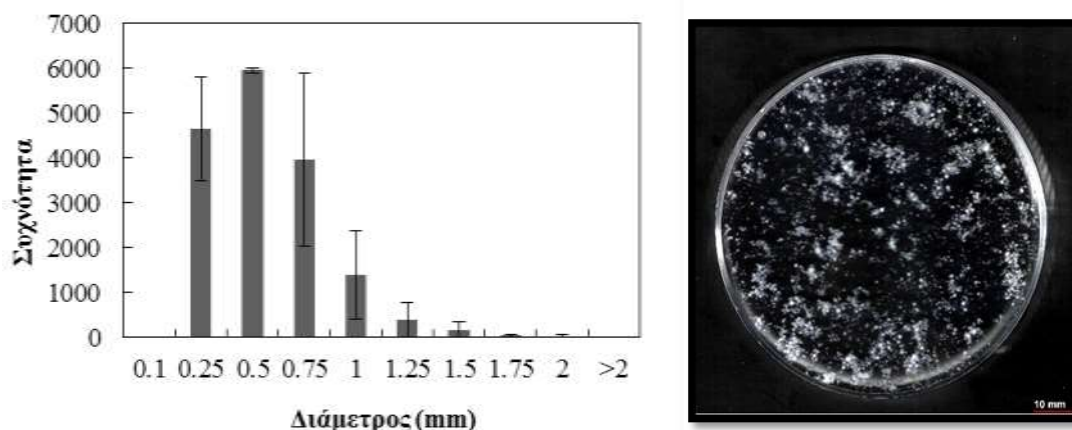
Σε αυτό το κεφάλαιο εξετάστηκαν οι εικόνες της βιομάζας που προέκυψαν από την προκαλλιέργεια του διάσπαρτου μυκηλίου (σύσταση κατά Rhodes et al., 1959 και τροποποιημένη Rhodes et al., 1959) μέσω της ανάλυσης εικόνας, όπως αυτή εφαρμόστηκε και στην προκαλλιέργεια σφαιριδίων του κεφ. 3.1.1.2. Αρχικά σημειώνεται ότι η προκαλλιέργεια με σύσταση σύμφωνα με τους Rhodes et al.

(1959), υπό μορφή διάσπαρτου μυκηλίου, κατέστη αδύνατη λόγω του σχηματισμού της μυκηλιακής μάζας, όπως γίνεται αντιληπτό στην *Εικόνα 3.1-5*, που ακολουθεί.



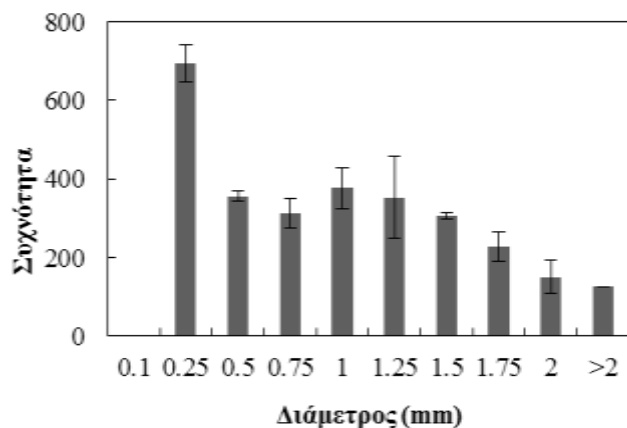
Εικόνα 3.1-5 Μορφολογία του μύκητα *Rhizopus arrhizus* NRRL 2582, κατά την υγρή ζύμωσή του σε γλυκόζη και 0.2 g/L θειϊκού αμμωνίου. Σύσταση προκαλλιέργειας κατά Rhodes et al. (1959).

Στη συνέχεια, αναλύθηκε η εικόνα της βιομάζας που προέκυψε από το εμβόλιο για την παραγωγή διάσπαρτου μυκηλίου της τροποποιημένης προκαλλιέργειας των Rhodes et al. (1959) με αρχική συγκέντρωση 25 g/L γλυκόζης και 0.2 g/L θειϊκού αμμωνίου στο μέσο της κύριας ζύμωσης. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι, ο αριθμός των κυττάρων στο υγρό της ζύμωσης ήταν 16593 κύτταρα, κατανεμημένα κατά κύριο λόγο σε ένα εύρος τιμών διαμέτρου από 0.25 έως 1.25 mm με την μέση διάμετρο των κυττάρων να είναι 0.52 mm και ο λόγος της σφαιρικότητας 1.44. Στην *Εικόνα 3.1-6* παρουσιάζεται η κατανομή των τιμών της μέσης διαμέτρου των κυττάρων της βιομάζας ανά 0.25 mm.



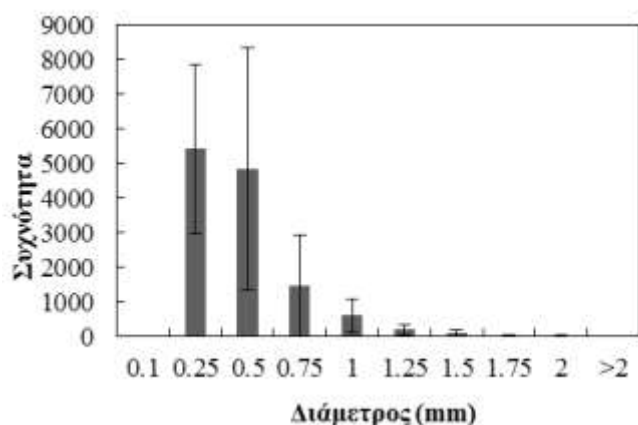
Εικόνα 3.1-6 Κατανομή του διάσπαρτου μυκηλίου της βιομάζας του μύκητα *Rhizopus Arrhizus* NRRL 2582 στις 48 ώρες ζύμωσης σε 25 g/L αρχική συγκέντρωση σακχάρων και 0.2 g/L θειϊκού αμμωνίου, με χρήση διάσπαρτου μυκηλίου από προκαλλιέργεια επωασμένη για 24 ώρες. Στα δεξιά παρουσιάζεται η ψηφιακή εικόνα της καλλιέργειας.

Στη συνέχεια, επεξεργάστηκε η εικόνα της βιομάζας που προήλθε από εμβόλιο για την παραγωγή διάσπαρτου μυκηλίου της τροποποιημένης προκαλλιέργειας των Rhodes et al. (1959) με αρχική συγκέντρωση γλυκόζης 25 g/L και 0.04 g/L θειϊκού αμμωνίου. Παρατηρήθηκε ότι, με την προσθήκη μικρότερης συγκέντρωσης θειϊκού αμμωνίου ο αριθμός των κυττάρων στο υγρό της ζύμωσης μειώθηκε αισθητά 2903 κύτταρα (από 16593 κύτταρα), κατανεμημένα σε ένα μεγαλύτερο εύρος τιμών διαμέτρου από 0.25 έως 2 mm. Επίσης, η μέση διάμετρος αυξήθηκε στα 0.86 mm (από 0.52 mm) σε σχέση με την αρχική συγκέντρωση 0.2 g/L θειϊκού αμμωνίου της κύριας καλλιέργειας, ενώ ο λόγος της σφαιρικότητας ήταν 1.37. Στην *Εικόνα 3.1-7* παρουσιάζεται η κατανομή των τιμών της μέσης διαμέτρου των κυττάρων της βιομάζας ανά 0.25 mm, όπου παρατηρείτε ομοιόμορφη κατανομή των κυττάρων της βιομάζας.



Εικόνα 3.1-7 Κατανομή του διάσπαρτου μυκηλίου της βιομάζας του μύκητα *Rhizopus Arrhizus* NRRL 2582 στις 48 ώρες ζύμωσης σε 25 g/L αρχική συγκέντρωση σακχάρων και 0.04 g/L θειϊκού αμμωνίου, με χρήση διάσπαρτου μυκηλίου από προκαλλιέργεια επωασμένη για 24 ώρες. Στα δεξιά παρουσιάζεται η ψηφιακή εικόνα της καλλιέργειας.

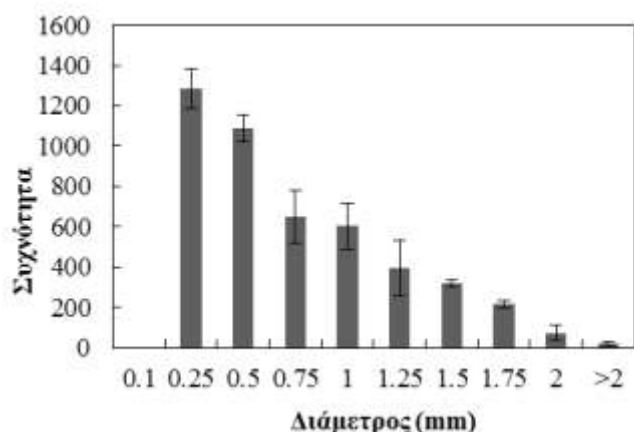
Κατά την αύξηση της αρχικής συγκέντρωσης των σακχάρων από τα 25 στα 50 g/L γλυκόζης στο μέσο της κύριας ζύμωσης, παρατηρήθηκε ότι όταν το θειϊκό αμμώνιο ήταν 0.2 g/L ο αριθμός των κυττάρων στο υγρό της ζύμωσης μειώθηκε στα 12763 κύτταρα (από 16593 κύτταρα στα 25 g/L γλυκόζης), κατανεμημένα σε ένα αρκετά μικρότερο εύρος τιμών διαμέτρου από 0.25 έως 1 mm όπου η μέση διάμετρος των σφαιριδίων μειώθηκε στα 0.34 mm (από 0.52 mm) και ο λόγος της σφαιρικότητας επίσης μειώθηκε 1.34 (από 1.44) (Εικόνα 3.1-8).



Εικόνα 3.1-8 Κατανομή του διάσπαρτου μυκηλίου της βιομάζας του μύκητα *Rhizopus Arrhizus* NRRL 2582 στις 48 ώρες ζύμωσης σε 50 g/L αρχική συγκέντρωση σακχάρων και 0.2 g/L θειϊκού αμμωνίου, με χρήση διάσπαρτου μυκηλίου από προκαλλιέργεια επωασμένη για 24 ώρες. Στα δεξιά παρουσιάζεται η ψηφιακή εικόνα της καλλιέργειας.

Τέλος, επεξεργάστηκε η εικόνα της βιομάζας που προήλθε από εμβόλιο για την παραγωγή διάσπαρτου μυκηλίου της τροποποιημένης προκαλλιέργειας των Rhodes et al. (1959) με αρχική συγκέντρωση γλυκόζης 50 g/L και 0.04 g/L θειϊκού αμμωνίου. Αναλυτικά, ο αριθμός των κυττάρων στο υγρό της ζύμωσης μειώθηκε στα 4650 κύτταρα (από 12763 κύτταρα), ενώ αυξήθηκε η μέση διάμετρος 0.43 mm (από 0.34 mm) σε σχέση με την ζύμωση αρχικής συγκέντρωσης 0.2 g/L θειϊκού αμμωνίου, ενώ ο λόγος της σφαιρικότητας ανήλθε στο 1.27. Στην *Εικόνα 3.1-9* παρουσιάζεται η κατανομή των τιμών της μέσης διαμέτρου της βιομάζας ανά 0.25 mm.

Αξίζει να σημειωθεί ότι παρατηρούνται παρόμοια αποτελέσματα (αριθμό κυττάρων, μέση διάμετρος και σφαιρικότητας), ανεξάρτητα από την αρχική συγκέντρωση γλυκόζης στο μέσο της κύριας ζύμωσης (από 25 στα 50 g/L), όταν χρησιμοποιείται το εμβόλιο που παράγεται με χρήση της τροποποιημένης προκαλλιέργειας των Rhodes et al. (1959).



Εικόνα 3.1-9 Κατανομή του διάσπαρτου μυκηλίου της βιομάζας του μύκητα *Rhizopus Arrhizus* NRRL 2582 στις 48 ώρες ζύμωσης σε 50 g/L αρχική συγκέντρωση σακχάρων και 0.04 g/L θειϊκού αμμωνίου, με χρήση διάσπαρτου μυκηλίου από προκαλλιέργεια επωασμένη για 24 ώρες. Στα δεξιά παρουσιάζεται η ψηφιακή εικόνα της καλλιέργειας.

3.1.2.3 Συγκριτική αξιολόγηση της παραγωγής φουμαρικού οξέος με χρήση βιομάζας υπό μορφή διάσπαρτου μυκηλίου

Όπως έγινε στο κεφ. 3.1.1.3, σε αυτό το κεφάλαιο μελετήθηκε η δυνατότητα παραγωγής φουμαρικού οξέος από τον μύκητα *Rhizopus arrhizus* NRRL 2582, με χρήση εμβολίου που προήλθε από την τροποποιημένη και μη προκαλλιέργεια των

Rhodes et al. (1959) για την παραγωγή διάσπαρτου μυκηλίου, ενώ παράλληλα μελετήθηκε και η μορφολογία που σχημάτισε η βιομάζα του.

Πίνακας 3.1-3 Αποτελέσματα της ζύμωσης του μύκητα *Rhizopus arrhizus* NRRL 2582 σε υπόστρωμα εμπορικής γλυκόζης αρχικής συγκέντρωσης 25 g/L, με χρήση προκαλλιέργειας για παραγωγή διάσπαρτου μυκηλίου, Rhodes et al. (1959) και τροποποιημένη, και αρχική συγκέντρωση 0.2 g/L θειϊκού αμμωνίου.

Σύσταση προκαλλιέργειας	Χρόνος (h)	Γλυκόζη (g/L)	Φουμαρικό οξύ (g/L)	Βιομάζα (g/L)	Ηλεκτρικό οξύ (g/L)	Αιθανόλη (g/L)
κατά Rhodes et al. (1959)	0	24.9±0.1	0	0	0	0
	72	0.8±0.1	10.8±0.6	4±1.2	1.6±0.1	6.3±0.2
Τροποποιημένη κατά Rhodes et al. (1959)	0	25±0.1	0	0	0	0
	72	0	19.4±1.1	2.5±0.1	2.2±0.1	1.6±0.3

Από τα αποτελέσματα του Πίνακα 3.1-3 φαίνεται ότι ο μύκητας *R. arrhizus* NRRL 2582 κατανάλωσε ικανοποιητικά την πηγή άνθρακα ανεξάρτητα από τη σύσταση της προκαλλιέργειας (Rhodes και τροποποιημένη Rhodes et al., 1959). Ενδεικτικά, καταναλώθηκε το 96.8 και 100% αντίστοιχα. Στις συγκεντρώσεις της παραγόμενης βιομάζας παρατηρήθηκε ότι στην προκαλλιέργεια με την σύσταση των Rhodes et al. (1959) ήταν σχεδόν διπλάσια (4 g/L) από αυτή της τροποποιημένης (2.5 g/L). Το παραγόμενο φουμαρικό οξύ από τα 10.8 g/L (Rhodes et al., 1959) σχεδόν διπλασιάστηκε στην τροποποιημένη (19.4 g/L). Όσον αφορά στα παραγόμενα παραπροϊόντα, η παραγόμενη αιθανόλη στην προκαλλιέργεια με την σύσταση των Rhodes et al. (1959) ήταν αρκετά υψηλή, 6.3 g/L (58.3% σε σχέση με το κύριο προϊόν), ενώ στην τροποποιημένη προκαλλιέργεια η συγκέντρωση διατηρήθηκε σε χαμηλά επίπεδα (1.6 g/L). Εν αντιθέσει, όσον αφορά στο παραγόμενο ηλεκτρικό οξύ δεν παρατηρήθηκε κάποια αξιολογή μεταβολή, ήτοι 1.6 g/L (Rhodes et al., 1959) και 2.2 g/L (τροποποιημένη).

Η απόδοση και η παραγωγικότητα αυξήθηκαν με την αλλαγή της σύστασης του εμβολίου, συγκεκριμένα στην προκαλλιέργεια με την σύσταση των Rhodes et al. (1959) η απόδοση ήταν 0.43 g/g και η παραγωγικότητα 0.15 g φουμαρικού οξέος /L/h, ενώ στην τροποποιημένη ήταν 0.78 g/g και 0.26 g/L/h, αντίστοιχα.

Πίνακας 3.1-4 Αποτελέσματα της ζύμωσης του μύκητα *Rhizopus arrhizus* NRRL 2582 σε υπόστρωμα εμπορικής γλυκόζης αρχικής συγκέντρωσης 25 και 50 g/L, με χρήση προκαλλιέργειας για παραγωγή διάσπαρτου μυκηλίου, τροποποιημένη Rhodes et al. (1959) και αρχική συγκέντρωση 0.04 και 0.2 g/L θειϊκού αμμωνίου.

Θειϊκό αμμώνιο (g/L)	Χρόνος (h)	Γλυκόζη (g/L)	Φουμαρικό οξύ (g/L)	Βιομάζα (g/L)	Ηλεκτρικό οξύ (g/L)	Αιθανόλη (g/L)
0.2	0	25±0.1	0	0	0	0
	72	0	19.4±1.1	2.5±0.1	2.2±0.1	1.6±0.3
0.04	0	23.4±0.1	0	0	0	0
	112	0.8±1.1	19.7±0.5	1.7±0.1	1.5±0.1	0.7±0.1
0.2	0	48.3±0.1	0	0	0	0
	96	1.4±0.1	25.4±0.2	4.9±0.1	1.6±0.1	9.6±0.4
0.04	0	45.9±0.1	0	0	0	0
	144	1.7±1.9	30.1±0.6	6.9±1.2	1.9±0.1	3.7±0.1

Αναφορικά με τα αποτελέσματα του Πίνακα 3.1-4 παρατηρείται ότι καταναλώθηκε πλήρως (96-100%) η πηγή άνθρακα ανεξάρτητα από την αρχική συγκέντρωση της γλυκόζης και του θειϊκού αμμωνίου στο υγρό της ζύμωσης. Διαπιστώνεται, επίσης, ότι οι συγκεντρώσεις της βιομάζας αυξήθηκαν με την αύξηση του θειϊκού αμμωνίου στα 25 g/L γλυκόζης, ενώ αντίθετη τάση παρατηρήθηκε στα 50 g/L γλυκόζης. Το μεν παραγόμενο ηλεκτρικό οξύ, όπως παρατηρήθηκε σε όλα τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν, ήταν αρκετά σταθερό ανεξάρτητα από την αρχική συγκέντρωση γλυκόζης και θειϊκού αμμωνίου. Η δε αιθανόλη αυξήθηκε όταν αυξήθηκε η συγκέντρωση του θειϊκού αμμωνίου ανεξάρτητα από την αρχική συγκέντρωση σακχάρων.

Πίνακας 3.1-5 Αποτελέσματα της ανάλυσης της μορφολογίας του μύκητα *Rhizopus arrhizus* NRRL 2582 σε υπόστρωμα εμπορικής γλυκόζης αρχικής συγκέντρωσης 25 και 50 g/L, με χρήση προκαλλιέργειας για παραγωγή διάσπαρτου μυκηλίου, τροποποιημένη Rhodes et al. (1959) και αρχική συγκέντρωση 0.04 και 0.2 g/L θειϊκού αμμωνίου .

Γλυκόζη (g/L)	Θειϊκό αμμώνιο (g/L)	Φουμαρικό οξύ (g/L)	Απόδοση (g/g)	Παραγωγικότητα (g/L/h)	Αριθμός κυττάρων	Μέση διάμετρος (mm)	Σφαιρικότητα
25	0.2	19.4±1.1	0.78	0.27	16593±2432	0.52±0.13	1.44±0.06
	0.04	19.7±0.5	0.84	0.17	2903±52	0.86±0.01	1.37±0.04
50	0.2	25.4±0.2	0.53	0.26	12763±8160	0.34±0.04	1.34±0.06
	0.04	30.1±0.6	0.66	0.21	4650±193	0.43±0.11	1.27±0.03

Στον Πίνακα 3.1-5 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της ανάλυσης της μορφολογίας του μύκητα, σε σχέση με τις αποδόσεις και την παραγωγικότητα του φουμαρικού οξέος στις διαφορετικές συνθήκες που μελετήθηκαν. Όπως γίνεται αντιληπτό, οι αποδόσεις επηρεάστηκαν σε μεγάλο βαθμό από την αρχική συγκέντρωση γλυκόζης και όχι τόσο από την συγκέντρωση του θειϊκού αμμωνίου. Αντίθετα, οι τιμές της παραγωγικότητας επηρεάστηκαν από την αρχική συγκέντρωση του θειϊκού αμμωνίου και ήταν ανεξάρτητες από τη συγκέντρωση της γλυκόζης.

Όσον αφορά στη μορφολογία παρατηρήθηκε ότι ανεξάρτητα από την συγκέντρωση των σακχάρων στη κύρια ζύμωση, όταν αυξήθηκε η συγκέντρωση του θειϊκού αμμωνίου αυξήθηκε ο αριθμός των κυττάρων και η τιμή της σφαιρικότητας, ενώ η μέση διάμετρος μειώθηκε.

Συνοψίζοντας τα ως άνω, οι καλύτερες συνθήκες για βιοτεχνολογική παραγωγή φουμαρικού οξέος της παρούσας μελέτης παρατηρήθηκαν όταν το εμβόλιο προερχόταν από προκαλλιέργειες στις οποίες χρησιμοποιήθηκε το εμβόλιο με την τροποποιημένη σύσταση των Rhodes et al. (1959) σε συνδυασμό με αρχική συγκέντρωση θειϊκού αμμωνίου 0.2 g/L κατά την κύρια ζύμωση. Τέλος, όσον αφορά στα μορφολογικά χαρακτηριστικά της βιομάζας, θα πρέπει ο αριθμός των κυττάρων της προκαλλιέργειας να είναι μεγαλύτερος από 10^4 κύτταρα ανά κωνική φιάλη και η μέση διάμετρος αυτών να είναι περίπου 0.5 mm.

3.2 Παραγωγή υδρολύματος σογιαλεύρου με την χρήση πρωτεολυτικών ενζύμων του μύκητα *Aspergillus oryzae*

Κατά τα τελευταία χρόνια, η έρευνα των μικροβιακών ζυμώσεων εστιάζεται στην αξιοποίηση διαφόρων βιομηχανικών παραπροϊόντων ως υπόστρωμα ανάπτυξης των μικροοργανισμών καθώς και παραγωγής χρήσιμων προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας. Όπως έχει αποδειχθεί από την μέχρι τώρα μελέτη, η πηγή αζώτου που χρησιμοποιείται στις μικροβιακές καλλιέργειες αποτελεί έναν από τους πιο σημαντικούς παράγοντες που επηρεάζουν την απόδοση του μικροοργανισμού. Ως εκ τούτου, στην παρούσα μελέτη θεωρήθηκε απαραίτητο να μελετηθεί η δυνατότητα αξιοποίησης του σογιαλεύρου το οποίο αποτελεί ένα σημαντικό παραπροϊόν της βιομηχανίας παραγωγής βιοντήζελ. Η μελέτη αξιοποίησης του σογιαλεύρου έχει διπλό στόχο: α) στην παραγωγή πρωτεολυτικών ενζύμων και β) στην ενζυμική παραγωγή υδρολύματος σογιαλεύρου.

Σε αυτό το πειραματικό στάδιο, πραγματοποιήθηκε υδρόλυση του σογιαλεύρου με τη χρήση των πρωτεολυτικών ενζύμων που παρήχθησαν από το μύκητα *Aspergillus oryzae* κατά την καλλιέργεια του σε υπόστρωμα στερεής κατάστασης. Ο κύριος στόχος ήταν η παραλαβή υγρού μέσου πλούσιο σε άζωτο, ανόργανο φώσφορο και άλλα ιχνοστοιχεία, ώστε να μπορεί να αξιοποιηθεί στις μικροβιακές ζυμώσεις για την παραγωγή φουμαρικού οξέος.

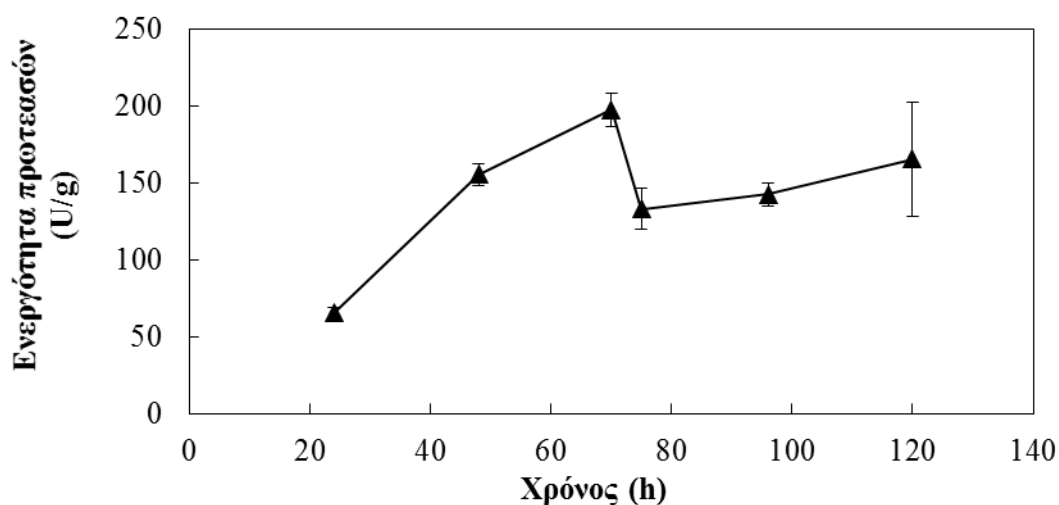
3.2.1 Παραγωγή των πρωτεολυτικών ενζύμων

Για την επίτευξη του πειράματος πραγματοποιήθηκε καλλιέργεια στερεής κατάστασης (Solid State Fermentation, SSF) του μύκητα *Aspergillus oryzae* σε υπόστρωμα σογιαλεύρου (περιγράφεται στο κεφ. 2.5.1). Στόχος ήταν η παραγωγή πρωτεολυτικών ενζύμων του μύκητα, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν στα επόμενα πειράματα για την υδρόλυση του σογιαλεύρου.

Αρχικά, μελετήθηκε η επίδραση του χρόνου επώασης του εν λόγω μύκητα (24-120 ώρες) στην παραγωγή των πρωτεολυτικών ενζύμων. Στο Διάγραμμα 3.2-1, παρατηρείται ότι η δραστηριότητα των πρωτεολυτικών ενζύμων, εκφρασμένα σε U ανά g ξηρού υποστρώματος, η οποία αυξάνεται μέχρι και τις 70 ώρες στερεής

καλλιέργειας, ενώ μετέπειτα ακολουθεί απότομη πτώση στις 75 ώρες. Η μέγιστη παραγωγή πρωτεολυτικών ενζύμων που επιτεύχθηκε ήταν 197.63 U/g στις 70 ώρες ζύμωσης.

Σύμφωνα με τους Kachrimanidou et al. (2013), η μέγιστη δραστηριότητα των πρωτεασών (400 U/g) στη ζύμωση στερεής κατάστασης, με την ηλιόπιτα ως πρώτη ύλη, επιτυγχάνεται με αρχικό ποσοστό υγρασίας του υποστρώματος 65%, μη ελεγχόμενη τιμή pH και θερμοκρασία 30 °C, συνθήκες οι οποίες εφαρμόστηκαν στην πειραματική διαδικασία της παρούσας μελέτης.



Διάγραμμα 3.2-1 Επίδραση του χρόνου καλλιέργειας (24-120 ωρών) στην παραγωγή πρωτεολυτικών ενζύμων (U/g) του μύκητα *Aspergillus oryzae*, κατά την στερεή καλλιέργειά του σε σογιάλευρο.



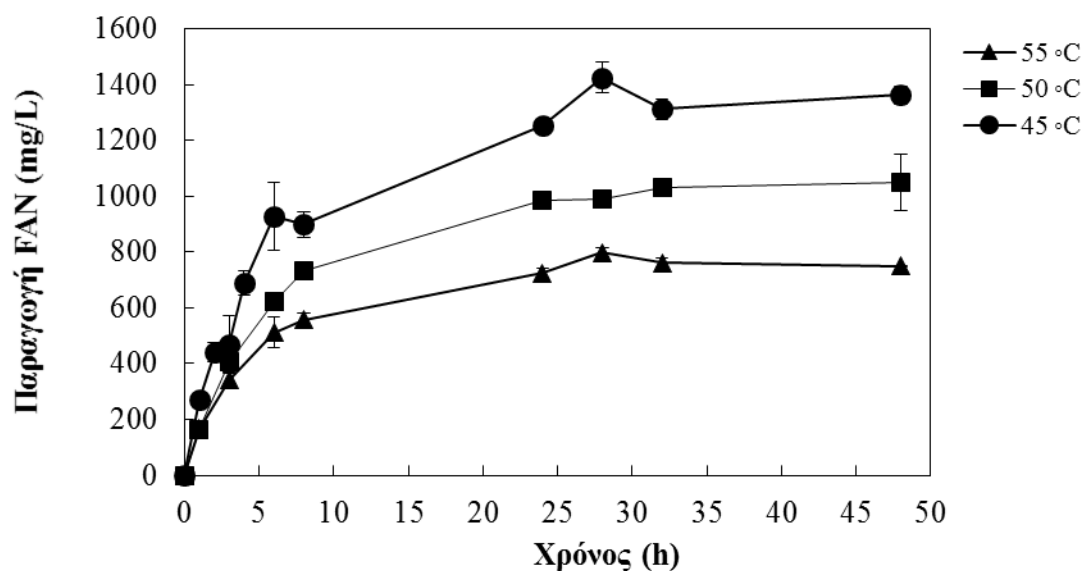
Εικόνα 3.2-1 Παραγωγή πρωτεολυτικών ενζύμων του μύκητα *Aspergillus oryzae* σε καλλιέργεια στερεής κατάστασης στις 70 ώρες ζύμωσης.

Λαμβάνοντας υπόψη τα αποτελέσματα του προσδιορισμού της δραστηρότητας των πρωτεολυτικών ενζύμων επιλέχθηκε, στα επόμενα πειράματα, το στερεό αποικισμένο υπόστρωμα να έχει διάρκεια επώασης 70 ώρες (Εικόνα 3.2-1).

3.2.2 Βελτιστοποίηση της υδρόλυσης του σογιαλεύρου

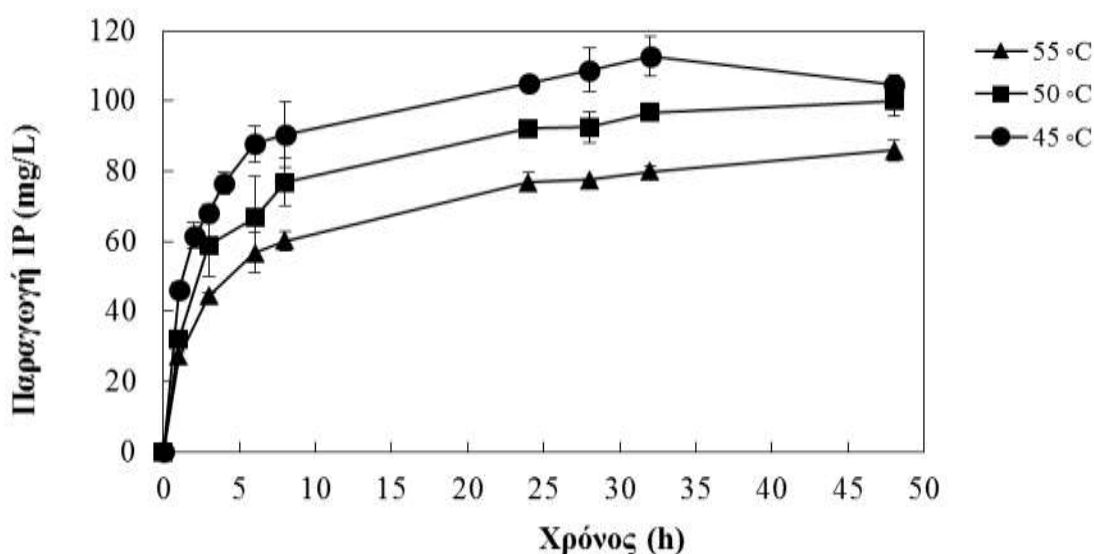
Στη συνέχεια των πειραμάτων, μελετήθηκε η επίδραση της θερμοκρασίας υδρολύσεως στην παραγωγή αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων (FAN) και ανόργανου φωσφόρου (IP), σε υπόστρωμα σογιαλεύρου.

Δοκιμάστηκαν, σε φιάλες Duran του 1 L, τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες υδρολύσεως, 45, 50 και 55 °C (οι συνθήκες περιγράφονται στο κεφ. 2.5.2). Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα που έδειξαν οι τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες, όσον αφορά στην παραγωγή αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων και του ανόργανου φωσφόρου, κρίνεται ότι η βέλτιστη θερμοκρασία για την υδρόλυση του σογιαλεύρου, ήταν οι 45 °C. Αυτό είναι εμφανές στα Διαγράμματα 3.2-2 και 3.2-3 που ακολουθούν.



Διάγραμμα 3.2-2 Κινητική παραγωγής του αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων (FAN, mg/L) κατά την υδρόλυση 45 g/L σογιαλεύρου από τον μύκητα *Aspergillus oryzae* σε θερμοκρασία 45, 50 και 55 °C για 48 ώρες.

Εφόσον το κύριο συστατικό του σογιαλεύρου είναι η πρωτεΐνη, το κριτήριο για την αξιολόγηση της υδρόλυσης ήταν η παραγωγή FAN. Η μέγιστη παραγωγή FAN που επιτεύχθηκε κατά την υδρόλυση του σογιαλεύρου ήταν 1426 mg/L στις 28 ώρες υδρόλυσης στους 45 °C, τιμή πολύ υψηλότερη από αυτή που επιτεύχθη σε αντίστοιχη υδρόλυση με υπόστρωμα την ηλιόπιτα φτάνοντας τα 600 mg/L FAN (Kachrimanidou et al., 2013). Το γεγονός αυτό οφείλεται στην υψηλότερη περιεκτικότητα πρωτεΐνης που έχει το σογιάλευρο.



Διάγραμμα 3.2-3 Κινητική παραγωγής ανόργανου φωσφόρου (IP, mg/L) κατά την υδρόλυση 45 g/L σογιαλεύρου από τον μύκητα *Aspergillus oryzae* σε θερμοκρασία 45, 50 και 55 °C για 48 ώρες.

Πίνακας 3.2-1 Παραγωγή του αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων (FAN, mg/L) και παραγωγή ανόργανου φωσφόρου (IP, mg/L) κατά την υδρόλυση 45 g/L σογιαλεύρου από τον μύκητα *Aspergillus oryzae* σε θερμοκρασία 45, 50 και 55 °C για 48 ώρες.

Ωρες (h)	θερμοκρασία (°C)	παραγωγή FAN (mg/L)	παραγωγή IP (mg/L)
24	45	1256	105
	50	984	92
	55	724	77
48	45	1363	105
	50	1050	100
	55	750	86

Τα αποτελέσματα της υδρόλυσης αναφέρονται αναλυτικά στον Πίνακα 3.2-1. Όπως γίνεται αντιληπτό, ήδη από τις 24 ώρες (1256 mg/L), το παραγόμενο FAN ακολουθούσε μια σταθερά ανοδική πορεία έως τις 48 ώρες (1363 mg/L). Κάτι αντίστοιχο συνέβη και στις περιπτώσεις των θερμοκρασιών 50 και 55 °C, ενδεικτικά

στις 24 ώρες το παραγόμενο FAN ήταν 984 και 724 mg/L αντίστοιχα, και στις 48 ώρες ήταν 1050 και 750 mg/L αντίστοιχα.

Όσον αφορά την παραγωγή ανόργανου φωσφόρου (IP) στο υδρόλυμα, η μέγιστη συγκέντρωση που επιτεύχθηκε κατά την υδρόλυση του σογιαλεύρου ήταν 113 mg/L στις 32 ώρες υδρόλυσης στους 45 °C. Όπως αναφέρεται στον Πίνακα 3.2-1, το παραγόμενο ανόργανο φώσφορο του υδρολύματος στις 24 και 48 ώρες ήταν ίδιος, 105 mg/L. Ενώ στις περιπτώσεις των θερμοκρασιών 50 και 55 °C ήταν, στις 24 ώρες 92 και 77 mg/L αντίστοιχα, και στις 48 ώρες 100 και 86 mg/L αντίστοιχα.

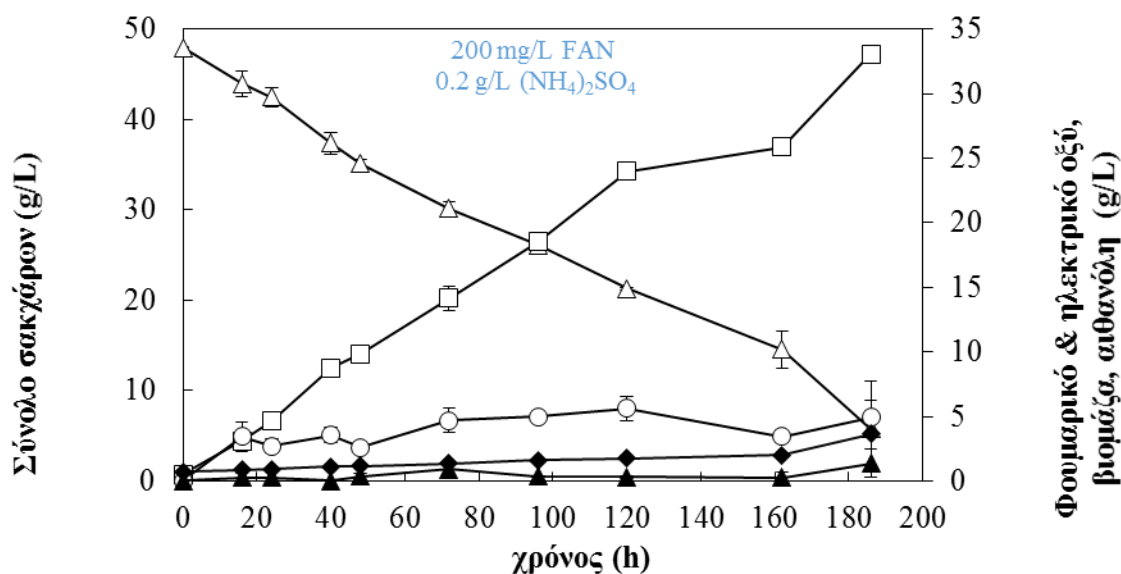
Συνοψίζοντας τα ως άνω, συμπεραίνουμε ότι ο καλύτερος χρόνος επώασης για την παραγωγή πρωτεολυτικών ενζύμων, του εν λόγω μύκητα, ήταν οι 70 ώρες και η βέλτιστη θερμοκρασία υδρόλυσης ήταν οι 45 °C.

3.3 Αξιοποίηση υδρολύματος σογιαλεύρου από τον μύκητα *Rhizopus arrhizus* NRRL 2582 για την παραγωγή φουμαρικού οξέος

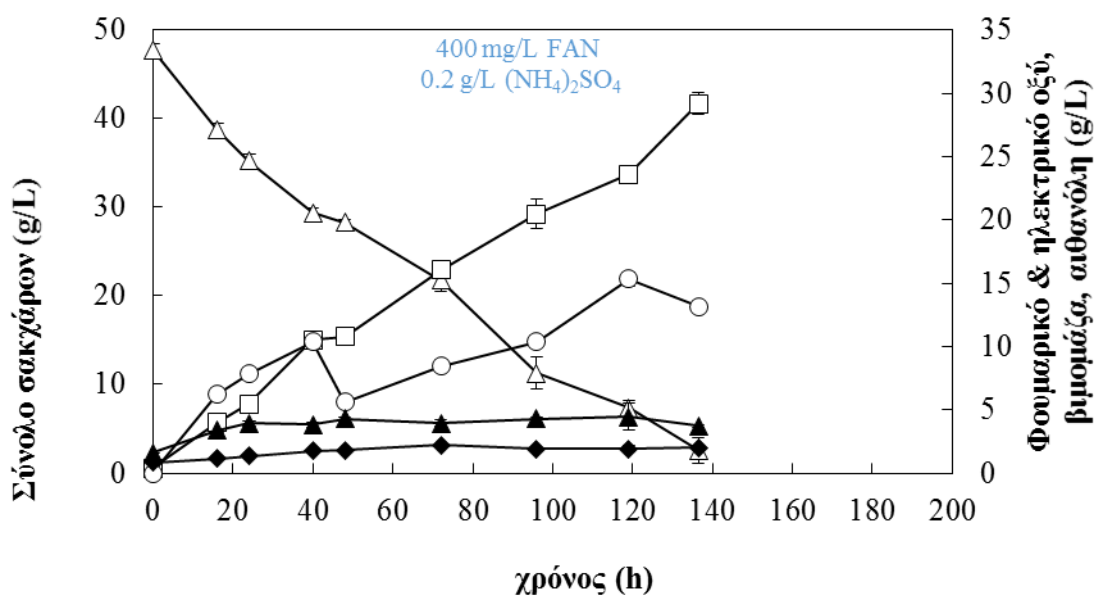
Τα δεδομένα που προέκυψαν από τα πειράματα της παρούσας μελέτης έδειξαν ότι, η καλύτερη μορφολογία ήταν αυτή που επιτεύχθηκε με την χρήση διάσπαρτων μυκηλιακών υφών ως εμβόλιο και 0.2 g/L θειϊκό αμμώνιο στη κύρια ζύμωση. Λαμβάνοντας υπόψη αυτά τα αποτελέσματα διερευνήθηκε η δυνατότητα να αντικατασταθούν οι εμπορικές πηγές αζώτου (ουρία και πεπτόνη) της προκαλλιέργειας με το υδρόλυμα σογιαλεύρου. Σκοπός του παρόντος πειράματος ήταν η αξιοποίηση του παραπροϊόντος για την παραγωγή φουμαρικού οξέος.

Μελετήθηκε η αντικατάσταση των εμπορικών πηγών αζώτου με το υδρόλυμα σογιαλεύρου σε δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις, 200 και 400 mg/L FAN, στην σύσταση της προκαλλιέργειας. Η αρχική συγκέντρωση των σακχάρων ήταν 50 g/L γλυκόζη. Στα Διαγράμματα 3.3-1 και 3.3-2 που ακολουθούν παρουσιάζονται οι κινητικές αύξησης του μύκητα και η παραγωγή φουμαρικού οξέος κατά την υγρή ζύμωσή του σε κωνικές φιάλες, σε δύο διαφορετικές αρχικές συγκεντρώσεις FAN. Αρχικά, παρατηρείται ότι ο μύκητας κατανάλωσε σχεδόν όλη την πηγή άνθρακα ανεξαρτήτως της αρχικής συγκέντρωσης FAN, ήτοι 87.9% και 94.6% στα 200 και 400 mg/L FAN, αντίστοιχα. Η βιομάζα στα 400 mg/L FAN ήταν σχεδόν διπλάσια από αυτή των 200 mg/L FAN, ενδεικτικά στις 48 ώρες ζύμωσης η βιομάζα ήταν 2.6 και 5.6 g/L στα 200 και 400 mg/L FAN, αντίστοιχα. Όσον αφορά στην παραγωγή φουμαρικού οξέος οι μεγαλύτερες συγκεντρώσεις που καταγράφηκαν ήταν 33 και 29.2 g/L (200 και 400 mg/L FAN αντίστοιχα).

Όσον αφορά στα παραπροϊόντα των ζυμώνσεων, η αιθανόλη στην περίπτωση των 200 mg/L FAN κατά τη διάρκεια της ζύμωσης ήταν σταθερά χαμηλή και στο τέλος αυξήθηκε ελαφρά φτάνοντας στις 186 ώρες τα 1.4 g/L, εν αντιθέσει με τη περίπτωση που χρησιμοποιήθηκαν 400 mg/L FAN που από τις πρώτες 16 ώρες ήταν 3.4 g/L καταλήγοντας στα 3.7 g/L στις 137 ώρες. Τέλος, στο υγρό της καλλιέργειας παράχθηκε και ηλεκτρικό οξύ, η συγκέντρωση του οποίου αυξανόταν παράλληλα με την παραγωγή φουμαρικού οξέος, οι τελικές συγκεντρώσεις ήταν 3.6 g/L στις 186 ώρες όταν χρησιμοποιήθηκαν 200 mg/L FAN και 2.0 g/L στις 137 ώρες όταν χρησιμοποιήθηκαν 400 mg/L FAN.



Διάγραμμα 3.3-1 Κινητική αύξησης του μύκητα *Rhizopus arrhizus* NRRL 2582, κατανάλωση γλυκόζης (Δ) και της παραγωγής φουμαρικού οξέος (\square), αιθανόλης (\blacktriangle), ηλεκτρικού οξέος (\blacklozenge) καθώς και της παραγόμενης βιομάζας (\circ) σε θρεπτικό μέσο αρχικής συγκέντρωσης 50 g/L γλυκόζης και προκαλλιέργεια με υδρόλυμα 200 mg/L FAN.

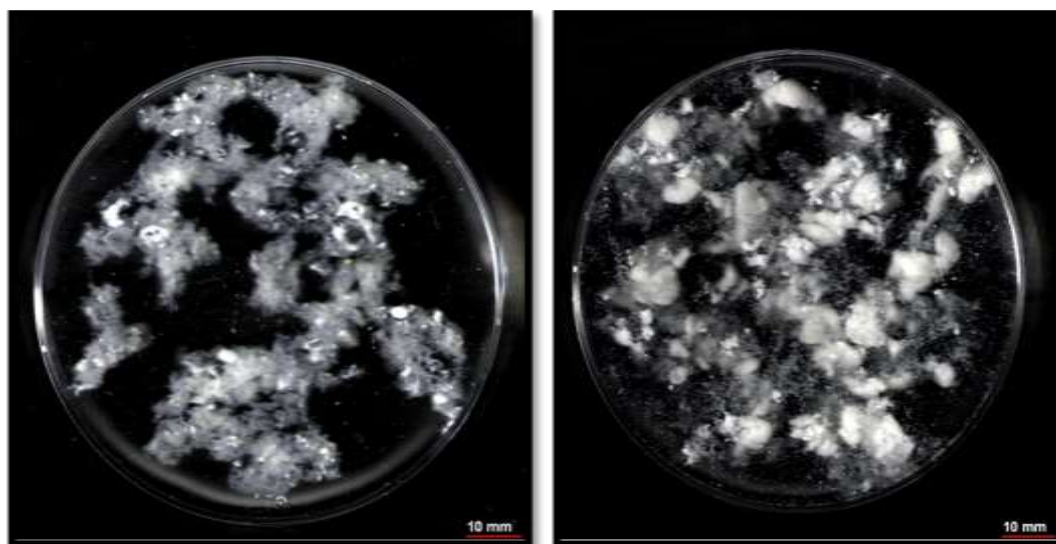


Διάγραμμα 3.3-2 Κινητική αύξησης του μύκητα *Rhizopus arrhizus* NRRL 2582, κατανάλωση γλυκόζης (Δ) και της παραγωγής φουμαρικού οξέος (\square), Αιθανόλης (\blacktriangle), Ηλεκτρικού οξέος (\blacklozenge) καθώς και της παραγόμενης βιομάζας (\circ) σε θρεπτικό μέσο αρχικής συγκέντρωσης 50 g/L γλυκόζης και προκαλλιέργεια με υδρόλυμα 400 mg/L FAN.

Παρατηρείται ότι και στις δύο περιπτώσεις, 200 και 400 mg/L FAN, το φουμαρικό οξύ αυξάνεται γραμμικά μέχρι το τέλος της ζύμωσης. Η στροφή του μεταβολισμού του μύκητα προς την παραγωγή φουμαρικού οξέος αποδίδεται στην απουσία αζώτου από το μέσο της καλλιέργειας από τις πρώτες ώρες της ζύμωσης.

Συνοψίζοντας, η μέγιστη συγκέντρωση φουμαρικού οξέος (33 g/L) διαπιστώθηκε στην περίπτωση που χρησιμοποιήθηκαν 200 mg/L FAN κατά την προκαλλιέργεια. Η ποσότητα αυτή φουμαρικού οξέος αποτελεί τη μέγιστη παραγόμενη της παρούσας μελέτης.

Είναι αξιοσημείωτο ότι όταν αυξήθηκε το FAN της προκαλλιέργειας από 200 σε 400 mg/L FAN παρατηρήθηκε μια αύξηση στην παραγωγικότητα του μύκητα (από 0.19 σε 0.22 g/L/h), χωρίς να επηρεάζεται αισθητά η απόδοση (από 0.69 σε 0.61 g/g) του φουμαρικού οξέος.



Εικόνα 3.3-1 Μορφολογία του μύκητα *Rhizopus arrhizus* NRRL 2582 μετά από χρήση υδρολύματος στην προκαλλιέργεια 200 mg/L FAN στα αριστερά και 400 mg/L FAN στα δεξιά.

Στην *Εικόνα 3.3-1* είναι προφανές ότι στις 48 ώρες της ζύμωσης, στην περίπτωση που χρησιμοποιήθηκαν 400 mg/L FAN η παραγόμενη συγκέντρωση της βιομάζας (5.6 g/L) είναι πυκνότερη από αυτή που παρήχθη με χρήση 200 mg/L FAN (2.6 g/L). Επίσης, όπως γίνεται αντιληπτό κατέστη αδύνατη η ανάλυση της εικόνας προκειμένου να μελετήσουμε την μορφολογία του μύκητα.

3.4 Παράθεση βιβλιογραφικών δεδομένων & σύγκριση των αποτελεσμάτων

Στον ακόλουθο Πίνακα 3.4-1 από βιβλιογραφική ανασκόπηση που έγινε, λαμβάνοντας υπόψη της ίδιες συνθήκες ζύμωσης (αναδευόμενες κωνικές φιάλες), παρουσιάζονται τα καλύτερα αποτελέσματα και γίνεται συγκριτική αξιολόγηση με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης.

Πίνακας 3.4-1 Παραγωγή φουμαρικού οξέος με τη χρήση εμπορικών πηγών αζώτου και υδρολυμάτων σε αναδευόμενες φιάλες με χρήση διαφόρων στελεχών του γένους *Rhizopus*.

Στέλεχος	Πηγή άνθρακα	Φουμαρικό οξύ (g/L)	Απόδοση (g/g)	Παραγωγικότητα (g/L/h)	Χρόνος ζύμωσης (h)	Αναφορά	
<i>R. nigricans</i> 45	γλυκόζη	18	0.46	0.15	120	Foster & Waksman (1938)	
		20	0.66	0.25	80	Romano et al. (1967)	
<i>R. oryzae</i> ATCC 20344	υδρόλυμα από σπάδικες καλαμποκιού	28	0.35	0.33	84	Xu et al. (2010)	
	γλυκόζη	50 ^a	0.72	0.34	147	Zhang et al. (2015)	
<i>R. arrhizus</i> NRRL 2582	γλυκόζη	μελάσα	90	0.68	0.53	170	Rhodes et al. (1959)
		19	0.78	0.27	72		
		20	0.84	0.17	112		
		29 ^{ab}	0.61	0.22	137	Παρούσα μελέτη	
		33 ^{ac}	0.69	0.19	186		
<i>R. arrhizus</i> RH-07-13	γλυκόζη	31	0.35	1.33	24	Gu et al. (2013)	
<i>R. arrhizus</i> NRRL 1526	γλυκόζη	98	0.81	1	96	Kenealy et al. (1986)	
	άμυλο	44	0.59	0.31	140	Moresi et al. (1991)	

a αντικατάσταση εμπορικών πηγών αζώτου με υδρολύματα.

b 400 mg/L FAN υδρόλυμα σογιάλευρου.

c 200 mg/L FAN υδρόλυμα σογιάλευρου.

Σημειώνεται ότι αρκετές μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί με τη χρήση του στελέχους *Rhizopus arrhizus* NRRL 2582 σε υπόστρωμα γλυκόζης και εμπορικές πηγές αζώτου, αλλά αφορούν πειράματα που έλαβαν χώρα σε βιοαντιδραστήρες (Rhodes et al., 1962; Ng et al., 1986; Gangl et al., 1990) με παραγόμενες ποσότητες

φουμαρικού οξέος μεταξύ 73 και 107 g/L, αποδόσεις μεταξύ 0.7 και 0.85 g/g και παραγωγικότητες μεταξύ 0.5 και 2 g/L/h (Roa-Engel et al., 2008). Τα καλύτερα αποτελέσματα της βιβλιογραφίας στην παραγωγή φουμαρικού οξέος έχουν επιτευχθεί με τη χρήση του στελέχους *Rhizopus arrhizus* NRRL 1526 σε υπόστρωμα γλυκόζης και σε εμπορικές πηγές αζώτου σε βιοαντιδραστήρα (Straathof & van Gulik, 2012). Ενδεικτικά, στην μελέτη των Ling & Ng (1989) το παραγόμενο φουμαρικό οξύ ανήλθε στα 126 g/L, η απόδοση ήταν 0.97 g/g και η παραγωγικότητα 1.38 g/L/h.

4 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Τα αποτελέσματα των πειραμάτων διαλείποντος έργου, σε καλλιέργεια υγρής κατάστασης για την βιοτεχνολογική παραγωγή φουμαρικού οξέος με τη χρήση του μύκητα *Rhizopus arrhizus* NRRL 2582, μπορούν να συνοψισθούν στα ακόλουθα:

1. Επίδραση της μορφολογίας του μύκητα:
 - Οι ομοιόμορφα διάσπαρτες μυκηλιακές υφές οδήγησαν σε καλύτερα αποτελέσματα από την βιομάζα σε μορφή σφαιριδίων όσον αφορά στην απόδοση και στην παραγωγικότητα του φουμαρικού οξέος.
 - Η αύξηση της συγκέντρωσης του θειϊκού αμμωνίου στα 0.2 g/L ευνόησε την παραγωγικότητα του φουμαρικού οξέος, ενώ η μεγαλύτερη απόδοση φουμαρικού οξέος επιτεύχθηκε όταν η αρχική συγκέντρωση του θειϊκού αμμωνίου ήταν 0.04 g/L.
 - Η μεγαλύτερη παραγωγικότητα του φουμαρικού οξέος (0.27 και 0.26 g φουμαρικού οξέος /L/h), στα 25 και 50 g/L γλυκόζης αντίστοιχα, επιτεύχθηκε με τη χρήση εμπορικής πηγής αζώτου και 0.2 g/L θειϊκού αμμωνίου.
 - Σε όλες τις προκαλλιέργειες με 24 ώρες διάρκεια επώασης (σφαιριδίων και διάσπαρτου μυκηλίου) παράλληλα με την αύξηση της συγκέντρωσης του θειϊκού αμμωνίου στην κύρια ζύμωση αυξήθηκε και ο αριθμός των κυττάρων της βιομάζας. Αντίθετα, όταν η προκαλλιέργεια είχε διάρκεια επώασης 7 ώρες, όταν αυξήθηκε η συγκέντρωση του θειϊκού αμμωνίου μειώθηκε ο αριθμός των κυττάρων του μύκητα σχεδόν διπλασιάζοντας τη μέση διάμετρος.
 - Σε όλες τις προκαλλιέργειες με διάρκεια επώασης 24 ώρες, παράλληλα με την αύξηση της συγκέντρωσης του θειϊκού αμμωνίου στην κύρια ζύμωση μειώθηκε η σφαιρικότητα των κυττάρων της βιομάζας. Αντίθετα, όταν η προκαλλιέργεια είχε διάρκεια επώασης 7 ώρες, όταν αυξήθηκε το θειϊκό αμμώνιο αυξήθηκε και η σφαιρικότητα των κυττάρων του μύκητα.
 - Με την αύξηση της συγκέντρωσης των σακχάρων στο υγρό ζύμωσης η σφαιρικότητα αυξήθηκε, ενώ η μέση διάμετρος των κυττάρων της βιομάζας μειώθηκε, ανεξάρτητα από τη συγκέντρωση του θειϊκού αμμωνίου.
 - Η μέση διάμετρος της βιομάζας καθώς και η σφαιρικότητα δεν επηρέασαν την παραγωγή φουμαρικού οξέος.

Τα αποτελέσματα της ανάλυσης της μορφολογίας του μύκητα *Rhizopus arrhizus* NRRL 2582 για την παραγωγή φουμαρικού οξέος ανεξάρτητα από τη σύσταση της προκαλλιέργειας έδειξαν ότι στην κύρια καλλιέργεια με αρχική συγκέντρωση 0.2 g/L θειϊκού αμμωνίου η βιομάζα του μύκητα πρέπει να έχει τα εξής χαρακτηριστικά: α) αριθμός κυττάρων μεγαλύτερος από 10^4 και β) μέση διάμετρος κυττάρων 0.5 mm, με το 90% να είναι κατανομημένα μεταξύ 0.25 και 0.75 mm. Η παραγόμενη βιομάζα με αυτά τα χαρακτηριστικά οδήγησε στα καλύτερα αποτελέσματα όσον αφορά: α) στην παραγόμενη συγκέντρωση φουμαρικού οξέος, β) στην μέγιστη απόδοση και γ) στην καλύτερη παραγωγικότητα.

2. Παραγωγή υδρολύματος σογιαλεύρου

- Η μέγιστη δραστηριότητα των πρωτεολυτικών ενζύμων επιτεύχθηκε όταν ο μύκητας είχε διάρκεια επώασης 70 ώρες.
- Η μέγιστη παραγωγή FAN που επιτεύχθηκε κατά τη διάρκεια της υδρόλυσης ήταν 1363 mg/L FAN στη θερμοκρασία 45 °C.
- Η μέγιστη παραγωγή ανόργανου φωσφόρου που επιτεύχθηκε κατά την υδρόλυση ήταν 105 mg/L στη θερμοκρασία 45 °C.

3. Αξιοποίηση του υδρολύματος σογιαλεύρου

- Η μεγαλύτερη συγκέντρωση φουμαρικού οξέος ήταν 33 g/L και επιτεύχθηκε όταν η αρχική συγκέντρωση του FAN ήταν 200 mg/L.
- Όταν χρησιμοποιήθηκε μεγαλύτερη συγκέντρωση FAN (400 mg/L) στην προκαλλιέργεια, αυξήθηκε η παραγωγικότητα (από 0.19 σε 0.22 g/L/h) του φουμαρικού οξέος εις βάρος της απόδοσης (από 0.69 σε 0.61 g/g).

Τέλος, η παραγωγή υδρολύματος πλούσιο σε άζωτο και ο πιθανός συνδυασμός με παραπροϊόντα της βιομηχανίας ως πηγή άνθρακα, αποτελεί μία προοπτική αξιοποίησης των παραπροϊόντων αυτών στη βιοτεχνολογική παραγωγή του φουμαρικού οξέος.

5 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Almeida J.R.M., Favarol L.C.L. & Quirino B.F. (2012). Biodiesel biorefinery: opportunities and challenges for microbial production of fuels and chemicals from glycerol waste. *Biotechnology for Biofuels* 5, 48.
- Altmeyer P.J., Matthes U., Pawlak F., Hoffmann K., Frosch P.J., Ruppert P., Wassilew S.W., Horn T., Kreysel H.W., Rietzschel I. & Joshi R.K. (1994). Antipsoriatic effect of fumaric derivatives- Results of multicenter double blind study in 100 patients. *Journal of the American Academy of Dermatology* 30, 977.
- Buyukkileci A.O. (2007). Investigation of sugar metabolism in *Rhizopus oryzae*. PhD Thesis. Middle East Technical University.
- Byrne G.S. & Ward O.P. (1989a). Effect of Nutrition on Pellet Formation by *Rhizopus arrhizus*. *Biotechnology and Bioengineering* 33, 912-914.
- Byrne G.S. & Ward O.P. (1989b). Growth of *Rhizopus arrhizus* in Fermentation Media. *Journal of Industrial Microbiology* 4, 155-161.
- Ciriacy M. (1997). Alcohol dehydrogenases in Yeast Sugar Metabolism. K.D. Entian Lancaster, P., Technomic Publishing Co.: 213-224.
- Das R.C., Dash U.N. & Panda K.N. (1980) Thermodynamics of dissociation of DL-malic, maleic and fumaric acids in water and water+dioxan mixtures. *Journal of Chemical Society Farad Trans I* 76, 2152-2158.
- Du L.X., Jia S.J. & Lu F.P (2002). Morphological changes of *Rhizopus chinensis* 12 in submerged culture and its relationship with antibiotic production. *Process Biochemistry* 38, 1643-1646.
- Donnelly M., Millard C.S. & Stols L. (2001). Mutant *E. coli* strain with increased succinic acid production. USR37393.
- Erickson D.R. (1995). Practical handbook of soybean processing and utilization. Pp. 184-187, 219, 243. ISBN: 0-935315-63-2. *AOCS Press*. Champaign, IL, USA.
- Food and Agriculture Organization of United Nations (FAO) (2013). At: <http://faostat3.fao.org/faostat-gateway/go/to/download/Q/QD/E>
- Foster J.W. & Waksman S.A. (1938). The production of fumaric acid by molds belonging to the genus *Rhizopus*. *Journal of American Chemical Society* 61, 127-135.
- Gangl I.C. Weigand W.A. & Keller F.A. (1990). Economic comparison of calcium fumarate and sodium fumarate production by *Rhizopus arrhizus*. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 24, 663-677.
- Gibbs P.A., Seviour R.J. & Schmid F. (2000). Growth of filamentous fungi in submerged culture: Problems and possible solutions. *Critical Reviews in Biotechnology* 20, 17-48.
- Goldberg I., Lonberg-Holm K., Bagley E.A. & Stieglitz B. (1983). Improved Conversion of Fumarate to Succinate by *Escherichia coli* Strains Amplified for Fumarate Reductase. *Applied and Environmental Microbiology* 45, 1838-1847.

- Goldberg I., Rokem J.S. & Pines O. (2006) Organic acids: old metabolites, new themes. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 81, 1601-1611.
- Goto M., Nara T., Tokumaru I., Fugono N., Uchida Y., Terasawa M. & Yukawa H. (1998). Method of producing fumaric acid. US5783428.
- Gu C., Zhou Y., Liu L. & Deng L. (2013). Production of fumaric acid by immobilized *Rhizopus arrhizus* on net. *Bioresource Technology* 131, 303-307.
- Harland B.F. & Harland J. (1980). Fermentative reduction of phytate in rye, white and whole wheat breads. *Cereal Chemistry* 57, 226-229.
- Hymowitz T. (2004). Speciation and cytogenetics. Soybeans: Improvement, Production and Uses. Boerma H.R. & Specht J.E. (eds) Third Edition. ASA, CSSA, SSSA, pp. 97-136. Madison, WI, USA.
- Ichikawa S., Iino T., Sato S., Nakahara T. & Mukataka S. (2003). Improvement of production rate and yield of fumaric acid from maleic acid by heat treatment of *Pseudomonas alcaligenes* strain XD-1. *Biochemical Engineering Journal* 13, 7-13.
- Jing M., Ma J., Wang Y., Yu L. & Huang X. (2010). Novel constructed high-yield fumaric acid gene engineering bacterium and method for producing fumaric acid thereby. CN101240259.
- Kachrimanidou V., Kopsahelis N., Chatzifragkou A., Papanikolaou S., Yanniotis S., Kookos I.K. & Koutinas A.A. (2013). Utilisation of By-Products from Sunflower-Based Biodiesel Production Processes for the Production of Fermentation Feedstock. *Waste and Biomass Valorization*, DOI 10.1007/s12649-012-9191-x.
- Kenealy W., Zaady E., Dupreez J.C., Stieglitz B. & Goldberg I. (1986). Biochemical aspects of fumaric acid accumulation by *Rhizopus arrhizus*. *Applied and Environmental Microbiology* 52, 128-133.
- Killestein J., Rudick R.A. & Polman C.H. (2011). Oral treatment for multiple sclerosis. *The Lancet Neurology* 10, 1026-1034.
- Koutinas A.A., Vlysidis A., Pleissner D., Kopsahelis N., Lopez Garcia I., Kookos I.K., Papanikolaou S., Kwan T.H. & Lin C.S.K. (2014). Valorization of industrial waste and by-product streams via fermentation for the production of chemicals and biopolymers. *The Royal Society of Chemistry* 43, 2587-2627.
- Lange B.A. & Sinks M.H. (1930). The solubility, specific gravity and index of refraction of aqueous solutions of fumaric, maleic and *i*-malic acids. *Journal of American Chemical Society* 52, 2602-2604.
- Liao W. (2005). Co-production of fumaric acid and chitin using *Rhizopus oryzae* fermentation on a nitrogen-rich agricultural residue-dairy. PhD Thesis. Washington State University.
- Liao W., Liu Y., Frear C. & Chen S. (2007a). A new approach of pellet formation of a filamentous fungus-*Rhizopus oryzae*. *Bioresource Technology* 98, 3415-3423.
- Liao W., Liu Y. & Chen S. (2007b). Studying Pellet Formation of a Filamentous Fungus *Rhizopus oryzae* to Enhance Organic Acid Production. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 136-140, 689-702.

- Lie S. (1973). The EBC-ninhydrin method for determination of free alpha amino nitrogen. *Journal of the Institute of Brewing* 79, 37–41.
- Liese A., Seelbach K. & Wandrey C. (2006). Industrial biotransformations, 2nd edn Wiley-VCH. Weinheim.
- Ling L.B. & Ng T.K. (1989) Fermentation process for carboxylic acids. US 4877731.
- Lohbeck K., Haferkorn H., Fuhrmann W. & Fedtke N. (2005). Maleic and Fumaric Acids. Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, 5th ed., Vol. A16, VCH 53-62. Weinheim, Germany.
- Magnuson J.K. & Lasure L.L. (2004). Organic acid production by filamentous fungi. *Advances in Fungal Biotechnology for Industry, Agricultural and Medicine*. (eds) by Lang J. & Lang L. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, 307-340.
- McGinn S.M., Beauchemin K.A., Coates T. & Colombatto D. (2004). Methane emissions from beef cattle: effects of monensin, sunflower oil, enzymes, yeast and fumaric acid. *Journal of Animal Science* 82, 3346-3356.
- Medina-Juarez L.A. & Gamez-Meza N. (2011). Effect of Refining Process and Use of Natural Antioxidants on Soybean Oil. *Soybean-Biochemistry and Physiology* (ed) Ng T.B. ISBN: 978-953-307-219-7, InTech.
- Miller G.L. (1959). Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugars. *Analytical Chemistry* 31, 426-428.
- Moresi M., Parente E., Petruccioli M. & Federici F. (1991). Optimization of fumaric acid production from potato flour by *Rhizopus arrhizus*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 36, 35-39.
- Morrin M. & Ward O.P. (1990). Relationships between fungal growth morphology and fumaric acid production by *Rhizopus arrhizus*. *Mycological Research* 94, 505-510.
- Mrowietz U., Christophers E. & Altmeyer P. (1998). Treatment of psoriasis with fumaric acid esters: results of a prospective multicentre study. *British Journal of Dermatology* 138, 456.
- NakajimaKamber T., Nozue T., Mukouyama M. & Nakahara T. (1997). Bioconversion of maleic acid to fumaric acid by *Pseudomonas alcaligenes* strain XD-1. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 84, 165.
- Ng T.K., Hesser R.J., Stieglitz B., Griffiths B.S. & Ling L.B. (1986). Production of tetrahydrofuran/1,4 butanediol by a combined biological and chemical process. *Biotechnology and Bioengineering Symposium* 17, 355-363.
- Osmani S.A. & Scrutton M.C. (1985). The sub-cellular localization and regulatory properties of pyruvate carboxylase from *Rhizopus arrhizus*. *European Journal of Biochemistry*, 147, 119.
- Otsuka K. (1961). Cis-trans isomerase-Isomerisation from maleic acid to fumaric acid. *Agricultural and Biological Chemistry* 25, 726.
- Papagianni M. (2004). Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes. *Biotechnology Advances* 22, 189-259.
- Pirt S.J. & Callow D.S. (1959). Continuous flow culture of the filamentous mould *Penicillium chrysogenum* and the control of its morphology. *Nature* 184, 307-310.

- Reich K., Thaci D., Mrowietz U., Kamps A., Neureither M. & Luger T. (2009). Efficacy and safety of fumaric acid esters in the long term treatment of psoriasis: a retrospective study (FUTURE). *Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft* 7, 603-611.
- Rhodes R.A., Moyer A.J., Smith M.L. & Kelley S.E. (1959). Production of Fumaric Acid by *Rhizopus arrhizus*. *Applied Microbiology* 7, 74-80.
- Rhodes R.A., Lagoda A.A., Jackson R.W., Misenhei T.J., Smith M.L. & Anderson R.F. (1962). Production of fumaric acid in 20 liter fermenters. *Applied Microbiology* 10, 9-15.
- Rico J.A.P. & Sauer I.L. (2015). A review of Brazilian biodiesel experiences. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 45, 513-529.
- Riscaldati E., Moresi M., Federici F. & Petruccioli M (2000). Direct ammonium fumarate production by *Rhizopus arrhizus* under phosphorous limitation. *Biotechnology Letters* 22, 1043.
- Roa Engel (2010). Integration of fermentation and cooling crystallization to produce organic acids. PhD Thesis. Bogota, Colombia.
- Roa Engel C.A., Straathof A.J.J., Zijlmans T.W., van Gulik W.M. & van der Wielen L.A.M. (2008). Fumaric acid production by fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology* 78, 379-389.
- Romano A.H., Bright M.M. & Scott W.E. (1967). Mechanism of fumaric acid accumulation in *Rhizopus nigricans*. *Journal of Biotechnology* 93, 600-604.
- Scher M. & Lennarz W.J. (1969). Maleate Isomerase. *The Journal of Biological Chemistry* 244, 1878.
- Shahid E.M. & Jamal Y. (2011). Production of biodiesel: A technical review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 15, 4732-4745.
- Soya & Oilseed Bluebook (2010). *The Annual Directory of the World Oilseed Industry*, Bar Harbor, ME, USA: Soyatech, pp 224-325. ISBN-13: 978-0972321679.
- Stephen W.I. (1965). Solubility and pH calculations. *Analytica Chimical Acta* 33, 227.
- Straathof A.J.J. & van Gulik W.M (2012). Production of Fumaric Acid by Fermentation. *Reprogramming Microbial Metabolic Pathways*. (eds) Wang X., Chen J. & Quinn P.J. Book Chapter. ISBN: 978-94-007-5055-5.
- Takamura Y, Takamura T, Soejima M. & Uemura T. (1969). Studies on induced synthesis of maleate cis-trans isomerase by malonate. Purification and properties of maleate cis-trans isomerase induced by malonate. *Agricultural and Biological Chemistry* 33, 718.
- Wang Q., Hou Y., Xu Z., Miao J. & Li G. (2008). Optimization of cold-active protease production by the psychrophilic bacterium *Colwellia* sp. NJ341 with response surface methodology. *Bioresource Technology* 99, (6): 1926-1931.
- Wang R., Law R.C.S. & Webb C. (2005). Protease production and conidiation by *Aspergillus oryzae* in flour fermentation. *Process Biochemistry* 40, 217-227.
- Weiss J.M. & Downs C.R. (1923a). The physical properties of maleic, fumaric and malic acids. *Journal of American Chemical Society* 45, 1003-1008.

- Werpy T. & Petersen G. (2004). Top Value added chemicals from biomass, Volume I: results of screening for potencial candidates from sugars and synthesis gas. US Department of Energy. <http://www1.eere.energy.gov/biomass/pdfs/35523.pdf>.
- Xiao Z.J., Liu P.H., Qin J.Y. & Xu P. (2007). Statistical optimization of medium components for enhanced acetoin production from molasses and soybean meal hydrolysate. *Applied Microbiology and Biotechnology* 74, 61-68.
- Xu Q., Li S., Fu Y.Q., Tai C. & Huang H. (2010). Two-stage utilization of corn straw by *Rhizopus oryzae* for fumaric acid production. *Bioresource Technology* 101, 6262-6264.
- Zhou Y. (1999). Fumaric acid fermentation by *Rhizopus oryzae* in submerged system. PhD Thesis. Purdue University. La Fayette, Indiana, USA. pp149.
- Zhang K., Yu C. & Yang S.T. (2015). Effects of soybean meal hydrolysate as the nitrogen source on seed culture morphology and fumaric acid production by *Rhizopus oryzae*. *Process Biochemistry* 50, 173-179.
- Zhou Y., Du J.X. & Tsao G.T. (2000). Mycelial pellet formation by *Rhizopus oryzae* ATCC 20344. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 84, 779-789.
- Zhou Y., Du J. & Tsao G.T. (2002) Comparison of fumaric acid production by *Rhizopus oryzae* using different neutralizing agents. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 25, 179.
- Zhou Z., Du G., Hua Z., Zhou J & Chen J. (2011). Optimization of fumaric acid production by *Rhizopus delemar* based on the morphology formation. *Bioresource Technology* 102, 9345-9349.
- Znidarsic P., Komel R. & Pavko A. (2000). Influence of some environmental factors on *Rhizopus nigricans* submerged growth in the form of pellets. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 16, 589-593.
- Znidarsic P. & Pavko A. (2001). The morphology of filamentous fungi in submerged cultivations as a bioprocess parameter. *Food Technology & Biotechnology* 39, 237-252.