

**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ**  
**Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου**  
**Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων**

**ΠΜΣ: ΒΙΟΔΙΕΡΓΑΣΙΕΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΒΙΟΔΙΥΛΙΣΤΗΡΙΑ**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ**

*«Επιλογή στελεχών μυκήτων και ζυμών προς βιοτεχνολογική παραγωγή  
δευτερογενών μικροβιακών μεταβολιτών»*

Επιβλέπων:

Σεραφείμ Παπανικολάου, Επίκουρος Καθηγητής

**Σοφία Χ. Μάινα**

**ΑΘΗΝΑ 2014**

## **ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ**

*«Επιλογή στελεχών μυκήτων και ζυμών προς βιοτεχνολογική παραγωγή  
δευτερογενών μικροβιακών μεταβολιτών»*

### **Εξεταστική Επιτροπή:**

Παπανικολάου Σεραφείμ, Επίκουρος Καθηγητής  
Κουτίνας Απόστολος, Επίκουρος Καθηγητής  
Δροσινός Ελευθέριος, Αναπληρωτής Καθηγητής

Επιβλέπων:

Σεραφείμ Παπανικολάου, Επίκουρος Καθηγητής

**Σοφία Χ. Μάινα**

**ΑΘΗΝΑ 2014**

## Περίληψη

Η παρούσα μελέτη εκπονήθηκε σε δύο στάδια με σκοπό την μελέτη στελεχών μυκήτων και την επιλογή ζυμομυκήτων προς βιοτεχνολογική παραγωγή δευτερογενών μεταβολιτών κυρίως οργανικών οξέων και μικροβιακού λίπους.

Κατά το πρώτο στάδιο μελετήθηκε η βιοχημική παραγωγή φουμαρικού οξέος με τη χρήση μυκήτων που ανήκουν στο γένος *Rhizopus*, και συγκεκριμένα των στελεχών *Rhizopus delemar* NRRL 1472, *Rhizopus oryzae* NRRL 1526, *Rhizopus arrhizus* NRRL 2582, *Rhizopus oryzae* NRRL 3562 και *Rhizopus oryzae* NRRL 3563. Τα υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν εμπορική σακχαρόζη, ισομοριακό μείγμα γλυκόζης: φρουκτόζης, μελάσα, χημικώς υδρολυμένη μελάσα και γλεκερόλη. Κατά τη διεξαγωγή της πειραματικής διαδικασίας μόνο το στέλεχος *R. arrhizus* NRRL 2582 παρουσίασε αύξηση στη βιομάζα και παραγωγή φουμαρικού οξέος στα υποστρώματα σακχαρόζης και μελάσας γεγονός το οποίο οφείλεται στην παρουσία του ενζύμου ιμπερτάσης. Συγκεκριμένα, η καλλιέργεια του εν λόγω στελέχους σε υπόστρωμα αρχικής συγκέντρωση σακχαρόζης  $50 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  η παραγωγή φουμαρικού οξέος ήταν  $12,8 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ . Αντιθέτως, κατά την καλλιέργεια του μύκητα σε μελάσα με αρχική συγκέντρωση  $50 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  δεν αναπτύχθηκε, ενώ σε συγκέντρωση  $25 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  η παραγωγή φουμαρικού οξέος ήταν  $5,1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ . Η μελέτη των στελεχών *Rhizopus* σε ισομοριακό μείγμα γλυκόζης: φρουκτόζης διεξήχθη σε δύο συγκεντρώσεις  $25$  και  $50 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ . Όλα τα στελέχη *Rhizopus*, εκτός από το *R. delemar* NRRL 1472, παρουσίασαν αύξηση και παραγωγή φουμαρικού οξέος. Στο ισομοριακό μείγμα γλυκόζης:φρουκτόζης αρχικής συγκέντρωσης  $25 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  σημείωσαν υψηλότερη απόδοση παραγόμενου προϊόντος, ενώ στο υπόστρωμα με αρχική συγκέντρωση  $50 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  παρατηρήθηκε υψηλότερη συγκέντρωση φουμαρικού οξέος. Ειδικότερα, τα στελέχη *R. oryzae* NRRL 1526, *R. arrhizus* NRRL 2582, *R. oryzae* NRRL 3562 και *R. oryzae* NRRL 3563 στο υπόστρωμα αρχικής συγκέντρωσης  $25 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  παράγαγαν  $12, 12,1, 9,4$  και  $8,9 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  φουμαρικό οξύ με συντελεστές απόδοσης  $0,59, 0,63, 0,39, 0,39 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$  αντίστοιχα, ενώ στο υπόστρωμα αρχικής συγκέντρωσης  $50 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  η συγκέντρωση φουμαρικού οξέος ήταν  $15,9, 13,1, 4,2$  και  $11,2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  με συντελεστές απόδοσης  $0,36, 0,28, 0,15$  και  $0,22 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$  αντίστοιχα. Τέλος, μελετήθηκε η δυνατότητα παραγωγής φουμαρικού οξέος με το στέλεχος *R. oryzae* NRRL 1526 σε χημικώς υδρολυμένη μελάσα αρχικής συγκέντρωσης  $25 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  και τα στελέχη *Rhizopus* σε γλεκερόλη  $20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , αλλά κανένα από τα στελέχη δεν σημείωσε αύξηση και παραγωγή φουμαρικού οξέος.

Κατά το δεύτερο στάδιο απομονώθηκαν και μελετήθηκαν στελέχη ζυμών για την παραγωγή οργανικών οξέων, κυρίως μηλικού, κιτρικού, ηλεκτρικού και φουμαρικού, καθώς και την παραγωγή μικροβιακού λίπους. Για την παραγωγή οργανικών οξέων, 35 στελέχη ζυμών απομονώθηκαν και επιλέχθηκαν για περαιτέρω μελέτη. Κατά την καλλιέργεια των στελεχών ζυμών σε υπόστρωμα γλυκόζης αρχικής συγκέντρωσης  $40 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  σημειώθηκε παραγωγή κιτρικού οξέος ( $3,56\text{-}7,85 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) ως κύριο μεταβολικό προϊόν από 5 στελέχη ζυμών. Επιπλέον, δύο στελέχη ζυμών που απομονώθηκαν από το φραγκόσυκο με κωδική ονομασία OFI\_C1 και OFI\_C2 σημείωσαν παραγωγή μηλικού οξέος με συγκέντρωση  $4,09$  και  $1,43 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  αντίστοιχα. Η παραγωγή ηλεκτρικού οξέος παρατηρήθηκε σε χαμηλές συγκεντρώσεις, ωστόσο σημειώθηκε ως κύριο μεταβολικό προϊόν σε ένα στέλεχος που απομονώθηκε από τη βανίλια (*Prunus domestica*). Όσο αφορά την μελέτη παραγωγής μικροβιακού λίπους, 51 στελέχη ζυμών απομονώθηκαν εκ των οποίων 24 είχαν τη δυνατότητα συσσώρευσης ενδοκυτταρικού λίπους μεγαλύτερη από 20% w/w. Από αυτά τα στελέχη 6 στελέχη ζυμών μελετήθηκαν περαιτέρω και ταυτοποιήθηκαν. Συγκεκριμένα, διερευνήθηκε σε πρωταρχικό στάδιο η δυνατότητα παραγωγής μικροβιακού λίπους σε υπόστρωμα σακχαρόζης αρχικής συγκέντρωσης 20 και  $100 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ . Κατά την καλλιέργεια των στελεχών σε σακχαρόζη αρχικής συγκέντρωσης  $20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , η παραγωγή μικροβιακού λίπους κυμάνθηκε από 24- 30 %. Ωστόσο, στην υψηλότερη συγκέντρωση σακχάρων, όλα τα στελέχη ζυμών, εκτός από το στέλεχος που απομονώθηκε από το σταφύλι (*Vitis vinifera*) με κωδική ονομασία VV\_D4, παρουσίασαν μείωση παραγωγής λίπους με ταυτόχρονη παραγωγή κιτρικού οξέος και αιθανόλης.

## Abstract

The aim of the present study was to evaluate fumaric acid production from 5 different *Rhizopus* strains and isolate yeast strains for the potential production of secondary metabolites, mainly organic acids and microbial oil. Screening of fungi and yeast strains, was conducted in two stages.

In the first stage we investigated the biochemical conversion of raw materials and commercial sugars, as carbon source, using *Rhizopus delemar* NRRL 1472, *Rhizopus oryzae* NRRL 1526, *Rhizopus arrhizus* NRRL 2582, *Rhizopus oryzae* NRRL 35262 and *Rhizopus oryzae* NRRL 3563 for the production of fumaric acid. The substrates investigated for this purpose were commercial sucrose, equimolar mixture of glucose and fructose, cane molasses, chemical hydrolyzed cane molasses and glycerol. In the case of commercial sucrose and cane molasses, only *R. arrhizus* NRRL 2582 was able to produce fumaric acid. Specifically, the recorded fumaric acid production of *R. arrhizus* NRRL 2582 on sucrose ( $50 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) was  $12.8 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ . During fermentation on cane molasses with initial concentration of  $50 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  sugars (as glucose equivalents) *R. arrhizus* NRRL 2582 did not show any growth, while on  $25 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  the production of fumaric acid was  $5.1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ . Fermentations of *Rhizopus* strains on equimolar mixture of glucose and fructose were performed using 25 and  $50 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  total sugars. All *Rhizopus* strains achieved maximum yield on  $25 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , and highest production of fumaric acid was observed on  $50 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , while *R. delemar* NRRL 1472 did not grow on any of the substrates used. In particular, the higher concentrations of fumaric acid on equimolar mixture of glucose:fructose with initial concentration of sugars  $25 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  by *R. oryzae* NRRL 1526, *R. arrhizus* NRRL 2582, *R. oryzae* NRRL 3562 and *R. oryzae* NRRL 3563 were 12, 12.1, 9.4 and  $8.9 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  with a yield of 0.59, 0.63, 0.39,  $0.39 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$ , respectively, while on the substrate with initial concentration of sugars  $50 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  fumaric acid production was 15.9, 13.1, 4.2 and  $11.2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  with a yield of 0.36, 0.28, 0.15 and  $0.22 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$ , respectively. The potential of fumaric acid production by *R. oryzae* NRRL 1526 strain was studied on chemical hydrolysed cane molasses in concentration of  $25 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  (as glucose equivalents) and on glycerol in  $20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  concentration was examined by all *Rhizopus* strains. Results showed that these substrates were not suitable for fumaric acid production.

In the second stage we isolated yeast strains for the potential production of organic acids, mainly malic, citric, succinic and fumaric acid and for the accumulation of microbial oil. For the

production of organic acids, 35 isolates which indicate a desirable product were selected for further analysis. During fermentation of yeast strains on glucose  $40 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , citric acid production was recorded ( $3.56\text{-}7.85 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) as main product by 5 isolates. Moreover, two yeast strains which were isolated from prickly pear (*Opuntia ficus indica*) with the code name OFI\_C1 and OFI\_C2 could produce malic acid in concentrations of  $4.09$  and  $1.43 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , respectively. Succinic acid production was relatively low, but it was observed as a main product by one of the strains isolated from plum (*Prunus domestica*). For the production of microbial oil, we isolated 51 yeast colonies, 24 of which could produce microbial oil more than 20% w/w lipid content in dry biomass. The best results were obtained by 6 isolated and were further studied in shake flask fermentations and were classified using 26S rRNA sequence. In particular, we investigated their ability to accumulate lipid on sucrose with initial concentrations of 20 and  $100 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ . Lipid was produced in amounts ranging from 24 to 30% w/w in sucrose concentration of  $20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ . Higher concentration ( $100 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) of sucrose did not improve lipid accumulation, except for one isolate from grape (*Vitis vinifera*) with the code name VV\_D4, with simultaneous production of citric acid and ethanol.

## **Ευχαριστίες**

Η παρούσα μελέτη εκπονήθηκε στο εργαστήριο «Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων» του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, στα πλαίσια του Π.Μ.Σ. «Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου». Θα ήθελα να εκφράσω τις θερμότερες ευχαριστίες μου στους κ. Παπανικολάου Σεραφείμ και κ. Κουτίνα Αποστόλη για την εμπιστοσύνη που έδειξαν στο πρόσωπο μου καθώς και για την καθοδήγηση και τη συνεργασία κατά τη διάρκεια της μελέτης αυτής.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήρω τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Ελευθέριο Δροσινό και τον κ. Σπυρίδων Παραμυθιώτη για την βοήθεια που μου προσέφεραν στην εκτέλεση της πειραματικής διαδικασίας.

Επιπλέον, θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες σε όλα τα μέλη των εργαστηρίων και κυρίως στις υποψήφιες διδάκτορες κα. Πατεράκη Χρυσάνθη και κα. Παπαδάκη Κατερίνα για την πολύτιμη βοήθεια και τη συνεχή στήριξη κατά τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας.

Τέλος, επιθυμώ να ευχαριστήσω τους γονείς και του φίλους μου για τη στήριξη και την κατανόηση τους καθ' όλη τη διάρκεια διεξαγωγής της μελέτης αυτής.

## Περιεχόμενα

Περίληψη.....	3
Abstract.....	5
Ευχαριστίες .....	7
Περιεχόμενα .....	8
Εισαγωγή.....	11
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1.....	12
Επιλογή στελεχών μυκήτων προς παραγωγή φουμαρικού οξέος.....	12
1. Εισαγωγή.....	12
1.1 Φουμαρικό οξύ.....	12
1.2 Ιδιότητες και εφαρμογές του φουμαρικού οξέως.....	12
1.3 Μέθοδοι παραγωγής φουμαρικού οξέος.....	14
1.3.1 Παραγωγή φουμαρικού οξέος μέσω της πετροχημικής βιομηχανίας.....	14
1.3.2 Ενζυμική μετατροπή μηλεϊνικού οξέος σε φουμαρικό οξύ.....	15
1.4 Βιοτεχνολογική παραγωγή φουμαρικού οξέος μέσω μικροβιακών ζυμώσεων .....	16
1.5 Βιομηχανικές εφαρμογές του γένους <i>Rhizopus</i> .....	19
1.6 Μεταβολικό μονοπάτι παραγωγής φουμαρικού οξέος.....	19
1.7 Υποστρώματα κατάλληλα για την παραγωγή φουμαρικού οξέος με τη χρήση στελεχών του μύκητα <i>Rhizopus</i> spp. ....	21
1.8 Επίδραση μορφολογίας του μύκητα <i>Rhizopus</i> στην παραγωγή φουμαρικού οξέος.....	21
1.9 Θρεπτικό μέσο για τη ζύμωση προς παραγωγή φουμαρικού οξέος .....	22
1.10 Επιδράσεις του pH και διαλυμένου οξυγόνου στη ζύμωση προς παραγωγή φουμαρικού οξέος	23
Σκοπός της μελέτης .....	26
2. Υλικά και μέθοδοι.....	27
2.1 Βιολογικό υλικό .....	27
2.2 Παρασκευή υγρού εμβολίου.....	27
2.3 Θρεπτικό μέσο για την παραγωγή φουμαρικού οξέος.....	28
2.4 Χημική υδρόλυση μελάσας .....	29
2.5 Προσδιορισμός σακχάρων και οργανικών οξέων.....	29
3. Αποτελέσματα .....	30
3.1 Συγκριτική αξιολόγηση της παραγωγής φουμαρικού οξέος από τα στελέχη του μύκητα <i>Rhizopus</i> σε υπόστρωμα εμπορικής σακχαρόζης .....	30

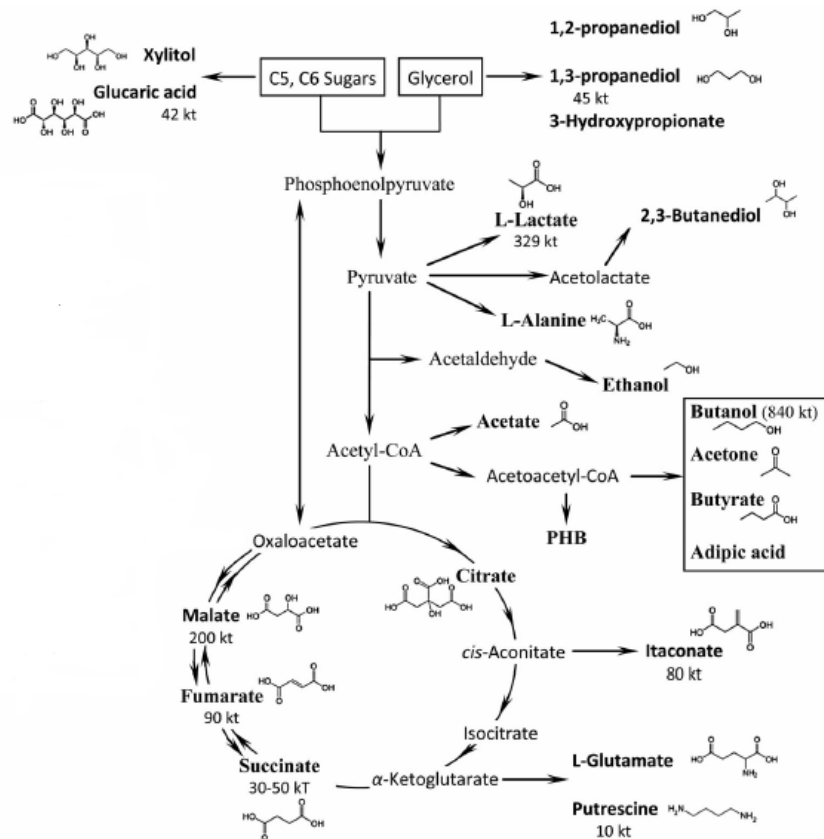


3.2	Συγκριτική αξιολόγηση της παραγωγής φουμαρικού οξέος από τα στελέχη του μύκητα <i>Rhizopus</i> σε υπόστρωμα ισομοριακού μείγματος γλυκόζης:φρουκτόζης.....	32
3.3	Καλλιέργεια του <i>R. arrhizus</i> NRRL 2582 σε υπόστρωμα μελάσας.....	34
3.4	Καλλιέργεια του <i>R. oryzae</i> NRRL 1526 σε υπόστρωμα υδρολυμένης μελάσας.....	36
3.5	Συγκριτική αξιολόγηση της παραγωγής φουμαρικού οξέος από στελέχη του μύκητα <i>Rhizopus</i> σε υπόστρωμα γλυκερόλης.....	36
4.	Συζήτηση.....	37
	ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2.....	43
	Επιλογή στελεχών ζυμών προς παραγωγή οργανικών οξέων και μικροβιακού λίπους.....	43
1.	Εισαγωγή.....	43
1.1	Δευτερογενείς μεταβολίτες.....	43
1.2	Παραγωγή οργανικών οξέων.....	43
1.2.1	Βιοχημεία παραγωγής οργανικών οξέων με τη χρήση ζυμών.....	43
1.3	Παραγωγή μικροβιακού λίπους.....	46
1.3.1	Βιοχημεία συσσώρευσης μικροβιακού λίπους.....	47
1.4	Απομόνωση ζυμών.....	50
1.5	Ταυτοποίηση ζυμών.....	50
	Σκοπός της μελέτης.....	51
2.	Υλικά και μέθοδοι.....	52
2.1	Απομόνωση ζυμών.....	52
2.1	Διαδικασία απομόνωσης.....	52
2.2	Θρεπτικά υποστρώματα για την παραγωγή δευτερογενών μεταβολιτών.....	53
2.2.1	Θρεπτικό μέσο μεικτών καλλιιεργειών.....	53
2.2.1	Θρεπτικό μέσο μονοκλωνικών καλλιιεργειών για την παραγωγή οργανικών οξέων.....	53
2.2.2	Θρεπτικό μέσο για την παραγωγή μικροβιακού λίπους.....	54
2.3	Προσδιορισμός σακχάρων και οργανικών οξέων.....	55
2.4	Προσδιορισμός βιομάζας.....	55
2.5	Εκχύλιση ενδοκυτταρικού λίπους.....	55
2.6	Ταυτοποίηση ζυμών.....	56
2.6.1	Απομόνωση και καθαρισμός DNA.....	56
2.6.2	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης PCR.....	56
2.6.3	Ηλεκτροφόρηση DNA σε πηκτή αγαρόζης.....	57

3.	Αποτελέσματα .....	59
3.1	Απομόνωση ζυμών.....	59
3.2	Μεικτές καλλιέργειες ζυμών .....	59
3.3	Παραγωγή οργανικών οξέων.....	60
3.3.1	Μεικτές καλλιέργειες ζυμών προς παραγωγή οργανικών οξέων.....	60
3.3.2	Μονοκλωνικές καλλιέργειες ζυμών προς παραγωγή οργανικών οξέων .....	61
3.4	Παραγωγή μικροβιακού λίπους.....	63
3.4.1	Ταυτοποίηση ελαιογόνων ζυμών .....	65
4.	Συμπεράσματα .....	68
	Βιβλιογραφία.....	73

## Εισαγωγή

Τα τελευταία χρόνια το ερευνητικό ενδιαφέρον έχει στραφεί προς την παραγωγή χημικών μέσω μικροβιακών ζυμώσεων. Στη σύγχρονη βιομηχανική πρακτική το μεγαλύτερο μέρος των παραγόμενων χημικών προέρχεται από την πετροχημική βιομηχανία, ωστόσο πολλά από αυτά δύναται να παραχθούν μέσω ζυμώσεων (εικόνα 1).



Εικόνα 1: Χημικά που δύναται να παραχθούν μέσω ζυμώσεων (Koutinas *et al.*, 2014)

Οι δευτερογενείς μεταβολίτες είναι οργανικές ενώσεις που δεν εμπλέκονται άμεσα στη ανάπτυξη και επιβίωση του μικροοργανισμού. Ωστόσο συμβάλουν στην επιβίωση του μικροοργανισμού σε συνθήκες στρες, δοθέντος του γεγονότος ότι κατά την παραγωγή τους προσφέρεται ενέργεια στα κύτταρα με άμεσο ή έμμεσο τρόπο, μέσω της παραγωγής NADH και FADH<sub>2</sub>, τα οποία είναι φορείς ηλεκτρονίων υψηλής ενέργειας. Οι ζύμες και οι μύκητες έχουν μελετηθεί εκτενώς για την παραγωγή δευτερογενών μεταβολικών προϊόντων. Παρόλα αυτά περαιτέρω μελέτες απαιτούνται ώστε να μπορεί η βιοτεχνολογική παραγωγή τους να ανταγωνιστεί την πετροχημική.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

### Επιλογή στελεχών μυκήτων προς παραγωγή φουμαρικού οξέος

#### 1. Εισαγωγή

##### 1.1 Φουμαρικό οξύ

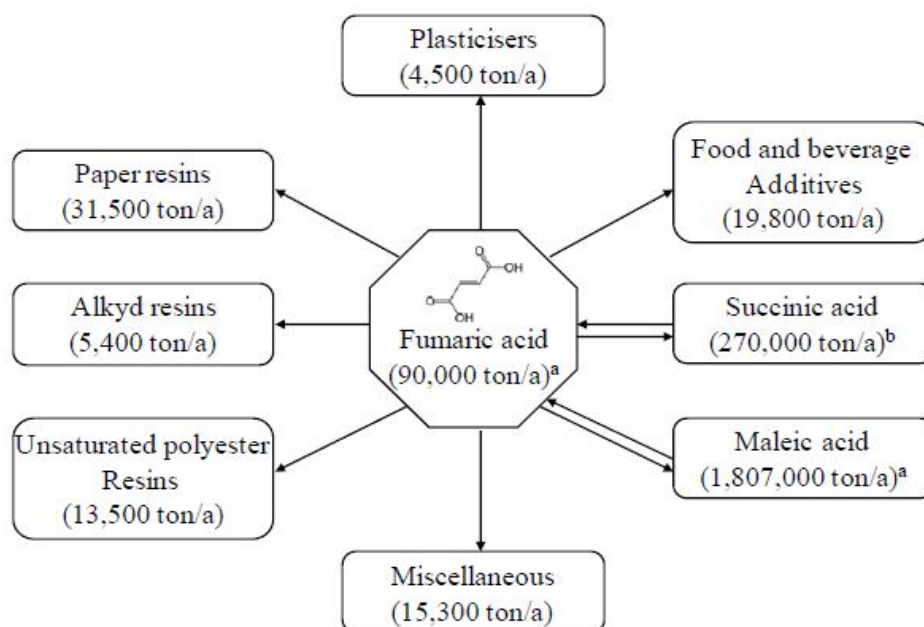
Το φουμαρικό οξύ είναι οργανικό οξύ ( $\text{HO}_2\text{CCH}=\text{CHCO}_2\text{H}$ ) το οποίο πρώτα απομονώθηκε από το φυτό *Fumaria officinalis*, απ' όπου πήρε το όνομα του. Το φουμαρικό οξύ είναι γνωστό και ως (E) -2- βουτενοδιοϊκό οξύ, βολετικό οξύ, αλλομαλικό οξύ, trans- 1,2-αιθυλενο-δικαρβοξυλικό οξύ ή λεχενικό οξύ.

Στη σύγχρονη βιομηχανική πρακτική, το μεγαλύτερο μέρος του παραγόμενου φουμαρικού οξέος προέρχεται από την καταλυτική οξείδωση του βενζολίου. Πιο συγκεκριμένα, το φουμαρικό οξύ παράγεται χημικά από μηλεϊνικό ανυδρίτη, ο οποίος με τη σειρά του παράγεται από το βουτάνιο. Ωστόσο, καθώς οι τιμές του πετρελαίου αυξάνονται ραγδαία, η νέα τάση της επιστήμης είναι η ανεξαρτητοποίηση της παραγωγής του φουμαρικού οξέος από τα παράγωγα του πετρελαίου, με την χρήση της βιοτεχνολογίας, διαδικασίας που ξεκίνησε κατά τη δεκαετία του 1940 αλλά διακόπηκε και αντικαταστάθηκε από πετροχημικές διεργασίες (Roa Engel *et al.*, 2008; Golberg *et al.*, 2006)

##### 1.2 Ιδιότητες και εφαρμογές του φουμαρικού οξέος

Λόγω της δομής του (ένας trans-διπλός δεσμός άνθρακα με δύο ομάδες καρβοξυλίου), το φουμαρικό οξύ έχει πολλές πιθανές βιομηχανικές εφαρμογές (Σχήμα 1.2.1). Δρα ως υλικό εκκίνησης στην βιομηχανία πολυμερισμού και σε αντιδράσεις εστεροποίησης. Τόσο το φουμαρικό οξύ όσο και ο μηλεϊνικός ανυδρίτης χρησιμοποιούνται σήμερα στη σύνθεση ακόρεστων πολυεστερικών ρητινών. Το φουμαρικό οξύ αν και πιο ακριβό, διαθέτει καλύτερες ιδιότητες υποκαθιστώντας τον μηλεϊνικό ανυδρίτη στα σκευάσματα των αλκυδικών ρητινών, συμπεριλαμβανομένης της μεγαλύτερης σκληρότητας στη δομή του πολυμερούς, της μη τοξικής φύσης και της μεγαλύτερης αντοχής. Πρόσφατα, τα παράγωγα φουμαρικού των oligομερών εστέρων, λόγω της μη τοξικότητας και της βιοσυμβατότητάς τους έχουν γίνει πιο ελκυστικά στον τομέα των βιοαποικοδομήσιμων πολυμερών. Επιπλέον, έχει χρησιμοποιηθεί για τη σύνθεση ηλεκτρικού και μηλεϊνικού οξέος.

Ο μη τοξικός χαρακτήρας προώθησε την ευρεία εφαρμογή του φουμαρικού οξέος σε προϊόντα τροφίμων και ποτών από το 1946. Χρησιμοποιείται ως πρόσθετο τροφίμων, δεδομένης της φύσης του, έχει ως αποτέλεσμα μια μακράς διάρκειας όξινη γεύση. Έτσι, η προσθήκη του στα τρόφιμα σε πολύ μικρές ποσότητες, λόγω της πολύ όξινης γεύσης του, μειώνει το κόστος πολλών τροφίμων και ποτών. Σε αντίθεση με άλλα οργανικά οξέα, δεν είναι υγροσκοπικό και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να κρατήσει την υγρασία από σκόνες τροφίμων, όπως σκόνη ψησίματος, μίγματα κέικ, κλπ. Το φουμαρικό οξύ έχει καλή διαλυτότητα σε ζεστό νερό, και χρησιμοποιείται σε ξηρά προϊόντα που προορίζονται για ζεστή προετοιμασία. Επίσης, χρησιμοποιείται στο σιτάρι, προζύμι και ψωμί σίκαλης, σε κατεψυγμένες ζύμες μπισκότων, σε χυμούς φρούτων και ποτών, σε επιδόρπια ζελατίνης, σε γέμιση για πίτες και το κρασί .



Σχήμα 1.2.1: Εφαρμογές της παραγωγής φουμαρικού οξέως. Στα διάφορα περιλαμβάνονται: λιπαντικά, μελάνια, βερνίκια, καρβοξυλικοί παράγοντες για καουτσούκ στυρολίου (Willke and Vorlop, 2004)

Το φουμαρικό οξύ έχει αποδειχθεί ότι είναι ένα ιδιαίτερα αποτελεσματικό πρόσθετο σε ζωοτροφές. Λειτουργεί ως μέσο οξίνισης που μπορεί να αντικαταστήσει τα αντιβιοτικά για να ελαχιστοποιείται η παρουσία των ανθεκτικών στα αντιβιοτικά παθογόνων στο κρέας και τα γαλακτοκομικά προϊόντα. Η προσθήκη φουμαρικού οξέος για την προσαρμογή του pH έχει ως αποτέλεσμα στη βελτίωση της υγείας των ζώων και την αύξηση του σωματικού βάρους τους μέσω ελέγχου των μικροβιακών πληθυσμών στο πεπτικό σύστημα ζώων και σε ζωοτροφές. Μία

άλλη πιθανή εφαρμογή είναι η χρήση του φουμαρικού ως συμπλήρωμα στη διατροφή των βοοειδών (Roa Engel *et al.*, 2008).

Το φουμαρικό οξύ, μαζί με το ηλεκτρικό και το μηλικό οξύ, έχει αναγνωριστεί ως ένα από τα κορυφαία 12 χημικά μόρια που μπορούν να παραχθούν μέσω βιολογικής ή χημικής μετατροπής. Σε σύγκριση με τα άλλα δικαρβοξυλικά οξέα, το φουμαρικό οξύ έχει χαμηλή διαλυτότητα ( $7\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$   $25^\circ\text{C}$ ,  $89\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$   $100^\circ\text{C}$ ) και χαμηλή τιμή pKa (3.03 και 4.44), με αποτέλεσμα να μπορεί να ανακτηθεί ευκολότερα (Roa Engel *et al.*, 2008; Werpy and Petersen, 2004).

### 1.3 Μέθοδοι παραγωγής φουμαρικού οξέος

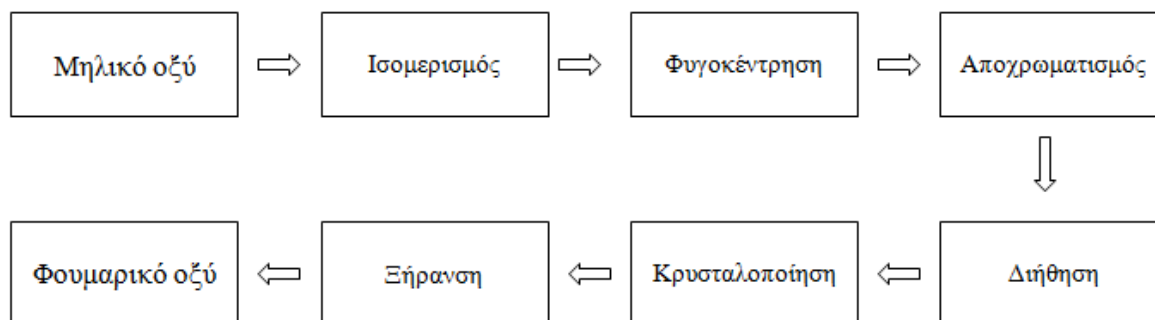
#### 1.3.1 Παραγωγή φουμαρικού οξέος μέσω της πετροχημικής βιομηχανίας

Στη σύγχρονη βιομηχανική πρακτική, το φουμαρικό οξύ παράγεται με ισομερισμό του μηλεϊνικού οξέος, το οποίο παράγεται από μηλεϊνικό ανυδρίτη. Ο μηλεϊνικός ανυδρίτης με τη σειρά του, παράγεται βιομηχανικά μέσω καταλυτικής οξειδωσης κατάλληλων υδρογονανθράκων σε αέρια φάση. Το βενζόλιο χρησιμοποιείται ως βασικό υλικό εκκίνησης, καθώς και από n-βουτανίου ή μίγματα n-βουτανίου-n-βουτενίου. Η αντίδραση οξειδωσης του βουτανίου που παράγει μηλεϊνικό ανυδρίτη και η μετατροπή του μηλεϊνικού ανυδρίτη σε φουμαρικό οξύ είναι:



Το φουμαρικό οξύ μπορεί να ανακτηθεί επιπλέον και ως παραπροϊόν κατά την παραγωγή του μηλεϊνικού ανυδρίτη. Αυτό βελτιώνει την παραγωγή του μηλεϊνικού ανυδρίτη και μετατρέπει το φουμαρικό οξύ σε πολύτιμο προϊόν κατά τη διαδικασία της ανάκτησης. Η οξειδωση του n-βουτανίου χρησιμοποιεί καταλύτες με βάση οξείδια του βαναδίου και του φωσφόρου. Για τον ισομερισμό του μηλεϊνικού οξέος προς φουμαρικό οξύ, διάφοροι τύποι καταλυτών έχουν αναπτυχθεί. Μπορούν να ταξινομηθούν σε τρεις τύπους: ανόργανα οξέα, ενώσεις υπεροξέων με βρωμίδια και ενώσεις που περιέχουν θείο, όπως θειουρία και τα παράγωγά της. Στο σχήμα 1.3.1.1 παρουσιάζει ένα απλοποιημένο διάγραμμα ροής της διαδικασίας. Ο αποχρωματισμός και η διήθηση εφαρμόζονται για την απομάκρυνση των ακαθαρσιών που είναι παρούσες στο διάλυμα. Το φουμαρικό οξύ μπορεί να ανακτηθεί μέσω κρυστάλλωσης, πλύση και ξήρανση με υψηλή καθαρότητα. Ωστόσο, η υψηλή τοξικότητα των καταλυτών, οι συνθήκες παραγωγής και

επιβλαβείς εξατμίσεις δημιουργούνται στη διαδικασία αυτή να προκαλέσει σοβαρή ρύπανση και ανησυχίες για την υγεία. (Roa Engel *et al.*, 2008).



Σχήμα 1.3.1.1: Διάγραμμα ροής παραγωγής φουμαρικού οξέος μέσω ισομερισμού του μηλεϊνικού οξέος (Roa Engel *et al.*, 2008).

### 1.3.2 Ενζυμική μετατροπή μηλεϊνικού οξέος σε φουμαρικό οξύ

Η χημική μετατροπή του μηλεϊνικού οξέος σε φουμαρικό οξύ πραγματοποιείται σε υψηλές θερμοκρασίες με αποτέλεσμα το σχηματισμό παραπροϊόντων και χαμηλή απόδοση σε σχέση με τη θεωρητική (Goto *et al.*, 1998). Αυτό οδήγησε σε έρευνα της ενζυμικής μετατροπής του μηλεϊνικού οξέος σε φουμαρικό οξύ.

Είναι γνωστό ότι η μηλεϊνική ισομεράση (μηλεϊκή cis-trans-ισομεράσης) μετατρέπει το μηλεϊνικό οξύ σε φουμαρικό οξύ. Μικροοργανισμοί που παράγουν μηλεϊνική ισομεράση είναι είδη *Pseudomonas*, *Alcaligenes faecalis*, και *Pseudomonas fluorescens* (Roa Engel *et al.*, 2008). Ωστόσο, η μηλεϊνική ισομεράση είναι ασταθής ακόμη και σε μέτριες θερμοκρασίες και επομένως είναι επιθυμητό ένα σταθερό στη θερμότητα ένζυμο μηλεϊνικής ισομεράσης. Θερμοσταθερή μηλεϊνική ισομεράση παράγεται από τα βακτήρια *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus brevis* και *Bacillus sp. MI-105* όπως έχουν αναφερθεί από τους Goto *et al.* (1998) Σύμφωνα με τους συγγραφείς, η χρήση των ενζύμων από αυτά τα βακτήρια μπορεί να βελτιώσει τη διαδικασία παραγωγής του φουμαρικού οξέος.

Επιπλέον, σε μια πιο πρόσφατη μελέτη χρησιμοποιώντας το βακτήριο *Pseudomonas alcaligenes* XD-1, αναφέρθηκαν υψηλά ποσοστά μετατροπής μηλεϊνικού οξέος σε φουμαρικό οξύ ( $6,98 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) (Nakajima-Kambe *et al.*, 1997). Αυτός ο μικροοργανισμός συνήθως δεν

παράγει φουμαρικό οξύ, αλλά με θερμική κατεργασία των κυττάρων (70 °C για 1 ώρα) η δραστηριότητα της φουμαράσης μειώνεται, η οποία είναι υπεύθυνη για τη μετατροπή του φουμαρικού οξέος σε L-μηλικό οξύ. Επιπλέον, όταν ιόντα ασβεστίου προστέθηκαν κατά τη διάρκεια της μετατροπής, παρατηρήθηκε αυξημένη θερμική σταθερότητα της μηλεϊνικής ισομεράσης. Με τη χρήση του βακτηρίου *Pseudomonas alcaligenes* XD-1, η υψηλότερη απόδοση μετατροπής (95 %) επιτεύχθηκε με τη μετατροπή του μηλεϊνικού οξέος προς φουμαρικό οξύ (Ichikawa *et al.*, 2003; Roa Engel *et al.*, 2008)

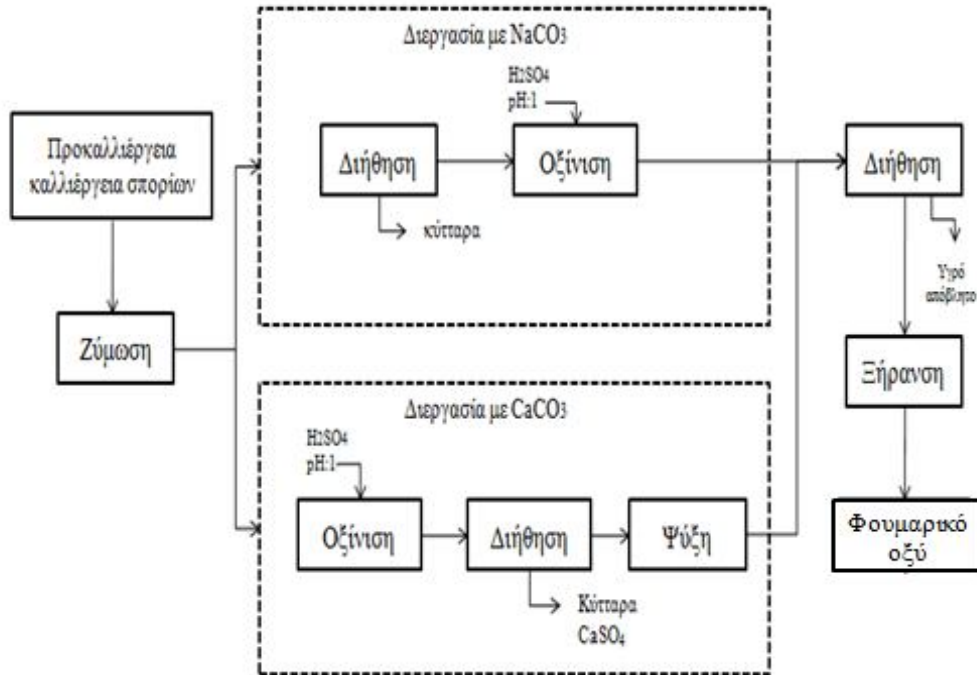
#### **1.4 Βιοτεχνολογική παραγωγή φουμαρικού οξέος μέσω μικροβιακών ζυμώσεων**

Η μικροβιακή παραγωγή του φουμαρικού οξέος περιορίζεται κυρίως στη χρησιμοποίηση μυκηλιακών μυκήτων. Η παραγωγή φουμαρικού οξέος παρατηρήθηκε για πρώτη φορά με τον μύκητα *Rhizopus nigricans* από τον Ehrlich το 1911. Κατά τη διάρκεια της δεκαετίας του 1940 και πριν από την άνοδο της πετροχημικής βιομηχανίας, το φουμαρικό οξύ παραγόταν από σάκχαρα μέσω ζύμωσης με τον μύκητα *Rhizopus arrhizus* (Rhodes *et al.*, 1959; Goldberg *et al.*, 2006). Οι Foster και Waksman μελέτησαν 41 στελέχη μυκητών από οκτώ γένη της κλασης Mucorales με σκοπό την εύρεση στελεχών για την επίτευξη υψηλής παραγωγής φουμαρικού οξέος. Μεταξύ των στελεχών, τα είδη *Rhizopus nigricans*, *Rhizopus arrhizus*, *Rhizopus oryzae* και *Rhizopus formosa* είχαν τη δυνατότητα να παράγουν φουμαρικό οξύ υπό αερόβιες και αναερόβιες συνθήκες (Zhang *et al.*, 2012; Rhodes *et al.*, 1959; Cao *et al.*, 1996; Carta *et al.*, 1999).

Το σχήμα 1.4.1 δείχνει το διάγραμμα ροής της για τη ζύμωση και την επακόλουθη διεργασία ανάκτησης που χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία για την παραγωγή φουμαρικού οξέος μέσω ζύμωσης (Gangl *et al.*, 1990). Σε γενικές γραμμές, η διαδικασία ζύμωσης περιλαμβάνει δύο στάδια: την παρασκευή καλλιέργειας σπορίων και την παραγωγή οξέος. Η καλλιέργεια των σπορίων διαρκεί 24 ώρες και στη συνέχεια τα κύτταρα συλλέγονται και μεταφέρονται σε βιοαντιδραστήρα για την παραγωγή φουμαρικού οξέος. Η διαδικασία ανάκτησης εξαρτάται από τον παράγοντα εξουδετέρωσης που χρησιμοποιείται κατά τη διάρκεια της ζύμωσης. Κατά τη διαδικασία με χρήση  $\text{CaCO}_3$ , το υγρό της ζύμωσης που περιέχει φουμαρικό ασβέστιο, τα μυκήλια και  $\text{CaCO}_3$  οξινίζεται με  $\text{H}_2\text{SO}_4$  σε pH 1.0. Μετά από διήθηση για απομάκρυνση των αδιάλυτων σωματιδίων (μυκηλίων και  $\text{CaSO}_4$ ), το διήθημα ψύχεται για την ανάκτηση του φουμαρικού οξέος ως ίζημα μέσω κρυστάλλωσης. Όταν χρησιμοποιείται ως παράγοντας



εξουδετέρωσης το  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , το υγρό της ζύμωσης αρχικά διηθείται για να απομακρυνθούν τα κύτταρα και στη συνέχεια οξινίζεται για την ανάκτηση των κρυστάλλων του φουμαρικού οξέος. Αυτή η διαδικασία είναι απλούστερη, καθώς δεν παράγεται ως στερεό απόβλητο  $\text{CaSO}_4$ .



Σχήμα 1.4.1: Διάγραμμα ροής παραγωγής φουμαρικού οξέος μέσω ζύμωσης (Gang *et al.*, 1990)

Η συμβατική βιομηχανική διαδικασία ζύμωσης για την παραγωγή φουμαρικού οξέος έγινε δυσμενής λόγω του υψηλού κόστους παραγωγής που μπορεί να αποδοθεί στην υψηλή τιμή της γλυκόζης (σε σύγκριση με την τιμή του πετρελαίου) και η σχετικά χαμηλή απόδοση του προϊόντος ( $< 85\% \text{ w/w}$ ), της συγκέντρωσης ( $< 70 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ), και της παραγωγικότητας ( $< 1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ ). Ωστόσο, η αύξηση των τιμών του πετρελαίου, οι περιβαλλοντικές ανησυχίες και οι απαιτήσεις για τα πράσινα και βιώσιμα προϊόντα έχουν προωθήσει την μελέτη παραγωγής φουμαρικού οξέος μέσω ζυμώσεων. Τα τελευταία χρόνια, έχουν υπάρξει σημαντικές ερευνητικές προσπάθειες για τη βελτίωση και τη βελτιστοποίηση της διαδικασίας ζύμωσης σε εργαστηριακή κλίμακα, συμπεριλαμβανομένης της επιλογής διαφορετικών ειδών και στελεχών *Rhizopus*, βελτιστοποιώντας τις συνθήκες ζύμωσης και τη σύνθεση θρεπτικού μέσου, με τη χρήση φθηνότερων πρώτων υλών βιομάζας, καθώς και την ανάπτυξη νέων βιοαντιδραστήρων, μεθόδους διαχωρισμού και ολοκληρωμένες διαδικασίες ζύμωσης διαχωρισμού.

Στον Πίνακα 1.4.1 συνοψίζονται και συγκρίνονται τα αποτελέσματα από μελέτες που χρησιμοποιούν διάφορα είδη *Rhizopus* και υποστρώματα. Όπως παρατηρείται, η παραγωγή φουμαρικού οξέος διαφέρει ανάλογα με το είδος του μικροοργανισμού, το υπόστρωμα καθώς και από τις συνθήκες ζύμωσης. Η υψηλότερη συγκέντρωση φουμαρικού οξέος ( $130 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) και απόδοση ( $1,0 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$ ) επιτυγχάνεται με τον έλεγχο του pH με  $\text{CaCO}_3$  και τον έλεγχο του οξυγόνου στο 30% -80% κατά τη διάρκεια της ζύμωσης (Ling and Ng, 1989), ενώ η υψηλότερη παραγωγικότητα ( $4,25 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ ) παρατηρήθηκε σε ζύμωση με ακινητοποιημένα κύτταρα και με τον ταυτόχρονο διαχωρισμό του προϊόντος μέσω προσρόφησης (Cao *et al.*, 1996).

Πίνακας 1.4.1: Παραγωγής φουμαρικού οξέος σε διάφορα υποστρώματα και συστήματα καλλιέργειας με στελέχη *Rhizopus*

Στέλεχος	Σύστημα καλλιέργειας	Υπόστρωμα	Φουμαρικό ( $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )	$Y^{\dagger}$ ( $\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ )	$P^{\dagger\dagger}$ ( $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ )	Αναφορά
<i>R. oryzae</i> ATCC 20344	RBC <sup>†††</sup> with Adsorption	γλυκόζη	92	0,85	4,25	Cao <i>et al.</i> , 1996
	RBC <sup>†††</sup>	γλυκόζη	74	0,75	3,78	Cao <i>et al.</i> , 1997
	Airlift loop reactor	γλυκόζη	37,8	75,4	0,81	Du <i>et al.</i> , 1997
	2L fermentor	γλυκόζη	30,21	0,28	-	Roa Engel <i>et al.</i> , 2011
<i>R. arrhizus</i> NRRL 1526	shake flasks	γλυκόζη	97,7	0,82	-	Kenealy <i>et al.</i> , 1986
	repeated batch	μελάσα	16,37	0,48	0,34	Petruccioli <i>et al.</i> , 1996
	3L fermentor	γλυκόζη	130	1	0,92	Ning and Ng, 1989
<i>R. oryzae</i> ME-F12	stirred-tank reactor	γλυκόζη	56,2	0,54	0,7	Fu <i>et al.</i> , 2010
<i>R. arrhizus</i> RH-07-13	shake flasks	γλυκόζη	31,23	0,35	1,33	Gu <i>et al.</i> , 2013
<i>R. oryzae</i> RUR709	stirred-tank reactor	γλυκόζη	32,1	0,45	0,32	Kang <i>et al.</i> , 2010
<i>R. fusants</i>	Microplate	γλυκερόλη	4,1	0,29	-	Kordowska <i>et al.</i> , 2012
<i>R. arrhizus</i> TKK204-1-1	shake flasks	ξυλόζη	15,3	0,23	0,07	Kautola & Linko, 1989
<i>R. arrhizus</i> NRRL 2582	shake flasks	μελάσα	90	0,68	0,53	Rhodes <i>et al.</i> , 1959
	20 L fermentor	γλυκόζη	100	0,91	1,67	Rhodes <i>et al.</i> , 1962
	2L fermentor	γλυκόζη	73,3	0,72	0,5	Gangl <i>et al.</i> , 1990
<i>R. nigricans</i>	shake flasks	χυμός μήλου	31,3	-	0,23	Podgórska <i>et al.</i> , 2004
<i>R. formosa</i> 28422	stirred tank	μπαγκάσσα	21,28	-	-	Carta <i>et al.</i> , 1999

<sup>†</sup> απόδοση παραγόμενου φουμαρικού οξέος ανά καταναλωθέν υπόστρωμα

<sup>††</sup> παραγωγικότητα φουμαρικού οξέος

<sup>†††</sup> Rotary biofilm contactor

### 1.5 Βιομηχανικές εφαρμογές του γένους *Rhizopus*

Το γένος *Rhizopus* spp, όπου ανήκει στην τάξη των *Zygomycota*, έχει εκτενείς βιομηχανικές εφαρμογές. Έχει μελετηθεί για τη δυνατότητα παραγωγής οξέων, αιθανόλης και ενός ευρύ φάσματος εμπορικών ενζύμων. Τα είδη *R. arrhizus* και *R. oryzae* έχουν μελετηθεί εκτενώς για την παραγωγή φουμαρικού οξέος. Όπως παρατηρείται στον πίνακα 1.4.1 της προηγούμενης ενότητας, το στελέχος *R. arrhizus* NRRL 2582 παρουσιάζει τη μεγαλύτερη απόδοση, ενώ *R. oryzae* ATCC 20344 έχει την υψηλότερη παραγωγικότητα.

Σε καλλιέργειες υπό αερόβιες συνθήκες, ορισμένα στελέχη του *R. oryzae* παράγουν φουμαρικό οξύ, ενώ άλλα, παράγουν L-γαλακτικό οξύ ως κύριο μεταβολικό προϊόν. Κάτω από αναερόβιες συνθήκες, τα στελέχη αυτά παράγουν περισσότερο αιθανόλη, αντί οργανικών οξέων. Ανάλογα με την παραγωγή του οργανικού οξέος κατά τη διάρκεια της αερόβιας ζύμωσης, τα στελέχη *R. oryzae* μπορούν να ταξινομηθούν σε δύο ομάδες: 1) παραγωγοί γαλακτικού οξέος που περιέχουν γονίδια που κωδικοποιούν στη σύνθεση αφυδρογονάσης γαλακτικού (*ldhA* και *ldhB*), και 2) παραγωγοί φουμαρικού-μηλικού οξέος που περιέχουν γονίδια που κωδικοποιούν στη σύνθεση αφυδρογονάσης γαλακτικού *ldhB* (Abe *et al.*, 2003; Saito *et al.*, 2004).

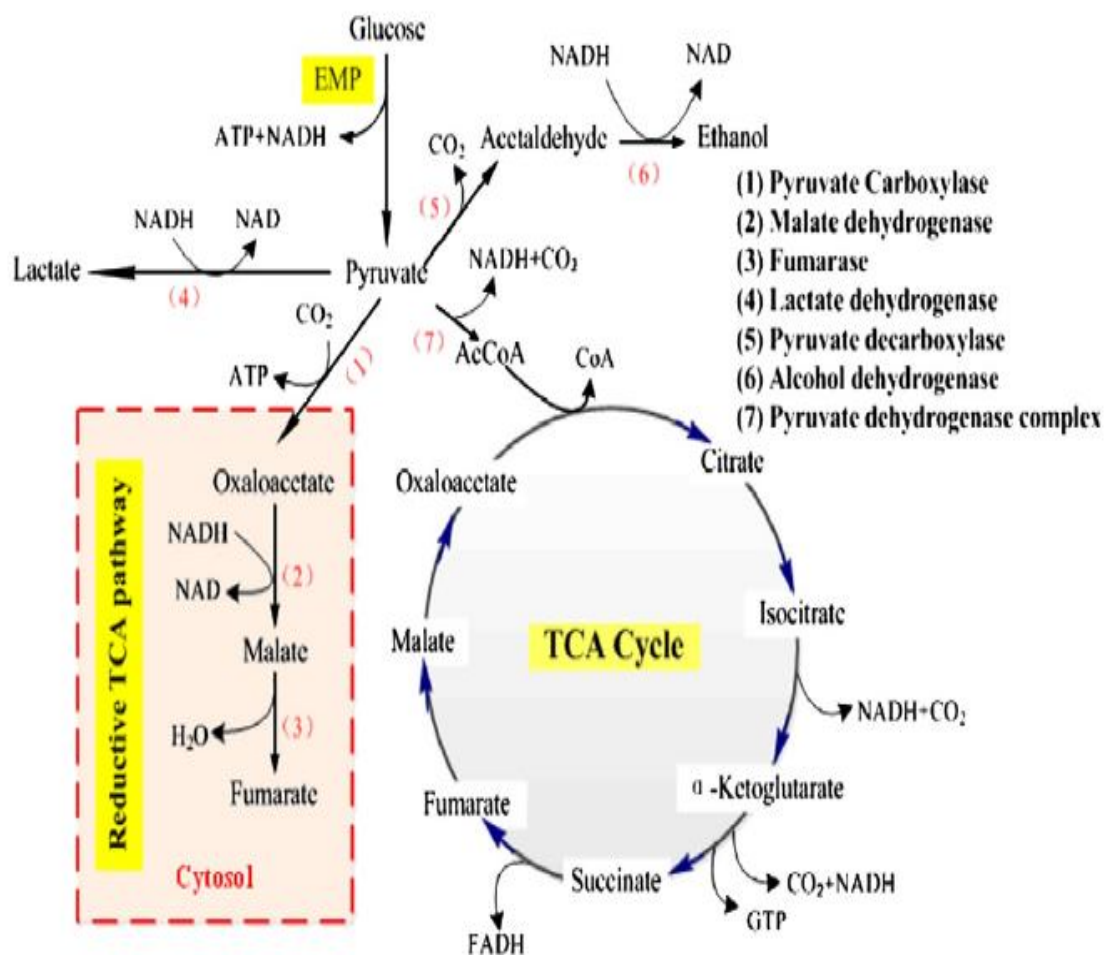
### 1.6 Μεταβολικό μονοπάτι παραγωγής φουμαρικού οξέος

Το φουμαρικό οξύ είναι κατά κύριο λόγο ένα ενδιάμεσο προϊόν του κύκλου του κιτρικού οξέος, αλλά εμπλέκεται και σε άλλα μεταβολικά μονοπάτια. Μέσω του οξειδωτικού μονοπατιού του κύκλου του κιτρικού οξέος η απόδοση του φουμαρικού αντιστοιχεί σε 1 mole ανά mole καταναλωθείσας γλυκόζης. Κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης των κυττάρων όμως, αυτή η οδός δεν μπορεί να οδηγήσει σε σημαντική βιοσύνθεση φουμαρικού οξέος. Με βάση μελέτες με τη χρήση ραδιενεργού άνθρακα,  $^{13}\text{C}$  και την ανίχνευση με τη βοήθεια πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) και τον προσδιορισμό ενζυμικής δραστηριότητας, η αναγωγική οδός του κύκλου του κιτρικού οξέος εμπλέκεται για στη βιοσύνθεση του φουμαρικού οξέος. Μέσω αυτής της οδού η μέγιστη θεωρητική απόδοση φουμαρικού οξέος αντιστοιχεί σε 2 moles φουμαρικού οξέος ανά mole γλυκόζης σύμφωνα με την αντίδραση:



Ωστόσο, οι πειραματικές αποδόσεις είναι χαμηλότερες καθώς η παραγωγή ενέργειας υπό μορφή ATP ή GTP μέσω του οξειδωτικού TCA κύκλου χρησιμοποιείται για βασικές διεργασίες ανάπτυξης και συντήρησης των κυττάρων.

Τα κύρια ένζυμα που εμπλέκονται στη δέσμευση CO<sub>2</sub> και την παραγωγή φουμαρικού οξέος στον μύκητα *Rhizopus* είναι τρία και το πυροσταφυλικό οξύ είναι το πιο σημαντικό ενδιάμεσο προϊόν. Η καρβοξυλίωση του πυροσταφυλικού οξέος είναι το πρώτο ένζυμο του αναγωγικού μονοπατιού του κύκλου TCA και βρίσκεται αποκλειστικά στο κυτταρόπλασμα, όπου καταλύει την καρβοξυλίωση του πυροσταφυλικού οξέος σε οξαλοξικό οξύ με τη κατανάλωση CO<sub>2</sub> και την παραγωγή ATP. Το οξαλοξικό οξύ στη συνέχεια μετατρέπεται σε μηλικό οξύ από την αφυδρογονάση του μηλικού οξέος και στη συνέχεια σε φουμαρικό οξύ από τη φουμαράση. Η αφυδρογονάση του μηλικού οξέος και η φουμαράση βρίσκονται και στο κυτταρόπλασμα και στα μιτοχόνδρια (Xu *et al.*, 2012; Kenealy *et al.*, 1986; Goldberg *et al.*, 2006) Η μεταβολική οδός σύνθεσης του φουμαρικού οξέος απεικονίζεται στο σχήμα 1.6.1.



Σχήμα 1.6.1: Μεταβολική οδός σύνθεσης φουμαρικού οξέος (Xu *et al.*, 2012)

### **1.7 Υποστρώματα κατάλληλα για την παραγωγή φουμαρικού οξέος με τη χρήση στελεχών του μύκητα *Rhizopus spp.***

Το γένος *Rhizopus spp* έχει την ικανότητα να καταναλώνει ευρύ φάσμα πηγών άνθρακα όπως γλυκόζη, μανόζη, σακχαρόζη, ξυλόζη και κελοβιόζη. Δεδομένης αυτής της ικανότητας έχει μελετηθεί η παραγωγή φουμαρικού οξέος με τη χρήση γλυκόζης, ξυλόζης, σακχαρόζης καθώς και αμυλούχων υποστρωμάτων. Η χρήση της γλυκόζης ως πηγής άνθρακα έχει δώσει τα καλύτερα αποτελέσματα (έως  $130 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  και  $4,25 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$  συγκέντρωση και παραγωγικότητα φουμαρικού οξέος, αντίστοιχα). Η ξυλόζη έχει μελετηθεί και ως πηγή άνθρακα σε ακινητοποιημένο γενετικά τροποποιημένο στέλεχος *R. arrhizus*, αλλά η υψηλότερη παραγωγικότητα ήταν  $0,087 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$  (Kautola και Linko, 1989). Επίσης, η σακχαρόζη έχει αξιοποιηθεί ως πρώτη ύλη για την παραγωγή φουμαρικού οξέος (Kautola and Linko, 1989; Zhang *et al.*, 2007), αλλά μειονεκτεί στον μεταβολισμό από τα στελέχη *R. oryzae* σε σύγκριση με τη γλυκόζη (Roa Engel *et al.*, 2008).

Πρώτες ύλες με βάση το άμυλο έχουν επίσης μελετηθεί για την παραγωγή φουμαρικού οξέος. Αλεύρι πατάτας χρησιμοποιήθηκε ως πρώτη ύλη με τον μύκητα *R. arrhizus* και παρατηρήθηκε φουμαρικό οξύ ως το κύριο μεταβολικό προϊόν αλλά με παραγωγικότητα μόνο  $0,35 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$  (Moresi *et al.*, 1991). Επιπλέον, υψηλές αποδόσεις φουμαρικού οξέος παρατηρήθηκαν από προϊόντα χημικής υδρόλυσης με βάση το άμυλο (Moresi *et al.*, 1992). Οι Carta *et al.* (1999) βελτιστοποίησαν την παραγωγή φουμαρικού οξέος του στελέχους *R. formosa* MUCL 28422 με τη χρήση υδρολυμένων υπολειμμάτων ζαχαροκάλαμου. Η παραγωγικότητα δεν βελτιώθηκε σε σχέση με τις αντίστοιχες ζυμώσεις με βάση τη γλυκόζη, αλλά το γεγονός ότι αυτές οι πρώτες ύλες είναι φτηνές και άφθονες καθιστά τις ζυμώσεις οικονομικά ελκυστικότερες (Roa Engel *et al.*, 2008).

### **1.8 Επίδραση μορφολογίας του μύκητα *Rhizopus* στην παραγωγή φουμαρικού οξέος**

Η μορφολογία του μύκητα *Rhizopus* ποικίλλει ανάλογα με τις συνθήκες ανάπτυξης (θρεπτικό μέσο, pH, θερμοκρασία και ρυθμός ανάδευσης), το στέλεχος και το μέγεθος του εμβολίου. Οι μυκηλιακοί μύκητες μπορούν να εμφανίζουν διάφορες μορφολογίες όπως: συσσωματώματα (clumps), σφαιρίδια (pellets) και νημάτια (filaments). Η μυκηλιακή μορφολογία αυξάνει το ιξώδες και επηρεάζει αρνητικά τη μεταφορά μάζας, ενώ η μορφολογία συσσωματωμάτων υστερεί λόγω χαμηλής μεταφοράς  $\text{O}_2$ . Η μορφολογία των σφαιριδίων (pellets) είναι επιθυμητή

για τις ζυμώσεις λόγω του χαμηλότερου ιξώδους και την καλύτερη μεταφορά μάζας. Ωστόσο, το μέγεθος των σφαιριδίων επηρεάζει την παραγωγή καθώς μεγάλα σε μέγεθος σφαιρίδια επηρεάζουν αρνητικά την παραγωγή φουμαρικού οξέος. Ως εκ τούτου, μικρά σφαιρίδια με διάμετρο περίπου 1 mm ή μικρότερο είναι προτιμότερα για τις ζυμώσεις προς παραγωγή φουμαρικού οξέος με στελέχη *Rhizopus* (Zhou *et al.*, 2000; Papagianni, 2004; Liao *et al.*, 2007a ; Liao *et al.*, 2007b; Zhou *et al.*, 2011; Zhang, 2012).

### **1.9 Θρεπτικό μέσο για τη ζύμωση προς παραγωγή φουμαρικού οξέος**

Η συσσώρευση του φουμαρικού οξέος συμβαίνει όταν τα κύτταρα του μύκητα καλλιεργούνται υπό περιορισμό ενός θρεπτικού συστατικού, όπως η καλλιέργεια του μικροοργανισμού σε περιβάλλον με περίσσεια πηγής άνθρακα και περιορισμό σε άζωτο ή φώσφορο (Riscaldati *et al.*, 2000). Όταν το μέσο περιέχει επαρκή πηγή αζώτου, η πηγή άνθρακα χρησιμοποιείται για την κυτταρική ανάπτυξη αντί για τη βιοσύνθεση φουμαρικού οξέος. Έτσι, ο λόγος της πηγής άνθρακα (C) προς την πηγή του αζώτου (N) που υπάρχει στο μέσο της καλλιέργειας είναι ο πιο σημαντικός παράγοντας στην ζύμωση.

Χρήση θρεπτικού μέσου απουσίας αζώτου έχει επίσης εφαρμοστεί με επιτυχία για επίτευξη υψηλής παραγωγής φουμαρικού οξέος. Ωστόσο, τα κύτταρα χάνουν την παραγωγικότητά τους με την πάροδο του χρόνου όταν καλλιεργούνται υπό συνθήκες απουσίας αζώτου. Επίσης, η αναστολή της παραγωγής μπορεί να συμβεί όταν η πηγή άνθρακα είναι πάρα πολύ υψηλή. Ο ρυθμός κατανάλωσης του υποστρώματος μειώνεται όταν η συγκέντρωση σακχάρου υπερβαίνει το 10% (w/v). Η παραγωγή του φουμαρικού οξέος μπορεί επίσης να επηρεαστεί από τον τύπο της πηγής αζώτου που χρησιμοποιείται στο μέσο. Η χρήση οργανικού αζώτου, όπως εκχύλισμα ζύμης, προάγει την ανάπτυξη των κυττάρων με μικρή συσσώρευση φουμαρικού οξέος, ενώ ανόργανη πηγή αζώτου, όπως  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , είναι προτιμότερη για την παραγωγή φουμαρικού οξέος (Ling και Ng, 1989). Εκτός από τις καλλιέργειες με περιορισμό αζώτου μπορούν να εφαρμοστεί και περιορισμός σε φωσφόρο για την παραγωγή φουμαρικού οξέος (Riscaldati *et al.*, 2000).

Ιχνοστοιχεία ή βαρέα μέταλλα διαδραματίζουν επίσης έναν σημαντικό ρόλο στην παραγωγή φουμαρικού οξέος δεδομένου ότι μεταλλικά ιόντα, συμπεριλαμβανομένου των  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ , είναι συμπαράγοντες ή ενεργοποιητές για ορισμένα ένζυμα που εμπλέκονται στον κεντρικό μεταβολισμό και τη βιοσύνθεση μακρομορίων (DNA, RNA). Επιπλέον, η προσθήκη

ιχνοστοιχείων στο μέσο της ζύμωσης επηρεάζει τη μορφολογία των κυττάρων, η οποία έχει σημαντικές επιπτώσεις στη ζύμωση (Rhodes *et al.*, 1958).

Άλλα θρεπτικά συστατικά όπως βιταμίνες μπορούν επίσης να επηρεάσουν τη ζύμωση. Πολλές βιταμίνες χρησιμεύουν ως συνένζυμα ή συμπράγοντες ενζύμου και παίζουν σημαντικό ρόλο στο μεταβολισμό των κυττάρων και τη βιοσύνθεση. Για παράδειγμα, η βιοτίνη είναι απαραίτητη για την κυτταρική ανάπτυξη και το μεταβολισμό των λιπιδίων και των αμινοξέων. Η βιοτίνη είναι επίσης ο ενεργοποιητής της πυροσταφυλικής καρβοξυλάσης, η οποία καταλύει την συμπύκνωση του πυροσταφυλικού με CO<sub>2</sub>. Η δέσμευση του CO<sub>2</sub> είναι το βασικό βήμα που οδηγεί στην βιοσύνθεση φουμαρικού οξέος. Αν και υπήρχαν λίγες μελέτες προσθήκης βιταμινών στο μέσο της καλλιέργειας, η προσθήκη πρώτων υλών πλούσια σε βιταμίνες, έχει αποδειχθεί ευεργετική για την παραγωγή φουμαρικού οξέος.

Η προσθήκη μεθανόλης επίσης έχει αποδειχθεί ότι είναι ευεργετική για την παραγωγή φουμαρικού οξέος (Petruccioli *et al.*, 1996; Rhodes *et al.*, 1958) καθώς ενισχύει την διαπερατότητα της κυτταρικής μεμβράνης. Επίσης, η ελαφρά τοξικότητα της μεθανόλης μειώνει την ανάπτυξη των κυττάρων και συνεπώς βελτιστοποιείται η παραγωγή του οξέος. Μια μικρή ποσότητα τρυγικού οξέος έχει επίσης προστεθεί στο μέσο της ζύμωσης σε μερικές μελέτες. Ωστόσο, δεν είναι σαφές εάν και πώς το τρυγικό οξύ μπορεί να επηρεάσει την κυτταρική ανάπτυξη και την παραγωγή φουμαρικού οξέος (Rhodes *et al.*, 1958).

### **1.10 Επιδράσεις του pH και διαλυμένου οξυγόνου στη ζύμωση προς παραγωγή φουμαρικού οξέος**

Όπως συζητήθηκε νωρίτερα, η βιοσύνθεση φουμαρικού οξέος περιλαμβάνει τη δέσμευση CO<sub>2</sub> για τη μετατροπή του πυροσταφυλικού οξέος σε οξαλοξικό οξύ (reductive TCA pathway). Προσθήκη CaCO<sub>3</sub>, το οποίο συνήθως χρησιμοποιείται ως παράγοντας εξουδετέρωσης για τη διατήρηση του pH του θρεπτικού μέσου γύρω στο 6.0, είναι επωφελής για την ζύμωση φουμαρικού οξέος. Η αντίδραση μεταξύ CaCO<sub>3</sub> και φουμαρικού οξέος απελευθερώνει CO<sub>2</sub>, το οποίο μπορεί να χρησιμοποιηθεί στην αντίδραση για το σχηματισμό οξαλοξικού οξέος από πυροσταφυλικό. Με την επαρκή παροχή του CO<sub>2</sub>, η μέγιστη θεωρητική απόδοση του φουμαρικού οξέος ανά γλυκόζη είναι 2 mol/ mol. Αν δεν υπάρχει εξωτερική προσθήκη CO<sub>2</sub> και το CO<sub>2</sub> παράγεται μόνο από τον κύκλο του κιτρικού οξέος (TCA), η μέγιστη θεωρητική απόδοση μειώνεται σε 1.5 mol/ mol (Roa Engel *et al.*, 2008).

Ωστόσο, υπάρχουν αρκετά ζητήματα που περιορίζουν τη βιομηχανική χρήση του. Αρχικά, το φουμαρικό ασβέστιο έχει χαμηλή διαλυτότητα  $21 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  (στους  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ ) και δημιουργεί ίζημα στο υγρό της ζύμωσης. Το προϊόν μαζί με τα κύτταρα, σχηματίζουν ένα ιξώδες υγρό, έχουν ως αποτέλεσμα να επηρεάζουν αρνητικά την ανάμιξη και τη μεταφορά μάζας στη ζύμωση. Επιπλέον, η προσθήκη θειικού οξέος στον υγρό της ζύμωσης για την εξουδετέρωση της περίσσειας του  $\text{CaCO}_3$  και την ανάκτηση του φουμαρικού οξέος, παράγει  $\text{CaSO}_4$ , ένα υποπροϊόν με μικρή χρήση που προκαλεί ρύπανση του περιβάλλοντος.

Άλλοι παράγοντες εξουδετέρωσης, όπως  $\text{Ca(OH)}_2$ ,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{NaHCO}_3$  και  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ , έχουν χρησιμοποιηθεί για τη ρύθμιση του pH της ζύμωσης. Ωστόσο, η απόδοση και η παραγωγικότητα είναι χαμηλότερη σε σύγκριση με τη χρήση  $\text{CaCO}_3$ . Αυτό συμβαίνει επειδή το  $\text{Ca(OH)}_2$  έχει χαμηλή διαλυτότητα στο νερό, ενώ υψηλή συγκέντρωση του  $\text{Na}^+$  ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) μπορεί να επηρεάσει αρνητικά το μεταβολισμό των κυττάρων. Επιπλέον, το φουμαρικό νάτριο έχει σχετικά υψηλή διαλυτότητα στο νερό και υψηλή συγκέντρωση θα μπορούσε να προκαλέσει αναστολή της παραγωγής του προϊόντος και μείωση της παραγωγής φουμαρικού οξέος (Gangl *et al.*, 1990; Zhou *et al.*, 2002).

Η διαδικασία της ζύμωσης χωρίς τη χρήση παράγοντα εξουδετέρωσης έχει προταθεί από τους Cao *et al* (1996). Συγκεκριμένα, το pH της ζύμωσης μπορεί να ελεγχθεί μέσω της απομάκρυνσης του φουμαρικού οξέος κατά τη διάρκεια της ζύμωσης, χωρίς τη χρήση ενός παράγοντα εξουδετέρωσης (Cao *et al.*, 1996).

Το φουμαρικό οξύ όπως αναφέρθηκε προηγουμένως παράγεται κυρίως υπό αερόβιες συνθήκες. Συνεπώς, σημαντικός παράγοντας αποτελεί το επίπεδο διαλυμένου οξυγόνου (DO). Καθώς η διαλυτότητα του οξυγόνου στο νερό είναι χαμηλή ( $40 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  στους  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ) απαιτείται συνεχής αερισμός και ανάδευση έτσι ώστε να διατηρηθεί υψηλό το επίπεδο διαλυμένου οξυγόνου (DO) και αυξημένος ρυθμός μεταφοράς οξυγόνου (OTR) για την ανάπτυξη των κυττάρων και το μεταβολισμό. Για τους συμβατικούς βιοαντιδραστήρες, υψηλότερες ταχύτητες ανάδευσης διευκολύνουν την παροχή αερίου, (όπου διασπάται σε μικρότερες φυσαλίδες), και έτσι επιτυγχάνεται αυξημένος ρυθμός μεταφοράς οξυγόνου (OTR) και αύξηση της παραγωγής του φουμαρικού οξέος.

Δεδομένου του γεγονότος ότι πολύ υψηλή συγκέντρωση διαλυμένου οξυγόνου (DO) οδηγεί σε μεγαλύτερη ανάπτυξη των κυττάρων σε βάρος της παραγωγής του φουμαρικού οξέος (Ling and



Ng, 1989), οι Fu *et al.* (2010) πρότειναν ένα σύστημα έλεγχου του διαλυμένου οξυγόνου. Συγκεκριμένα, το διαλυμένο οξυγόνο διατηρείται στο 80% κατά τις πρώτες 18 ώρες και στη συνέχεια μειώνεται στο 30% με αποτέλεσμα την αύξηση τόσο της απόδοσης του φουμαρικού οξέος όσο και της παραγωγικότητα σε σύγκριση με όταν το DO διατηρείται σε σταθερό επίπεδο (Fu *et al.*, 2010).

## Σκοπός της μελέτης

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η μελέτη στελεχών μυκήτων του γένους *Rhizopus* για τη βιοτεχνολογική παραγωγή φουμαρικού οξέος. Δεδομένου του γεγονότος ότι περισσότεροι ερευνητές έχουν ασχοληθεί με την αξιοποίηση της γλυκόζης ως υπόστρωμα για την βιοτεχνολογική παραγωγή του φουμαρικού οξέος, κρίθηκε σκόπιμη η συγκριτική αξιολόγηση 5 διαφορετικών στελεχών του γένους *Rhizopus* ως προς την ικανότητα να αξιοποιούν διαφορετικά υποστρώματα για την παραγωγή φουμαρικού οξέος. Συγκεκριμένα τα υποστρώματα που μελετήθηκαν ήταν εμπορική σακχαρόζη, ισομοριακό μείγμα γλυκόζης:φρουκτόζης, γλυκερόλη, μελάσα και υδρολυμένη μελάσα.

## 2. Υλικά και μέθοδοι

### 2.1 Βιολογικό υλικό

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν 5 στελέχη του μύκητα *Rhizopus* spp. από τη συλλογή καλλιιεργειών NRRL για την βιοτεχνολογική παραγωγή φουμαρικού οξέος και συγκεκριμένα τα στελέχη: *R. delemar* NRRL 1472, *R. oryzae* NRRL 1526, *R. arrhizus* NRRL 2582, *R. oryzae* NRRL 3562 και *R. oryzae* NRRL 3563.

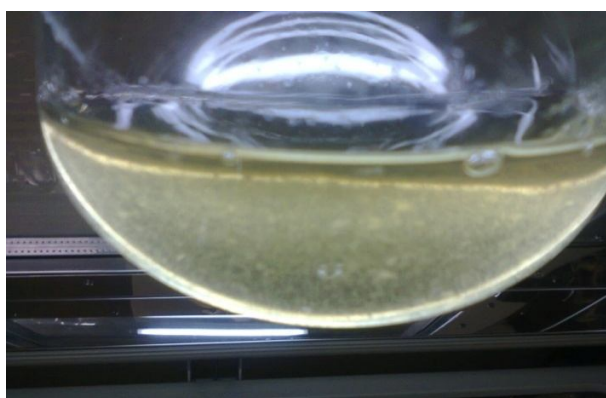
### 2.2 Παρασκευή υγρού εμβολίου

Τα στελέχη αρχικά καλλιεργήθηκαν σε κεκλιμένους σωλήνες πεπληρωμένους με θρεπτικό υλικό PDA (Potato Dextrose Agar, LabM) στους 30 °C για 6 ημέρες. Στη συνέχεια, ακολούθησε η διαδικασία παραγωγής σπορίων σε κωνικές φιάλες των 250 mL πληρωμένες με 50 mL θρεπτικό υλικό με σύνθεση 20 g·L<sup>-1</sup> ηλίόπιτα, 30 g·L<sup>-1</sup> πίτουρο σίτου και 20 g·L<sup>-1</sup> άγαρ (LAbM). Συγκεκριμένα, στους κεκλιμένους σωλήνες προστέθηκαν 5 mL απιονισμένου νερού που περιείχε γαλακτωματοποιητή Tween, 800,01%(v/v), προς επίτευξη ομοιόμορφης διασποράς των σπορίων του μύκητα, και στη συνέχεια 2 mL από το εναιώρημα σπορίων που είχε δημιουργηθεί σε κάθε σωλήνα, μεταγγιζόταν σε κάθε μία από τις κωνικές φιάλες και ακολούθησε επώαση στους 30 °C για 3- 4 ημέρες (εικόνα 2.2.1). Για την παραλαβή των σπορίων, τέλος, ακολούθησε έκπλυση των σπορίων με αποστειρωμένο απιονισμένο νερό που περιείχε γαλακτωματοποιητή Tween, 800,01%(v/v), και το εναιώρημα σπορίων συλλέχθηκε και αποθηκεύτηκε σε φιαλίδια (cryovials) με γλυκερόλη στους -20 °C.



Εικόνα 2.2.1: Ανάπτυξη των σπορίων των στελεχών *Rhizopus*.

Τα φιαλίδια που περιείχαν το εναιώρημα σπορίων χρησιμοποιήθηκαν για τον εμβολιασμό της καλλιέργειας εκβλαστήσεως των σπορίων (προκαλλιέργεια), όπου διεξήχθη σε κωνικές φιάλες των 250 mL πληρωμένες με θρεπτικό υλικό με σύσταση  $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  γλυκόζη και  $2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  πεπτόνη. Μετά τον εμβολιασμό ακολούθησε επώαση στους  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  σε περιστροφικό αναδευτήρα με ρυθμό 200 rpm για 8-9 h (εικόνα 2.2.2). Τα υλικά και θρεπτικά μέσα που χρησιμοποιήθηκαν αποστειρώθηκαν σε αυτόκλειστο στους  $121 \text{ }^\circ\text{C}$  για 20 min.



Εικόνα 2.2.2: Εκβλάστηση σπορίων κατά την προκαλλιέργεια του *R. arrhizus* NRRL 2582 μετά από 9 h επώαση

### 2.3 Θρεπτικό μέσο για την παραγωγή φουμαρικού οξέος

Η συγκριτική αξιολόγηση των πέντε στελεχών *Rhizopus* ως προς τη βιοσύνθεση φουμαρικού οξέος πραγματοποιήθηκε σε διαφορετικές πηγές άνθρακα, ήτοι η εμπορική σακχαρόζη, ισομοριακό μείγμα γλυκόζης/ φρουκτόζης σε αναλογία 1:1, γλυκερόλη, μελάσα και υδρολυμένη μελάσα σε συγκεντρώσεις όπως φαίνεται στον πίνακα 2.3.1.

Πίνακας 2.3.1: Πηγές άνθρακα και αντίστοιχες συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν για την επιλογή των στελεχών *Rhizopus*.

Πηγή άνθρακα	Συγκέντρωση $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	
Εμπορική σακχαρόζη	-	50
Γλυκερόλη	25	50
Γλυκόζη:Φρουκτόζη (1:1)	25	50
Μελάσα	25	50
Υδρολυμένη μελάσα	25	-

Το θρεπτικό μέσο της κύριας ζύμωσης είχε τη ακόλουθη σύσταση: 80% της πηγής άνθρακα  $\text{CaCO}_3$ ,  $0,6 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $0,4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $0,044 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{ZnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $0,016 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{FeCl}_3\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ,  $0,0075 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  τρυγικό οξύ,  $0,5 \text{ mL}\cdot\text{L}^{-1}$  corn steep liquor,  $15 \text{ mL}\cdot\text{L}^{-1}$  μεθανόλη και

antifoam 0.1%. Ως πηγή αζώτου χρησιμοποιήθηκε το θειικό αμμώνιο ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) σε συγκέντρωση 0.2 g·L<sup>-1</sup>.

Η κύρια ζύμωση παραγωγής φουμαρικού οξέος διεξήχθει σε Duran 1L πληρωμένες με 500 mL θρεπτικού μέσου. Μετά τον εμβολιασμό ακλούθησε επώαση στους 30 °C σε περιστροφικό αναδευτήρα με ρυθμό 200 rpm και παροχή αέρα 1 vvm για τις πρώτες 18 h ενώ στη συνέχεια η παροχή μειωνόταν κατά το ήμισυ. Τα υλικά και θρεπτικά μέσα που χρησιμοποιήθηκαν αποστειρώθηκαν σε αυτόκλειστο στους 121 °C για 20 min. Η πηγή αζώτου αποστειρώθηκε ξεχωριστά, η μεθανόλη αποστειρώθηκε με φίλτρο 0,2 μm και υπό ασηπτικές συνθήκες προστέθηκαν στο θρεπτικό μέσο.

#### **2.4 Χημική υδρόλυση μελάσας**

Για την χημική υδρόλυση της μελάσας ακολούθησε η τροποποιημένη μέθοδος των Dumbrepatil *et al.* (2008) κατά την οποία 10 mL H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (20%, v/v) προστέθηκαν σε 90 mL διαλύματος μελάσας και ακολούθησε βρασμός για 20 min.

#### **2.5 Προσδιορισμός σακχάρων και οργανικών οξέων**

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης των σακχάρων και των παραγόμενων προϊόντων πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια της Υγρής Χρωματογραφία Υψηλής Αποδόσεως (High Performance Liquid Chromatography, HPLC). Για τον προσδιορισμό του φουμαρικού οξέος με τη χρήση της Υγρής Χρωματογραφία Υψηλής Αποδόσεως απαιτείται προεργασία του δείγματος, δεδομένου του γεγονότος ότι το φουμαρικό ασβέστιο που σχηματίζεται κατά τη διάρκεια της ζύμωσης καταβυθίζεται. Η προεργασία του δείγματος που ακολούθησε πριν την ανάλυση είναι η ακόλουθη: σε 0,8 mL δείγματος προστίθενται 200μL H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 3 M και 3,4 mL απιονισμένο νερό ούτως ώστε η τιμή του pH να είναι <1, στη συνέχεια ακολουθεί έντονη ανάδευση (vortex) και φυγοκέντριση (5000 rpm, 10 min). Το υπερκείμενο συλλέγεται και ακολουθεί ανάλυση των προϊόντων με Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Αποδόσεως. Η ταυτοποίηση των μεταβολικών προϊόντων βασίστηκε στον χρόνο κατακράτησης, ο οποίος συγκρίθηκε με γνωστά δείγματα αυτών. Ως κινητή φάση χρησιμοποιήθηκε υδατικό διάλυμα H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (10 mM) και η ροή της ρυθμίστηκε στα 0,6 mL/min. Η στήλη με την οποία έγινε ο διαχωρισμός του μίγματος ήταν τύπου Aminex HPX-87H (300mm × 7,8 mm) και θερμοκρασίας 45 °C.

### 3. Αποτελέσματα

Μέχρι προσφάτως, η πλειονότητα των ερευνών στη διεθνή βιβλιογραφία αφορούσε στη χρήση γλυκόζης ως πηγή άνθρακα για την παραγωγή φουμαρικού οξέος μέσω της βιοτεχνολογικής οδού, ενώ ένας περιορισμένος αριθμός μελετών σχετίζεται με την αξιοποίηση άλλων υποστρωμάτων όπως σακχαρόζη, ξυλόζη καθώς και αποβλήτων για την παραγωγή φουμαρικού οξέος. Για το λόγο αυτό μελετήθηκε η δυνατότητα παραγωγής φουμαρικού οξέος σε υποστρώματα εμπορικής σακχαρόζης, ισομοριακού μείγματος γλυκόζης:φρουκτόζης, μελάσας, υδρολυμένης μελάσας και γλυκερόλης.

#### 3.1 Συγκριτική αξιολόγηση της παραγωγής φουμαρικού οξέος από τα στελέχη του μύκητα *Rhizopus* σε υπόστρωμα εμπορικής σακχαρόζης

Το πρώτο υπόστρωμα στο οποίο διερευνήθηκε η ικανότητα των 5 διαφορετικών στελεχών για παραγωγή φουμαρικού οξέος, ήταν η εμπορική σακχαρόζη σε συγκέντρωση  $50 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ . Όπως παρατηρείται στον πίνακα 3.1.1, μόνο το στέλεχος *R. arrhizus* 2582 έχει την ικανότητα να καταναλώνει τη σακχαρόζη και να παράγει φουμαρικό οξύ. Η ικανότητα αυτή του *R. arrhizus* 2582 οφείλεται στην δυνατότητα να παράγει ιμπερτάση και να υδρολύει τη σακχαρόζη.

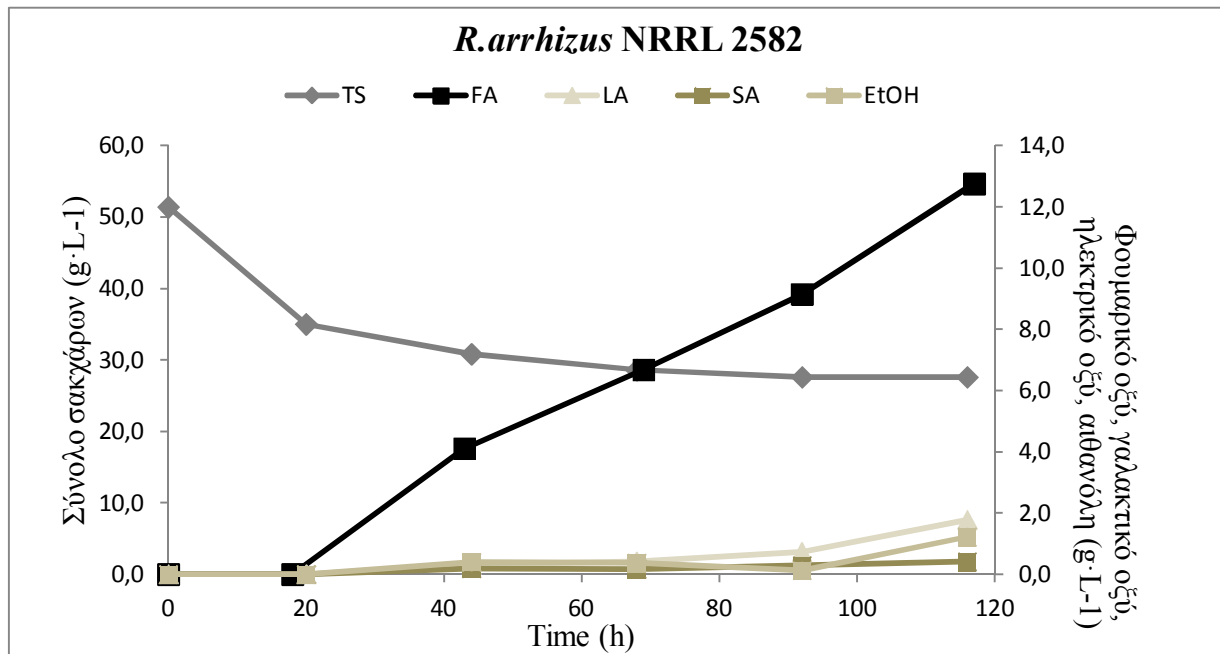
Πίνακας 3.1.1: Παραγωγή φουμαρικού οξέος και απόδοση των 5 στελεχών σε κλειστή καλλιέργεια με υπόστρωμα εμπορικής σακχαρόζης με συγκέντρωση  $50 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ . Οι τιμές είναι μέσοι όροι δύο επαναλήψεων (τυπική απόκλιση < 5 %)

Στέλεχος NRRL	Χρόνος (h)	Φουμαρικό οξύ ( $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )	Απόδοση ( $\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ) †
<i>R. delemar</i> 1472	68	0	0
<i>R. oryzae</i> 1526	68	0,30	0,07
<i>R. arrhizus</i> 2582	116	12,8	0,54
<i>R. oryzae</i> 3562	116	0,40	0,04
<i>R. oryzae</i> 3563	116	0	0

†g παραγόμενου φουμαρικού οξέος·  $\text{g}^{-1}$  καταναλωθέντος υποστρώματος

Η κινητική της κατανάλωσης υποστρώματος και της παραγωγής φουμαρικού οξέος από το *R. arrhizus* NRRL 2582 παρουσιάζεται στο σχήμα 3.1.1. Όπως παρατηρείται κατά τις πρώτες 20 h δεν σημειώνεται παραγωγή φουμαρικού οξέος, λόγω της παρουσίας πηγής αζώτου στο μέσο της καλλιέργειας, ωστόσο παρατηρείται γρήγορος ρυθμός κατανάλωσης του υποστρώματος (31,9 %) για την αύξηση της βιομάζας (εικόνα 3.1.1). Μετά το πέρας των 20 h αρχίζει η βιοσύνθεση του φουμαρικού οξέος λαμβάνοντας τη μέγιστη τιμή του,  $12,8 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , στις 116 h ζύμωσης και

αντίστοιχο συντελεστή απόδοσης φουμαρικού οξέος,  $0,54 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$ . Σημειώνεται ότι ένα ποσοστό 46% της αρχικής συγκέντρωσης υποστρώματος παραμένει ακατανάλωτο μετά την ολοκλήρωση της ζύμωσης.



Σχήμα 3.1.1: Κινητική εξέλιξη της κατανάλωσης σακχάρων και της παραγωγής φουμαρικού οξέος κατά την κλειστή καλλιέργεια του *R. arrhizus* NRRL 2582 σε υπόστρωμα σακχαρόζης ( $50 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ )



Εικόνα 3.1.1: Παραγωγή μικρών σφαιριδίων (pellets) βιομάζας κατά τη ζύμωση του μύκητα *R. arrhizus* NRRL 2582 σε υπόστρωμα σακχαρόζης

### 3.2 Συγκριτική αξιολόγηση της παραγωγής φουμαρικού οξέος από τα στελέχη του μύκητα *Rhizopus* σε υπόστρωμα ισομοριακού μείγματος γλυκόζης:φρουκτόζης

Δεδομένου του γεγονότος ότι τα στελέχη *R. delemar* NRRL 1472, *R. oryzae* NRRL 1526, *R. oryzae* NRRL 3562 και *R. oryzae* NRRL 3563 δεν έχουν την ικανότητα να υδρολύουν τη σακχαρόζη (λόγω πιθανότατα της απουσίας του ενζύμου ιμπερτάσης) μελετήθηκε η ικανότητα των στελεχών να παράγουν φουμαρικό οξύ σε ισομοριακό μείγμα γλυκόζης:φρουκτόζης σε δύο διαφορετικές αρχικές συγκεντρώσεις, 25 g·L<sup>-1</sup> και 50 g·L<sup>-1</sup>. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων αυτών παρουσιάζονται στον πίνακα 3.2.1.

Όπως παρατηρείται, όλα τα στελέχη *Rhizopus* εκτός από το *R. delemar* NRRL 1472 έχουν την ικανότητα να αξιοποιούν το ισομοριακό μείγμα γλυκόζης:φρουκτόζης προς παραγωγή φουμαρικού οξέος. Τα στελέχη *R. oryzae* NRRL 1526 και *R. arrhizus* NRRL 2582 παρήγαγαν τη μεγαλύτερη ποσότητα φουμαρικού οξέος (περίπου 12 g·L<sup>-1</sup>) στις καλλιέργειες με αρχική συγκέντρωση σακχάρων 25 g·L<sup>-1</sup>, ενώ στα 50 g·L<sup>-1</sup> αρχική συγκέντρωση σακχάρων παρήγαγαν 13,1 g·L<sup>-1</sup> και 15,9 g·L<sup>-1</sup> αντίστοιχα. Ωστόσο μεγαλύτερη απόδοση παρατηρήθηκε στη χαμηλότερη συγκέντρωση σακχάρων.

Πίνακας 3.2.1: Αποτελέσματα των στελεχών *Rhizopus* κατά την καλλιέργεια σε ισομοριακό μείγμα γλυκόζης: φρουκτόζης σε συγκεντρώσεις 25 g·L<sup>-1</sup> και 50 g·L<sup>-1</sup>.

Ισομοριακό μείγμα γλυκόζης:φρουκτόζης με αρχική συγκέντρωση 25 g·L <sup>-1</sup>					
Στέλεχος NRRL	Χρόνος (h)	Φουμαρικό οξύ (g·L <sup>-1</sup> )	Απόδοση %	Παραγωγικότητα (g·L <sup>-1</sup> ·h <sup>-1</sup> )	Βιομάζα (g·L <sup>-1</sup> )
<i>R. delemar</i> 1472	88	0	0	0	0
<i>R. oryzae</i> 1526	73	12,0	59	0,16	8,1
<i>R. arrhizus</i> 2582	88	12,1	63	0,14	10,5
<i>R. oryzae</i> 3562	112	9,40	39	0,08	6,7
<i>R. oryzae</i> 3563	88	8,90	39	0,10	6,9

Ισομοριακό μείγμα γλυκόζης:φρουκτόζης με αρχική συγκέντρωση 50 g·L <sup>-1</sup>					
Στέλεχος NRRL	Χρόνος (h)	Φουμαρικό οξύ (g·L <sup>-1</sup> )	Απόδοση %	Παραγωγικότητα (g·L <sup>-1</sup> ·h <sup>-1</sup> )	Βιομάζα (g·L <sup>-1</sup> )
<i>R. delemar</i> 1472		0	0	0	0
<i>R. oryzae</i> 1526	162	15,9	36	0,10	19,3
<i>R. arrhizus</i> 2582	162	13,1	28	0,08	16,6
<i>R. oryzae</i> 3562	96	4,20	15	0,04	12,2
<i>R. oryzae</i> 3563	162	11,2	22	0,07	16,2



Τα στελέχη *R. oryzae* NRRL 3562 και *R. oryzae* NRRL 3563 παρήγαγαν περίπου 9 g·L<sup>-1</sup> φουμαρικό οξύ όταν καλλιεργήθηκαν σε υπόστρωμα με αρχική συγκέντρωση σακχάρων 25 g·L<sup>-1</sup>, ενώ στα 50 g·L<sup>-1</sup> παρήγαγαν 4,2 και 11,2 g·L<sup>-1</sup> αντίστοιχα. Σε αυτά τα στελέχη η απόδοση παραγόμενου προϊόντος ήταν ίδια στην περίπτωση με την αρχική συγκέντρωση σακχάρων 25 g·L<sup>-1</sup>, ενώ στην υψηλότερη συγκέντρωση σακχάρων (50 g·L<sup>-1</sup>) ήταν αρκετά χαμηλότερη.

Στη συνέχεια παρουσιάζονται οι συγκεντρώσεις του φουμαρικού οξέος και των παραπροϊόντων στις δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις του υποστρώματος 25 g·L<sup>-1</sup> (πίνακας 3.2.2) και 50 g·L<sup>-1</sup> (πίνακας 3.2.3). Παρατηρείται ότι στο υπόστρωμα με αρχική συγκέντρωση 50 g·L<sup>-1</sup> οι συγκεντρώσεις των παραπροϊόντων (γαλακτικού οξέος, ηλεκτρικού οξέος και αιθανόλης) είναι αυξημένες (περισσότερο από 50 %) με εξαίρεση το στέλεχος *R. arrhizus* NRRL 2582 που σημείωσε αύξηση παραγωγής γαλακτικού οξέος κατά 37% και ηλεκτρικού κατά 2,5 %.

Πίνακας 3.2.2: Προϊόντα ισομοριακού μείγματος γλυκόζης: φρουκτόζης με συγκέντρωση 25 g·L<sup>-1</sup>

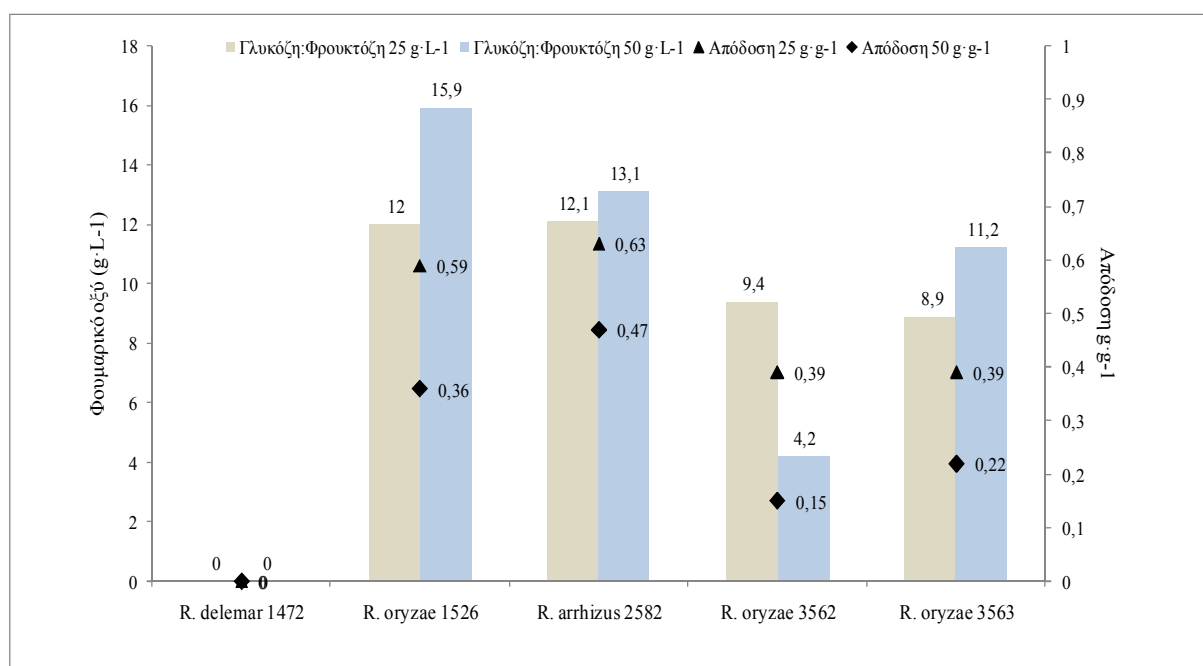
Στελέχη NRRL	Χρόνος (h)	Συγκέντρωση προϊόντων (g·L <sup>-1</sup> )			
		Φουμαρικό οξύ	Γαλακτικό οξύ	Ηλεκτρικό οξύ	Αιθανόλη
<i>R. delemar</i> 1472		0	0	0	0
<i>R. oryzae</i> 1526	73	12,0	0,70	0,50	1,10
<i>R. arrhizus</i> 2582	88	12,1	1,00	0,39	0
<i>R. oryzae</i> 3562	112	9,40	1,70	0,44	0
<i>R. oryzae</i> 3563	88	8,90	0,60	0,45	0,27

Πίνακας 3.2.3: Προϊόντα ισομοριακού μείγματος γλυκόζης:φρουκτόζης με συγκέντρωση 50 g·L<sup>-1</sup>

Στελέχη NRRL	Χρόνος (h)	Συγκέντρωση προϊόντων (g·L <sup>-1</sup> )			
		Φουμαρικό οξύ	Γαλακτικό οξύ	Ηλεκτρικό οξύ	Αιθανόλη
<i>R. delemar</i> 1472		0	0	0	0
<i>R. oryzae</i> 1526	162	15,9	3,20	1,80	1,90
<i>R. arrhizus</i> 2582	162	13,1	1,60	0,40	0,70
<i>R. oryzae</i> 3562	96	4,20	3,40	1,90	0,90
<i>R. oryzae</i> 3563	162	11,2	1,20	0,70	0,60

Συγκρίνοντας τις δυο διαφορετικές αρχικές συγκεντρώσεις υποστρώματος (σχήμα 3.2.1) παρατηρείται ότι δεν υπήρξε μεγάλη διαφορά ως προς την παραγωγή φουμαρικού οξέος με εξαίρεση το στέλεχος *R. oryzae* NRRL 3562 όπου η συγκέντρωση φουμαρικού οξέος ήταν

αυξημένη κατά  $4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  όταν η αρχική συγκέντρωση σακχάρων ήταν  $50 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ . Παρόλα αυτά η απόδοση παραγόμενου προϊόντος ήταν χαμηλότερη στην υψηλότερη συγκέντρωση σακχάρων σε όλα τα στελέχη. Αυτό οφείλεται τόσο στην αύξηση της παραγωγής των παραπροϊόντων όσο και στην αυξημένη παραγωγή βιομάζας κατά την καλλιέργεια των στελεχών *Rhizopus* στο θρεπτικό μέσο με  $50 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  αρχική συγκέντρωση σακχάρων. Τέλος, είναι αξιοσημείωτο το γεγονός ότι η απόδοση του φουμαρικού οξέος εμφανίζει θετική συσχέτιση με την παραγόμενη βιομάζα, δηλαδή όσο αυξάνεται η απόδοση του φουμαρικού οξέος τόσο αυξάνεται και η παραγόμενη βιομάζα των στελεχών.



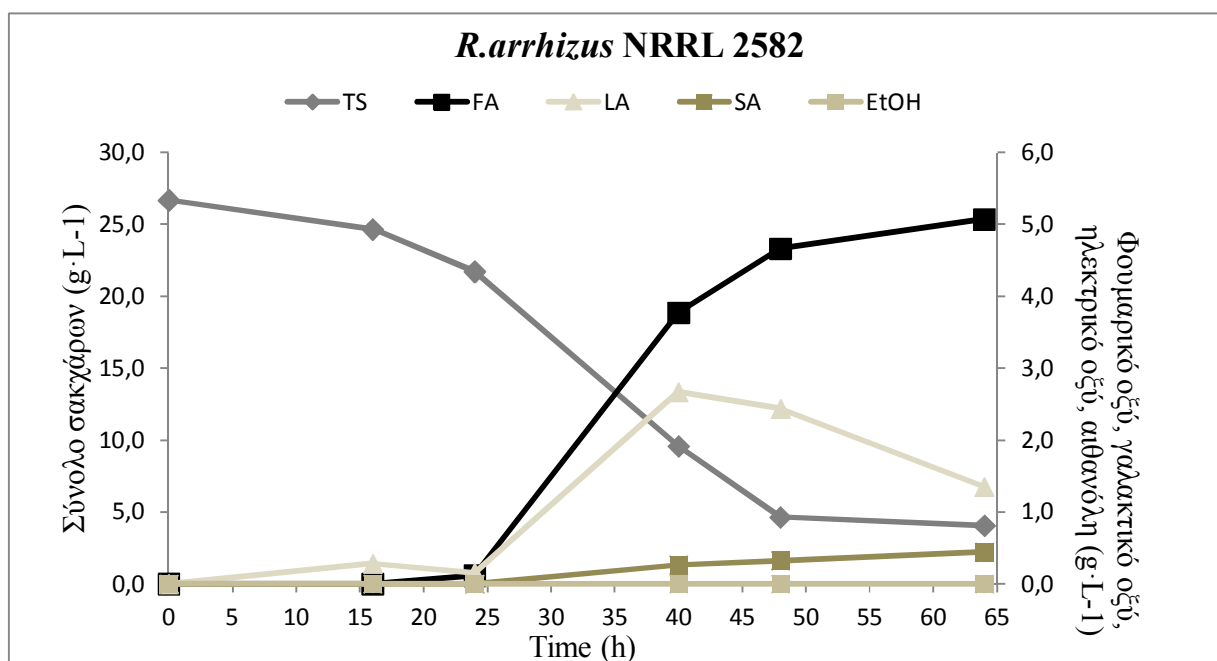
Σχήμα 3.2.1: Συγκριτική αναπαράσταση παραγωγής φουμαρικού οξέος και απόδοσης σε ισομοριακό μείγμα γλυκόζης: φουκτόζης με αρχική συγκέντρωση σακχάρων 25 και  $50 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ .

### 3.3 Καλλιέργεια του *R. arrhizus* NRRL 2582 σε υπόστρωμα μελάσας

Από τα προηγούμενα πειράματα των 5 διαφορετικών στελεχών σε υπόστρωμα σακχαρόζης με αρχική συγκέντρωση  $50 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  παρατηρήθηκε ότι μόνο το στέλεχος *R. arrhizus* NRRL 2582 έχει την ικανότητα να παράγει φουμαρικό οξύ. Έτσι κρίθηκε σκόπιμο να διερευνηθεί η δυνατότητα αξιοποίησης της μελάσας προς παραγωγή φουμαρικού οξέος.

Μελετήθηκαν δύο διαφορετικές αρχικές συγκεντρώσεις μελάσας 25 και  $50 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  (εκφρασμένη σε ισοδύναμα γλυκόζης). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι μέχρι τις 64h ζύμωσης δεν σημειώθηκε

παραγωγή φουμαρικού οξέος στα  $50 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , ενώ κατά την καλλιέργεια σε αρχική συγκέντρωση  $25 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  παράχθησαν  $5,1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  φουμαρικό οξύ. Η αδυναμία του μύκητα *R. arrhizus* NRRL 2582 να παράγει φουμαρικό οξύ στην καλλιέργεια με  $50 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  μελάσα (ισοδύναμα σακχάρων) μπορεί να οφείλεται σε παρεμπόδιση λόγω της σύστασης της μελάσας. Η κινητική κατανώσεως υποστρώματος και της συσσώρευσης φουμαρικού οξέος και παραπροϊόντων κατά την καλλιέργεια του μύκητα στα  $25 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  δίνεται στο σχήμα 3.3.1.



Σχήμα 3.3.1: Κινητική εξέλιξης της κατανώσεως του υποστρώματος και της παραγωγής φουμαρικού οξέος και παραπροϊόντων σε συνάρτηση του χρόνου.

Κατά τις πρώτες 20 h της ζύμωσης δεν παρατηρείται παραγωγή φουμαρικού οξέος που αποδίδεται στην παρουσία αζώτου στο μέσο της καλλιέργειας, κατά τη φάση αυτή η κατανώση του υποστρώματος προορίζεται για την αύξηση της βιομάζας. Μετά τις 20 h αρχίζει η παραγωγή φουμαρικού οξέος μέχρι την κατανώση του υποστρώματος. Η μέγιστη παραγωγή φουμαρικού οξέος σημειώθηκε στις 64 h και αντιστοιχεί σε  $5,1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ .

Η μειωμένη παραγωγή φουμαρικού οξέος, συγκριτικά με το αντίστοιχο πείραμα του στελέχους *R. arrhizus* NRRL 2582 σε υπόστρωμα εμπορικής σακχαρόζης όπου η μέγιστη παραγωγή φουμαρικού οξέος ήταν  $12,8 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , μπορεί να οφείλεται στην παρουσία στερεών στη μελάσα καθώς και τον σχηματισμό μεγαλύτερων σφαιριδίων (pellets) που μειώνουν τη μεταφορά οξυγόνου και αυξάνουν το ιξώδες του υγρού. Στην εικόνα 3.3.1 παρουσιάζεται ο σχηματισμός

των σφαιριδίων (pellets) κατά την ανάπτυξη του *R. arrhizus* NRRL 2582 σε μελάσα με αρχική συγκέντρωση σακχάρων  $25 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ .



Εικόνα 3.3.1: Μορφή σφαιριδίων (pellets) κατά τη ζύμωση του μύκητα *R. arrhizus* NRRL 2582 σε μελάσα  $25 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  (ισοδύναμα γλυκόζης)

#### **3.4 Καλλιέργεια του *R. oryzae* NRRL 1526 σε υπόστρωμα υδρολυμένης μελάσας**

Σύμφωνα με τα προηγούμενα αποτελέσματα των πειραμάτων το στέλεχος *R. oryzae* NRRL 1526 έδωσε τα καλύτερα αποτελέσματα σε ισομοριακό μείγμα γλυκόζης:φρουκτόζης, και δεδομένου της ανάγκης για τη χρησιμοποίηση ως υποστρωμάτων απόβλητα με χαμηλό ή και αρνητικό κόστος, μελετήθηκε η δυνατότητα αξιοποίησης από το *R. oryzae* NRRL 1526 υδρολυμένης μελάσας προς παραγωγή φουμαρικού οξέος.

Η χημική υδρόλυση της μελάσας οδήγησε σε συνολική ανάκτηση σακχάρων 90%. Το υδρολυμένο υπόστρωμα σε συγκέντρωση συνολικών σακχάρων  $25 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  αξιοποιήθηκε για την παραγωγή φουμαρικού οξέος, αλλά δεν παρατηρήθηκε ανάπτυξη του μικροοργανισμού. Κατά τη χημική υδρόλυση της μελάσας πιθανόν παράγονται διάφορες χημικές ουσίες που προκαλούν αναστολή της ανάπτυξης του μύκητα *R. oryzae* NRRL 1526.

#### **3.5 Συγκριτική αξιολόγηση της παραγωγής φουμαρικού οξέος από στελέχη του μύκητα *Rhizopus* σε υπόστρωμα γλυκερόλης**

Η δυνατότητα παραγωγής φουμαρικού οξέος των 5 στελεχών του μύκητα *Rhizopus spp.* διερευνήθηκε και σε υπόστρωμα με κύρια πηγή άνθρακα την γλυκερόλη σε συγκέντρωση  $25 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  και  $50 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  αλλά δεν παρατηρήθηκε ανάπτυξη σε κανένα από τα στελέχη.

#### 4. Συζήτηση

Τα τελευταία χρόνια η παραγωγή φουμαρικού οξέος μέσω μικροβιακών ζυμώσεων αποτελεί ενδιαφέρον πεδίο έρευνας για την επιστήμη της βιοτεχνολογίας. Λόγω της δομής του, το φουμαρικό οξύ έχει ευρύ φάσμα εφαρμογών που περιλαμβάνουν τη βιομηχανία τροφίμων, ως μέσο οξίνισης καθώς και τη χημική βιομηχανία με σημαντικές εφαρμογές στη βιομηχανία πολυμερισμού και τη σύνθεση ρητινών. Στη σύγχρονη βιομηχανική πρακτική, το μεγαλύτερο μέρος του παραγόμενου φουμαρικού οξέος, προέρχεται από την καταλυτική οξείδωση του βενζολίου. Ωστόσο, καθώς οι τιμές του πετρελαίου αυξάνονται, η νέα τάση της επιστήμης είναι η ανεξαρτητοποίηση της παραγωγής του φουμαρικού οξέος από τα παράγωγα του πετρελαίου με τη χρήση της βιοτεχνολογίας.

Αρκετές μελέτες έχουν γίνει σε εργαστηριακό επίπεδο, για την παραγωγή φουμαρικού οξέος μέσω ζύμωσης, χρησιμοποιώντας διάφορα στελέχη μυκήτων και αξιοποιώντας ανανεώσιμες πηγές ενέργειας. Η μικροβιακή παραγωγή του φουμαρικού οξέος περιορίζεται κυρίως με τη χρήση νηματοειδών μυκήτων και κυρίως των στελεχών *Rhizopus arrhizus* και *Rhizopus oryzae*. Οι μελέτες της παραγωγής φουμαρικού οξέος μέσω μικροβιακών ζυμώσεων με τη χρήση στελεχών *Rhizopus* εστιάζουν κυρίως στην αξιοποίηση της γλυκόζης, ενώ υπόστρωμα σακχαρόζης, μελάσας, ξυλόζης και γλυκερόλης έχουν μελετηθεί λιγότερο. Χρησιμοποιώντας υπόστρωμα γλυκόζη η υψηλότερη συγκέντρωση φουμαρικού οξέος ( $130 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) με απόδοσης  $1 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$  επιτεύχθηκε χρησιμοποιώντας  $\text{CaCO}_3$  ως παράγοντα εξουδετέρωσης και με έλεγχο του διαλυμένου οξυγόνου κατά το στάδιο ανάπτυξης του μύκητα (80- 100 %) και κατά το στάδιο παραγωγής φουμαρικού οξέος (30-80 %) (Ling and Ng, 1989). Ενώ η υψηλότερη παραγωγικότητα που έχει επιτευχθεί  $4,25 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ , πραγματοποιήθηκε με ακινητοποιημένα κύτταρα και ταυτό-χρονο διαχωρισμό του προϊόντος μέσω συστήματος προσρόφησης (Cao *et al.*, 1996).

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η συγκριτική αξιολόγηση στελεχών *Rhizopus* ως προς τη βιοτεχνολογική παραγωγή φουμαρικού οξέος. Συγκεκριμένα μελετήθηκαν τα στελέχη *R. delemar* NRRL 1472, *R. oryzae* NRRL 1526, *R. arrhizus* NRRL 2582, *R. oryzae* NRRL 3562 και *R. oryzae* NRRL 3563 ως προς την ικανότητα να αξιοποιούν διαφορετικά υποστρώματα για τη σύνθεση φουμαρικού οξέος.

Αρχικά, μελετήθηκαν τα στελέχη *Rhizopus* σε υπόστρωμα εμπορικής σακχαρόζης ( $50 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ). Στόχος ήταν η επιλογή των στελεχών που έχουν την ικανότητα να υδρολύουν τη σακχαρόζη και να την αξιοποιεί για την παραγωγή φουμαρικού οξέος. Από τα αποτελέσματα συμπεραίνουμε ότι μόνο το στέλεχος *R. arrhizus* NRRL 2582 μπορεί να παράγει ιμβερτάση για την υδρόλυση της σακχαρόζης και την περαιτέρω αξιοποίηση της για σύνθεση φουμαρικού οξέος. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης η μέγιστη παραγωγή φουμαρικού οξέος σε υπόστρωμα σακχαρόζης από το εν λόγω στέλεχος ήταν  $12,8 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  με αντίστοιχη απόδοση  $0,54 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$ . Η καλλιέργεια του *R. arrhizus* NRRL 2582 στη σακχαρόζη δεν συνοδεύτηκε από εξάντληση του σακχάρου στο μέσο της καλλιέργειας αλλά 46% του σακχάρου έμεινε ακατανάλωτο.

Στη συνέχεια των πειραμάτων και δεδομένου ότι τα στελέχη *R. delemar* NRRL 1472, *R. oryzae* NRRL 1526, *R. oryzae* NRRL 3562 και *R. oryzae* NRRL 3563 δεν έχουν ικανότητα να αξιοποιήσουν τη σακχαρόζη μελετήθηκε η παραγωγή φουμαρικού οξέος σε ισομοριακό μείγμα γλυκόζης:φρουκτόζης σε δύο συγκεντρώσεις  $25 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  και  $50 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ . Όλα τα στελέχη εκτός από το *R. delemar* NRRL 1472 μπορούν να αξιοποιούν το ισομοριακό μείγμα γλυκόζης:φρουκτόζης προς παραγωγή φουμαρικού οξέος. Συγκεκριμένα, στο υπόστρωμα με αρχική συγκέντρωση σακχάρων  $25 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  η μέγιστη παραγωγή φουμαρικού οξέος περίπου  $12,1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) παρατηρήθηκε από το στέλεχος *R. arrhizus* NRRL 2582 και *R. oryzae* NRRL 1526 ενώ ακολούθησαν με φθίνουσα πορεία τα *R. oryzae* NRRL 3562 με  $9,4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  και *R. oryzae* NRRL 3563 με  $8,9 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ . Οι καλλιέργειες των στελεχών *Rhizopus* στο συγκεκριμένο υπόστρωμα συνοδεύτηκαν με κατανάλωση του σακχάρου στο μέσο της καλλιέργειας σε ποσοστό μεγαλύτερο από 76%. Επιπλέον, 80- 90 % των συνολικών προϊόντων της ζύμωσης ήταν φουμαρικό οξύ για όλα τα στελέχη *Rhizopus*.

Στο ισομορικό μείγμα γλυκόζης:φρουκτόζης με αρχική συγκέντρωση σακχάρων  $50 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  παρατηρήθηκαν υψηλότερες συγκεντρώσεις φουμαρικού οξέος για τα στελέχη *R. oryzae* NRRL 1526, *R. arrhizus* NRRL 2582 και *R. oryzae* NRRL 3563,  $15,9 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $13,1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  και  $11,2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  αντίστοιχα, ενώ για το *R. oryzae* NRRL 3562 η παραγωγή φουμαρικού οξέος ήταν μειωμένη κατά 50 %. Ωστόσο, παρατηρήθηκε αύξηση της κατανάλωσης υποστρώματος και της παραγωγής παραπροϊόντων. Συγκεκριμένα, σημειώθηκε αύξηση της κατανάλωσης του υποστρώματος κατά 53- 58 % για τα στελέχη *R. oryzae* NRRL 1526, *R. arrhizus* NRRL 2582 και *R. oryzae* NRRL 3563 ενώ 14 % για το στέλεχος *R. oryzae* NRRL 3562. Επίσης, η παραγωγή των παραπροϊόντων

(γαλακτικό οξύ, ηλεκτρικό οξύ και αιθανόλη) αυξήθηκε από 33- 47 % για τα στελέχη *R. oryzae* NRRL 1526, *R. arrhizus* NRRL 2582 και *R. oryzae* NRRL 3563, ενώ για το *R. oryzae* NRRL 3562 η αύξηση της παραγωγής των παραπροϊόντων αντιστοιχούσε σε 68 %.

Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα στις διαφορετικές συγκεντρώσεις 25 και 50 g·L<sup>-1</sup> (πίνακας 4.1) παρατηρούμε ότι αν και η συγκέντρωση φουμαρικού οξέος είναι μεγαλύτερη όταν καλλιεργήθηκαν σε υπόστρωμα με αρχική συγκέντρωση 50 g·L<sup>-1</sup> εκτός για το στέλεχος *R. delemar* NRRL 1472, η απόδοση παραγόμενου προϊόντος ανά καταναλωθέν υπόστρωμα είναι μικρότερη. Αυτό οφείλεται στην αυξημένη παραγωγή των παραπροϊόντων. Συνήθως το 20 % των συνολικών προϊόντων αποτελούν παραπροϊόντα της ζύμωσης φουμαρικού οξέος τα οποία τείνουν να αυξάνονται όταν οι συνθήκες της ζύμωσης δεν είναι οι βέλτιστες. Επίσης, έχει αναφερθεί σε προηγούμενες μελέτες ότι το ποσοστό του φουμαρικού οξέος μειώνεται με την αύξηση της συγκέντρωσης του σακχάρου (Rhodes *et al.*, 1958).

Πίνακας 4.1: Αποτελέσματα ζύμωσης των στελεχών *Rhizopus* σε υπόστρωμα γλυκόζης:φρουκτόζης. Οι τιμές είναι μέσοι όροι δύο επαναλήψεων (τυπική απόκλιση < 5 %).

Στελέχη <i>Rhizopus</i>	Υπόστρωμα Γλυκόζης:Φρουκτόζης			
	25 g·L <sup>-1</sup>		50 g·L <sup>-1</sup>	
	Συγκέντρωση	Απόδοση	Συγκέντρωση	Απόδοση
<i>R. delemar</i> NRRL 1472	0	0	0	0
<i>R. oryzae</i> NRRL 1526	12,0	0,59	15,9	0,39
<i>R. arrhizus</i> NRRL 2582	12,1	0,63	13,1	0,28
<i>R. oryzae</i> NRRL 3562	9,40	0,39	4,20	0,15
<i>R. oryzae</i> NRRL 3563	8,90	0,39	11,2	0,22

Λόγω της δυνατότητας του στελέχους *R. arrhizus* NRRL 2582 να υδρολύει τη σακχαρόζη κρίθηκε σημαντικό να μελετηθεί η αξιοποίηση της μελάσας ως υπόστρωμα για τη σύνθεση φουμαρικού οξέος. Η μελάσα αποτελεί απόβλητο της διαδικασίας παραγωγής ζάχαρης και περιέχει ένα μεγάλο ποσοστό σακχαρόζης (~50 %). Μελετήθηκαν δύο διαφορετικές αρχικές συγκεντρώσεις μελάσας 25 και 50 g·L<sup>-1</sup> (ισοδύναμα γλυκόζης). Κατά τη ζύμωση με αρχική συγκέντρωση σακχάρων 25 g·L<sup>-1</sup> σημειώθηκε μέγιστη παραγωγή φουμαρικού οξέος 5,1 g·L<sup>-1</sup> με αντίστοιχη απόδοση 0,22 g·g<sup>-1</sup>, ενώ κατά τη ζύμωση με αρχική συγκέντρωση σακχάρων 50 g·L<sup>-1</sup> δεν παρουσιάστηκε ανάπτυξη του μύκητα και παραγωγή φουμαρικού οξέος. Η μειωμένη παραγωγή φουμαρικού οξέος σε σύγκριση με τη σακχαρόζη πιθανότατα οφείλεται στην ύπαρξη συστατικών στη μελάσα που προκαλούν παρεμπόδιση. Ωστόσο, στη βιβλιογραφία δεν υπάρχουν αρκετές μελέτες σχετικά με την αξιοποίηση της μελάσας ως υπόστρωμα για την παραγωγή

φουμαρικού οξέος. Σύμφωνα με τους Rhodes *et al.* (1958), κατά την ζύμωση του *R. arrhizus* NRRL 2582 σε υπόστρωμα μελάσας (140 g·L<sup>-1</sup> ισοδύναμα σακχάρων) παρήγαγε 90 g·L<sup>-1</sup> φουμαρικό οξύ με απόδοση 0,68 g·g<sup>-1</sup>. Επίσης, οι Petruccioli *et al.* (1996) μελέτησαν την παραγωγή φουμαρικού οξέος με ακινητοποιημένο στέλεχος *R. arrhizus* NRRL 1526 σε σύστημα ανακύκλωσης κυττάρων με αρχική συγκέντρωση μελάσας 50 g·L<sup>-1</sup> (ισοδύναμα σακχάρων) και παρήγαγαν 7 g·L<sup>-1</sup> κατά το πρώτο batch και 16,37 g·L<sup>-1</sup> φουμαρικό οξύ στο δεύτερο batch. Η διαφορά της συγκέντρωσης φουμαρικού οξέος σε σύγκριση με την παρούσα μελέτη μπορεί να οφείλεται στην διαφορετική σύσταση της μελάσας καθώς και στις συνθήκες καλλιέργειας.

Στη συνέχεια της πειραματικής πορείας μελετήθηκε η δυνατότητα παραγωγής φουμαρικού οξέος σε υδρολυμένη μελάσα από τον *R. oryzae* NRRL 1526 καθώς παρήγαγε την υψηλότερη συγκέντρωση φουμαρικού οξέος σε ισομοριακό μείγμα γλυκόζης: φρουκτόζης. Το υδρολυμένο υπόστρωμα σε συγκέντρωση συνολικών σακχάρων 25 g·L<sup>-1</sup> αξιοποιήθηκε για την παραγωγή φουμαρικού οξέος, αλλά δεν παρατηρήθηκε ανάπτυξη του μικροοργανισμού. Αν και η υδρόλυση της μελάσας πραγματοποιήθηκε με βάση τη μέθοδο των Dumbrepatil *et al.* (2008) όπου χρησιμοποιήθηκε για την παραγωγή γαλακτικού οξέος με γενετικώς τροποποιημένο βακτήριο *Lactobacillus delbrueckii*, κατά τη χημική υδρόλυση της μελάσας στη παρούσα μελέτη πιθανόν να παράγονται διάφορες χημικές ουσίες που προκαλούν αναστολή της ανάπτυξης του μύκητα *R. oryzae* NRRL 1526.

Τέλος, μελετήθηκε η παραγωγή φουμαρικού οξέος αξιοποιώντας της γλυκερόλης ως πηγή άνθρακα. Αν και μελετήθηκαν διαφορετικές συγκεντρώσεις γλυκερόλης (25 και 50 g·L<sup>-1</sup>) δεν παρατηρήθηκε ανάπτυξη κανενός από τα στελέχη *Rhizopus*. Στη βιβλιογραφία δεν υπάρχουν μελέτες σχετικά με την αξιοποίηση της γλυκερόλης ως υπόστρωμα για την παραγωγή φουμαρικού οξέος με τα συγκεκριμένα στελέχη. Παρόλα αυτά οι Kordowska-Wiater *et al.* (2012) μελέτησαν τα στελέχη *R. oryzae* R15 (NBRC 4756) και *R. microsporus* R67 που απομονώθηκαν από σίκαλη σε υπόστρωμα γλυκερόλης (20 g·L<sup>-1</sup>) και με τη χρήση της τεχνικής «protoplast fusion» όπου επιτεύχθηκε παραγωγή φουμαρικού οξέος από 3,4 έως 4,1 g·L<sup>-1</sup>. Από την άλλη πλευρά, η γλυκερόλη έχει βρεθεί ως πολύ ικανοποιητικό υπόστρωμα για την αύξηση διαφόρων ζυγομυκήτων (Chatzifragkou *et al.*, 2011; Papanikolaou *et al.*, 2008)

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης σε σύγκριση με αντίστοιχα της βιβλιογραφίας παρουσιάζονται στον πίνακα 4.2.



Πίνακας 4.2: Παραγωγή φουμαρικού οξέος από μύκητες του γένους *Rhizopus* κατά την καλλιέργεια τους σε διάφορα υποστρώματα.

Στέλεχος <i>Rhizopus</i>	Υπόστρωμα (g·L <sup>-1</sup> )	Σύστημα καλλιέργειας	Φουμαρικό οξύ (g/L)	P (g·L <sup>-1</sup> ·h <sup>-1</sup> )	Y (g·g <sup>-1</sup> )	Αναφορά
<i>R. arrhizus</i> NRRL 2582	Σακχαρόζη 50	batch	12,8	0,11	0,54	
<i>R. oryzae</i> NRRL 1526		batch	15,9	0,1	0,36	
<i>R. arrhizus</i> NRRL 2582	Ισομοριακό μείγμα 50	batch	13,1	0,08	0,47	Παρούσα μελέτη
<i>R. oryzae</i> NRRL 1526	γλυκόζης: φρουκτόζης	batch	12	0,16	0,59	
<i>R. arrhizus</i> NRRL 2582		25 batch	12,1	0,14	0,63	
<i>R. arrhizus</i> NRRL 2582	Μελάσα 25	batch	5,1	0,08	0,22	
<i>R. arrhizus</i> NRRL 2582	Μελάσα 140	flasks	90	0,68	0,58	Rhodes <i>et al.</i> 1958
<i>R. arrhizus</i> NRRL 1526-immobilized	Μελάσα 50	8 repeated batches in fluidized-bed reactor	~ 7,0	~ 0,14	~ 0,26	Petruccioli <i>et al.</i> , 1996
			(1 <sup>st</sup> batch)			
			16,37	0,34	0,48	
			(2 <sup>nd</sup> batch)			
<i>R. oryzae</i> R15	Γλυκερόλη 50	flasks	3,4- 4,1	-	-	Kordowska-Wiater <i>et al.</i> , 2012
<i>R. microsporus</i> R67						

Με βάση τα δεδομένα της μελέτης μπορούμε να συμπεράνουμε ότι το στέλεχος *R. arrhizus* NRRL 2582 έχει την ικανότητα να παράγει φουμαρικό οξύ αξιοποιώντας τη μελάσα ως πηγή άνθρακα. Ωστόσο για την αύξηση της παραγωγή του φουμαρικού οξέος απαιτούνται περαιτέρω μελέτες οι οποίες κρίνεται σκόπιμο να εστιάσουν στη βελτιστοποίηση του θρεπτικού της ζύμωσης καθώς και τη χρήση τεχνικών ακινητοποίησης των κυττάρων. Επίσης η παραγωγή του φουμαρικού οξέος μπορεί να βελτιωθεί εφαρμόζοντας τεχνικές ανάκτησης όπως η χρήση προσρόφισης, επιλεκτικών ρητινών ή σύστημα κρυστάλλωσης. Επιπλέον, το στέλεχος *R. oryzae* NRRL 1526 δύναται να χρησιμοποιηθεί σε υδρολυμένο υπόστρωμα μελάσας. Εναλλακτικά της χημικής υδρόλυσης θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί η ενζυμική υδρόλυση με εμπορικά ένζυμα ή ακατέργαστα ένζυμα με τη χρήση μικροοργανισμών για την παραγωγή τους.

Συμπερασματικά, η παραγωγή φουμαρικού οξέος μέσω βιοτεχνολογικών ζυμώσεων απαιτεί περισσότερο έρευνα για τη βελτιστοποίηση της παραγωγής, του συντελεστή απόδοσης, της

παραγωγικότητας αλλά και τη χρήση υποστρωμάτων χαμηλού ή και αρνητικού κόστους, ώστε να μπορέσει να ανταγωνιστεί τη μέχρι τώρα χημική μέθοδο παραγωγής του.

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2**

### **Επιλογή στελεχών ζυμών προς παραγωγή οργανικών οξέων και μικροβιακού λίπους**

#### **1. Εισαγωγή**

##### **1.1 Δευτερογενείς μεταβολίτες**

Οι δευτερογενείς μεταβολίτες είναι οργανικές ενώσεις που δεν είναι απαραίτητες άμεσα στη ανάπτυξη και επιβίωση του μικροοργανισμού (Davati *et al.*, 2013). Η βιοτεχνολογική παραγωγή δευτερογενών μεταβολικών προϊόντων στηρίζεται στην ανάπτυξη του μικροοργανισμού σε συνθήκες περιορισμού ενός συστατικού. Για παράδειγμα, ανεπάρκεια αζώτου στο θρεπτικό μέσο έχει ως αποτέλεσμα τη σύνθεση διαφόρων μεταβολιτών όπως ηλεκτρικό, οξικό, κιτρικό, ισοκιτρικό, μηλικό, φουμαρικό οξύ, μικροβιακό λίπος και άλλα (Paranikolaou and Aggelis, 2011). Κατά την παραγωγή των δευτερογενών μεταβολιτών παράγεται ενέργεια, μέσω της παραγωγής NADH και FADH<sub>2</sub>. Τα NADH και FADH<sub>2</sub> μπορούν να μετατραπούν σε ATP κάτω από αερόβιες συνθήκες μέσω αντιδράσεων.

##### **1.2 Παραγωγή οργανικών οξέων**

Η παραγωγή οργανικών οξέων μέσω μικροβιακών ζυμώνσεων αποτελεί αντικείμενο έρευνας τα τελευταία χρόνια. Οργανικά οξέα, που παράγονται μέχρι σήμερα μέσω της πετροχημικής βιομηχανίας, θα μπορούσαν να παραχθούν με τη χρήση μικροοργανισμών (μύκητες, ζύμες, βακτήρια) αξιοποιώντας ανανεώσιμες πηγές. Τα περισσότερα από αυτά είναι ενδιάμεσα προϊόντα κύριων μεταβολικών μονοπατιών που σε πολλές περιπτώσεις καθίστανται ως τελικά προϊόντα κατά τη ζύμωση με διάφορους μικροοργανισμούς.

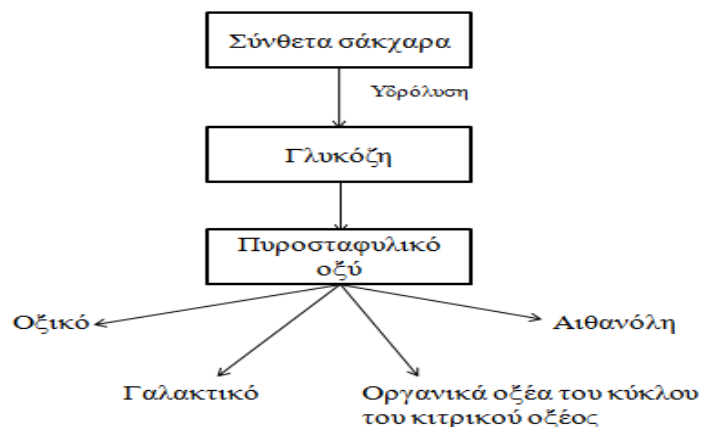
##### **1.2.1 Βιοχημεία παραγωγής οργανικών οξέων με τη χρήση ζυμών**

Οι μικροοργανισμοί χρησιμοποιούν διάφορες μεταβολικές οδούς για τη μετατροπή των σακχάρων σε ενδιάμεσα μόρια. Στις ζύμες, όπως και σε άλλους ετερότροφους οργανισμούς, ο αναβολισμός και ο καταβολισμός είναι δυο αλληλοεξαρτώμενες δραστηριότητες. Οι μεταβολικοί οδοί του κεντρικού μεταβολισμού του άνθρακα είναι ταυτόσημοι μεταξύ των διαφορετικών ειδών ζυμών.

Οι ετερότροφοι μικροοργανισμοί είναι ικανοί να καταβολίζουν μια μεγάλη ποικιλία σακχάρων. Ανεξαρτήτως του είδους των σακχάρων τα προϊόντα αποδόμησης συνιστούν ενδιάμεσα μόρια

των κύριων καταβολικών οδών. Για την έναρξη του καταβολισμού απαιτείται μια χρονική περίοδος επαγωγής που αντιστοιχεί στη περίοδο που απαιτείται για τη βιοσύνθεση των ενζύμων που συμμετέχουν τόσο στη μεταφορά των σακχάρων στο μικροβιακό κύτταρο όσο και στη καταβολική διεργασία. Για το μεταβολισμό των διαφορετικών πηγών άνθρακα όπως εξόζες (γλυκόζη, φρουκτόζη, γαλακτόζη, μαννόζη) και δισακχαρίτες (μαλτόζη ή σακχαρόζη) χρησιμοποιούνται τα ίδια μεταβολικά μονοπάτια με τη διαφορά μόνο στα αρχικά στάδια του μεταβολισμού.

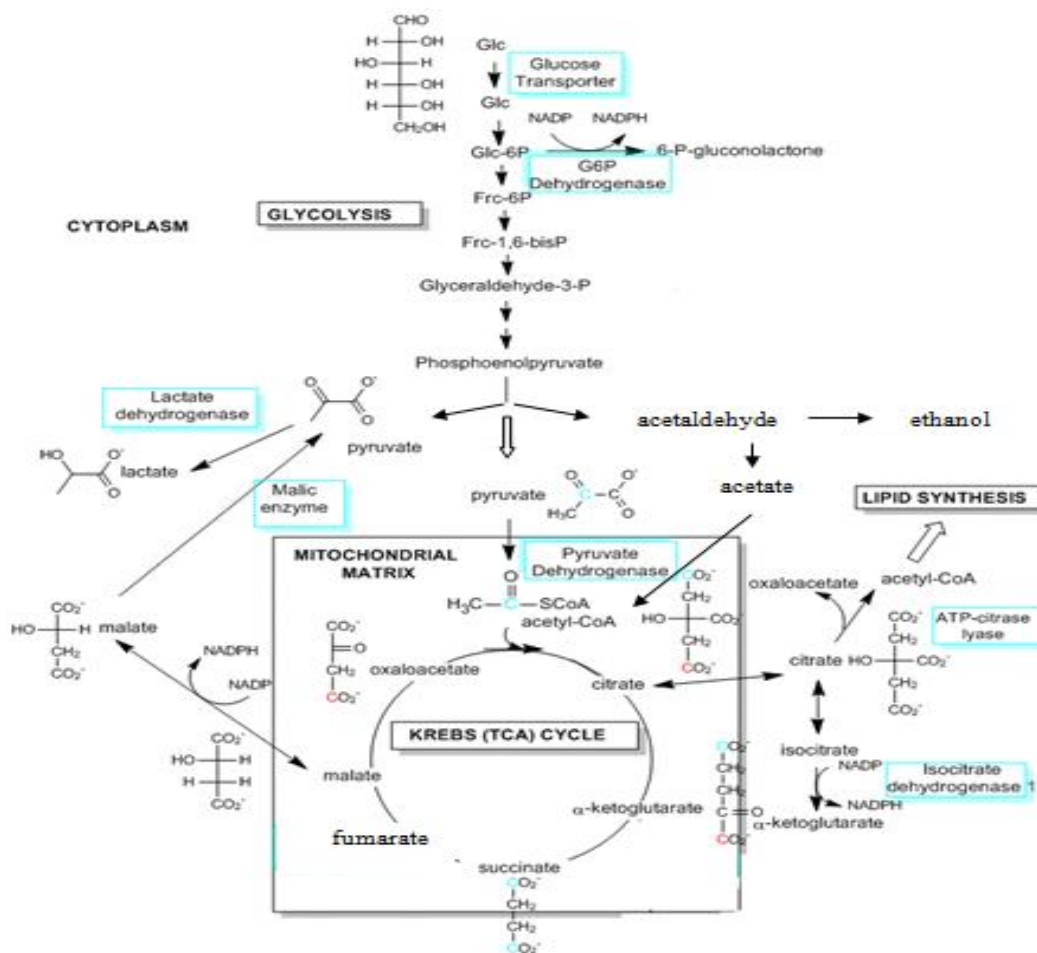
Το πρώτο βήμα για την αφομοίωση των σακχάρων από τα μικροβιακά κύτταρα είναι η αποδόμηση τους σε απλούστερα μόρια και η μεταφορά τους στο εσωτερικό των κυττάρων. Στη συνέχεια ακολουθεί η μετατροπή των σακχάρων σε πυροσταφυλικό με διάσπαση και οξείδωση και τέλος ο περαιτέρω μεταβολισμός του πυροσταφυλικού. Η υδρόλυση των σύνθετων σακχάρων μπορεί να συμβεί από εξωκυτταρικά ένζυμα σε ουδέτερο pH ή ενδοκυτταρικά σε σχεδόν ουδέτερο pH. Μετά την είσοδο των σακχάρων στο μικροβιακό κύτταρο, στην περίπτωση των εξοζών, η συνέχεια του καταβολισμού γίνεται μέσω της οδού Embden-Mayerhof-Parnas (EMP). Το τελικό προϊόν της γλυκολυτικής οδού EMP είναι το πυροσταφυλικό οξύ το οποίο μπορεί να μετατραπεί σε ένα πλήθος ενώσεων ανάλογα με το είδος του μικροοργανισμού και τις συνθήκες καλλιέργειας (σχήμα 1.2.1.1).



Σχήμα 1.2.1.1: Απεικόνιση της πορείας του καταβολισμού των σακχάρων (Pronk *et al.*, 1996).

Οι κύριες μεταβολικές οδοί παρουσιάζονται στο σχήμα 1.2.1.2. Το πυροσταφυλικό μπορεί να μετατραπεί σε ακετυλοσυνένζυμο-A (ακετυλο-CoA) από ένα πολυενζυμικό σύμπλεγμα της πυροσταφυλικής αφυδρογονάσης (PDH). Ο περαιτέρω αερόβιος καταβολισμός του ακετυλο-

CoA πραγματοποιείται μέσω του κύκλου του κιτρικού οξέος (Tricarboxylic acid cycle ή TCA). Επίσης, το πυροσταφυλικό μπορεί να μετατραπεί σε ακετυλοσυνένζυμο-A μέσω του παρακαμπτήριου PDH μονοπατιού κατά το οποίο αρχικά το πυροσταφυλικό μετατρέπεται σε ακεταλδεύδη με τη δράση της αποκαρβοξυλάσης του πυροσταφυλικού, στη συνέχεια σε οξικό ή αιθανόλη την αλδεϋδική αφυδρογονάση ή τη δράση της αλκοολικής αφυδρογονάσης, αντίστοιχα. Το οξικό στη συνέχεια μετατρέπεται σε ακετυλοσυνένζυμο-A με την ακετυλο-coA συνθάση. Σε υψηλή συγκέντρωση γλυκόζη η δράση της πυροσταφυλικής αποκαρβοξυλάσης αυξάνεται κατά 3- 4 φορές και μειώνεται η δράση της αλδεϋδικής αφυδρογονάσης με αποτέλεσμα να επιδρά θετικά στην αλκοολική ζύμωση και την παραγωγή αιθανόλης. Εναλλακτικά, το πυροσταφυλικό μπορεί να μετατραπεί σε γαλακτικό με τη δράση του ενζύμου γαλακτική αφυδρογονάση. (Rodrigues *et al.*,2005; Pronk *et al.*, 1996)



Σχήμα 1.2.1.2: Κύριες μεταβολικές οδοί κατά τον καταβολισμό των σακχάρων (Vander Heiden *et al.*, 2009)

Ο κύκλος του κιτρικού οξέος (TCA) συμβάλει στην παραγωγή ενέργειας κυρίως υπό τη μορφή ανηγμένων συνενζύμων NADH και FADH<sub>2</sub> τα οποία επανοξειδούμενα παράγουν ATP καθώς και στην παραγωγή ενδιάμεσων μεταβολιτών που χρησιμοποιούνται ως πρόδρομες ουσίες στη βιοσύνθεση κυτταρικών υλικών. Σε πολλές περιπτώσεις, οι ενδιάμεσοι μεταβολίτες καθίστανται ως τελικά προϊόντα λόγω της δράσης ενζύμων.

### 1.3 Παραγωγή μικροβιακού λίπους

Τα τελευταία χρόνια υπάρχει μεγάλο ερευνητικό ενδιαφέρον για την παραγωγή μικροβιακού λίπους (έλαιο μονοκύτταρων μικροοργανισμών- single cell oil, SCO). Τα μικροβιακά λιπίδια παράγονται από τους ελαιογόνους μικροοργανισμούς, που μπορεί να είναι ζύμες, μύκητες και φωτοσυνθέτοντα μικροφύκη, οι οποίοι, αναπτυσσόμενοι σε συγκεκριμένες συνθήκες περιβάλλοντος, δύναται να συσσωρεύουν λίπος εντός των κυττάρων τους, σε ποσοστά μεγαλύτερα από 20% κατά βάρος επί ξηράς ουσίας. Ορισμένοι μικροοργανισμοί είναι ικανοί να συσσωρεύουν ενδοκυτταρικό λίπος 25% w/w της ξηρής βιομάζας, ενώ άλλοι έχουν την ικανότητα να συσσωρεύουν έως και 70% w/w λιπίδια. Στον πίνακα 1.3.1 παρουσιάζεται το ποσοστό συσσώρευσης ενδοκυτταρικού λίπους σε διάφορα στελέχη ζυμών. Όπως παρατηρείται τα είδη *Rhodospiridium*, *Rhodotorula* και *Lipomyces* εμφανίζουν τα μεγαλύτερα ποσοστά συσσώρευσης λιπιδίων αξιοποιώντας διαφορετικά υποστρώματα.

Πίνακας 1.3.1: Περιεκτικότητα λίπους (%) διαφόρων στελεχών ζυμών.

Στέλεχος	Υπόστρωμα	Σύστημα καλλιέργειας	Λίπος %	Αναφορά
<i>Rhodospiridium toruloides</i>	Γλυκόζη	batch	71	Wu <i>et al.</i> , 2011
	Γλυκόζη	flasks	58	Wu <i>et al.</i> , 2011
	Γλυκόζη	flasks	62	Wu <i>et al.</i> , 2010
	Γλυκόζη	fed batch	71	Zhao <i>et al.</i> , 2010
	Γλυκόζη	fed batch	67,5	Li <i>et al.</i> , 2007
	Γλυκόζη	batch	36,6	Dai <i>et al.</i> , 2007
<i>Rhodotorula glacialis</i>	Γλυκόζη	fed batch	48	Johnson <i>et al.</i> , 1992
	Γλυκόζη	batch	68	Amaretti <i>et al.</i> , 2011
	Γλυκερόλη	flasks	37	
	Ξυλόζη	flasks	22	Easterling <i>et al.</i> , 2009
<i>Rhodotorula glutinis</i>	Γλυκόζη	flasks	25	
	Μελάσα	fed batch	22	
	Σακχαρόζη	fed batch	50	Johnson <i>et al.</i> , 1995
	Σακχαρόζη	batch	6,5	
	Μελάσα	batch	7,92	

<i>Rodotorula</i> 110	Γλυκόζη	batch	58,2	Enshaeieh <i>et al.</i> , 2013
	Γλυκερόλη	batch	22,3	Makri <i>et al.</i> , 2010
	Απόβλητα ελαιουργείου	flask	34	Sarris <i>et al.</i> , 2011
<i>Yarrowia lipolytica</i>	Απόβλητα ελαιουργείου	batch	14	Papanikolaou <i>et al.</i> , 2008
	Γλυκερόλη	continuous	43	Papanikolaou and Aggelis, 2002
	Γλυκόζη	batch	14,3	Rupčić <i>et al.</i> , 1996
	Σακχαρόζη	flasks	63	
<i>Trichosporon fermentans</i>	Ξυλόζη	flasks	58	
	Γαλακτόζη	flasks	50	Zhu <i>et al.</i> , 2008
	Φρουκτόζη	flasks	41	
	Μελάσα	flasks	37	
<i>Lipomyces starkeyi</i>	Κελοβιόζη, ξυλόζη, γλυκόζη	flasks	52	Gong <i>et al.</i> , 2012
	Γλυκόζη	flasks	63	Ratledge and Wynn, 2002
<i>Cryptococcus curvatus</i>	Γλυκόζη	fed-batch	53	Hassan <i>et al.</i> , 1995
<i>Candida curvata</i>	Σακχαρόζη	batch	37,4	Evans and Ratledge, 1983
<i>Candida curvata</i>	Σακχαρόζη	continuous	28	Evans and Ratledge, 1983

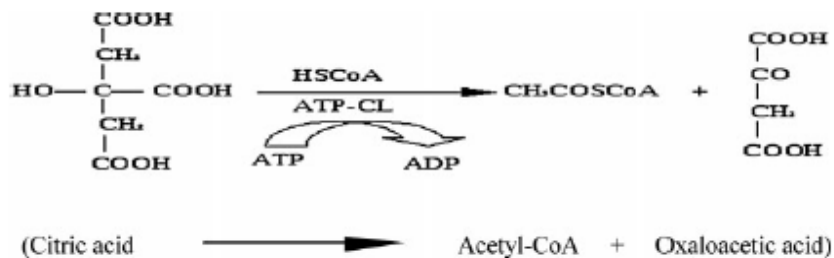
Το ενδιαφέρον για την παραγωγή των λιπιδίων αυτών είναι μεγάλο καθώς αποτελούν πηγή σημαντικών λιπαρών οξέων που δεν απαντώνται συχνά στη φύση. Το εν λόγω λίπος μπορεί να περιέχει υψηλές ποσότητες πολυακόρεστων λιπαρών οξέων διατροφικής και φαρμακευτικής σημασίας. Αυτά τα λιπαρά οξέα χρησιμοποιούνται στην κλινική διατροφή και ως πρώτες ύλες για την παρασκευή ειδικών τροφών και καλλυντικών. Επιπλέον, δύναται να υποκαταστήσουν φυτικά και ζωικά λίπη εξεζητημένης σύστασης και δομής, όπως έλαια πλούσια σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα σπανίως απαντώμενα στη φύση ή λίπη εξεζητημένης δομής όπως το λίπος του κακάο (Leiva-Candia *et al.*, 2014; Papanikolaou and Aggelis, 2011; Ratledge, 2004; Xu *et al.*, 2012).

### 1.3.1 Βιοχημεία συσσώρευσης μικροβιακού λίπους

Η συσσώρευση λίπους εντός των κυττάρων του μικροοργανισμού λαμβάνει μέρος όταν αλλάζει η ενδοκυτταρική συγκέντρωση διαφόρων μεταβολιτών, που πραγματοποιείται κατά την εξάντληση, στο περιβάλλον ανάπτυξης, κάποιου θρεπτικού συστατικού, κυρίως άζωτου. Όταν το άζωτο της καλλιέργειας εξαντληθεί, ο μικροοργανισμός δεν μπορεί να αναπτυχθεί περαιτέρω, αφού το άζωτο είναι απαραίτητο για τη βιοσύνθεση πρωτεϊνών και νουκλεοτιδίων. Η συνεχής κατανάλωση της πηγής άνθρακα έχει ως αποτέλεσμα τη μετατροπή της σε ενδοκυτταρικό λίπος (με τη μορφή τριγλυκεριδίων) στους ελαιογόνους μικροοργανισμούς.

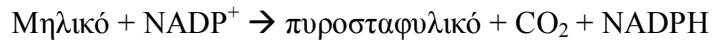
Οι λόγοι για τους οποίους ορισμένοι μικροοργανισμοί παράγουν ενδοκυτταρικό λίπος εξαρτώνται κυρίως από δύο παράγοντες. Η πρώτη αφορά στην ικανότητα του μικροοργανισμού να παράγει συνεχώς ακετυλοσυνενζύμου Α (acetyl-CoA) απευθείας στο κυτταρόπλασμα του κυττάρου δρώντας ως ο πρόδρομο μόριο για την σύνθεση των λιπαρών οξέων. Η δεύτερη αφορά στην ικανότητα του μικροοργανισμού να παράγει επαρκείς ποσότητες NADPH, ενός βασικού αναγωγικού μέσου που χωρεί κατά την βιοσύνθεση των λιπαρών οξέων (Ratledge, 2004; Papanikolaou and Aggelis, 2011).

Στους ελαιογόνους μικροοργανισμούς οι οποίοι καλλιεργούνται στη γλυκόζη ή συναγή υποστρώματα ο σχηματισμός του ακετυλο-CoA αποδίδεται στην παρουσία της ATP: κιτρικής λυάσης (ATP:ACL) η οποία δεν απαντάται στην πλειοψηφία των μη ελαιογόνων μικροοργανισμών. Η εξάντληση της πηγής αζώτου στο μέσο της καλλιέργειας οδηγεί σε μία σειρά αντιδράσεων με αποτέλεσμα το σχηματισμό του ακετυλο-CoA. Κατά την κατανάλωση του αζώτου (σχήμα 1.3.1.1). ενεργοποιείται το ένζυμο AMP- απαμινάση με αποτέλεσμα την ταχύτατη πτώση της περιεκτικότητας του κυττάρου σε AMP και την παρεμπόδιση της δράσης του ενζύμου ισοκιτρικής αφυδρογονάσης. Αποτέλεσμα αυτής της παρεμπόδισης είναι η συσσώρευση του κιτρικού οξέος εντός του μιτοχονδρίου και όταν αυτό υπερβεί τη συγκέντρωση ανοχής εξέρχεται από το μιτοχόνδριο στο κυτταρόπλασμα. Στη συνέχεια, παρουσία της ATP: κιτρική λυάσης διασπάται σε ακετυλο-CoA και σε οξαλοξικό οξύ. Το ακετυλο-CoA χρησιμοποιείται ως πρόδρομη ουσία για τη βιοσύνθεση των λιπαρών οξέων, ενώ το οξαλοξικό οξύ μετατρέπεται μέσω της αφυδρογονάσης του μηλικού οξέος σε μηλικό, το οποίο στη συνέχεια χρησιμοποιείται στο κύκλο κιτρικού/μηλικού οξέος. Η αντίδραση που λαμβάνει χώρα είναι η εξής:

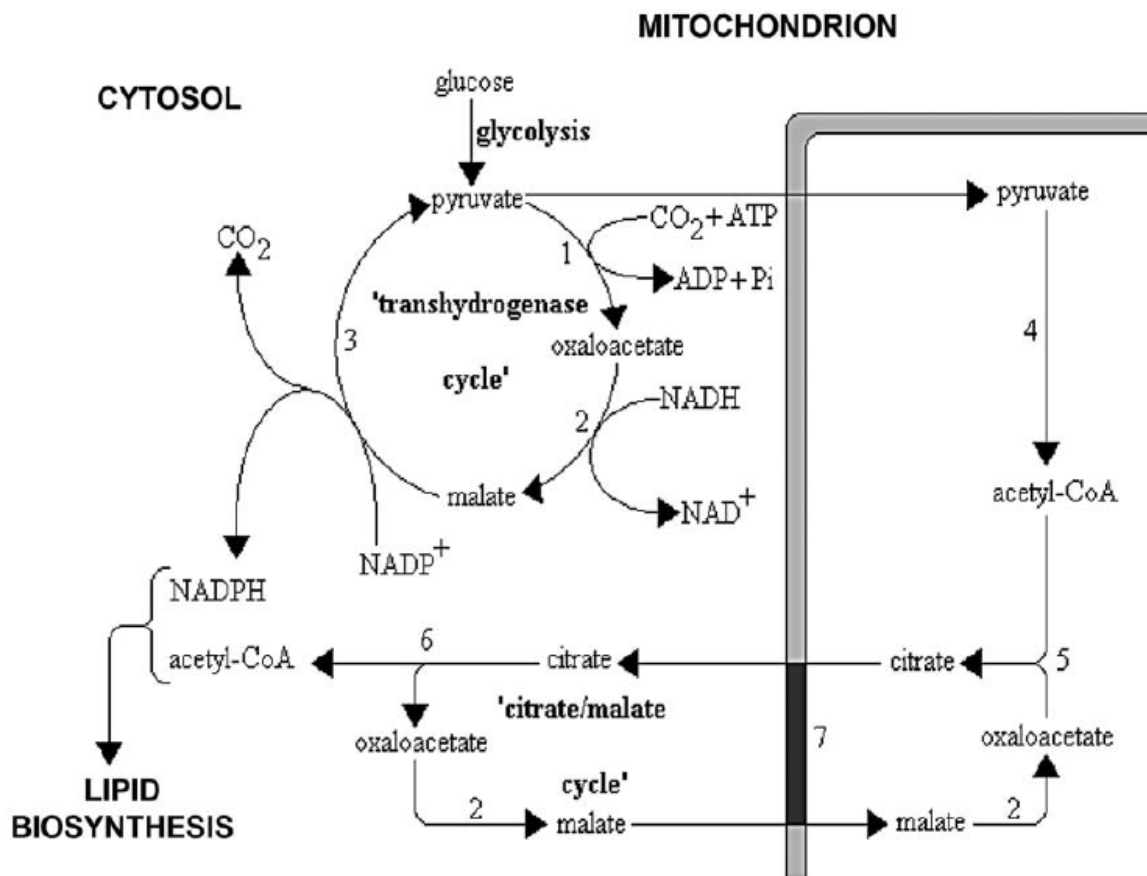




Για τη βιοσύνθεση των λιπαρών οξέων, εκτός από την παραγωγή του ακετυλο-CoA, είναι απαραίτητη η παροχή επαρκούς ποσότητας NADPH. Το μηλικό ένζυμο λειτουργεί ως προμηθευτής NADPH κατά την ακόλουθη αντίδραση:



Το μηλικό ένζυμο φέρεται να σχηματίζει ένα σταδιακό μεταβολικό σύμπλοκο που συνδυάζεται με την ATP: κιτρική λυάση και την συνθάση των λιπαρών οξέων, έτσι ώστε να εξασφαλίζεται άμεση επικοινωνία κατά τη μετατροπή του ακετυλο-CoA σε λιπαρά οξέα. Τα λιπαρά οξέα που βιοσυντίθενται εστεροποιούνται με γλυκερόλη σε τριγλυκερίδια και ενσωματώνονται μέσω του ενδοπλασματικού δικτύου σε σταγονίδια λιπαρών οξέων.



Σχήμα 1.3.1.1: Απεικόνιση του κύκλου του Krebs και του κύκλου του κιτρικού/μηλικού στην παροχή του ακετυλο-CoA και NADPH, για τη συσσώρευση μικροβιακού λίπους. Ένζυμα: 1. αποκαρβοξυλάση του πυροσταφυλικού οξέος, 2. αφυδρογονάση του μηλικού οξέος, 3. μηλικό ένζυμο, 4. αφυδρογονάση του πυροσταφυλικού οξέος, 5. κιτρική συνθάση, 6. ATP: κιτρική λυάση, 7. ένζυμο υπεύθυνο για τη λειτουργία του συστήματος μεταφοράς κιτρικού/μηλικού οξέος μεταξύ μιτοχονδρίου και κυτταροπλάσματος (Ratledge, 2004).

#### **1.4 Απομόνωση ζυμών**

Οι ζύμες απαντώνται σε διάφορα φυσικά περιβάλλοντα απ' όπου και μπορούν να απομονωθούν. Δεδομένου ότι μπορεί να συνυπάρχουν με μύκητες και βακτήρια διάφορες επιλεκτικές τεχνικές χρησιμοποιούνται για την απομόνωση τους. Η χρησιμοποίηση εκλεκτικών μέσων με τιμές pH ή συγκεκριμένης ενεργότητας νερού που μειώνουν ή αναστέλλουν την ανάπτυξη των βακτηρίων, ή με την ενσωμάτωση αντιβιοτικών μπορεί να γίνεται η απομόνωση των ζυμών. Η χρήση αντιβιοτικών όπως η χλωραμφενικόλη χρησιμοποιείται ευρέως για την απομόνωση ζυμών λόγω της θερμικής σταθερότητας και του μεγάλου αντιβακτηριακού φάσματος.

#### **1.5 Ταυτοποίηση ζυμών**

Για να μελετηθεί ο πληθυσμός των ζυμών χρησιμοποιούνται διάφορες τεχνικές. Οι περισσότερες από αυτές απαιτούν πρώτα την καλλιέργεια τους σε τρυβλίο και την ανάπτυξη τους σε κάποιο θρεπτικό μέσο και έπειτα γίνεται η ταυτοποίηση τους με μοριακές τεχνικές.

Με τη χρήση μοριακών τεχνικών ανάλυσης της αλληλουχίας του μιτοχονδριακού DNA και τη χρήση μοριακών δεικτών είναι εφικτή η ταυτοποίηση όχι μόνο του είδους των ζυμών που συμμετέχουν στη ζύμωση αλλά και των στελεχών που απαντώνται στη ζύμωση. Οι τεχνικές που χρησιμοποιούνται για την ταυτοποίηση του είδους των μικροοργανισμών είναι η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) του 26S ριβοσωμικού RNA και η ταυτοποίηση της αλληλουχίας του και η PCR με τη χρήση περιοριστικών ενζύμων στους εσωτερικούς μεταγραφικούς παράγοντες περιορισμού του 5,8 S ριβοσωμικού RNA. Οι τεχνικές που βασίζονται στην PCR μπορούν να κατατάξουν τους μικροοργανισμούς σε είδη ή/ και γένη χρησιμοποιώντας διάφορους κατάλληλους εκκινητές.

## **Σκοπός της μελέτης**

Σκοπός της μελέτης ήταν η απομόνωση ζυμών από διάφορες φυσικές πηγές και απόβλητα για την βιοτεχνολογική παραγωγή δευτερογενών μεταβολιτών κυρίως οργανικών οξέων (κιτρικό οξύ, μηλικό οξύ, φουμαρικό οξύ και ηλεκτρικό οξύ) και μικροβιακού λίπους.

## 2. Υλικά και μέθοδοι

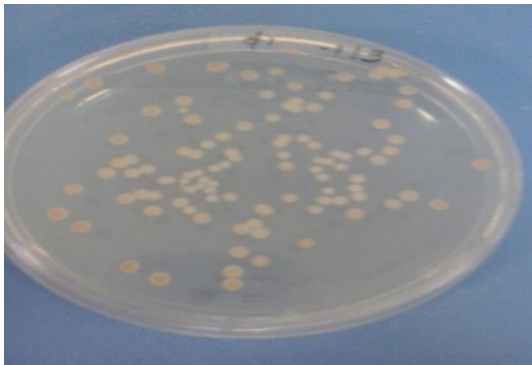
### 2.1 Απομόνωση ζυμών

Διαφορετικές φυσικές πηγές με υψηλά επίπεδα σακχάρων (γλυκόζη, φρουκτόζη και σακχαρόζη) επιλέχθηκαν για την απομόνωση ζυμών για την παραγωγή δευτερογενών μεταβολιτών. Συγκεκριμένα, η απομόνωση στελεχών ζυμών έγινε από την επιφάνεια και τη σάρκα 19 φρούτων τα οποία είναι: λευκά και ερυθρά σταφύλια (*Vitis vinifera*), φιρίκι (*Malus domestica*), φραγκόσυκα (*Opuntia ficus indica*), σύκα (*Ficus carica*), αχλάδια (*Pyrus pyrifolia*), δαμάσκηνα (*Prunus domestica*), ρόδια (*Punica granatum*) και πεπόνια (*Cucumis melo*). Επίσης, ελήφθησαν δείγματα από το δεύτερο στάδιο της παραγωγής ενσίρωματος.

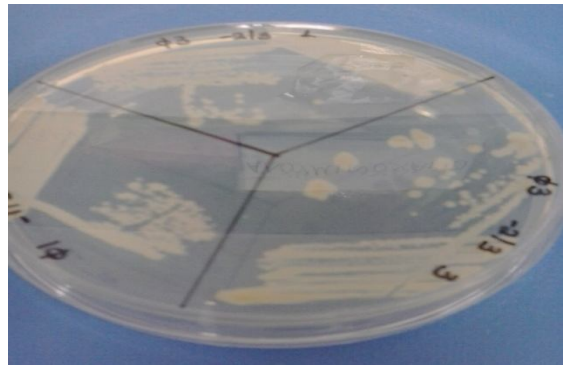
### 2.1 Διαδικασία απομόνωσης

Για την απομόνωση των ζυμών 10 g δείγματος τοποθετήθηκαν σε αποστειρωμένη σακούλα Stomacher με 90 mL αποστειρωμένου ισοτονικό διάλυμα Ringer και ομογενοποιήθηκαν σε συσκευή Stomacher. Ακολούθησαν διαδοχικές αραιώσεις των ομογενοποιημένων δειγμάτων σε αποστειρωμένο ισοτονικό διάλυμα Ringer και εξάπλωση σε τρυβλίο Petri με επιλεκτικό υπόστρωμα YGC, με σύσταση: 5 g·L<sup>-1</sup> εκχύλισμα ζύμης, 20 g·L<sup>-1</sup> γλυκόζη, 0,1 g·L<sup>-1</sup> χλωραμφενικόλη και 15 g·L<sup>-1</sup> άγαρ. Όλα τα δείγματα επώαστηκαν στους 27°C για 2 ημέρες. Μετά την επώαση, 3- 4 περιοχές από κάθε τρυβλίο Petri μεταφέρθηκαν με μικροβιολογικό κρίκο σε υγρό θρεπτικό μέσο κατάλληλο για τη παραγωγή δευτερογενών μεταβολιτών (η σύσταση του οποίου δίνεται στην επόμενη ενότητα).

Οι καλλιέργειες οι οποίες παρουσίασαν παραγωγή δευτερογενών μεταβολιτών (κιτρικού οξέος, ηλεκτρικού οξέος, μηλικού οξέος, φουμαρικού οξέος και μικροβιακού λίπους) μελετήθηκαν περαιτέρω. Συγκεκριμένα, έγινε μεταφορά 1mL από την υγρή καλλιέργεια σε δοκιμαστικούς σωλήνες και ακολούθησαν διαδοχικές αραιώσεις και στη συνέχεια ακολούθησε εξάπλωση στο επιλεκτικό υπόστρωμα YGC. Από κάθε εξάπλωση (εικόνα 2.1.1) επιλέχθηκαν οι αποικίες με βάση τη διαφορετικότητα της μορφολογίας τους (σχήμα, μέγεθος και χρώμα). Οι επιλεγμένες αποικίες υποβλήθηκαν σε γραμμική εξάπλωση με μικροβιολογικό κρίκο (streaking) σε τρυβλία Petri με θρεπτικό υπόστρωμα YGC (εικόνα 2.1.2). Τα στελέχη ζυμών διατηρήθηκαν σε τρυβλίο Petri με YGC στους 4°C.



Εικόνα 2.1.1: Αποικίες ζυμών σε YGC



Εικόνα 2.1.2: Γραμμική εξάπλωση

## 2.2 Θρεπτικά υποστρώματα για την παραγωγή δευτερογενών μεταβολιτών

### 2.2.1 Θρεπτικό μέσο μεικτών καλλιέργειών

Για την παραγωγή δευτερογενών μεταβολιτών με τις ζύμες που προηγουμένως απομονώθηκαν ακολούθησαν αρχικά μεικτές καλλιέργειες ζυμών σε υγρό θρεπτικό μέσο με πηγή άνθρακα  $20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  εμπορική σακχαρόζη,  $0,3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  εκχύλισμα ζύμης,  $0,5 \text{ mL}\cdot\text{L}^{-1}$  com steep liquor και μίγμα αλάτων με σύνθεση:  $11,7 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1} \text{ NaH}_2\text{PO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $1,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1} \text{ K}_2\text{HPO}_4$ ,  $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1} \text{ NaCl}$ ,  $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1} \text{ CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $0,04 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1} \text{ MgSO}_4\cdot \text{H}_2\text{O}$ ,  $0,044 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1} \text{ ZnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$  και  $0,016 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1} \text{ FeCl}_3\cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (Fu *et al.*, 2010; Joslyn, 1951). Οι ζυμώσεις διεξήχθησαν σε κωνικές φιάλες των 100 mL με 20 mL τελικό όγκο ζύμωσης για να επιτευχθεί επαρκώς αερόβιο περιβάλλον, υπό ανάδευσης 170 rpm, στους  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  και pH 5. Αποστειρωμένο  $\text{CaCO}_3$  προστέθηκε για να διατηρηθεί η τιμή του pH γύρω στο 5. Ο εμβολιασμός του θρεπτικού μέσου γινόταν με μικροβιολογικό κρίκο από τα τρυβλία Petri.

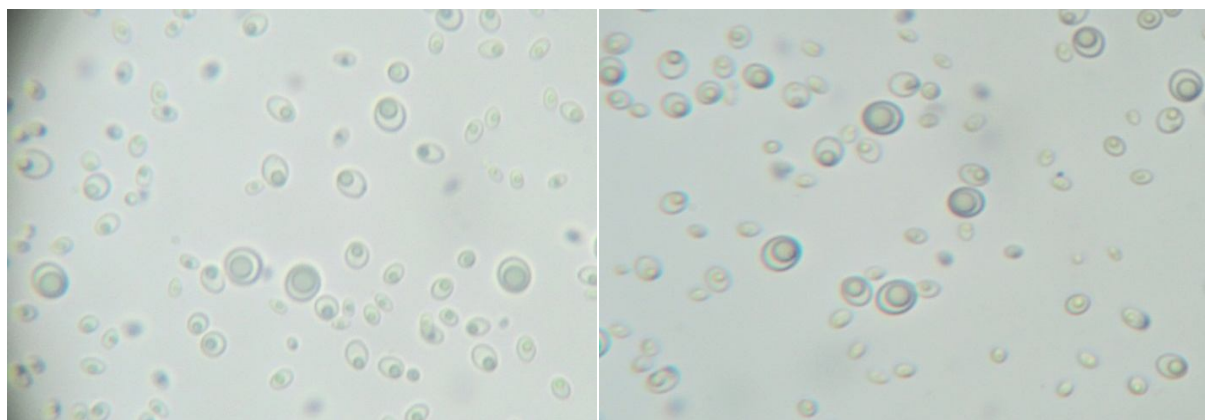
### 2.2.1 Θρεπτικό μέσο μονοκλωνικών καλλιέργειών για την παραγωγή οργανικών οξέων

Οι μεικτές καλλιέργειες που παρουσίασαν παραγωγή οργανικών οξέων και κυρίως κιτρικού, ηλεκτρικού, μηλικού και φουμαρικού οξέος, μετά την απομόνωση και διαχωρισμό τους καλλιεργήθηκαν σε υγρό θρεπτικό μέσο με σύσταση:  $40 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  γλυκόζη,  $0,3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  εκχύλισμα ζύμης,  $0,5 \text{ mL}\cdot\text{L}^{-1}$  com steep liquor και μίγμα αλάτων με σύνθεση:  $11,7 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1} \text{ NaH}_2\text{PO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $1,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1} \text{ K}_2\text{HPO}_4$ ,  $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1} \text{ NaCl}$ ,  $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1} \text{ CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $0,04 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1} \text{ MgSO}_4\cdot \text{H}_2\text{O}$ ,  $0,044 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1} \text{ ZnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $0,016 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1} \text{ FeCl}_3\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ,  $0,064 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1} \text{ CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$  και  $2 \text{ mL}\cdot \text{L}^{-1}$  βιοτίνη (Fu *et al.*, 2010).

Οι ζυμώσεις διεξήχθησαν σε κωνικές φιάλες των 100 mL με 20 mL τελικό όγκο ζύμωσης για να επιτευχθεί επαρκώς αερόβιο περιβάλλον, υπό ανάδευσης 170 rpm, στους 25 °C και pH 5. Αποστειρωμένο CaCO<sub>3</sub> προστέθηκε για να διατηρηθεί η τιμή του pH γύρω στο 5. Ο εμβολιασμός του θρεπτικού μέσου γινόταν με μικροβιολογικό κρίκο από τα τρυβλία Petri.

### 2.2.2 Θρεπτικό μέσο για την παραγωγή μικροβιακού λίπους

Οι μεικτές καλλιέργειες που παρουσίασαν συσσώρευση μικροβιακού λίπους (εικόνα 2.2.2.1) απομονώθηκαν και διαχωρίστηκαν με τη μέθοδο που αναφέρθηκε προηγουμένως. Στη συνέχεια για τη μελέτη και την επιλογή των ελαιογόνων μικροοργανισμών όλα τα στελέχη που απομονώθηκαν από τις μεικτές καλλιέργειες και παρατηρήθηκε συσσώρευση μικροβιακού λίπους καλλιεργήθηκαν αρχικά σε θρεπτικό μέσο YPD (10% εκχύλισμα ζύμης, 10% πεπτόνη, 10% γλυκόζη) για 24 h για την ανάπτυξη του εμβολίου και στη συνέχεια το εμβόλιο (10 % v/v) μεταφερόταν υπό ασηπτικές συνθήκες σε θρεπτικό μέσο με σύσταση: 20 g·L<sup>-1</sup> εμπορική σακχαρόζη, 0,3 g·L<sup>-1</sup> εκχύλισμα ζύμης, 0,5 mL·L<sup>-1</sup> corn steep liquor, 11,7 g·L<sup>-1</sup> NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, 1,5 g·L<sup>-1</sup> K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1 g·L<sup>-1</sup> NaCl, 1 g·L<sup>-1</sup> CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0,04 g·L<sup>-1</sup> MgSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, 0,044 g·L<sup>-1</sup> ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O και 0,016 g·L<sup>-1</sup> FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O. Οι ζυμώσεις, στην περίπτωση που έγινε ποσοτικοποίηση του λίπους στις 72 h, πραγματοποιήθηκαν σε κωνικές φιάλες των 250 mL πληρωμένες με 50 mL θρεπτικό υλικό, ενώ στην περίπτωση που μελετήθηκε η κινητική κατανάλωσης σακχάρων και η συσσώρευση λίπους διεξήχθησαν σε κωνικές φιάλες των 500 mL πληρωμένες με 80 mL θρεπτικό υλικό, υπό ανάδευσης 170 rpm, στους 25 °C. Τα υλικά και θρεπτικά μέσα που χρησιμοποιήθηκαν αποστειρώθηκαν σε αυτόκλειστο στους 121 °C για 20 min.



Εικόνα 2.2.2.1: Συσσώρευση μικροβιακού λίπους σε μεικτές καλλιέργειες ζυμών.

### 2.3 Προσδιορισμός σακχάρων και οργανικών οξέων

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης των σακχάρων και των παραγόμενων προϊόντων πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια της Υγρής Χρωματογραφία Υψηλής Αποδόσεως (High Performance Liquid Chromatography, HPLC). Η ταυτοποίηση των μεταβολικών προϊόντων βασίστηκε στον χρόνο κατακράτησης, ο οποίος συγκρίθηκε με γνωστά δείγματα αυτών. Ως κινητή φάση χρησιμοποιήθηκε υδατικό διάλυμα  $H_2SO_4$  (10 mM) και η ροή της ρυθμίστηκε στα 0,6 mL/min. Η στήλη με την οποία έγινε ο διαχωρισμός του μίγματος ήταν τύπου Aminex HPX-87H (300mm × 7,8 mm) και θερμοκρασίας 45 °C.

### 2.4 Προσδιορισμός βιομάζας

Η βιομάζα συλλέχθηκε με φυγοκέντρωση σε φυγόκεντρο τύπου Heraeus Sepatech Suprafuge 22 (9000 rpm, 10min). Ακολούθησε έκπλυση με απιονισμένο νερό και δεύτερη φυγοκέντρωση. Στη συνέχεια η βιομάζα μεταφέρθηκε σε προζυγισμένα φιαλίδια και τοποθετήθηκε στον φούρνο προς ξήρανση ( $90 \pm 5$  °C) μέχρι σταθερού βάρους. Το ξηρό υπόλειμμα ζυγίστηκε σε ζυγό ακριβείας τύπου Sartorius basic, και εκφράζεται σε  $g \cdot L^{-1}$ .

### 2.5 Εκχύλιση ενδοκυτταρικού λίπους

Σε κάθε ζύμωση που έλαβε χώρα πραγματοποιήθηκε ποσοτική ανάλυση του παραγόμενου ενδοκυτταρικού λίπους.

Για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης ενδοκυτταρικού λίπους που παράγεται κατά τη διάρκεια της υγρής ζύμωσης, μετά τη ζύγιση της ξηρής βιομάζας προστέθηκε 4 mL HCL 2M ανά 300 mg βιομάζας και ακολούθησε θέρμανση στους 80°C για 1h. Στη συνέχεια, ακολούθησε φυγοκέντρωση σε φυγόκεντρο τύπου Heraeus Sepatech Suprafuge 22 (9000 rpm, 10 min). Το ίζημα τοποθετήθηκε σε φιαλίδιο McCartney και προστέθηκε διάλυμα διαλυτών χλωροφορμίου ( $CHCl_3$ ):μεθανόλης σε αναλογία 2:1 (Folch *et al.*, 1957). Μετά την προσθήκη του προαναφερθέντος μίγματος διαλυτών τα φιαλίδια τοποθετούνταν σε σκότος ώστε να αποφευχθεί η οξείδωση των λιπαρών οξέων του ενδοκυτταρικού λίπους. Με το συγκεκριμένο μίγμα διαλυτών εκχυλίζεται το συνολικό μικροβιακό λίπος, ήτοι και τα αποθηκευτικά και τα δομικά λιπίδια. Κατόπιν η βιομάζα μαζί με το μίγμα διαλυτών υφίστατο διήθηση σε ηθμό. Το διήθημα συλλεγόταν σε προζυγισμένη φιάλη εξάτμισης και ακολούθησε εξάτμιση σε περιστροφικό εξάτμιστήρα (BUCHI Waterbath B-480, BUCHI Rotavapor R-114) για την απομάκρυνση των

διαλυτών. Τελικά, στη φιάλη εξάτμισης παρέμενε το μικροβιακό λίπος, η συγκέντρωση του μικροβιακού λίπους εκφραζόταν σε  $\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  ξηρής μάζας και  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  καλλιέργειας.

## **2.6 Ταυτοποίηση ζυμών**

### **2.6.1 Απομόνωση και καθαρισμός DNA**

Για την απομόνωση και καθαρισμό του DNA αρχικά έγινε αιώρηση της βιομάζας σε 1 mL διαλύματος 1M sorbitol, 0,1M EDTA (pH:7,5). Στη συνέχεια ακολούθησαν υπέρηχοι για τη διάρρηξη και λύση των κυττάρων, με αποτέλεσμα την απελευθέρωση του γονιδιωματικού DNA στο διάλυμα, και φυγοκέντρωση (15min, 13400rpm) και διάλυση του ιζήματος σε 0,5 50mM Tris-HCl, 20 mM EDTA (pH:7,4) για την αποδιάταξη της διπλής έλικας του DNA. Για την απομάκρυνση των πρωτεϊνών και των λιπιδίων προστέθηκε 50μL 10% SDS και παραμονή στους 65°C για 30 min. Έπειτα απενεργοποιήθηκε το SDS με την προσθήκη 0,2 mL οξικό κάλιο 5M και άμεση μεταφορά σε πάγο για 30 min. Ακολούθησε φυγοκέντρωση (15min, 13000rpm, 4°C) και στο υπερκείμενο προστέθηκε 1mL ισοπροπανόλης, μετά από παραμονή 5min σε θερμοκρασία δωματίου γίνεται επαναιώρηση σε 0.5 mL 70% αιθανόλη για τον καθαρισμό του DAN. Τέλος, το DNA λαμβάνεται σε καθαρή μορφή με φυγοκέντρωση (15min 13000rpm 4°C), πλήρη απομάκρυνση της αιθανόλης και απαναδιάλυση σε 50μL ddH<sub>2</sub>O

### **2.6.2 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης PCR**

Η PCR είναι μια ενζυμική μέθοδος σύνθεσης και πολλαπλασιασμού του DNA που μπορεί να ενισχύσει μια αλληλουχία από ένα μόνο μόριο DNA.

Σε μια τυπική αντίδραση PCR, ένα δείγμα DNA αναμιγνύεται με τριφωσφορικά νουκλεοτίδια, του δύο κατάλληλους εκκινητές και μια θερμοσταθερή DNA πολυμεράση σε κατάλληλο διάλυμα. Το δείγμα θερμαίνεται στους 95 °C προκειμένου να αποδιαταχθεί το DNA και ακολούθως ψύχεται στους 40-60 °C ανάλογα με τη θερμοκρασία επαναδιάταξης των εκκινητών ώστε αυτοί να υβριδοποιηθούν με τις αποδιαταγμένες αλυσίδες του DNA. Ακολουθεί πολυμερισμός στους 72 °C και τα παραπάνω βήματα επαναλαμβάνονται για 35 κύκλους, έως ότου συντεθεί αρκετό προϊόν. Η αντίδραση είναι εκθετική και ένα μόριο DNA μετά από 35 επαναλήψεις της αντίδρασης δίνει περίπου  $10^{12}$  μόρια DNA. Μετά το τέλος των κύκλων ακολουθεί η αντίδραση τελικής επέκτασης αφήνοντας το δείγμα στους 72 °C.



Για την ενίσχυση αλληλουχίας 26S ριβοσωμικού DNA σε κάθε σωληνάκι PCR προστίθενται τα ακόλουθα:

26S rDNA	
25 $\mu$ L	συγκέντρωση
10x buffer without MgCl <sub>2</sub>	2.5 $\mu$ L
DNA	2 $\mu$ L
Primer NL1	0.5 $\mu$ L
Primer NL2	0.5 $\mu$ L
dNTP's	0.5 $\mu$ L
Taq	0.2 $\mu$ L
H <sub>2</sub> O	18.8 $\mu$ L

Η αντίδραση τοποθετείται στη συσκευή της PCR και ακολουθεί το πρόγραμμα όπως φαίνεται στο πίνακα 2.6.2.1

Πίνακας 2.6.2.1: PCR program

94°C	5 min
94 °C	1 min
52°C	1 min
72°C	2 min
72°C	5 min

### 2.6.3 Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης

Η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό, την απομόνωση και την ταυτοποίηση DNA μορίων (Sambrook et al, 1989). Μόρια DNA μεγέθους 200 bp έως 50 kb μπορούν να διαχωριστούν σε πήκτωμα αγαρόζης διαφόρων συγκεντρώσεων. Όταν το ηλεκτρικό πεδίο εφαρμόζεται στα άκρα του πηκτώματος, το DNA, που είναι αρνητικά φορτισμένο σε ουδέτερο pH, κινείται προς την άνοδο με ταχύτητα αναστρόφως ανάλογη του λογάριθμου του μοριακού του βάρους. Η ηλεκτροφορητική κινητικότητα του DNA εξαρτάται επίσης και από τη συγκέντρωση της αγαρόζης στο πήκτωμα. Το DNA γίνεται ορατό σε υπεριώδες φως με τη βοήθεια βρωμιούχου αιθιδίου, το οποίο δεσμεύεται στη διπλή έλικα του DNA.

Η ποσοτικοποίηση βασίζεται στην εκτίμηση του φθορισμού που εκπέμπεται από τα μόρια του βρωμιούχου αιθιδίου κάτω από υπεριώδες φως. Το βρωμιούχο αιθίδιο ενσωματώνεται στο DNA σε ποσότητα ανάλογη με τη συγκέντρωση του DNA. Έτσι η σύγκριση του φθορισμού που εκπέμπεται από το προς ανάλυση DNA με το φθορισμό γνωστής ποσότητας DNA, μας παρέχει την εκτίμηση της ποσότητας του προς ανάλυση DNA.

Τα στάδια της ηλεκτροφόρησης DNA σε πηκτή αγαρόζης που ακλούθησαν αρχικά η παρασκευή διαλύματος αγαρόζης 1.5% και τοποθέτηση στα ειδικά πιατα ηλεκτροφόρησης. Πριν την πήξη του διαλύματος τοποθετούνται σε αυτό τα κτενάκια ηλεκτροφόρησης τα οποία θα επιτρέψουν το σχηματισμό θέσεων τοποθέτησης του DNA στο πήκτωμα, όταν αυτό στερεοποιηθεί. Στη συνέχεια το πήκτωμα τοποθετείται στις ειδικές συσκευές ηλεκτροφόρησης, οι οποίες γεμίζονται με διάλυμα ηλεκτροφόρησης. Στα δείγματα DNA προστίθεται διάλυμα χρωστικής και τοποθέτηση στο πήκτωμα αγαρόζης. Το διάλυμα αυτό επιτρέπει στο DNA να τοποθετηθεί στα πηγαδάκια και να μην διαχυθεί στο διάλυμα της ηλεκτροφόρησης, ενώ η χρωστική επιτρέπει την παρακολούθηση της πορείας της ηλεκτροφόρησης.

### 3. Αποτελέσματα

Η επιλογή στελεχών ζυμών που απομονώθηκαν από τις διάφορες φυσικές πηγές πραγματοποιήθηκε σε δύο στάδια. Κατά το πρώτο στάδιο καλλιεργήθηκαν μεικτές καλλιέργειες ζυμών σε υγρό θρεπτικό μέσο. Σε αυτό το στάδιο όσες καλλιέργειες παρουσίασαν παραγωγή οργανικών οξέων (μηλικό οξύ, ηλεκτρικό οξύ, φουμαρικό οξύ και κιτρικό οξύ) ή μικροβιακό λίπος απομονώθηκαν και διαχωρίστηκαν. Στη συνέχεια, οι ζύμες που διαχωρίστηκαν μελετήθηκαν ως προς την παραγωγή των δευτερογενών μεταβολιτών.

#### 3.1 Απομόνωση ζυμών

Η απομόνωση των ζυμών πραγματοποιήθηκε από 12 διαφορετικές φυσικές πηγές, όπως φαίνεται στον πίνακα 3.1.1, τα οποία επιλέχθηκαν λόγω της υψηλής περιεκτικότητάς του σε ζυμώσιμα σάκχαρα (γλυκόζη, φρουκτόζη και σακχαρόζη) που αποτελούν ευνοϊκό περιβάλλον για την ανάπτυξη ζυμών.

Πίνακας 3.1.1: Πηγές απομόνωσης και αντίστοιχος κωδικός

Πηγή απομόνωσης		Κωδικός
Αχλαδόμηλο	<i>Pyrus pyrifolia</i>	PP
Ρόδι	<i>Punica granatum</i>	PG
Δαμάσκηνο	<i>Prunus domestica insititia</i>	PDI
Σταφύλι	<i>Vitis vinifera</i>	VV
Σύκο	<i>Ficus carica</i>	FC
Φιρίκι	<i>Malus domestica</i>	MD
Βανίλια	<i>Prunus domestica</i>	PD
Φραγκόσυκο	<i>Opuntia ficus-indica</i>	OFI
Αχλάδι	<i>Pyrus communis</i>	PC
Πεπόνι	<i>Cucumis melo</i>	C
Ενσίρωμα υγρό		CSL
Ενσίρωμα στερεό		CSS

#### 3.2 Μεικτές καλλιέργειες ζυμών

Πρώτο στάδιο της μελέτης για παραγωγή δευτερογενών μεταβολιτών με τις ζύμες που απομονώθηκαν ήταν η καλλιέργεια μεικτού πληθυσμού ζυμών. Τα αποτελέσματα της παραγωγής ή μη των μεικτών καλλιεργειών παρουσιάζονται στον πίνακα 3.2.1. Όπως φαίνεται, παρουσιάστηκε παραγωγή οργανικών οξέων από τις περισσότερες πηγές απομόνωσης. Επίσης, συσσώρευση μικροβιακού λίπους παρατηρήθηκε σε όλες τις μεικτές καλλιέργειες εκτός από αυτές που απομονώθηκαν από το ρόδι και το στερεό και υγρό ενσίρωμα.

Πίνακας 3.2.1: Παραγωγή δευτερογενών μεταβολιτών κατά τις μεικτές καλλιέργειες ζυμών.

[με (+) χαρακτηρίζεται η παραγωγή του αντίστοιχου μεταβολίτη ,ενώ με (-) η μη]

Πηγή απομόνωσης	Κωδικός	Παραγωγή οργανικών οξέων και μικροβιακού λίπους							Μικροβιακό λίπος
		Μηλικό	Κιτρικό	Ηλεκτρικό	Φουμαρικό	Γαλακτικό	Μυρμηκικό	Οξικό	
<i>Pyrus pyrifolia</i>	PP	+	+	-	+	-	-	-	+
<i>Punica granatum</i>	PG	-	+	+	+	+	-	+	-
<i>Prunus dom.ins.</i>	PDI	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>Vitis vinifera</i>	VV	-	+	-	+	-	-	-	+
<i>Ficus carica</i>	FC	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>Malus domestica</i>	MD	-	+	-	+	-	+	-	+
<i>Prunus domestica</i>	PD	-	+	-	+	-	-	-	+
<i>Opuntia fic.-in.</i>	OFI	-	+	+	+	-	-	+	+
<i>Pyrus communis</i>	PC	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>Cucumis</i>	C	-	-	-	-	-	-	-	+
Ενσίρωμα υγρό	CSL	-	-	-	-	+	-	+	-
Ενσίρωμα στερεό	CSS	-	-	-	-	+	-	-	-

### 3.3 Παραγωγή οργανικών οξέων

#### 3.3.1 Μεικτές καλλιέργειες ζυμών προς παραγωγή οργανικών οξέων

Οι καλλιέργειες ζυμών σε υγρό θρεπτικό μέσο με 20 g·L<sup>-1</sup> εμπορικής σακχαρόζης που παρουσίασαν παραγωγή οργανικών οξέων παρουσιάζονται στον πίνακα 3.3.1.1.

Πίνακας 3.3.1.1: Παραγωγή οργανικών οξέων από τις μεικτές καλλιέργειες ζυμών

Πηγή απομόνωσης	Κωδικός	Χρόνος	Συγκέντρωση παραγόμενων οξέων (g·L <sup>-1</sup> )								
			Μηλικό	Κιτρικό	Ηλεκτρικό	Φουμαρικό	Γαλακτικό	Μυρμηκικό	Οξικό	Αιθανόλη	
<i>Opuntia ficus-indica</i>	OFI_A	72	-	2,85	-	-	-	-	-	0,18	-
	OFI_B	72	-	2,85	0,07	-	-	-	-	0,47	-
	OFI_C	94	-	5,24	0,07	0,03	-	-	-	0,18	-
<i>Malus domestica</i>	MD_A	98	-	-	-	0,06	-	-	-	-	-
	MD_B	98	-	3,20	-	0,17	-	0,14	-	-	-
	MD_C	72	-	-	-	0,09	-	-	-	-	-
<i>Prunus domestica</i>	PD_A	98	-	-	-	0,15	-	-	-	-	-
	PD_B	98	-	-	-	0,23	-	-	-	-	-
	PD_C	50	-	2,85	-	0,03	-	-	-	-	-
<i>Pyrus pyrifolia</i>	PP_A	50	-	-	-	0,03	-	-	-	-	-
	PP_B	50	0,45	3,94	-	0,09	-	-	-	-	-
<i>Vitis vinifera</i> (white)	VV_A	50	-	2,36	-	0,29	-	-	-	-	-
<i>Punica granatum</i>	PG_A	50	-	1,58	0,17	0,23	0,12	-	0,06	-	-

Το κιτρικό οξύ που παράχθηκε από τις μεικτές καλλιέργειες ζυμών παρουσίασε τις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις. Συγκεκριμένα κυμαίνεται από 1,58 έως 5,24 g·L<sup>-1</sup>. Η παραγωγή μηλικού

σημειώθηκε μόνο από τις ζύμες που απομονώθηκαν από το αχλαδόμηλο (*Pyrus pyrifolia*). Επίσης, η παραγωγή ηλεκτρικού και φουμαρικού οξέος σημειώθηκε σε αρκετές απομονώσεις αλλά σε πολύ μικρή συγκέντρωση (μικρότερη από 1 g·L<sup>-1</sup>).

### 3.3.2 Μονοκλωνικές καλλιέργειες ζυμών προς παραγωγή οργανικών οξέων

Στη συνέχεια της διαδικασίας επιλογής στελεχών ζυμών προς την παραγωγή οργανικών οξέων, ακολούθησε η διαδικασία διαχωρισμού. Συγκεκριμένα, απομονώθηκαν οι ζύμες από τις μεικτές καλλιέργειες που παρουσίασαν παραγωγή κιτρικού, μηλικού, ηλεκτρικού και φουμαρικού οξέος, λόγω του μεγαλύτερου βιοτεχνολογικού ενδιαφέροντος. Τα στελέχη ζυμών που απομονώθηκαν, καλλιεργήθηκαν σε συνθετικό θρεπτικό μέσο με πηγή άνθρακα τη γλυκόζη (40 g·L<sup>-1</sup>). Τα αποτελέσματα της παραγωγής οργανικών οξέων παρουσιάζονται στον πίνακα 3.3.2.1.

Πίνακας 3.3.2.1: Παραγωγή οργανικών οξέων κατά την καλλιέργεια των ζυμών σε θρεπτικό μέσο με αρχική συγκέντρωση γλυκόζης 40 g·L<sup>-1</sup>.

#### Πηγή απομόνωσης: Φραγκόσυκο- *Opuntia ficus indica*

Κωδικός	Χρόνος	Συγκέντρωση παραγόμενων οξέων (g·L <sup>-1</sup> )							Αιθανόλη
		Μηλικό	Κιτρικό	Ηλεκτρικό	Φουμαρικό	Γαλακτικό	Μυρμηκικό	Οξικό	
OFI_A1	114	0,31	<b>7,85</b>	0,14	-	2,88	-	-	1,93
OFI_A2	114	0,84	<b>5,70</b>	0,24	-	3,56	-	0,06	3,14
OFI_A3	138	1,01	-	0,31	-	3,80	-	-	<b>5,64</b>
OFI_B1	114	0,80	5,42	0,41	0,03	<b>9,63</b>	-	-	1,00
OFI_B2	138	1,15	5,53	0,34	-	<b>3,68</b>	-	-	1,29
OFI_C1	138	<b>4,09</b>	-	-	-	4,08	-	0,12	0,07
OFI_C2	138	<b>1,43</b>	-	-	-	1,29	-	0,47	-
OFI_C3	94	0,94	5,56	0,44	0,06	<b>4,48</b>	-	0,12	0,36
OFI_C4	114	0,77	-	0,14	-	<b>2,45</b>	-	-	1,00
OFI_C5	138	0,84	-	-	-	<b>1,78</b>	-	-	-

#### Πηγή απομόνωσης: Φιρίκι- *Malus domestica*

Κωδικός	Χρόνος	Συγκέντρωση παραγόμενων οξέων (g·L <sup>-1</sup> )							Αιθανόλη
		Μηλικό	Κιτρικό	Ηλεκτρικό	Φουμαρικό	Γαλακτικό	Μυρμηκικό	Οξικό	
MD_A1	138	1,68	-	0,14	-	1,23	-	-	<b>3,14</b>
MD_A2	114	0,59	<b>6,20</b>	0,34	-	4,29	-	0,24	1,43
MD_B1	94	0,38	6,69	-	0,15	0,55	0,43	-	<b>7,00</b>
MD_B2	94	0,56	-	-	0,26	0,74	0,85	-	<b>6,07</b>
MD_B3	94	0,28	-	-	-	0,12	-	-	<b>6,79</b>
MD_C1	94	0,56	5,39	0,51	0,26	2,27	-	-	<b>6,14</b>
MD_C2	70	0,91	2,96	0,20	-	1,53	-	-	<b>6,64</b>

**Πηγή απομόνωσης: Βανίλια- *Prunus domestica***

Κωδικός	Χρόνος	Συγκέντρωση παραγόμενων οξέων (g·L <sup>-1</sup> )							Αιθανόλη
		Μηλικό	Κιτρικό	Ηλεκτρικό	Φουμαρικό	Γαλακτικό	Μυρμηκικό	Οξικό	
PD_A1	72	1,12	-	0,51	0,09	1,78	-	-	<b>7,43</b>
PD_A2	48	0,49	-	0,20	-	1,78	-	-	<b>11,50</b>
PD_A3	96	0,63	-	0,65	0,58	1,10	-	0,12	<b>8,14</b>
PD_B1	96	0,66	-	0,34	0,29	0,49	0,36	-	<b>7,14</b>
PD_B2	45	0,98	-	0,17	-	0,92	-	-	<b>5,43</b>
PD_B3	94	0,59	<b>5,00</b>	0,65	0,38	0,86	0,78	-	5,00
PD_C1	72	0,31	-	0,24	0,29	0,37	0,21	-	<b>6,43</b>
PD_C2	72	-	-	<b>0,88</b>	-	-	-	0,06	-

**Πηγή απομόνωσης: Αχλαδόμηλο- *Pyrus pyrifolia***

Κωδικός	Χρόνος	Συγκέντρωση παραγόμενων οξέων (g·L <sup>-1</sup> )							Αιθανόλη
		Μηλικό	Κιτρικό	Ηλεκτρικό	Φουμαρικό	Γαλακτικό	Μυρμηκικό	Οξικό	
PP_A1	96	0,45	-	-	0,20	2,21	-	0,06	<b>6,64</b>
PP_A2	48	1,05	-	0,24	-	1,78	-	-	<b>5,72</b>
PP_A3	48	0,80	-	0,24	-	2,15	-	-	<b>6,64</b>
PP_B1	96	0,94	-	0,17	-	2,94	-	0,18	<b>3,71</b>

**Πηγή απομόνωσης: Σταφύλι- *Vitis vinifera***

Κωδικός	Χρόνος	Συγκέντρωση παραγόμενων οξέων (g·L <sup>-1</sup> )							Αιθανόλη
		Μηλικό	Κιτρικό	Ηλεκτρικό	Φουμαρικό	Γαλακτικό	Μυρμηκικό	Οξικό	
VV_A1	72	1,19	-	0,20	-	4,78	-	0,12	<b>10,22</b>
VV_A2	72	0,70	-	0,17	-	4,91	-	-	<b>10,00</b>
VV_A3	72	0,52	5,07	0,10	-	3,92	-	0,12	<b>9,86</b>

**Πηγή απομόνωσης: Ρόδι- *Punica granatum***

Κωδικός	Χρόνος	Συγκέντρωση παραγόμενων οξέων (g·L <sup>-1</sup> )							Αιθανόλη
		Μηλικό	Κιτρικό	Ηλεκτρικό	Φουμαρικό	Γαλακτικό	Μυρμηκικό	Οξικό	
PG_A1	94	-	<b>3,56</b>	0,41	-	3,13	-	-	3,21
PG_A2	48	0,98	-	0,17	-	1,59	-	-	<b>2,50</b>
PG_A3	72	1,89	-	0,37	-	2,88	-	-	<b>5,29</b>

Όπως παρατηρείται από τον παραπάνω πίνακα, όλες οι ζύμες παρήγαγαν αιθανόλη σε πολλές εκ των οποίων ήταν το κύριο προϊόν της ζύμωσης. Σε σύγκριση με τις μεικτές καλλιέργειες, όπου δεν σημειώθηκε παραγωγή αιθανόλης, η παραγωγή αιθανόλης στις μονοκλωνικές καλλιέργειες πιθανόν οφείλεται στην αρχική συγκέντρωση σακχάρων που χρησιμοποιήθηκε (φαινόμενο Crabtree). Ωστόσο, τα αποτελέσματα με περισσότερο βιοτεχνολογικό ενδιαφέρον αποτελούν τα στελέχη ζυμών που παρήγαγαν κιτρικό, μηλικό και ηλεκτρικό οξύ. Συγκεκριμένα, 5 ζύμες παρήγαγαν ως κύριο μεταβολικό προϊόν κιτρικό οξύ με μεγαλύτερη συγκέντρωση (7,85 g·L<sup>-1</sup>) να

παρουσιάζει η ζύμη με κωδικό OFI\_A1 που απομονώθηκε από το φραγκόσυκο. Επιπλέον, οι ζύμες OFI\_C1 και OFI\_C2 που απομονώθηκαν από το φραγκόσυκο σημείωσαν παραγωγή μηλικού οξέος (ως κύριο προϊόν της ζύμωσης) σε συγκεντρώσεις 4,09 και 1,43 g·L<sup>-1</sup>, αντίστοιχα. Η παραγωγή ηλεκτρικού οξέος, παρατηρήθηκε σε χαμηλές συγκεντρώσεις (μικρότερη από 1 g·L<sup>-1</sup>) παρ' όλα αυτά στη ζύμη PD\_C2 που απομονώθηκε από βανίλια αν και η συγκέντρωση ήταν χαμηλή (0,88 g·L<sup>-1</sup>) αποτελεί το κύριο προϊόν της ζύμωσης. Τέλος, η παραγωγή φουμαρικού οξέος σε όλα τα στελέχη ζυμών ήταν πολύ χαμηλή, με τη μεγαλύτερη τιμή να φτάνει τα 0,58 g·L<sup>-1</sup>. Στον πίνακα 3.3.2.2 παρουσιάζονται συγκεντρωτικά τα αποτελέσματα των απομονώσεων με μεγαλύτερο βιοτεχνολογικό ενδιαφέρον. Συμπεραίνουμε ότι, απομονώθηκαν 5 ζύμες που μπορούν να παράγουν κιτρικό οξύ, 2 ζύμες για παραγωγή μηλικού οξέος και 1 για παραγωγή ηλεκτρικού οξέος.

Πίνακας 3.3.2.2: Αποτελέσματα των στελεχών ζυμών με μεγαλύτερο βιοτεχνολογικό ενδιαφέρον

Πηγή απομόνωσης	Κωδικός	Κύριο προϊόν	Συγκέντρωση (g·L <sup>-1</sup> )	Απόδοση <sup>†</sup> (g·g <sup>-1</sup> )	Απόδοση <sup>††</sup> (g·g <sup>-1</sup> )
	OFI_A1	Κιτρικό	7,85	0,20	0,47
Φραγκόσυκο- <i>Opuntia ficus indica</i>	OFI_A2	Κιτρικό	5,70	0,21	0,42
	OFI_C1	Μηλικό	4,09	0,24	0,34
	OFI_C2	Μηλικό	1,43	0,30	0,45
Φιρίκι- <i>Malus communis</i>	MC_A2	Κιτρικό	6,20	0,18	0,47
Βανίλια- <i>Prunus domestica</i>	PD_B3	Κιτρικό	5,00	0,15	0,40
	PD_C2	Ηλεκτρικό	0,88	0,15	0,94
Ρόδι- <i>Punica granatum</i>	PG_A1	Κιτρικό	3,56	0,16	0,35

<sup>†</sup> g παραγόμενου προϊόντος/g σακχάρων που καταναλώθηκαν

<sup>††</sup> g κύριου προϊόντος/ g συνολικών παραπροϊόντων

### 3.4 Παραγωγή μικροβιακού λίπους

Οι μεικτές καλλιέργειες των στελεχών ζυμών που παρουσίασαν συσσώρευση μικροβιακού λίπους απομονώθηκαν και διαχωρίστηκαν. Στη συνέχεια ακολούθησαν ζυμώσεις με τα στελέχη ζυμών και μελετήθηκε το ποσοστό συσσώρευση μικροβιακού λίπους σε 72 ώρες με σκοπό την επιλογή των στελεχών ζυμών που χαρακτηρίζονται ως ελαιογόνοι.

Στον πίνακα 3.4.1 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από τη μελέτη ενδοκυτταρικού λίπους στα στελέχη ζυμών που απομονώθηκαν. Παρατηρείται ότι 24 στελέχη ζυμών μπορούν να χαρακτηριστούν ως ελαιογόνες καθώς έχουν την ικανότητα να συσσωρεύουν ενδοκυτταρικό λίπος περισσότερο από 20 % επί της ξηράς τους μάζας.

Πίνακας 3.4.1: Αποτελέσματα των στελεχών ζυμών που απομονώθηκαν για την παραγωγή μικροβιακού λίπους.

Πηγή απομόνωσης	Κωδικός	Βιομάζα (g·L <sup>-1</sup> )	% Λίπος	Πηγή απομόνωσης	Κωδικός	Βιομάζα (g·L <sup>-1</sup> )	% Λίπος
Βανίλια- <i>Prunus domestica</i>	PD_D1	7,21	20,70	Αχλαδόμηλο- <i>Pyrus pyrifolia</i>	PP_E1	7,78	15,70
	PD_D2	7,29	<b>24,89</b>		PP_E2	9,94	12,25
	PD_E1	7,03	21,03		PP_E3	7,33	23,27
	PD_E2	5,60	27,05		PP_C1	6,19	19,08
	PD_E3	6,47	13,18		PP_C2	8,11	17,33
	PD_E4	7,54	23,41		PP_C3	7,91	19,06
	PD_F1	7,24	<b>25,00</b>		PP_D1	6,88	24,87
	PD_F2	5,90	22,01		PP_D2	5,66	33,51
	PD_H1	6,58	21,88		PP_D3	7,18	<b>31,15</b>
Φραγκόσυκο- <i>Opuntia ficus- indica</i>	PD_H2	6,80	20,76	Σύκο- <i>Ficus carica</i>	FC_A1	7,70	16,14
	OFI_D1	6,90	12,62		FC_A2	10,72	11,95
	OFI_D2	6,44	20,55		FC_A3	7,53	8,30
	OFI_D3	6,53	12,44	Δαμάσκηνο- <i>Prunus domestica insititia</i>	PDI_A1	9,01	14,00
	OFI_E1	6,93	23,50		PDI_A2	6,99	15,93
OFI_E2	8,06	16,40	PDI_A3		7,02	18,48	
Σταφύλι- <i>Vitis vinifera</i>	VV_B1	6,63	28,88	PDI_B1	2,06	8,29	
	VV_C1	7,87	9,43	Αχλάδι- <i>Pyrus communis</i>	PC_A1	6,97	10,19
	VV_C3	8,36	6,52		PC_A2	6,52	<b>24,85</b>
	VV_D1	10,09	13,70		PC_A3	7,08	19,15
	VV_D2	8,13	9,92	Φιρίκι- <i>Malus domestica</i>	MD_D1	6,63	21,04
	VV_D3	7,69	18,70		MD_D2	6,98	18,61
	VV_D4	7,09	<b>23,36</b>		MD_E1	9,10	14,15
Πεπόνι- <i>Cucumis</i>	C_A1	6,87	17,27		MD_E2	7,33	24,32
	C_A2	10,20	17,32	MD_F1	7,24	<b>30,77</b>	
	C_A3	10,16	20,63	MD_F2	6,74	29,22	
				MD_F3	6,85	29,38	



Από αυτά τα στελέχη ζυμών που χαρακτηρίζονται ως ελαιογόνες επιλέχθηκαν 6 με βάση το ποσοστό λίπους που συσσωρεύτηκε και μελετήθηκαν περαιτέρω. Συγκεκριμένα καλλιεργήθηκαν σε εμπορική σακχαρόζη με αρχική συγκέντρωση  $100 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ . Τα αποτελέσματα των στελεχών στο χρόνο που παρατηρήθηκε η μέγιστη παραγωγή ενδοκυτταρικού λίπους παρουσιάζονται στον πίνακα 3.4.2.

Πίνακας 3.4.2: Αποτελέσματα των στελεχών ζυμών σε υπόστρωμα εμπορικής σακχαρόζη ( $100 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ )

Πηγή απομόνωσης	Κωδικός	Χρόνος (h)	Βιομάζα ( $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )	Λίπος ( $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )	Λίπος %	Κιτρικό ( $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )	Αιθανόλη ( $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )
<i>Prunus domestica</i>	PD_D2	72	8,98	2,05	22,83	16,55	10,08
<i>Vitis vinifera</i>	VV_D4	72	9,10	1,98	21,76	17,72	7,42
<i>Pyrus communis</i>	<b>PC_A2</b>	72	9,08	2,80	<b>30,84</b>	7,17	37,02
<i>Prunus domestica</i>	PD_F1	72	8,28	1,22	14,73	11,40	30,73
<i>Pyrus pyrifolia</i>	PP_D3	72	11,26	1,85	16,43	6,99	39,99
<i>Malus domestica</i>	MD_F1	72	6,75	1,73	25,63	15,73	6,84

Όπως παρατηρείται, η συσσώρευση του λίπους για όλα τα στελέχη ήταν μειωμένη εκτός από αυτό που απομονώθηκε από το αχλάδι- PC\_A2 (*Pyrus communis*) που σημείωσε μικρή αύξηση (19,4 %). Κατά την καλλιέργεια των ζυμών παρατηρήθηκε παραγωγή κιτρικού οξέος και αιθανόλης σε υψηλές συγκεντρώσεις. Η παραγωγή κιτρικού οξέος στο μέσο της καλλιέργειας είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση του pH που πιθανότατα να οφείλεται στην χαμηλή συσσώρευση ενδοκυτταρικού λίπους. Επιπλέον, η υψηλή συγκέντρωση σακχάρων μπορεί να επιδρά παρεμποδιστικά για τη βιοσύνθεση μικροβιακού λίπους. Κρίνεται λοιπόν απαραίτητη η διερεύνηση της αρχικής συγκέντρωσης σακχάρου για τον προσανατολισμό του μεταβολισμού προς τη συσσώρευση μικροβιακού λίπους.

### 3.4.1 Ταυτοποίηση ελαιογόνων ζυμών

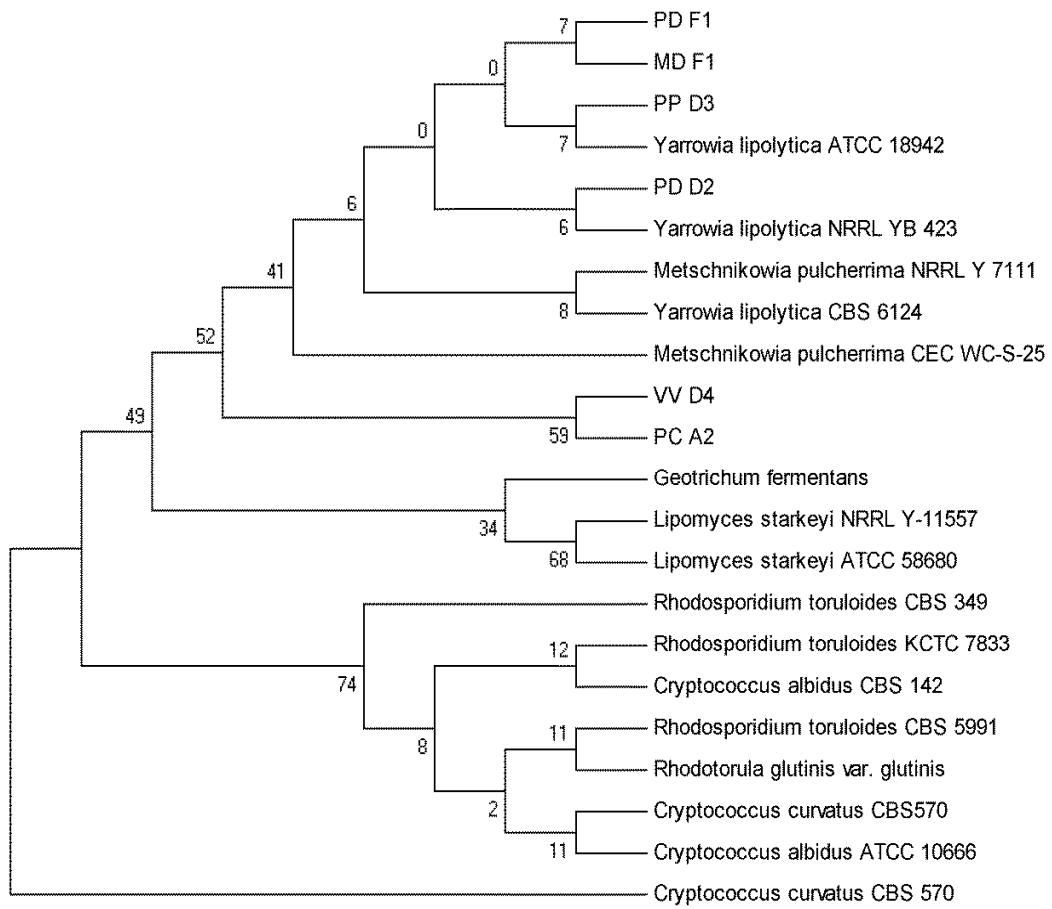
Η ενισχυμένη 26S αλληλουχία του ριβοσωμικού RNA ταυτοποιήθηκε στις ζύμες που επιλέχθηκαν για περαιτέρω μελέτη και προέκυψε σημαντική συγγένεια με το γένος *Metschnikowia* (Πίνακας 3.4.1.1). Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε συγγένεια του PD\_D2 με το είδος *Metschnikowia andauensis*, των PD\_F1 και MD\_F1 με το είδος *Metschnikowia pulcherrima*, ενώ οι ζύμες με κωδικούς PC\_A2, PP\_D3 και VV\_D4, δεν παρουσίασαν σημαντική συσχέτιση με κάποιο είδος. Παρ' όλο που από το είδος *Metschnikowia pulcherrima* δεν έχει παρατηρηθεί η παράγωγή λίπους, μόνο σε μια αναφορά (Fabio Sanntamauro *et al.*, 2014)

σημειώθηκε η παραγωγή 7,4 g·L<sup>-1</sup> βιομάζας με 40% συσσώρευση μικροβιακού λίπους χρησιμοποιώντας γλυκερόλη (30 g·L<sup>-1</sup>) σαν πηγή άνθρακα.

Πίνακας 3.4.1: Αποτελέσματα συγγένειας με βάση την ταυτοποίηση της ενισχυμένης 26S αλληλουχίας του ριβοσωμικού RNA

Κωδικός	Είδος - Συγγένεια με βάση την ενίσχυση του 26S rRNA	Max score	Query coverage	E value	Identical	Accession number
PD_D2	<i>Metschnikowia andauensis</i> , συγγενικό είδος	815	95%	0.0	98%	AJ745108.1
VV_D4	Άγνωστο είδος	782	86%	0.0	92%	JX188181.1
PC_A2	Άγνωστο είδος	257	72%	3,00E-65	93%	HM627131.1
PD_F1	<i>Metschnikowia pulcherrima</i> , συγγενικό είδος	841	99%	0.0	95%	JX103182.1
PP_D3	Άγνωστο είδος	638	98%	2,00E-179	85%	JX188181.1
MD_F1	<i>Metschnikowia aff. pulcherrima</i> , συγγενικό είδος	896	96%	0.0	99%	JX188181.1

Όπως φαίνεται και στο φυλογενετικό δέντρο (Σχήμα 3.4.1) που κατασκευάστηκε με βάση την 26S αλληλουχία του ριβοσωμικού RNA με τυπικά στελέχη (type strains) ελαιογόνων ζυμών, οι ζύμες με κωδικούς PD\_F1, MD\_F1, PP\_D3, και PD\_D2 παρουσίασαν συγγένεια με τα είδη *Metschnikowia pulcherrima* και *Yarrowia lipolytica*. Οι ζύμες με κωδικούς PC\_A2 και VV\_D4, παρουσιάζονται σε πιο απομακρυσμένο κλάδο και δεν παρουσίασαν σημαντικές ομοιότητες με κάποια από τα γνωστά είδη ελαιογόνων ζυμών.



Σχήμα 3.4.1: Φυλογενετικό δέντρο όπως προέκυψε μετά την ταυτοποίηση της 26S ριβοσωμικής RNA αλληλουχίας.

#### 4. Συμπεράσματα

Η παραγωγή οργανικών οξέων και μικροβιακού λίπους μέσω μικροβιακών ζυμώνσεων αποτελεί πεδίο έρευνας για την επιστήμη της βιοτεχνολογίας. Τα τελευταία χρόνια έχει στραφεί το ερευνητικό ενδιαφέρον προς παραγωγή οργανικών οξέων χρησιμοποιώντας διάφορους μικροοργανισμούς (μύκητες, ζύμες, βακτήρια) και αξιοποιώντας ανανεώσιμα υποστρώματα.

Τα οργανικά οξέα έχουν πλήθος εφαρμογών όπως η χρήση ως μέσο οξίνισης και βελτίωσης της γεύσης στη βιομηχανία τροφίμων καθώς και στη βιομηχανία πολυμερισμού. Μέχρι σήμερα, η παραγωγή τους γίνεται μέσω της πετροχημικής βιομηχανίας, ωστόσο λόγω της αύξησης της τιμής πετρελαίου και τις ανησυχίες για την κλιματική αλλαγή το ενδιαφέρον έχει στραφεί στην παραγωγή οργανικών οξέων μέσω μικροβιακών ζυμώνσεων. Το 2004, οι Werpy και Petersen κατέταξαν το ηλεκτρικό, φουμαρικό και μηλικό οξύ στα 12 πιο ενδιαφέρον χημικά στοιχεία που μπορούν να παραχθούν από βιομάζα (Werpy and Petersen, 2004).

Η παραγωγή μικροβιακών ελαίων, επίσης αποτελεί ερευνητικό πεδίο στη σύγχρονη βιοτεχνολογία. Τα μικροβιακά λιπίδια που παράγονται από ελαιογόνους μικροοργανισμούς αποτελούνται κυρίως από τριγλυκερίδια, φωσφολιπίδια και σε μικρότερο βαθμό από εστέρες στερολών. Τα λιπίδια αυτά δύνανται να χρησιμοποιηθούν στην παραγωγή προσθέτων σε τρόφιμα υψηλής διατροφικής αξίας, στην παρασκευή συμπληρωμάτων διατροφής και φαρμακευτικών σκευασμάτων. Επίσης, το μικροβιακό λίπος θα μπορούσε να βρει χρήση και στην παραγωγή καυσίμου βιολογικής προέλευσης- βιοντήζελ, καθώς και στην παραγωγή λιπιδίων σπανίως απαντώμενης σύστασης όπως το λίπος του κακάου με εξεζητημένης δομή τριγλυκεριδίων.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η χρήση ζυμών για τη βιοτεχνολογική παραγωγή δευτερογενών μεταβολιτών. Δεδομένου ότι οι ζύμες παρουσιάζουν μεγαλύτερη αντοχή σε υψηλές συγκεντρώσεις σακχάρων, είναι λιγότερο ευαίσθητες σε μεταλλικά ιόντα, μπορεί να γίνει καλύτερος έλεγχος της διεργασία και μπορούν να αξιοποιούν ένα ευρύ φάσμα υποστρωμάτων πλεονεκτούν σε σύγκριση με τους άλλους μικροοργανισμούς.

Στα πλαίσια της παρούσας μελέτης, ερευνήθηκε η δυνατότητα παραγωγής δευτερογενών μεταβολιτών από στελέχη ζυμών που απομονώθηκαν από φυσικές πηγές.

Μέχρι σήμερα λίγες μελέτες αναφέρονται στην παραγωγή μηλικού οξέος, φουμαρικού οξέος και ηλεκτρικού οξέος με ζύμες. Στον πίνακα 4.1 παρουσιάζονται οι μελέτες σχετικά με την παραγωγή αυτών των οξέων από ζύμες.

Πίνακας 4.1: Παραγωγή μηλικού, φουμαρικού και ηλεκτρικού οξέος από ζύμες

Στέλεχος	Υπόστρωμα	Μηλικό (g·L <sup>-1</sup> )	Φουμαρικό (g·L <sup>-1</sup> )	Ηλεκτρικό (g·L <sup>-1</sup> )	Αναφορά
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i> V19	Γλυκόζη	74,9	-	7,7	Taing <i>et al</i> , 2007
<i>S. cerevisiae</i> 1141 & 1083	Γλυκόζη	< 1	-	-	Fatichenti <i>et al</i> , 1984
<i>S. cerevisiae_engineered</i>	Γλυκόζη	59	-	8	Zelle <i>et al</i> , 2008
<i>S. cerevisiae</i> DMM1-15A	Γαλακτόζη	5,8	-	-	Pines, 1996
<i>S. cerevisiae</i> 52	Γλυκόζη	1,78	-	-	Schwartz and Radler, 1988
<i>S. uvarum</i> GE1	Γλυκόζη	3,16	-	-	Schwartz and Radler, 1988
<i>Candida catenulata</i>	Αιθανόλη	4	-	5,2	Kamzolova <i>et al.</i> , 2009
<i>Candida zeylanoides</i>	Αιθανόλη	8,8	-	9,4	Kamzolova <i>et al.</i> , 2009
<i>Yarrowia. lipolytica</i> 69	Αιθανόλη	0,4	0,12	0,5	Kamzolova <i>et al.</i> , 2009
<i>Candida hydrocarbofumarica</i>	Γλ. σταφυλιών	-	13,5	-	Gobbetti and Vincenzi, 1993
<i>Candida hydrocarbofumarica</i>	Υδρογονάνθρακα	-	7,5	-	Yamada <i>et al</i> , 1970
<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	Γλυκερόλη	8,47	-	0,25	Garcia-Fraile <i>et al.</i> , 2013

Όπως παρατηρείται, η μέγιστη παραγωγή μηλικού οξέος (74,9 g·L<sup>-1</sup>) από ζύμες, σημειώθηκε από το στέλεχος *Zygosaccharomyces rouxii* V19 σε υπόστρωμα γλυκόζης (300 g·L<sup>-1</sup>) με την προσθήκη 5 g·L<sup>-1</sup> γλουταμικού οξέος. Οι Gobbetti and De Vincenzi αναφέρουν την ικανότητα παραγωγής φουμαρικού οξέος (13,5 g·L<sup>-1</sup>) από *Candida hydrocarbofumarica* σε υπόστρωμα γλεύκους σταφυλιών. Ενώ, η μέγιστη παραγωγή ηλεκτρικού οξέος (9,4 g·L<sup>-1</sup>) σημειώθηκε από το στέλεχος *Candida zeylanoides* VKM Y-2324 σε υπόστρωμα αιθανόλης.

Η παραγωγή κιτρικού οξέος με τη χρήση στελεχών ζυμών, κυρίως του γένους *Yarrowia*, έχει μελετηθεί εκτενώς σημειώνοντας υψηλές συγκεντρώσεις και απόδοση. Όπως παρατηρείται από τον πίνακα 4.2 η παραγωγή κιτρικού οξέος με τη χρήση στελεχών *Yarrowia lipolytica* και αξιοποιώντας τη γλυκερόλη ως υπόστρωμα κυμαίνεται από 8,1-125 g·L<sup>-1</sup> ανάλογα με το σύστημα και τις συνθήκες καλλιέργειας. Ωστόσο, τα στελέχη αυτά δεν έχουν την ικανότητα να καταναλώνουν τη σακχαρόζη καθώς δεν παράγουν το ένζυμο ιμπερτάση. Η παραγωγή κιτρικού οξέος αξιοποιώντας ως υπόστρωμα τη σακχαρόζη έχει μελετηθεί από του Forster *et al*, σε ανασυνδιασμένο στέλεχος *Y. lipolytica*, όπου η συγκέντρωση κιτρικού οξέος ήταν 140 g·L<sup>-1</sup>.

Πίνακας 4.2: Παραγωγή κιτρικού οξέος από ζύμες

Στέλεχος ζύμης	Υπόστρωμα	Σύστημα καλλιέργειας	Κιτρικό (g·L <sup>-1</sup> )	Αναφορά
<i>Candida oleophila</i> ATCC 20177	Γλυκόζη	repeated batch	167	Anastassiadis, 2006
<i>Candida oleophila</i> ATCC 20177	Γλυκόζη	continuous	98	
<i>Candida lipolytica</i> Y 1095	Γλυκόζη	batch	78,5	Rane and Sims, 1993
<i>Yarrowia lipolytica</i> JMY1203	Γλυκόζη	flask	31,5	Papanikolaou <i>et al.</i> , 2013
<i>Yarrowia lipolytica</i> JMY1203	Γλυκερόλη	flask	19,1	Papanikolaou <i>et al.</i> , 2013
<i>Yarrowia lipolytica</i> ACA-YC 5033	Γλυκερόλη	flask	50,1	Andre <i>et al.</i> , 2009
<i>Yarrowia lipolytica</i> N 15 mutant	Ηλιέλαιο	batch	150	Kamzolova <i>et al.</i> , 2008
<i>Yarrowia lipolytica</i> LGAM	Γλυκόζη	flask	10,9	Papanikolaou <i>et al.</i> , 2002
<i>Yarrowia lipolytica</i> LGAM	Γλυκερόλη	flask	35,1	Papanikolaou <i>et al.</i> , 2002
<i>Yarrowia lipolytica</i> N15	Γλυκερόλη	10L fermenter	98	Kamzolova <i>et al.</i> , 2010
<i>Yarrowia lipolytica</i> 50682	Γλυκερόλη	batch	8,21	Silva <i>et al.</i> , 2012
<i>Yarrowia lipolytica</i> NCIM 3589	Γλυκερόλη	batch	77,9	Imandi <i>et al.</i> , 2007
<i>Yarrowia lipolytica</i> 1,31	Γλυκερόλη	batch	124,5	Rymowicz <i>et al.</i> , 2006
<i>Yarrowia lipolytica</i> YB-423	Γλυκερόλη	batch	21,6	Levinson <i>et al.</i> , 2007
<i>Yarrowia lipolytica</i> 57	Γλυκερόλη	batch	32,8	Karasu <i>et al.</i> , 2009
<i>Yarrowia lipolytica</i> recombinant	Σακχαρόζη	batch	140	Forster <i>et al.</i> , 2007

Στην παρούσα μελέτη απομονώθηκαν στελέχη ζυμών που έχουν την ικανότητα να αξιοποιούν τη σακχαρόζη για την παραγωγή οργανικών οξέων. Συγκεκριμένα απομονώθηκαν δύο στελέχη ζυμών για την παραγωγή μηλικού οξέος, ένα στέλεχος προς την παραγωγή ηλεκτρικού και πέντε στελέχη προς την παραγωγή κιτρικού οξέος. Ωστόσο, λόγω της χαμηλής συγκέντρωσης των παραγόμενων προϊόντων (πίνακας 4.3) σε σύγκριση με την βιβλιογραφία, θα πρέπει να διερευνηθούν περαιτέρω οι συνθήκες καλλιέργειας για αύξηση της παραγωγής των οργανικών οξέων.

Πίνακας 4.3: Αποτελέσματα παραγωγής οργανικών οξέων με τα στελέχη ζυμών που απομονώθηκαν

Πηγή απομόνωσης	Κωδικός	Κύριο προϊόν	Συγκέντρωση (g·L <sup>-1</sup> )
Φραγκόσυκο- <i>Opuntia ficus indica</i>	OFI_A1	Κιτρικό οξύ	7,85
	OFI_A2	Κιτρικό οξύ	5,70
	OFI_C1	Μηλικό οξύ	4,09
	OFI_C2	Μηλικό οξύ	1,43
Φιρίκι- <i>Malus domestica</i>	MD_A2	Κιτρικό οξύ	6,20
	PD_B3	Κιτρικό οξύ	5,00
Βανύλια- <i>Prunus domestica</i>	PD_C2	Ηλεκτρικό οξύ	0,88
	PG_A1	Κιτρικό οξύ	3,56

Οι ζύμες που συσσωρεύουν μικροβιακό λίπος περισσότερο από 20 % ανήκουν κυρίως στα γένη *Yarrowia*, *Candida*, *Rhodotorula*, *Rhodosporidium*, *Cryptococcus*, *Trichosporon* και *Lipomyces*

(Enshaeieh *et al.*, 2013). Ανάλογα με τις συνθήκες καλλιέργειας, το υπόστρωμα και το στέλεχος, οι ελαιογόνες ζύμες δύνανται να συσσωρεύσουν λίπος έως και 70 %. Για παράδειγμα, το στέλεχος *Rhodotorula glacialis* συσσωρεύει από 30-70 % λίπος αξιοποιώντας τη γλυκόζη ως υπόστρωμα (Wu *et al.*, 2010; Wu *et al.*, 2011; Xue *et al.*, 2010), ενώ σε υπόστρωμα γλυκερόλης 22,3 % (Makri *et al.*, 2010). Διαφορετικά στελέχη *Yarrowia lipolytica* έχουν την ικανότητα να συσσωρεύσουν λίπος έως και 40 % σε διάφορα υποστρώματα όπως γλυκερόλη, γλυκόζη και απόβλητα ελαιουργείων (Papanikolaou and Aggelis, 2002; Papanikolaou *et al.*, 2008; Sarris *et al.*, 2011), ενώ αύξηση σε υδρόφοβα υποστρώματα αυξάνει τη περιεκτικότητα λίπους έως και 60%. Το στελέχος *Lipomyces starkeyi* σε υπόστρωμα γλυκόζης συσσωρεύει έως 68 %. Στον πίνακα 4.4 που ακολουθεί παρουσιάζονται τα στελέχη ζυμών που δύνανται να καταναλώνουν σακχαρόζη ή μελάσα προς παραγωγή μικροβιακού λίπους. Η μέγιστη συσσώρευση μικροβιακού λίπους (62,56 %) με σακχαρόζη ως υπόστρωμα παρατηρείται στο στέλεχος *Trichosporon fermentans*.

Πίνακας 4.4: Συσσώρευση μικροβιακού λίπους από στελέχη ζυμών σε υπόστρωμα σακχαρόζης και μελάσας

Στέλεχος	Υπόστρωμα	Σύστημα καλλιέργειας	Βιομάζα (g·L <sup>-1</sup> )	Λίπος (g·L <sup>-1</sup> )	Λίπος %	Αναφορά
<i>Candida curvata</i>	Σακχαρόζη	batch	11,2	4,19	37,41	Evans and Ratledge, 1983
<i>Candida curvata</i>	Σακχαρόζη	continuous	16,0	4,48	28,00	Evans and Ratledge, 1983
<i>Cryptococcus curvatus</i>	Σακχαρόζη	continuous	16,0	4,48	28,00	Evans and Ratledge, 1983
<i>Trichosporon fermentans</i>	Μελάσα	batch	36,4	12,8	35,16	Zhu et al, 2008
<i>Trichosporon fermentans</i>	Σακχαρόζη	batch	19,5	12,2	62,56	Zhu et al, 2008
<i>Rhodotorula glutinis</i>	Μελάσα	fed batch	18,37	4,00	21,77	Johnson et al.,1995
<i>Rhodotorula glutinis</i>	Σακχαρόζη	fed batch	6,90	3,45	50,00	Johnson et al.,1995
<i>Rhodotorula glutinis</i>	Σακχαρόζη	batch	6,00	0,39	6,50	Johnson et al.,1995
<i>Rhodotorula glutinis</i>	Μελάσα	batch	9,85	0,78	7,92	Johnson et al.,1995

Με βάση τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης τεκμαίρεται ότι οι ζύμες που απομονώθηκαν δύνανται να παράγουν μικροβιακό λίπος έως 31 % αξιοποιώντας τη σακχαρόζη ως πηγή άνθρακα. Αν και η συσσώρευση μικροβιακού λίπους συνοδεύτηκε με την παραγωγή κιτρικού οξέος και αιθανόλης τα αποτελέσματα είναι συγκρίσιμα με αντίστοιχα της βιβλιογραφίας. Ωστόσο θα πρέπει να εξεταστούν οι συνθήκες καλλιέργειας και η αρχική συγκέντρωση σακχάρων. Επίσης, δεδομένης της ικανότητας να καταναλώνουν τη σακχαρόζη θα μπορούσε να διερευνηθεί η δυνατότητα παραγωγή μικροβιακού λίπους με την αξιοποίηση αποβλήτων όπως η μελάσα που περιέχει υψηλό ποσοστό σακχαρόζης.

Οι μικροβιακές ζυμώσεις με τη χρήση ζυμών προς παραγωγή οργανικών οξέων και μικροβιακού λίπους παραμένει πεδίο έρευνας παρά το μεγάλο αριθμό μελετών στη διεθνή βιβλιογραφία. Τα οργανικά οξέα που παράγονται μέχρι σήμερα μέσω της πετροχημικής βιομηχανίας δύναται να παραχθούν μέσω μικροβιακών βιομετατροπών αξιοποιώντας ανανεώσιμα υποστρώματα. Αντίστοιχα το μικροβιακό λίπος μπορεί να παραχθεί από τη χρήση ανανεώσιμων πηγών ενέργειας παρέχοντας μια πιθανή διέξοδο για τη διαχείριση διαφόρων αποβλήτων και παραπροϊόντων το οποίο αποτελεί μείζονος σημασίας πρόβλημα στη σύγχρονη αλλά και μελλοντική βιοοικονομία.



## Βιβλιογραφία

- Abe A, Sone T, Sujaya I.N, Saito K, Oda Y, Asano K, Tomita F. 2003. rDNA ITS sequence of *Rhizopus oryzae*: its application to classification and identification of lactic acid producers. *Biosci Biotechnol Biochem* 67: 1725-1731
- Amaretti A, Raimondi S, Sala M, Roncaglia L, De Lucia M, Leonardi A, Rossi M. 2011. Production of single cell oils by cold-adapted oleaginous yeast *Rhodotorula glacialis* AS 4.7: effects of the growth temperature and the C:N ratio. *Chem Eng Trans.* 20: 109-114
- Anastassiadis S. 2006. Citric acid production from glucose by yeast *Candida oleophila* ATCC 20177 under batch, continuous and repeated batch cultivation. *Journal of biotechnology*
- Andre A, Chatzifragkou A, Diamantopoulou P, Sarris D, Philippousis A, Galiotou-Panayotou M, Komaitis M, Papanikolaou S. 2009. Biotechnological conversions of bio-diesel derived crude glycerol by *Yarrowia lipolytica* strains. *Eng Life Sci* 6:468-478
- Cao N.J, Du J.X, Chen C.S, Gong C.S, Tsao G.T. 1997. Production of fumaric acid by immobilized *Rhizopus* using rotary biofilm contactor. *Appl Biochem Biotechnol* 63–5: 387–394
- Cao NJ, Du JX, Gong CS, Tsao GT. 1996. Simultaneous production and recovery fumaric acid from immobilized *Rhizopus oryzae* with a rotary biofilm contactor adsorption column. *Appl Environ Microbiol* 62: 2926-2931
- Carta F.S, Soccol C.R, Ramos L.P, Fontana J.D. 1999. Production of fumaric acid by fermentation of enzymatic hydrolysates derived from cassava bagasse. *Bioresource Technol* 68: 23–28
- Dai C.C, Tao J, Xie F, Dai Y.J, Zhao M. 2007. Biodiesel generation from oleaginous yeast *Rhodotorula glutinis* with xylose assimilating capacity. *Afr J Biotechnol.* 6: 2130-2134
- Davati N, Najafi M.H. 2013. Overproduction strategies for microbial secondary metabolites: a review. *Journal of life science and pharma research.*
- Du L.X, Jia S.J, Lu F.P. 2003. Morphological changes of *Rhizopus chinesis* 12 in submerged culture and its relationship with antibiotic production. *Process Biochem* 38: 1643-1646

- Dumbrepatil A, Adsul M, Chaudhari S, Khire J, Gokhale D. 2007. Utilization of molasses sugar for lactic acid production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii* mutant Uc-3 in batch fermentation. *App and Environ Microbiol* 74: 333
- Easterling E.R, French W.T, Hernandez R, Licha M. 2009. The effect of glycerol as a sole and secondary substrate on the growth and fatty acid composition of *Rhodotorula glutinis*. *Bioresource Technol.* 100: 356-361
- Enshaeieh M, Abdoli A, Nahvi I, Madani M. 2013. Selection and optimization of single cell oil production from *Rodotorula* 110 using environmental waste as substrate. *Journal of cell and molecular research.* 4: 68- 75
- Evans C.T, Ratledge C. 1983. A comparison of the oleaginous yeast, *Candida curvata*, grown on different carbon sources in continuous and batch culture. *Lipids* vol. 18
- Faticenti F, Farris G.A, Deiana P, and Ceccarelli S. 1984. Malic acid production and consumption by selected of *Sacchromyces cerevisiae* under anaerobic and aerobic conditions. *Appl Microbiol Biotechnol* 19: 427-429
- Folch J, Lees M, Stanley G.H.S. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem* 226: 497-509
- Forster A, Aurich A, Mauersberger S, Barth G. 2007. Citric acid production from sucrose using a recombinant strain of the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Appl Microb Biotechnol* 75: 1409-1417
- Fu Y.Q, Li S, Chen Y, Xu Q, Huang H, Sheng X.Y. 2010. Enhancement of fumaric acid production by *Rhizopus oryzae* using a two-stage dissolved oxygen control strategy. *Appl Biochem Biotechnol* 162: 1031-1038
- Gangl I.C, Weigand W.A, Keller F.A. 1990. Economic comparison of calcium fumarate and sodium fumarate production by *Rhizopus arrhizus*. *Appl Biochem Biotechnol* 24-25: 663–677
- Garcia-Fraile P, Silva L.R, Sanchez-Marquez S, Velazquez E, Rivas R. 2013. Plums (*Prunus domestica* L.) are a good source of yeasts producing organic acids of industrial interest from glycerol. *Food Chemistry* 139: 31-34
- Gobbetti M., Vincenzi S. 1993. Preliminary study on fumaric acid production from grape must by *Candida hydrocarbofumarica*. *Agro Food Industry Hi Tech* 4: 23-25

- Goldberg I, Stefan Rokem J, Pines O. 2006. Organic acids: old metabolites, new themes. *J Chem Technol Biotech* 81: 1601-1611
- Gong Z, Wang Q, Shen H, Hu C, Jin G, Zhao Z.K. 2012. Co-fermentation of cellobiose and xylose by *Lipomyces starkeyi* for lipid production. *Bioresource Technol.* 117: 20-24
- 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
- Hassan M, Blanc PJ, Granger LM, Pareilleux A, Goma G. 1995. Influence of nitrogen and iron limitation on lipid production by *Cryptococcus curvatus* grown in batch and fed-batch culture. *Process Biochem.* 31: 355-361
- 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. *Biochem Eng J* 13: 7–13
- Imandi S.B, Bandaru V.V.R, Somalanka S.R, Garapari H.R. 2007. Optimization of medium constituents for the production of citric acid from byproduct glycerol using Doehlert experimental design. *Enzyme and Microbial Technology.* 40: 1367-1372
- Johnson V, Singh M, Saini V.S, Sista V.R, Yadav N.K. 1992. Effect of pH on lipid accumulation by an oleaginous yeast: *Rhodotorula glutinis* IIP-30. *World J Microbiol Biotechnol.* 8: 382-384
- Johnson V.W, Singh M, Saini V.S, Adhikari D.K, Sista V, Yadav N.K. 1995. Utilization of molasses for the production of fat by an oleaginous yeast *Rhodotorula glutinis* IIP-30. *J.*
- Joslyn M A. 1951. Nutrient requirements of yeast. University of California.
- Kamzolova S.V, Yusupova A.I, Dedyukhina E.G, Chistyakova T.I, Kozyreva T.M, Morgunou I.G. 2009. Synthesis of succinic acid by yeast. *Food Technol. Biotechnol.* 47: 144–152
- Kang S.W, Lee H, Kim D, Lee D, Kim S, Chun G.T, Lee J, Kim S.W, Park C. 2010. Strain development and medium optimization for fumaric acid production. *Biotech Biopro Eng* 15: 761-769

- Karasu Yalcin S, Bozdemir M.T, Ozbas Z.Y. 2009. A comparative study of the effects of glycerol and mannitol on citric acid production by two *Yarrowia lipolytica* strains. *Romanian Biotechnological Letters*. 14(6): 4870-4881
- Kautola H, Linko Y. 1989. Fumaric acid production from xylose by immobilized *Rhizopus arrhizus* cells. *Appl Microbiol Biotechnol* 31: 448-452
- Kenealy W, Zaady E, Dupreez J.C, Stieglitz B, Goldberg I. 1986. Biochemical aspects of fumaric acid accumulation by *Rhizopus arrhizus*. *Appl Environ Microbiol* 52: 128
- Klasson T.K, Clausen E.C, Gaddy J.L. Continuous fermentation for the production of citric acid from glucose. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 20/21: 491-509
- Kordowska-Wiater M, Polak-Berecka P, Wasiko A, Targonski Z. 2012. Protoplast fusion of *Rhizopus oryzae* and *Rhizopus microspores* for enhanced fumaric acid production from glycerol. *Journal of Biotechnology*. 93: 425-430
- Koutinas A.A, Vlysidis A, Pleissner D, Kopsahelis N, Garcia I.K, Koukos 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. *Chem.Soc Rev* 43:2587
- Leiva-Candia D.E, Pinzi S, Redel-Macias M.D, Koutinas A, Webb C, Dorado M.P. 2014. The potential for agro-industrial waste utilization using oleaginous yeast for the production of biodiesel. *Fuel* 123:33-42
- Li Y, Zhao Z.K, Bai F. 2007. High density cultivation of oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides* Y4 in fedbatch culture. *Enzyme Microb Technol*. 41: 312- 317
- Liao W, Liu Y, Chen S, 2007a. Studying pellet formation of a filamentous fungus *Rhizopus oryzae* to enhance organic acid production. *Appl Biochem Biotechnol*. 136-140
- Liao W, Liu Y, Frear C, Chen S, 2007b. A new approach of pellet formation of a filamentous fungus- *Rhizopus oryzae*. *Bioresource Technol* 98: 3415-3423
- Ling L.B, Ng T.K. 1989. Fermentation process for carboxylic acids. US 4877731
- Makri A, Fakas S, Aggelis G. 2010. Metabolic activities of biotechnological interest in *Yarrowia lipolytica* grown on glycerol in repeated batch cultures. *Bioresource Technol*. 101: 2351-2358

- Moresi M, Parente E, Petruccioli M, Federici F. 1991. Optimization of fumaric acid production from potato flour by *Rhizopus arrhizus*. *Appl Microbiol Biotechnol* 36: 35-39
- Moresi M, Parente E, Petruccioli M, Federici F. 1992. Fumaric acid production from hydrolysates of starch-based substrates. *J Chem Tech Biotechnol* 54: 283-290
- Nakajima- Kambe T, Nozue T, Mukouyama M, Nakahara T. 1997. Bioconversion of maleic acid to fumaric acid by *Pseudomonas alcaligenes* strain XD-1. *J Ferment Bioeng* 84: 165–168
- Papagianni M, 2004. Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelia processes. *Biotechnol Advances* 22: 189-259
- Papanikolaou S and Aggelis G. 2011. Lipids of oleaginous yeast. Part I: Biochemistry of single cell oil production. *Lipid Sci. Technol.* 113: 1031-1051
- Papanikolaou S, Aggelis G. 2002. Lipid production by *Yarrowia lipolytica* growing on industrial glycerol in a singlestage continuous culture. *Bioresource Technol.* 82: 43-49
- Papanikolaou S, Beopoulos A, Koletti A, Thevenieau F, Koutinas A.A, Nicaud J.M, Aggelis G. 2013. Importance of the methyl-citrate on glycerol metabolism in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *J Biotechnol* 168:303-314
- Papanikolaou S, Fakas S, Ficka M, Chevalota I, Galiotou- Panayotou M, Komaitis M. 2008. Biotechnological valorisation of raw glycerol discharged after bio-diesel (fatty acid methyl esters) manufacturing process: Production of 1,3-propanediol, citric acid and single cell oil. *Biomass Bioenergy.* 32: 60-71
- Papanikolaou S, Muniglia L, Chevalot I, Aggelis G, Marc I. 2002. *Yarrowia lipolytica* as a potential producer of citric acid fom raw glycerol. *J Appl. Microbiol.* 92: 737-744
- Petruccioli M, Angiani E, Federici F. 1996. Semi continuous fumaric acid production by *Rhizopus arrhizus* immobilized in polyurethane sponge. *Process Biochem* 31: 463
- Pines O, Even-Ram S, Elnathan N, Battat E, Aharonov O, Gibson D, Goldberg I. 1996. The cytosolic pathway of L-malic acid synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*: the role of fumarase. *Appl Microbiol biotechnol* 46:n393-399
- Podgorska E, Kaspizak M, Szwajgier D. 2004. Fumaric acid production by *Rhizopus nigricans* and *Rhizopus oryzae* using apple juice. *Pol J Food Nutr Sci* 13: 47-50

- Pronk J.T, Steensam H.Y and Van Dijken J.P. 1996. Pyruvate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. 12: 1607-1633
- Ratledge C, Wynn JP. 2002. The biochemistry and molecular biology of lipid accumulation in oleaginous microorganisms. *Adv Appl Microbiol*. 51: 1-51
- Ratledge C. 2004. Fatty acid biosynthesis in microorganisms being used for single cell oil production. *Biochimie* 86: 807-815
- 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 fermentors. *Appl Microbiol* 10: 9–15
- Rhodes R.A, Moyer A.J, Smith M.L, Kelley S.E. 1959. Production of fumaric acid by *Rhizopus arrhizus*. *Appl Microbiol* 7: 74–80
- Riscaldati E, Moresi M, Federici F, Petruccioli. 2000. Direct ammonium fumarate production by *Rhizopus arrhizus* under phosphorous limitation. *Biotechnol Letters* 22: 1043-1047
- Roa Engel C.A, Straathof A.J.J, Zijlmans TW, Van Gulik W.M, Van der Wielen L.A.M. 2008. Fumaric acid production by fermentation. *Appl Microbiol Biotechnol* 78: 379-389
- Rodrigues F, Ludovico P and Leão C. 2006. Sugar metabolism in yeasts: an overview of aerobic and anaerobic glucose catabolism. In: the yeast handbook, ed: Peter G. and Rosa C. Springer Berlin Heidelberg, 101-121
- Rupčić J, Blagović B, Marić V. 1996. Cell lipids of the *Candida lipolytica* yeast grown on methanol. *J Chromatogr A*. 755: 75-80
- Rymowicz W, Rywinska A, Zarowska B, Juszczak P. 2006. Citric acid production from raw glycerol by acetate mutants of *Yarrowia lipolytica*, *Chemical Papers*. 60(5): 391-394
- Saito K, Saito A, Ohnishi M, Oda Y. 2004. Genetic diversity in *Rhizopus oryzae* strains as revealed by the sequence of lactate dehydrogenase genes. *Arch Microbiol* 182: 30-36
- Santamauro F, Whiffin F.M, Scott R.J, Chuck C.J. 2014. Low cost lipid production by an oleaginous yeast cultures in non-sterile conditions using model waste resources. *Biotechnol. for biofuels* 7:34

- Sarris D, Galiotou-Panayotou M, Koutinas A.A, Komaitis M, Papanikolaou S. 2011. Citric acid, biomass and cellular lipid production by *Yarrowia lipolytica* strains cultivated on olive mill wastewater based media. *J Chem Technol Biotechnol* 86:1439-1448
- Schwartz H and Radler F. 1988. Formation of L(-)malate by *Saccharomyces cerevisiae* during fermentation. *Appl Microbiol Biotechnol* 27: 553-560
- Silva L.V, Tavares C.B, Amaral P.F.F, Coelho M.A.Z. 2012. Production of Citric Acid by *Yarrowia lipolytica* in Different Crude Glycerol Concentrations and in Different Nitrogen Sources. *Chemical engineering transactions* vol.27
- Taing O and Taing K. 2007. Production of malic and succinic acid by sugar- tolerant yeast *Zygosaccharomyces rouxii*. *Eur Food Res Technol* 224: 343-347
- Vander Heiden M.G, Cantley L.C, Thompson C.B. 2009. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science* 324:1029-1033
- Werpy T, Petersen G. 2004. Top ten value added chemicals from biomass feedstocks. U.S. Department of Energy, USA
- Willke T, Vorlop K.D. 2004. Industrial bioconversion of renewable resources as an alternative to conventional chemistry. *Appl Microbiol Biotechnol* 66: 131
- Wu S, Hu C, Jin G, Zhao X, Zha Z.K. 2010. Phosphate-limitation mediated lipid production by *Rhodospiridium toruloides*. *Bioresource Technol.* 101: 6124- 6129
- Wu S, Zhao X, Shen H, Wang Q, Zhao Z.K. 2011. Microbial lipid production by *Rhodospiridium toruloides* under sulfate- limited conditions. *Bioresource Technol.* 102:1803-1807
- Xu Q, Li S, Huang H , Wen J. 2012. Key technologies for the industrial production of fumaric acid by fermentation. *Biotechnology Advances* 30: 1685–1696
- Yamada K, Furukawa T, Nakahara T. 1970. Studies on the utilization of hydrocarbons by microorganisms. Fermentation production of fumaric acid by *Candida hydrocarbofumarica*. *Agric Biol Chem* 34: 670-675
- Zelle R.M, Hulster E, Van Winden W.A, Waard P, Dijkema C, Winkler A.A, Geeram J.A, Van Dijken J.P, Pronk J.T, Van Maris J.A. 2008. Malic acid production by *Saccharomyces*

*cerevisiae*: Engineering of pyruvate carboxylation, oxaloacetate reduction and malate export. *Appl. Environ. Microbiol* 74(9): 2766

Zhang B. 2012. Metabolic engineering for fumaric and malic acids production. Phd thesis. The Ohio State University

Zhang Z.Y, Jin B, Kelly J.M. 2007. Production of lactic acid and byproducts from waste potato starch by *Rhizopus arrhizus*: role of nitrogen sources. *World J Microbiol Biotechnol* 23: 229–236

Zhao X, Hu C, Wu S, Shen H, Zhao Z.K. 2011. Lipid production by *Rhodospiridium toruloides* Y4 using different substrate feeding strategies. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 38: 627-632

Zhou Y, Du J, Tsao G.T, 2000. Mycelial pellet formation by *Rhizopus oryzae* ATCC 20344. *Appl Biochem Biotechnol* 84-86: 779-789

Zhu L.Y, Zong M.H, Wu H. 2008. Efficient lipid production with *Trichosporun fermentans* and its use for biodiesel preparation. *Bioresource Technology* 99: 7881-7885