

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ  
Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων Και Διατροφής Του Ανθρώπου  
Εργαστήριο Μηχανικής Τροφίμων, Επεξεργασίας Και  
Συντήρησης Γεωργικών Προϊόντων  
ΠΜΣ: Επιστήμη Και Τεχνολογία Τροφίμων Και Διατροφή Του  
Ανθρώπου

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**  
**«Βιοτεχνολογική αξιοποίηση αποβλήτων της**  
**βιομηχανίας τροφίμων προς παραγωγή χρωστικών**  
**ουσιών με στελέχη μυκήτων»**

---

**Αναστασία Α. Καντιφεδάκη**

ΑΘΗΝΑ 2016

Επιβλέπων

Απόστολος Κουτίνας, Επίκουρος Καθηγητής

## ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

«Βιοτεχνολογική αξιοποίηση αποβλήτων της βιομηχανίας τροφίμων  
προς παραγωγή χρωστικών ουσιών με στελέχη μυκήτων »

Αναστασία Α. Καντιφεδάκη

Επιβλέπων

Απόστολος Κουτίνας, Επίκουρος Καθηγητής

Εξεταστική Επιτροπή

Κουτίνας Απόστολος, Επίκουρος Καθηγητής

Νικόλαος Στοφόρος, Καθηγητής

Αθανάσιος Μαλλούχος, Λέκτορας

ΑΘΗΝΑ 2016

## Περίληψη

Στην παρούσα μελέτη εξετάστηκε η αξιοποίηση αγροτοβιομηχανικών αποβλήτων προς τη παραγωγή φυσικών χρωστικών μέσω ζυμώσεων με μυκητιακά στελέχη. Ειδικότερα, εξετάστηκε η χρησιμοποίηση του φλοιού πορτοκαλιού ως απόβλητο της διαδικασίας χυμοποίησης σε ζυμώσεις στερεάς κατάστασης (solid state fermentation), ημι-στερεάς κατάστασης (semi-solid state fermentation) καθώς και σε υγρές καλλιέργειες (submerged fermentations). Τα μυκητιακά στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν ήταν το στέλεχος *Monascus purpureus* ATCC 16365 καθώς και το *Penicillium purpurogenum* CBS 113139.

Αρχικά πραγματοποιήθηκαν ζυμώσεις στερεάς κατάστασης με το στέλεχος *M. purpureus* όπου εξετάστηκε η βελτιστοποίηση της μεθόδου εκχύλισης των χρωστικών με διαφορετικούς οργανικούς διαλύτες καθώς και η επίδραση του ξηρού και του νωπού ζυμούμενου υποστρώματος. Εν συνεχεία μελετήθηκε η επίδραση του μεγέθους των κόκκων του υποστρώματος και σε επόμενο στάδιο η επίδραση της παρουσίας των αιθερίων ελαίων που εμπεριέχονται στο φλοιό του πορτοκαλιού κατά τη διάρκεια της ζύμωσης. Επιπρόσθετα μελετήθηκε η προσθήκη πηγής αζώτου μέσω της προσθήκης ηλιαλεύρου στο θρεπτικό υπόστρωμα. Στις βέλτιστες συνθήκες που προσδιορίστηκαν, πραγματοποιήθηκαν εν συνεχεία ζυμώσεις με το στέλεχος *P. purpurogenum* προκειμένου να συγκριθεί η παραγωγή χρωστικών.

Στο επόμενο στάδιο της πειραματικής μελέτης έλαβαν χώρα ζυμώσεις ημι-στερεάς κατάστασης σε δύο διαφορετικές αρχικές συγκεντρώσεις, ήτοι 20 και 50 g/L, κατά τις οποίες ο φλοιός πορτοκαλιού προστίθεται σε υγρό μέσο καλλιέργειας ώστε να παρέχει τα θρεπτικά συστατικά αλλά παράλληλα και ένα μέσο υποστήριξης για την ανάπτυξη των μυκηλλιακών υφών. Η πειραματική διεργασία πραγματοποιήθηκε και για τα δύο μυκητιακά στελέχη, ενώ ιδιαίτερη σημασία δόθηκε στη σύγκριση μεταξύ εσωκυττάρων και εξωκυττάρων χρωστικών.

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε η αξιολόγηση υγρών θρεπτικών μέσων που προήλθαν από διαφορετικές θερμικές μεθόδους επεξεργασίας του φλοιού πορτοκαλιού ως υποστρώματα σε υγρές καλλιέργειες για την παραγωγή χρωστικών. Κατά τη διάρκεια των εν λόγω πειραμάτων αξιολογήθηκε η παραγωγή ενδοκυττάρων και εξωκυττάρων χρωστικών, η παραγωγή συνολικού ξηρού βάρους καθώς και η κατανάλωση των

σακχάρων και του αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων που εμπεριέχονται στα αμινοξέα και στα πεπτίδια (free amino nitrogen, FAN) και για τα δύο στελέχη των μυκήτων. Επίσης, κατά τη διάρκεια όλων των πειραμάτων προσδιορίστηκαν τα ολικά φαινολικά συστατικά και η αντιοξειδωτική ικανότητα των εκχυλισμάτων.

**Λέξεις κλειδιά:** χρωστικές, υπολείμματα φλοιού πορτοκαλιού, μύκητες, *Monascus purpureus*, *Penicillium*

## Abstract

The aim of the present study was the valorization of various agro-industrial waste and by-product streams for the fermentative production of natural pigments using fungal strains. More specifically, waste orange peel (WOP) was evaluated as substrate in solid state fermentations, semi-solid state fermentation and submerged fermentations implementing the fungal strains *Monascus purpureus* ATCC 16365 and *Penicillium purpurogenum* CBS 113139.

Initially, solid state fermentations were conducted with the strain *M. purpureus* to evaluate and optimize the extraction of pigments using different organic solvents along with the effect of the fermentated substrate (on wet or dry basis). Subsequently, the effect of substrate particle size was implemented, the presence or absence of essential oils in the solid substrate and finally the effect of nitrogen source through the addition of sunflower meal. Under the optimum conditions demonstrated, further experiments were carried out with the strain *P. purpurogenum* to compare microbial proliferation and pigment production.

During the next experimental step semi-solid state fermentations were conducted in two different initial concentrations of WOP, namely 20 and 50 g/L for both fungal strains. WOP was dispersed in liquid medium in order to provide the essential nutrients along with a substrate substrate to facilitate fungal hyphae proliferation. Furthermore, special attention was attributed in the comparison of intracellular and extracellular pigments.

Subsequent experiments focused on the evaluation of liquid supplements deriving from various thermal treatments of WOP as substrates for the fermentative production of pigments employing the two fungal strains. Pigment biosynthesis and total dry weight production were evaluated along with sugars and free amino nitrogen consumption during fermentation. Finally, the total phenolic content and the antioxidant capacity was assessed in all the extracts obtained from all the experiments performed in solid state, semi-solid state and submerged fermentations.

Department of Food Science and Human Nutrition, Agricultural University of Athens, Athens, Greece

**Keywords:** pigments, orange peel waste, fungi, *Monascus purpureus*, *Penicillium*

## Ευχαριστίες

Με το πέρας της μεταπτυχιακής μου μελέτης νιώθω την ανάγκη να αναφερθώ και να ευχαριστήσω τους ανθρώπους εκείνους που μου έδωσαν τη δυνατότητα να πάρω μια μικρή γεύση από την έρευνα στον κλάδο των Τροφίμων, κάτι που ήθελα από πολύ μικρή να κάνω. Καταρχήν, ευχαριστώ θερμά τον επίκουρο καθηγητή κ. Κουτίνα Απόστολο, ο οποίος με ενέταξε με μεγάλη προθυμία, στο εργαστήριο της Βιοτεχνολογίας και της Μηχανικής και Συντήρησης Τροφίμων. Μου έδωσε την ευκαιρία να μελετήσω ένα θέμα πάνω στην βιοτεχνολογία των τροφίμων, γνωρίζοντας ότι η επαφή μου με το συγκεκριμένο αντικείμενο στηριζόταν μόνο σε μια βασική γνώση πάνω στην Βιολογία, και όχι σε κάποια πρότερη εμπειρία και εξοικείωση πάνω στις βιοδιεργασίες τροφίμων. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά από το εργαστήριο της Χημείας Τροφίμων, τον λέκτορα κ.Μαλλούχο Αθανάσιο, ο οποίος με βοήθησε ουσιαστικά στην κατεύθυνση και οργάνωση της δουλειάς που είχα να κάνω, καθώς επίσης και το μέλος Ειδικού και Εργαστηριακού Προσωπικού κ. Γαρδέλη Χρυσανγή, όπου βοήθησε στην διεκπεραίωση τμήματος της συγκεκριμένης μελέτης. Ακόμα, ευχαριστώ θερμά όλη την ομάδα των εργαστηρίων Μηχανικής και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων, καθένας από τους οποίους ήταν πάντα πρόθυμος με τον δικό του τρόπο να βοηθήσει στην ολοκλήρωση της εργασίας μου, αλλά και να διευκολύνει τη δουλειά μου όταν οι προσωπικές δυσκολίες της καθημερινότητας τη δυσκόλευαν. Πιο συγκεκριμένα να αναφερθώ στις κυρίες και κυρίους: Καχριμανίδου Βάσω, Μάινα Σοφία, Παπαδάκη Κατερίνα, Αλεξανδρή Μαίρη, Ξερόπουλο Βαγγέλη, Τσούκο Ερμίντα, Λαδάκη Δημήτρη και Ανέστη Βλυσίδα. Τέλος, θα ήθελα μέσα από την καρδιά μου να ευχαριστήσω τον άντρα μου Αλέξανδρο ο οποίος πιστεύει σε εμένα και με στήριξε ουσιαστικά και σε αυτή προσπάθεια που έκανα.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Περίληψη .....	3
Abstract.....	5
Ευχαριστίες.....	6
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....</b>	<b>11</b>
1.1. Στερεά απόβλητα.....	11
1.2. Ο φλοιός πορτοκάλι ως υπόλειμμα από τα απόβλητα βιομηχανίας τροφίμων ...	11
1.3. Χημική σύσταση φλοιού πορτοκαλιού .....	13
1.4. Η σημασία των αιθέριων ελαίων του φλοιού πορτοκαλιού .....	14
1.6. Συνηθισμένες μέθοδοι αξιοποίησης του φλοιού πορτοκαλιού. Εφαρμογές .....	16
1.7. Εναλλακτική βιοτεχνολογική αξιοποίηση του φλοιού πορτοκαλιού προς παραγωγή χρωστικών.....	18
1.8. Φυσικές και συνθετικές χρωστικές .....	19
1.9. Η σημασία φυσικών χρωστικών στη βιοτεχνολογία τροφίμων .....	21
1.10. Η περίπτωση των χρωστικών MPs (Monascus Polyketide pigments) .....	22
1.11. Από την παράδοση στις σύγχρονες εφαρμογές.....	23
1.12. Χημική δομή των χρωστικών MPs.....	24
1.13. Βιοχημεία χρωστικών MPs.....	26
1.14. Παράγοντες που επιδρούν στην παραγωγή χρωστικής .....	29
1.15. Ασφάλεια των χρωστικών MPs σε τρόφιμα- Η περίπτωση της κιτρινίνης.....	30
1.16. Επιλογή στελεχών που δεν παράγουν μυκοτοξίνες ως μελλοντικό εργαλείο παραγωγής χρωστικών .....	31
1.17. Σκοπός της παρούσας μελέτης .....	34
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ .....</b>	<b>35</b>
2.1. Εργαστηριακή υποδομή .....	35
2.2. Μικροβιακό υλικό .....	35
2.2.1. Συνθήκες καλλιέργειας .....	35
2.2.2. Αποθήκευση σε γλυκερόλη (Glycerol stock) .....	36
2.2.3. Προετοιμασία εμβολίου.....	36
2.2.4. Υπολογισμός κυτταρικού πληθυσμού (σπορίων).....	37
2.3. Παρασκευή θρεπτικών υποστρωμάτων .....	38
2.3.1. Συνθετικά θρεπτικά υποστρώματα .....	39
2.3.2. Θρεπτικά υποστρώματα από απόβλητα της βιομηχανίας τροφίμων: .....	39

2.3.2.4.	Συνοπτική παρουσίαση παρασκευής των φυσικών υποστρωμάτων μετά από επεξεργασία φλοιού πορτοκαλιού .....	43
2.4.	Ζυμώσεις .....	44
2.4.1.	Ζυμώσεις στερεάς κατάστασης (Solid State Fermentation, SSF) με τα στελέχη μυκήτων <i>Monascus purpureus</i> ATCC 16365 <i>Penicillium purpurogenum</i> CBS 113139.....	44
2.4.2.	Ζυμώσεις ημι-στερεάς κατάστασης (semi Solid State Fermentation, semi-SSF) με τα στελέχη μυκήτων <i>Monascus purpureus</i> ATCC 16365 <i>Penicillium purpurogenum</i> CBS 113139.....	45
2.4.3.	Ζυμώσεις βυθού (Submerged Fermentation, SmF) με τα στελέχη μυκήτων <i>Monascus purpureus</i> ATCC 16365 <i>Penicillium purpurogenum</i> CBS 113139 .....	46
2.5.	Αναλυτικές μέθοδοι .....	46
2.5.1.	Εκχύλιση χρωστικών .....	46
2.5.2.	Ποιοτικός προσδιορισμός παραγόμενων χρωστικών, με φασματοφωτόμετρο UV-VIS .....	48
2.5.3.	Προσδιορισμός βιομάζας.....	49
2.5.4.	Ποιοτικός προσδιορισμός ανάγοντων σακχάρων .....	49
2.5.5.	Ποσοτικός προσδιορισμός σακχάρων.....	50
2.5.6.	Προσδιορισμός Αζώτου των Ελεύθερων Αμινομάδων .....	51
2.5.7.	Μέτρηση σχετικής υγρασίας σε στερεά υποστρώματα .....	52
2.5.8.	Προσδιορισμός απόδοσης αιθέριων ελαίων .....	53
2.5.9.	Εξάτμιση υπερκείμενων διαλυμάτων, μετά από ζύμωση (semi-SSF, SmF).....	53
2.5.10.	Προσδιορισμός συνολικών φαινολικών στα υπερκείμενα των ζυμούμενων υποστρωμάτων (ssf/semi-ssf/smf).....	53
2.5.11.	Προσδιορισμός αντιοξειδωτικής ικανότητας (DPPH Radical Scavenging Method).....	55

### **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ..... 56**

3.1.	Παρατήρηση μορφολογίας σε συνθετικό θρεπτικό μέσο, των στελεχών <i>Monascus purpureus</i> ATCC 16365 και <i>Penicillium purpurogenum</i> CBS 113139.....	56
3.2.	Επίδραση διαλύτη, τρόπου εκχύλισης σε ζυμούμενο στερεό υπόστρωμα χονδρόκοκκου πίτυρου.....	60
3.3.	Παραγωγή MPs χρωστικών από το στέλεχος <i>Monascus purpureus</i> ATCC 16365 σε ζύμωση στερεάς κατάστασης σε φλοιό πορτοκαλιού .....	63
3.4.	Μελέτη παραγόντων που επιδρούν στη ζύμωση στερεάς κατάστασης σε φλοιό πορτοκαλιού .....	64



3.4.1.	Επίδραση του μεγέθους των κόκκων του υποστρώματος στην παραγωγή χρωστικών. ....	65
3.4.2.	Επίδραση του οργανικού διαλύτη και του υποστρώματος στην εκχύλιση των χρωστικών (φύση διαλύτη και φύση υποστρώματος) .....	66
3.4.3.	Επίδραση των αιθερίων ελαίων στην παραγωγή χρωστικών .....	67
3.4.4.	Επίδραση της προσθήκης πηγής αζώτου στο υπόστρωμα.....	68
3.5.	Ζυμώσεις στερεάς κατάστασης.....	70
3.5.1.	Συγκριτική αξιολόγηση των στελεχών <i>Monascus purpureus</i> ATCC 16365 και <i>Penicillium purpurogenum</i> CBS 113139 ως προς την παραγόμενη κόκκινη .....	70
3.5.2.	Συγκριτική αξιολόγηση των στελεχών <i>Monascus purpureus</i> ATCC 16365 και <i>Penicillium purpurogenum</i> CBS 113139 ως προς την παραγόμενη κόκκινη χρωστική, μετά από προσθήκη ηλιόλευρου. ....	72
3.5.3.	Σύγκριση υποστρωμάτων εσπεριδοειδών ως προς την παραγόμενη κόκκινη χρωστική.....	73
3.5.4	Επίδραση αιθέριων ελαίων με το στέλεχος <i>Penicillium purpurogenum</i> CBS 113139 .....	74
3.6.	Ζυμώσεις ημιστερεάς κατάστασης.....	76
3.6.1.	Συγκριτική αξιολόγηση των στελεχών <i>Monascus purpureus</i> ATCC 16365 και <i>Penicillium purpurogenum</i> CBS 113139 ως προς την παραγόμενη κόκκινη χρωστική.....	76
3.6.2.	Συγκριτική αξιολόγηση των στελεχών <i>Monascus purpureus</i> ATCC 16365 και <i>Penicillium purpurogenum</i> CBS 113139 ως προς την παραγόμενη εσωκυττάρια και εξωκυττάρια χρωστική .....	78
3.6.3.	Συγκριτική αξιολόγηση των στελεχών <i>Monascus purpureus</i> ATCC 16365 και <i>Penicillium purpurogenum</i> CBS 113139 ως προς την κατανάλωση σακχάρων (DNS) και αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων (FAN).....	83
3.7.	Ζυμώσεις βυθού .....	85
3.7.1.	Ποσοτικός προσδιορισμός κατανάλωσης σακχάρων με HPLC <i>Monascus purpureus</i> ATCC 16365 σε διήθημα βρασμένου φλοιού πορτοκαλιού .....	85
3.7.2.	Προσδιορισμός κόκκινης χρωστικής, TDW (g/L), κατανάλωσης σακχάρων και αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων σε υπόστρωμα Czapek Broth με το στέλεχος <i>Penicillium purpurogenum</i> . ....	86
3.7.3.	Συγκριτική αξιολόγηση των στελεχών <i>Monascus purpureus</i> ATCC 16365 και <i>Penicillium purpurogenum</i> CBS 113139 ως προς την παραγόμενη κόκκινη χρωστική.....	89

3.7.4. Συγκριτική αξιολόγηση των στελεχών <i>Monascus purpureus</i> ATCC 16365 και <i>Penicillium purpurogenum</i> CBS 113139 ως προς την αναλογία εσωκυττάριας/εξωκυττάριας χρωστικής .....	90
3.7.5. Συγκριτική αξιολόγηση των στελεχών <i>Monascus purpureus</i> ATCC 16365 και <i>Penicillium purpurogenum</i> CBS 113139 ως προς την κατανάλωση σακχάρων (DNS) αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων (FAN) και βιομάζας (TDW) .....	94
3.8. Σύγκριση συγκέντρωσης φαινολικών και αντιοξειδωτικής ικανότητας στα στελέχη <i>Monascus purpureus</i> ATCC 16365 και <i>Penicillium purpurogenum</i> CBS 113139 σε ζυμώσεις στερεάς, ημιστερεάς κατάστασης και βυθού.....	97
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ .....</b>	<b>101</b>
4.1. Η αναγκαιότητα αξιοποίησης των χρωστικών στον κλάδο τροφίμων.....	101
4.2. Παράγοντες που επιδρούν στην βελτίωση παραγόμενων χρωστικών .....	102
4.3. Επιλογή καλύτερου υποστρώματος (από αγροτοβιομηχανικά απόβλητα) ως προς την παραγωγή χρωστικών. ....	104
4.3.1. Ζυμωση στερεάς κατάστασης, αξιοποιώντας τα στελέχη <i>Monascus purpureus</i> ATCC 16365 και <i>Penicillium purpurogenum</i> CBS 113139 .....	104
4.3.2. Ζυμωση ημι-στερεάς κατάστασης, αξιοποιώντας τα στελέχη <i>Monascus purpureus</i> ATCC 16365 και <i>Penicillium purpurogenum</i> CBS 113139 .....	105
4.3.3. Ζυμωση βυθού, αξιοποιώντας τα στελέχη <i>Monascus purpureus</i> ATCC 16365 και <i>Penicillium purpurogenum</i> CBS 113139 .....	105
4.4. <i>Monascus purpureus</i> ATCC 16365: Ο μικροοργανισμός μοντέλο στην παραγωγή χρωστικών.....	106
4.5. <i>Penicillium purpurogenum</i> CBS 113139: Πλεονεκτήματα και προοπτική .....	107
4.6. Φλοιός πορτοκάλι και στρατηγική βιοτεχνολογικής αξιοποίησης .....	109
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....</b>	<b>111</b>

# ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

---

## 1.1. Στερεά απόβλητα

Με βάση την ΚΥΑ 50910 αναφορικά με τα μέτρα και τους όρους για τη διαχείριση των στερεών αποβλήτων, ως στερεό απόβλητο ορίζεται «κάθε ουσία ή αντικείμενο το οποίο προκύπτει από την επεξεργασία τροφίμων (Απόφαση 2001/118/ΕΚ), και το οποίο ο κάτοχός του απορρίπτει, προτίθεται ή υποχρεούται να απορρίψει». Ο καθορισμός κατευθύνσεων και μέτρων για τη διαχείριση των στερεών αποβλήτων απαιτείται προκειμένου να μειωθούν όσο το δυνατόν οι αρνητικές επιπτώσεις στο περιβάλλον και τη δημόσια υγεία, λαμβάνοντας υπόψη το οικονομικό και το κοινωνικό κόστος. Ένα μεγάλο κομμάτι στερεών αποβλήτων που προκύπτουν από τη βιομηχανία τροφίμων αποτελούν τα αγροτοβιομηχανικά απόβλητα, των οποίων η αξιοποίηση, έχει μελετηθεί από διάφορους ερευνητές. Ένα μεγάλο μέρος των αποβλήτων αυτών, αποτελούν η πούλπα των φρούτων, το τυρόγαλο, η μελάσα, το υγρό υπόλειμμα καλαμποκιού και το πίτυρο, ενώ σε αυτά περιλαμβάνονται τα άχυρα, ο μίσχος, τα φύλλα, οι σπόροι, οι φλούδες, οι λοβοί, τα διάφορα καλάμια κλπ (Panesar *et al.*, 2015).

## 1.2. Ο φλοιός πορτοκάλι ως υπόλειμμα από τα απόβλητα βιομηχανίας τροφίμων

Ένα από τα απόβλητα αγροτοβιομηχανίας που προκύπτει σε μεγάλες ποσότητες ώστε να προκαλεί το ενδιαφέρον στη βιομηχανία τροφίμων, είναι τα υπολείμματα μεταποίησης πορτοκαλιού. Αυτό συμβαίνει, διότι το πορτοκάλι ως πρώτη ύλη αποτελεί την πιο άμεσα διαθέσιμη καλλιέργεια φρούτων στον κόσμο, με χαμηλό κόστος (Mahmood *et al.*, 1998). Επιπλέον, η βιομηχανική χυμοποίησή του αποτελεί σήμερα ένα σημαντικό οικονομικό τομέα, καθώς ο χυμός πορτοκάλι είναι το πιο διαδεδομένο σε κατανάλωση αναψυκτικό παγκοσμίως, ιδιαίτερα για τις χώρες οι οποίες καλλιεργούν το συγκεκριμένο φρούτο, (Αμερική, Βραζιλία, Μεξικό, Πακιστάν, Κίνα, Ινδία, και οι περισσότερες Μεσογειακές χώρες) (Martín *et al.*, 2010). Με βάση τη στατιστική βάση του οργανισμού Τροφίμων και Γεωργίας της Αμερικής (FAOSTAT), ποσοστό άνω του 70% της μεταποίησης πορτοκαλιού, εκτιμάται ότι χρησιμοποιείται παγκοσμίως με σκοπό την παραγωγή χυμού πορτοκαλιού ή/και μαρμελάδας. Από αυτή τη παραγωγή, περίπου το 50-60% του νωπού βάρους του πορτοκαλιού, αποτελεί απόβλητο, το οποίο αποτελείται

από το φλοιό πορτοκαλιού και τα υπολείμματα του σπόρου και του καρπού (Wilkins *et al.*, 2007a). Με δεδομένο λοιπόν, ότι κατά τη χυμοποίηση του πορτοκαλιού υπάρχει στην παραγωγική διαδικασία πάνω από 50% απώλεια, αλλά και ότι το μεγαλύτερο ποσοστό των υπολειμμάτων πορτοκαλιού αποτελείται από το φλοιό (Bejar *et al.*, 2012), ερευνώνται διάφορες μέθοδοι επεξεργασίας και αξιοποίησης αυτού του παραπροϊόντος. Μέχρι στιγμής, οι κυριότεροι τρόποι διαχείρισης του φλοιού είναι είτε η παραγωγή ζωοτροφών, τα προϊόντα της οποίας έχουν μικρή θρεπτική αξία και υψηλή κατανάλωση ενέργειας, σε σχέση με τη χαμηλή τιμή του πορτοκαλιού (Mahmood *et al.*, 1998), είτε απλώς η καύση τους προς απελευθέρωση ενέργειας 4545 kcal/kg σε ξηρή βάση, αλλά υψηλή περιβαλλοντική ρύπανση (Lapuerta *et al.*, 2008).

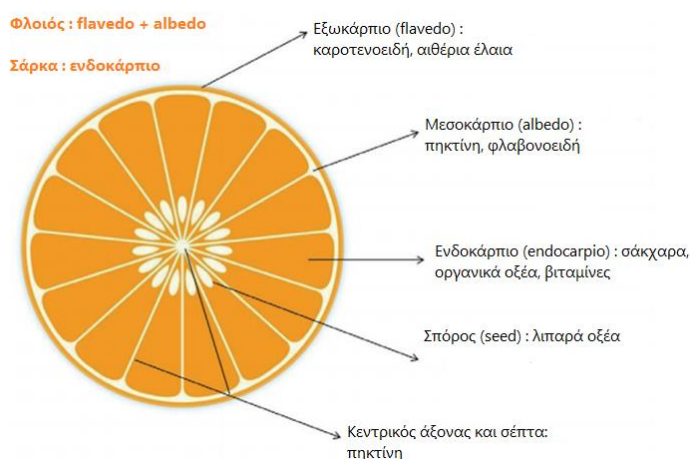


**Γράφημα 1.1:** Απεικόνιση υπολειμμάτων επεξεργασίας πορτοκαλιού μετά τη διαδικασία χυμοποίησης.

Οι προβλέψεις του Αμερικάνικου οργανισμού Γεωργίας (USDA) για την παγκόσμια παραγωγή πορτοκαλιού αναμένονται να φτάσουν τους 47.9 MMT (million metric tones) για το έτος 2015-2016, με την παγκόσμια παραγωγή χυμού πορτοκαλιού να αγγίζει τους 2 MMT. Συνεπώς, υπάρχει ανάγκη εφαρμογής εναλλακτικών μεθόδων των παραπροϊόντων χυμοποίησης, και ιδιαίτερα του φλοιού, με μεγαλύτερες αποδόσεις, προκειμένου να αποφευχθούν περιβαλλοντικά προβλήματα από την υψηλή συγκέντρωση του συγκεκριμένου απόβλητου.

### 1.3. Χημική σύσταση φλοιού πορτοκαλιού

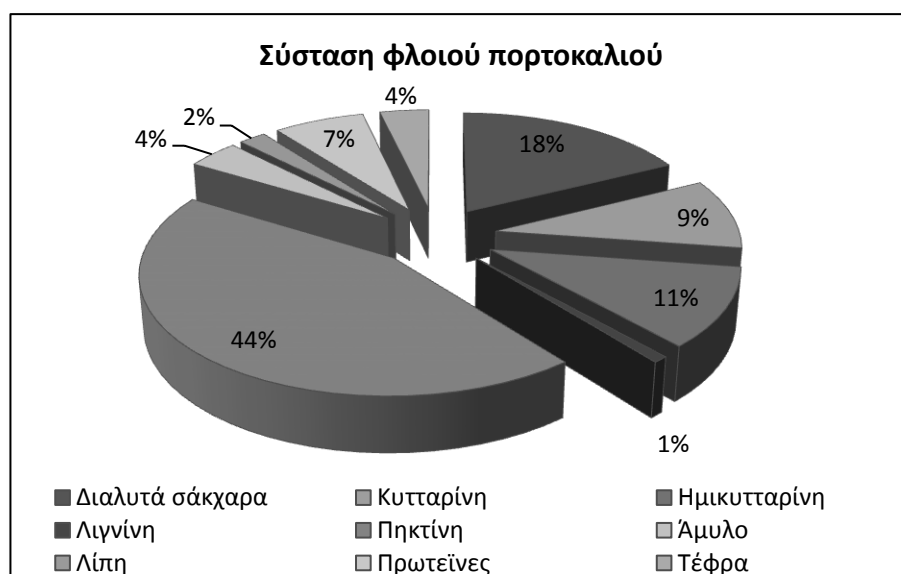
Γενικά, τα απόβλητα χυμοποίησης του πορτοκαλιού, αποτελούνται από το φλοιό ή αλλιώς περικάρπιο (εξωκάρπιο και ενδοκάρπιο) και τα υπολείμματα σάρκας (ενδοκαρπίου) και σπόρων. Τα κύρια συστατικά τους είναι τα λίπη (ελαϊκό, λινελαϊκό, λινολενικό, παλμιτικό, στεατικό, γλυκερίνη, και φυτοστερόλες), τα σάκχαρα (γλυκόζη, φρουκτόζη, σακχαρόζη), τα οξέα (ιδιαίτερα κιτρικό και μηλικό οξύ, καθώς επίσης, βενζοϊκό, οξαλικό και ηλεκτρικό), οι αδιάλυτοι υδατάνθρακες (κυτταρίνη, πηκτίνη), διάφορα ένζυμα (πηκτινάσες, φωσφατάσες, υπεροξειδάσες), τα φλαβονοειδή (εσπεριδίνη, narirutin), τα αιθέρια έλαια (D-λιμονένιο) και οι χρωστικές (καροτενοειδή και ξανθοφύλλες), (Boukroufa *et al.*, 2015).



**Γράφημα 1.2:** Ανατομία τομής του πορτοκαλιού.

Πιο συγκεκριμένα, όσον αφορά στο υπόλειμμα φλοιού πορτοκαλιού (waste orange peel-WOP) αποτελείται από περίπου 20% ξηρή ουσία και 80% νερό. Αποτελείται κυρίως από διαλυτά σάκχαρα (16.9 % wt) και πηκτίνη (42.5 % wt), ενώ ακολουθούν η ημικυτταρίνη (10.5 % wt), η κυτταρίνη (9.21 % wt), οι πρωτεΐνες (6.50 % wt), το άμυλο (3.75 % wt), η τέφρα (3.50 % wt) και η λιγνίνη (0.84 % wt), (Rivas *et al.*, 2008). Η συνολική περιεκτικότητα σε σάκχαρα κυμαίνεται από 29 - 44% (διαλυτά και μη διαλυτά σάκχαρα) (Harvey *et al.*, 1936), ενώ περίπου το 50% του ξηρού βάρους του πορτοκαλιού (με κυρίαρχα τα σάκχαρα) είναι διαλυτό σε αλκοόλες (Sinclair *et al.*, 1953). Τα σάκχαρα που υπάρχουν στο φλοιό είναι η γλυκόζη (με το μεγαλύτερο ποσοστό), η φρουκτόζη και η σακχαρόζη. Οι αδιάλυτοι πολυσακχαρίτες στο φλοιό του πορτοκαλιού είναι η πηκτίνη, η κυτταρίνη και η ημικυτταρίνη. Η πηκτίνη και η ημικυτταρίνη είναι πλούσιες σε

γαλακτουρονικό οξύ, αραβινόζη και γαλακτόζη, αλλά επίσης περιέχουν μικρές ποσότητες ξυλόζης, γλυκόζης, και ραμνόζης (Ma *et al.*, 1993).



Γράφημα 1.3: Σύσταση φλοιού πορτοκαλιού κατά Rivas *et al.*, (2008).

#### 1.4. Η σημασία των αιθέριων ελαίων του φλοιού πορτοκαλιού

Ένα από τα μείζονος σημασίας συστατικά που περιέχεται στο φλοιό πορτοκαλιού είναι τα αιθέρια έλαια, τα οποία βρίσκονται σε μικρούς σάκους ή αδένες διαμέτρου 0,4 - 0,6 mm και αποτελούν πηγή διαφόρων βιοενεργών ενώσεων όπως οι κουμαρίνες, τα φλαβονοειδή, οι φαινόλες, τα καροτένια, τα τερπένια και η λιναλοόλη (Mondello *et al.*, 2005). Ο φλοιός, περιέχει 5,436 kg αιθέριων ελαίων ανά 1000 kg πορτοκαλιών, εκ των οποίων περίπου το 90% είναι ένα κυκλικό τερπένιο, το D-λιμονένιο (Braddock *et al.*, 1986, Hull *et al.*, 1953). Το D-λιμονένιο αποτελεί το κύριο συστατικό του φλοιού όλων των εσπεριδοειδών, ενώ έχει βρεθεί ότι υπάρχουν συνολικά 18-22 ενώσεις που έχουν ταυτοποιηθεί και αποτελούν το 98% των αιθέριων ελαίων. Το D-λιμονένιο, όπως και οι υπόλοιπες ενώσεις, χρησιμοποιούνται στην παρασκευή των τροφίμων και των φαρμάκων ως αρωματικές ουσίες και έχουν πολλές εφαρμογές στη χημική βιομηχανία καθώς και σε καλλυντικά και σε προϊόντα οικιακής χρήσης (Smyth και Lambert, 1998). Τα τελευταία χρόνια έχει αναφερθεί από μελέτες και η αντιμικροβιακή τους δράση (Braddock *et al.*, 1986, Plessas *et al.*, 2007, Ma *et al.*, 2009).

**Πίνακας 1.1:** Χημική σύσταση σε αιθέρια έλαια του φλοιού πορτοκαλιού *Citrus sinensis* (στο νωπό και ξηρό του βάρους), με βάση τους Kamal et al., (2011).

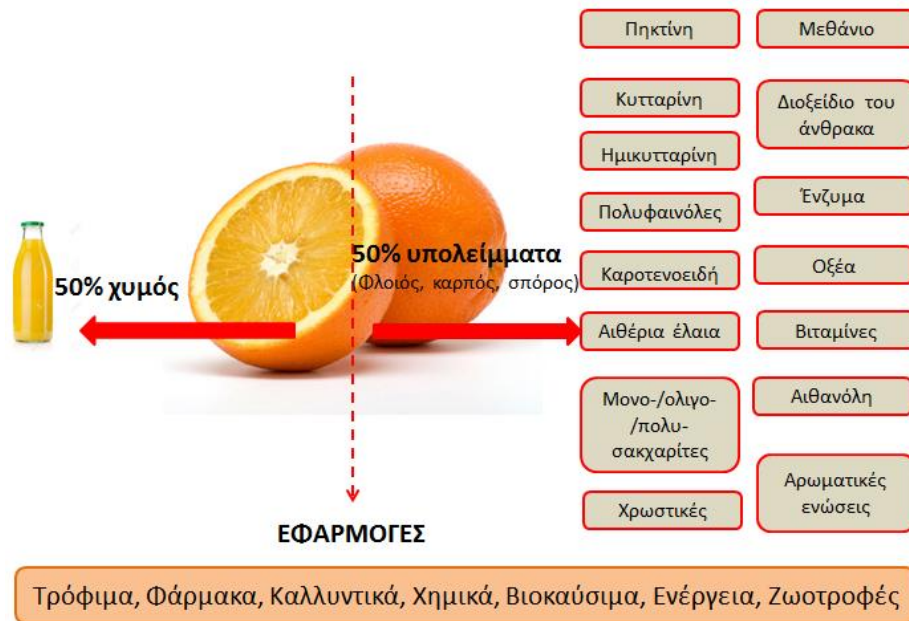
Components (%)	Fresh (%)	Air dried (%)
<b>Monoterpene Hydrocarbons</b>		
a-pinene	1.65±0.12	1.77±0.13
Sabinene	0.37±0.03	-
a-phyllandrene	-	0.46±0.05
b-myrcene	4.19±0.25	3.76±0.13
Δ3-carene	1.03±0.10	0.78±0.04
Limonene	80.9±1.51	72.7±2.40
Z-β-ocimene	0.34±0.03	-
4-carene	0.85±0.05	0.61±0.05
1,3,8 p-methatriene	1.69±0.10	1.21±0.05
<b>Oxygenated Monoterpene Hydrocarbons</b>		
linalool oxide	-	0.48±0.04
linalool	1.52±0.08	2.10±0.12
tras-p-2.8 methadien-1-ol	-	0.79±0.05
Limonen oxide	0.76±0.08	-
a-terpinenol	-	2.34±0.14
Decanal	1.02±0.08	0.71±0.04
z-carveol	0.68±0.06	2.38±0.13
Citronelol	0.71±0.05	1.24±0.06
d-carvone	-	-
Isophorone	1.09±0.07	1.31±0.08
4-vinyl guaiacol	-	1.27±0.08
Pipentenone	-	-
Eugenol	-	-
<b>SEQUITERPENE HYDROCARBONS</b>		
a-cubebene	0.70±0.06	-
Valencene	1.20±0.09	0.41±0.04
δ-cadinene	-	-
<b>Oxygenated SEQUITERPENE Hydrocarbons</b>		
3-furanacetic acid	-	-
β-sinensal	0.83±0.07	-
α-sinensal	0.49±0.04	-
Nikkol	-	5.70±0.23
<b>Total</b>	<b>100.00</b>	<b>100.00</b>

## **1.6. Συνηθισμένες μέθοδοι αξιοποίησης του φλοιού πορτοκαλιού. Εφαρμογές**

Το είδος *Citrus sinensis*, ανήκει στην οικογένεια Rutaceae, η οποία αποτελείται από περίπου 140 γένη και 1300 είδη (Kamal *et al.*, 2011). Επίσης, το γκρεϊπ φρουτ (*Citrus paradise*), το λεμόνι (*Citrus limon*), το μανταρίνι (*Citrus reticulate*), το κίτρο (*Citrus grandis*), η νερατζιά (*Citrus aurantium*) και το λάιμ (*Citrus aurantifolia*) είναι μερικά από τα σημαντικότερα είδη των εσπεριδοειδών (Anwar *et al.*, 2008). Τα προϊόντα μεταποίησης των υπολειμμάτων χυμοποίησης των εσπεριδοειδών, είναι υψηλής οικονομικής και φαρμακευτικής αξίας, ενώ έχουν εφαρμογές στη βιομηχανία τροφίμων, φαρμάκων και καλλυντικών, χημικών (Silalahi 2002, Saidani *et al.*, 2004).

Ο φλοιός του πορτοκαλιού έχει χρησιμοποιηθεί για την εξαγωγή (εκχύλιση, διαχωρισμός, καθαρισμός) διαφόρων συστατικών του, όπως το ινώδες τμήμα του φλοιού αποτελούμενο από την πηκτίνη, την κυτταρίνη και την ημικυτταρίνη (μετά από όξινη υδρόλυση), τις πολυφαινόλες (εσπεριδίνη, naringin και narirutin - Bocco *et al.*, 1998), τα καροτενοειδή, τα αιθέρια έλαια (μετά από απόσταξη) και διάφορα σάκχαρα (είτε από το υγρό υπόλειμμα αφυδάτωσης φλοιού, είτε μετά από υδρόλυση). Ωστόσο, είναι εξίσου σημαντική η μετατροπή του φλοιού σε άλλες βιοδραστικές ενώσεις μετά από βιοτεχνολογική αξιοποίηση. Πιο συγκεκριμένα είναι η αιθανόλη, το μεθάνιο και το διοξείδιο του άνθρακα με αναερόβια ζύμωση (Wheatley, 1990), διάφορες χρήσιμες πρωτεΐνες, αμινοξέα, βιομηχανικά ένζυμα (πολυγαλακτουρονάση, πηκτίνη εστεράση, κυτταρινάση, ξυλανάση (Wicker *et al.*, 1989, Siles *et al.*, 2010), οξέα όπως το κιτρικό οξύ (Hossian *et al.*, 1984), το γλουταμινικό οξύ, το ηλεκτρικό, (Bicu *et al.*, 2011), η βιταμίνη ριβοφλαβίνη (Gaden *et al.*, 1954) αλλά και οι πτητικές αρωματικές ενώσεις (Graumlich, 1983, Braddock και Cadwallader, 1992).





**Γράφημα 1.4:** Εναλλακτικές μέθοδοι αξιοποίησης των υπολειμμάτων χυμοποίησης πορτοκαλιού.

Τα τελευταία χρόνια, η παραγωγή βιοκαυσίμων, θεωρείται μια υψηλά υποσχόμενη μέθοδος επεξεργασίας, κατά την οποία μπορεί να ελεγχθεί η περιβαλλοντική μόλυνση με παράλληλη παραγωγή ενέργειας, η χαμηλή απαίτηση σε θρεπτικά συστατικά, η παραγωγή λίγων αποβλήτων και η μεγιστοποίηση της αξίας που προέρχεται από την πρώτη ύλη της βιομάζας που προκύπτει μετά από χυμοποίηση πορτοκαλιών. Στο παρακάτω γράφημα φαίνεται η σύσταση του φλοιού ειδικότερα σε διάφορα χημικά στοιχεία, καθώς και η αναλογία σε οξυγόνο, άζωτο, φώσφορο, παράγοντες οι οποίοι διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο για την παραγωγή δευτερογενών μεταβολιτών. Η σύσταση που έχει βρεθεί με βάση τη μελέτη του Martin *et al.*, (2010), φαίνεται να ευνοεί αυτές τις συνθήκες για καλή απόδοση βιοκαυσίμων (η αναλογία σε οξυγόνο, άζωτο, φώσφορο COD:N:P που είναι πάνω από 300:5:1 και η παρουσία χημικών στοιχείων τα οποία βοηθούν στη σταθεροποίηση της αναερόβιας διαδικασίας).

**Πίνακας 1.2:** Παρουσίαση χημικής σύστασης φλοιού πορτοκαλιού σε χημικές ουσίες οι οποίες ευνοούν τον έλεγχο και την απόδοση αναερόβιας ζύμωσης, προς παραγωγή βιοκαυσίμων (Martín *et al.*, 2010).

Πηγή: Martín <i>et al.</i> , 2010	Αναλύσεις (με βάση την APHA, 1989)	Φλοιός (WOP)
Νωπό βάρος	pH	3,42±0,02
	Πτητική οξύτητα (mg ακετικού οξέος/L)	1950±27
	Αλκαλικότητα (mg CaCO <sub>3</sub> /kg υδατικού διαλύματος)	Εκτός ορίου (pH=<4.5)
	Υγρασία (%)	79,83 ± 0,08
	Συνολικά στερεά (mg/L, %)	20,17 ± 0,08
	Συνολικά μεταλλικά στερεά (mg/L, %)	0,87 ± 0,03
	Πτητικά στερεά (mg/L, %)	19,31 ± 0,11
Ξηρό βάρος	Συνολικά μεταλλικά στερεά (mg/L, %)	4.31 ± 0.15
	Πτητικά στερεά (mg/L, %)	95.74 ± 0.55
	Χημική απαίτηση σε οξυγόνο (mg O <sub>2</sub> /g, mg/L)	1085 ± 55
	Συνολικό άζωτο (mg N/g)	12.24 ± 0.56
	Άζωτο κατά Kjeldahl (mg N/g)	11.67 ± 0.24
	Αμμωνιακό άζωτο (mg N/g)	1.68 ± 0.19
	Συνολικός φώσφορος (mg/kg)	1.18 ± 0.03
	Cu (mg/kg)	Εκτός ορίου
	Cr (mg/kg)	1,6 ± 0,7
	Ni (mg/kg)	6,1 ± 1,3
	Cd (mg/kg)	4,9 ± 0,8
	Pb (mg/kg)	Εκτός ορίου
	Zn (mg/kg)	4,5 ± 0,4

### 1.7. Εναλλακτική βιοτεχνολογική αξιοποίηση του φλοιού πορτοκαλιού προς παραγωγή χρωστικών

Παρά τα πλεονεκτήματα των φυσικών χρωστικών, ο σχεδιασμός και η ανάπτυξη διεργασιών για τη βιομηχανική παραγωγή των χρωστικών, μέσω βιοτεχνολογικής αξιοποίησης, συνεπάγεται υψηλό κόστος το οποίο προέρχεται κυρίως από το υψηλό κεφάλαιο επένδυσης των θρεπτικών μέσων. Γι αυτό το λόγο, η χρήση χαμηλού κόστους αγροτοβιομηχανικών αποβλήτων, ως θρεπτικών μέσων για την παραγωγή χρωστικών, μπορεί όχι μόνο να μειώσει το κόστος, αλλά και να συμβάλλει στην παραγωγή προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας και στην ανάπτυξη αειφόρων διεργασιών.

Μερικά από τα αγροτοβιομηχανικά απόβλητα που έχουν χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή χρωστικών φαίνονται στον παρακάτω πίνακα, με βάση τη μελέτη του Carvalho, *et al.*, (2006).

**Πίνακας 1.3:** Ο προσδιορισμός των κόκκινων χρωστικών (μέτρηση στα 500nm) σε ζύμωση στερεάς κατάστασης αποκαλύπτει το τεράστιο εύρος που παρουσιάζουν στα αγροτοβιομηχανικά απόβλητα, με βάση τη χημική τους σύνθεση (Franco, 1992). Ο χρόνος ζύμωσης είναι 7-11 μέρες.

Παραγωγή βιοχρωστικών (AU/g ξηρού υποστρώματος) και σύνθεση υποστρώματος				
Υπόστρωμα	Μέση σύνθεση(g/Kg db)			Μέση ειδική απορρόφηση(AU/g ξηρού υποστρώματος)
	Υδατάνθρακες	Πρωτεΐνες	Φώσφορος	
Rice	820	90	1.14	216
Wheat	770	140	3.63	79
Corn	780	130	3.19	60
Soy	330	40	6	13
Soy Bran	400	480	7	22
TSP	-	-	-	12.6
Cassava	864	19	10.99	119.6
Cassava starch	900	20	3.3	38.5
Cassava flour	910	14	2.2	98.1
Cassava bagasse	660	11	-	15.7
Potato	800	100	9.6	4.7

(-)Υποσημαίνει άγνωστα δεδομένα

Συνεπώς, και τα απόβλητα πορτοκαλιού δύνανται να αποτελέσουν μια χαμηλού κόστους, παγκοσμίως διαθέσιμη και αρκετά αποτελεσματική πρώτη ύλη, τόσο σα στερεό όσο και σαν υγρό θρεπτικό μέσο, δεδομένης της χημικής του σύστασης. Σήμερα, έχει χρησιμοποιηθεί για πάρα πολλές εφαρμογές (όπως περιγράφονται σε προηγούμενη ενότητα) και με τους δύο τρόπους (Panesar *et al.*, 2015).

Επίσης, με βάση τη μέχρι τώρα βιβλιογραφική ανασκόπηση, η μοναδική εργασία που εξετάζει την παραγωγή χρωστικών από φλοιό πορτοκάλι είναι των T.Padmavathi *et al.*, (2013), όπου αναφέρεται η παραγόμενη χρωστική (στα 510nm) στα 0.65 AU/g από το στέλεχος *Monascus purpureus* MTCC 410 (pH=6, T=28°C, H=56-60%, 20 μέρες επώασης). Ωστόσο, στη συγκεκριμένη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν συνθετικές πηγές αζώτου και ιχνοστοιχεία για την ενίσχυση του θρεπτικού υποστρώματος.

## 1.8. Φυσικές και συνθετικές χρωστικές

Το χρώμα στα τρόφιμα μπορεί να δημιουργήσει προσδοκίες και συμπεριφορές, που αναπτύσσονται με βάση τις κοινωνικές παραδόσεις. Επιπλέον, αποτελεί βασικό παράγοντα στην εκτίμηση ποιότητας ενός τροφίμου. Γι αυτό το λόγο άλλωστε είναι γνωστή και η φράση που χρησιμοποιείται για να περιγράψει ένα τρόφιμο που «τρώγεται με τα μάτια» (Stich *et al.*, 2002). Με βάση τη διεθνή νομοθεσία (Codex Alimentarius) οι

χρωστικές (συνθετικές και φυσικές) συγκαταλέγονται στα πρόσθετα τροφίμων (E100-E199). Στην Ελλάδα οι προδιαγραφές για τη χρήση των πρόσθετων χρωστικών καθορίζονται από τον Κώδικα Τροφίμων και Ποτών και είναι εναρμονισμένες με την Ευρωπαϊκή νομοθεσία.

Είναι γνωστό ότι η χρήση φυσικών χρωστικών ξεκίνησε από το 1500 π.Χ. από το εκχύλισμα φυτών και κρασιού, ενώ στην πορεία η βιομηχανική ανάπτυξη τέλος στο του 19<sup>ου</sup> αιώνα έφερε στο προσκήνιο τη χρήση συνθετικών χρωστικών, οι οποίες κυριάρχησαν μέχρι και τον 20<sup>ο</sup> αιώνα (Downham και Collins, 2000). Όμως οι απαιτήσεις του καταναλωτικού κοινού για χρήση φυσικών προϊόντων έφερε ξανά στο προσκήνιο την ανάγκη παραγωγής φυσικών χρωστικών. Επιπλέον τα τελευταία χρόνια η χρήση συνθετικών χρωστικών έχει αναθεωρηθεί από μια πιο αυστηρή νομοθεσία όσον αφορά στην ετικέτα των προϊόντων, αλλά και έχει απαγορευτεί σε κάποιες περιπτώσεις εξαιτίας των επιζήμιων επιδράσεων στην ανθρώπινη υγεία.

Όσον αφορά στις φυσικές χρωστικές των οποίων η χρήση επιτρέπεται στα τρόφιμα, προέρχονται από ανθοφόρα φυτά και έντομα (ιστούς). Τυπικά, αυτά εκχυλίζονται χρησιμοποιώντας συγκεκριμένους διαλύτες και πωλούνται εν συνεχεία σε μορφή σκόνης ή γαλακτωμάτων (Marari *et al.*, 2009).

Στα τρόφιμα, οι φυσικές χρωστικές που υπάρχουν περιλαμβάνουν τις χλωροφύλλες (πράσινο χρώμα), τις φαιοφυτίνες (καστανοπράσινο χρώμα), την αιμογλοβίνη και τη μυογλοβίνη (χρώματα κρέατος και παραγώγων του), τα φλαβονοειδή με κίτρινο χρώμα (καμπφερόλη, κερκετίνη, απιγενίνη, φλαβανόνες εσπεριδοειδών), τις ταννίνες (κατεχίνες, λευκοανθοκυανίνες), τις κινόνες και ξανθόνες (κιτρινωπές χρωστικές), τα καροτενοειδή (κίτρινο και πορτοκαλί χρώμα) και παράγωγά τους (λυκοπένιο, β-κρυπτοξανθίνη, κανθαξανθίνη, ζεαξανθίνη) και τις ανθοκυανίνες (πελαργονιδίνη, δελφινιδίνη, κυανιδίνη με κόκκινα-μπλε χρώματα ανάλογα με το pH). Όμως η εποχική προμήθεια των πρώτων υλών των φυσικών χρωστικών, η αδυναμία να χαρακτηριστούν από ίδιες φυσικοχημικές ιδιότητες και λειτουργίες λόγω των κλιματικών συνθηκών (πχ καθαρότητα, αντοχή σε pH, θερμότητα φως, η διαλυτότητα), αποδεικνύουν ότι η χρήση τους στη βιομηχανία τροφίμων δεν έχει μεγάλη προοπτική (Spears, 1988). Γι αυτό το λόγο, είναι αναγκαίο να υπάρξει στροφή στη μελέτη και στην εναλλακτική αξιοποίηση των φυσικών χρωστικών από μικροοργανισμούς, καθώς μπορούν να

ανεξαρτητοποιήσουν την εποχικότητα και τη διακύμανση των χαρακτηριστικών των χρωστικών στην παραγωγική διαδικασία.

## **1.9. Η σημασία φυσικών χρωστικών στη βιοτεχνολογία τροφίμων**

Σε αντίθεση με τις φυσικές χρωστικές που προέρχονται από τα φυτά και τα ζώα, η βιοτεχνολογική παραγωγή φυσικών χρωστικών αναμφίβολα τις τελευταίες δεκαετίες υπερέχει, καθώς οι μικροοργανισμοί που χρησιμοποιούνται δύνανται να αναπτυχθούν γρήγορα και οικονομικά σε φτηνά υποστρώματα, ανεξάρτητα από καιρικές συνθήκες, ενώ είναι άμεσα διαθέσιμοι όλο το χρόνο και επιδέχονται εύκολο χειρισμό στις περιπτώσεις που είναι γνωστή η γενετική τους βάση. Επιπλέον οι χρωστικές που παράγουν, είναι βιοαποικοδομήσιμες, συνήθως είναι πιο σταθερές και διαλυτές δομές από αυτές των φυτών/ζώων (Gunasekaran και Poorniammal, 2008) με διάφορες βιολογικές ιδιότητες (αντιοξειδωτικές, αντιβιοτικές, αντικαρκινικές, αντιφλεγμονώδεις κλπ).

Οι μικροοργανισμοί που είναι σήμερα γνωστοί για την παραγωγή χρωστικών, αλλά συνήθως με μικρή δυναμικότητα παραγωγής και υψηλό κόστος, ανήκουν σε διάφορα βακτήρια, ζύμες και βασιδιομύκητες (Arad και Yaron, 1992, Zhang *et al.*, 2006, Davoli και Weber, 2002, Marari *et al.*, 2009, Ogihara *et al.*, 2001). Αντίθετα, η παραγωγή χρωστικών από ασκομύκητες αυξάνει διαρκώς εξαιτίας της δυνατότητας των μικροοργανισμών αυτών να παράγουν χρωστικές με διαφορετικές χημικές δομές, και κατ' επέκταση διαφορετικό χρωματικό εύρος. Κάποιες από τις χρωστικές που ήδη παράγονται στη βιομηχανία τροφίμων με τη βοήθεια των μικροοργανισμών αυτών, είναι οι εξής: ασταξανθίνη, torularhodin, ζεαξανθίνη, torulene, β-καροτένιο, isonieratene, κανθαξανθίνη, λυκοπένιο, ριβοφλαβίνη και η κόκκινη χρωστική Arpink Red (Dufosse *et al.*, 2006). Εκτός από την εφαρμογή που έχουν στα τρόφιμα, οι χρωστικές αυτές έχουν εφαρμογές στη βιομηχανία φαρμάκων, καλλυντικών, ρούχων και χάρτου.

**Πίνακας 1.4:** Χρωστικές οι οποίες παράγονται από διάφορους μικροοργανισμούς, και οι οποίες είτε έχουν ήδη εμπορευματοποιηθεί (B), είτε είναι σε στάδιο εργαστηριακής ανάπτυξης (A) είτε είναι υπό διερεύνηση (E).

Μόριο	Μικροοργανισμός	Χρώμα	Κατάσταση
Ankaflavin	<i>Monascus sp.(fungus)</i>	Κίτρινο	B
Anthraquinone	<i>Penicillium oxalicum(fungus)</i>	Κόκκινο	B
Lycopene	<i>Blakeslea trispora(fungus)</i>	Κόκκινο	A
Lycopene	<i>Fusarium sporotrichioides(fungus)</i>	Κόκκινο	E
Monascorubramin	<i>Monascus sp.(fungus)</i>	Κόκκινο	B
Naphthoquinone	<i>Cordyceps unilateralis(fungus)</i>	Βαθύ κόκκινο	E
Riboflavin	<i>Ashbya gossypi(fungus)</i>	Κίτρινο	B
Rubropunctatin	<i>Monascus sp.(fungus)</i>	Πορτοκαλί	B
β-carotene	<i>Blakeslea trispora(fungus)</i>	Κίτρινο-Πορτοκαλί	B
β-carotene	<i>Fusarium sporotrichioides(fungus)</i>	Κίτρινο-Πορτοκαλί	E
β-carotene	<i>Mucor circinelloides(fungus)</i>	Κίτρινο-Πορτοκαλί	A
β-carotene	<i>Neurospora crassa(fungus)</i>	Κίτρινο-Πορτοκαλί	E
β-carotene	<i>Phycomyces blakesleeanus(fungus)</i>	Κίτρινο-Πορτοκαλί	E
Άγνωστο	<i>Penicillium purpurogenum(fungus)</i>	Κόκκινο	A
Άγνωστο	<i>Paecilomyces sinclairii(fungus)</i>	Κόκκινο	E
Astaxanthin	<i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i> πρ. <i>Phaffia rhodozyma</i> (yeast)	Ροζ-Κόκκινο	A
Melanin	<i>Saccharomyces neoformans</i> var. <i>nigricans</i> (yeast)	Μαύρο	E
Torularhodin	<i>Rhodotrula sp.(yeast)</i>	Πορτοκαλί-Κόκκινο	A
Astaxanthin	<i>Agrobacterium aurantiacum(bacteria)</i>	Ροζ-Κόκκινο	E
Astaxanthin	<i>Paracoccus carotinifaciens(bacteria)</i>	Ροζ-Κόκκινο	E
Canthaxanthin	<i>Bradyrhizobium sp.(bacteria)</i>	Σκούρο κόκκινο	E
Rubrolone	<i>Streptomyces echinoruber(bacteria)</i>	Κόκκινο	A
Zeaxanthin	<i>Flavobacterium sp.(bacteria)</i>	Κίτρινο	A
Zeaxanthin	<i>Paracoccus zeaxanthinifaciens(bacteria)</i>	Κίτρινο	E

Το B: Βιομηχανική Παραγωγή, το A: Υπό Ανάπτυξη, το E: Υπό Έρευνα

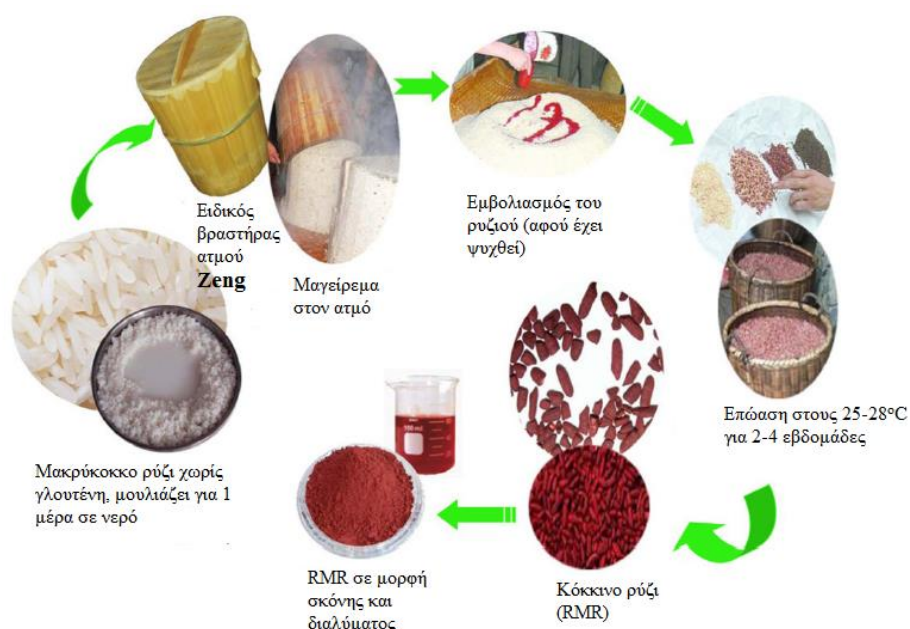
### 1.10. Η περίπτωση των χρωστικών MPs (Monascus Polyketide pigments)

Το γένος *Monascus* sp. ορίστηκε από τον van Tieghem το 1884 (Feng et al., 2012). Περιλαμβάνει τυπικούς ασκομύκητες των οποίων η ταξινόμηση είναι η εξής: Βασίλειο: Fungi, Διαιρέση: Eumycota, Υποδιαιρέση: Ascomycotina, Κλάση: Eurotiomycetes, Υποκλάση: Eurotiomycetidae, Τάξη: Eurotiales, Οικογένεια: Monascaceae, Γένος: *Monascus* (Ainsworth 2008). Πρόσφατα, αναγνωρίστηκαν 9 είδη μέσα στο γένος (*M. argentinensis*, *M. eremophilus*, *M. floridanus*, *M. lunisporas*, *M. pallens*, *M. pilosus*, *M. purpureus*, *M. ruber*, and *M. sanguineus* (Shao and others 2014). Ανάμεσα σε αυτά, τα είδη *M. pilosus*, *M. purpureus*, and *M. ruber* είναι τα τέσσερα πιο σημαντικά για τη βιομηχανία τροφίμων. Οι φυσικές χρωστικές MPs αποτελούν

δευτερογενείς μεταβολίτες πολυκετιδικής δομής, που χρησιμοποιούνται ευρέως στις βιομηχανίες τροφίμων ιδιαίτερα των Ανατολικών χωρών (Χονγκ Κονγκ, Ιαπωνία, Κορέα, Μαλαισία, Σιγκαπούρη, Ταϊλάνδη, Ταϊβάν, Κίνα). Άλλοι δευτερογενείς μεταβολίτες οι οποίοι παράγονται από το γένος *Monascus*, με σημαντική δράση είναι οι λοβαστατίνες ή μονακολίνες (αντι-υπερχοληστερική δράση), το γ-αμινοβουτιρικό οξύ ή GABA (υπερτασική δράση), το διμερικό οξύ (αντιοξειδωτική δράση), η εργοστερόλη, και η μυκοτοξίνη κιτρινίνη (νεφροηπατική τοξίνη) (Feng et al., 2012, Kongruang, 2011). Μέχρι τώρα έχουν μελετηθεί και ταυτοποιηθεί πάνω από 50 MPs, με μεγάλο εύρος βιολογικών ιδιοτήτων όπως αντιμεταλλαξογόνες, αντικαρκινικές, αντιμικροβιακές, παράγοντες μείωσης χοληστερόλης (Feng et al., 2012).

### 1.11. Από την παράδοση στις σύγχρονες εφαρμογές

Παραδοσιακά, χρησιμοποιείται για ζυμώσεις στερεάς κατάστασης σε απόβλητα αγροτοβιομηχανιών, όπως απόβλητα ζυθοποιίας σιτηρών, πίτουρο ρυζιού, πίτουρο σιταριού, σημαμέλαιο, φοινικέλαιο, λάδι αραχίδας, λάδι καρύδας, σκόνη μανιόκας ή cassava, σκόνη αρτόκαρπου ή jackfruit και σκόνη ταμάρινδου, (Kongruang, 2011). Επίσης χρησιμοποιείται για χρωματισμό, για ιατρικούς σκοπούς και σαν αρχική καλλιέργεια (starter), για πάνω από ένα αιώνα (Shi και Pan 2011) .



**Γράφημα 1.5:** Παραδοσιακή διαδικασία παραγωγής του κόκκινου ρυζιού RMR (Chen, et al., 2015)

Γενικά, το εύρος των εφαρμογών των MPs χρωστικών είναι τεράστιο. Πιο συγκεκριμένα, στα τρόφιμα χρησιμοποιούνται ως ενισχυτές χρώματος και γεύσης σε γάλατα, τυριά σόγιας, γιαούρτια, ρύζι, λουκάνικα, μπιφτέκια, αλλαντικά, πάστες ψαριών surimi, σώς, σάλτσες και ketchup, ως εκκινητές σε προϊόντα ζυθοποιίας-οινοποιίας, ως σταθεροποιητικοί παράγοντες σε ζελέδες, ως μπαχαρικά, ως συντηρητικά (αντικαθιστώντας τα νιτρώδη και το νιτρικό κάλιο κυρίως σε προϊόντα κρέατος) στα φάρμακα (συμπλήρωμα για μείωση κακής χοληστερόλης και ενίσχυση της κυκλοφορίας του αίματος), στη μεταποίηση ρούχων (σε δέρματα και ρούχα) και χάρτου (Dufosse, 2006, Panesar et al.,2015, Feng et al., 2012, Patakova et al., 2013).



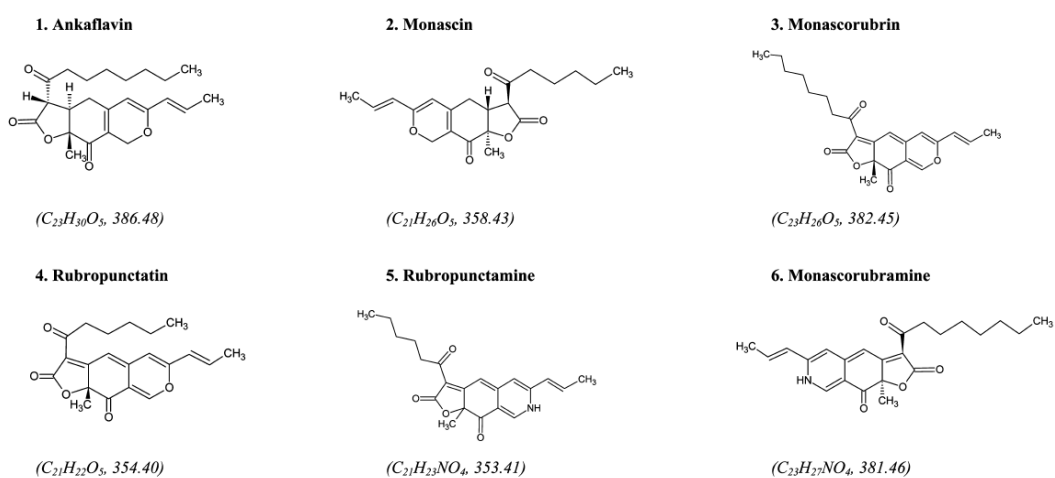
*Γράφημα 1.6: Παρουσίαση μερικών εφαρμογών σε τρόφιμα (Κόκκινη σως, σογια σως, κόκκινο ζύδι, κόκκινη σκόνη, κόκκινη σάλτσα, καρκεύματα, κρασιά) και φάρμακα.*

## 1.12. Χημική δομή των χρωστικών MPs

Οι βασικές MPs χρωστικές οι οποίες παράγονται από το γένος *Monascus* είναι έξι και ταξινομούνται σε τρεις ομάδες ανάλογα με το χρώμα που παράγουν. Σε αυτές περιλαμβάνονται οι κίτρινες χρωστικές monascin ( $C_{21}H_{26}O_5$ ) και ankaflavin ( $C_{23}H_{30}O_5$ ), οι πορτοκαλί monascorubrin ( $C_{23}H_{26}O_5$ ) και rubropunctatin ( $C_{21}H_{22}O_5$ ) και τέλος οι κόκκινες monascorubramine ( $C_{23}H_{27}NO_4$ ) και rubropuntamine ( $C_{21}H_{23}NO_4$ ) (Kim et al., 2006).



Αποτελούν δευτερογενείς μεταβολίτες πολυκετιδικής δομής που ονομάζονται azaphilones (λέγονται έτσι εξαιτίας της στενής συγγενείας τους με μόρια που περιέχουν αμινομάδες, όπως οι πρωτεΐνες, τα αμινοξέα, τα νουκλεϊκά οξέα- Osmanova et al., 2010), με παρόμοιες μοριακές δομές αλλά και χημικές ιδιότητες (Babitha 2009). Η δομική ανάλυση των χρωστικών από το γένος *Monascus* έχει αρχίσει από το 1932 (Salomon και Karrer 1932), ενώ μέχρι το 1973, έχουν ταυτοποιηθεί και οι έξι κύριες χρωστικές (Manchand και Whalley, 1973). Παρακάτω παρουσιάζεται η δομή των 6 κυριότερων MPs χρωστικών.



**Γράφημα 1.7:** Παρουσίαση χημικής δομής των 6 κυριότερων MPs χρωστικών (Mapari et al., 2008)

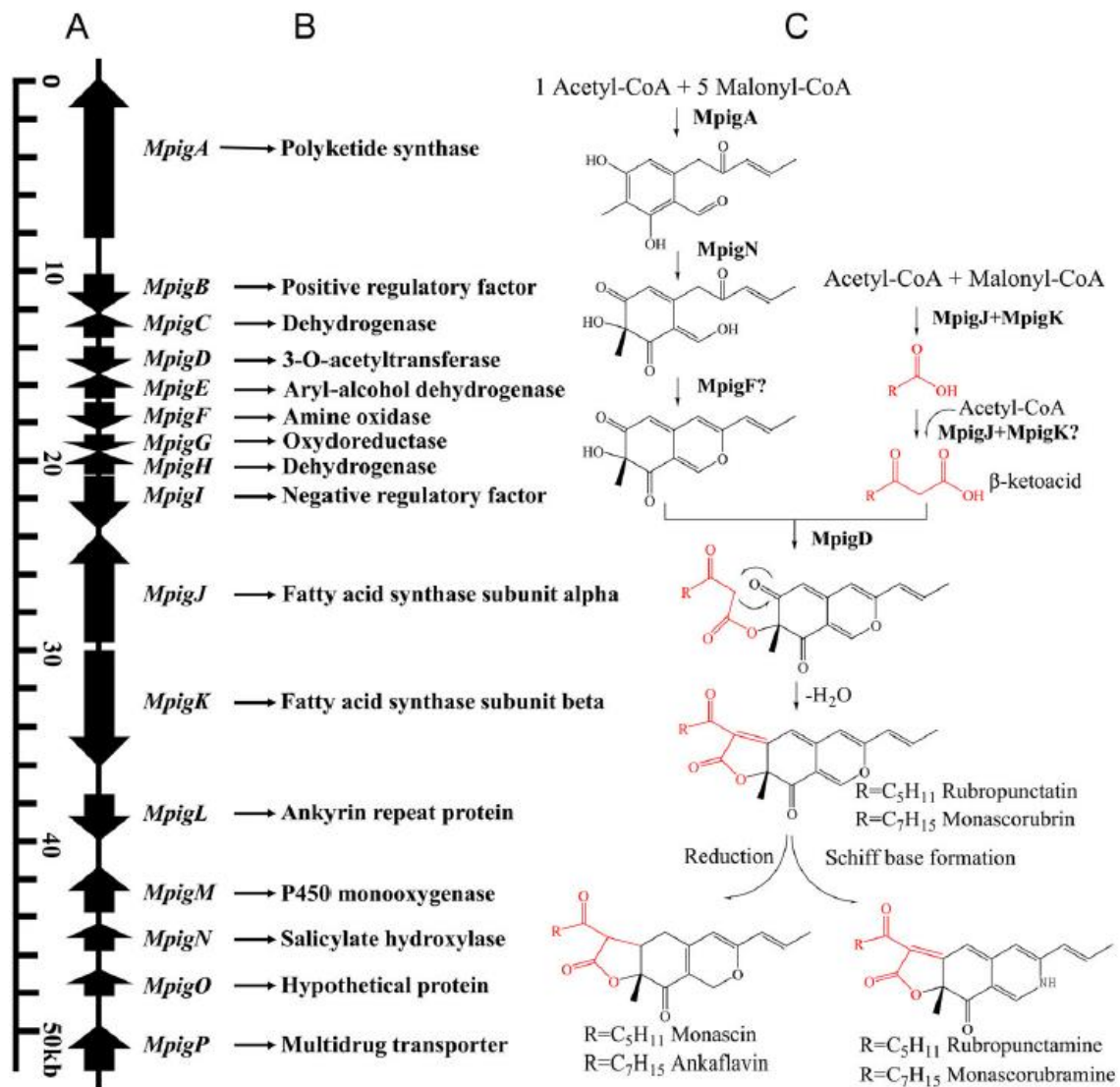
Η δομή παίζει καθοριστικό ρόλο στις φυσικοχημικές ιδιότητες των χρωστικών. Για παράδειγμα, είναι αδιάλυτες σε υδατικό περιβάλλον, και διαλυτές σε αιθανόλη, ακετικό οξύ, εξάνιο κλπ, και διαλύονται είτε στη περίπτωση προσθήκης γλουταμινικού, λευκίνης, γλυκίνης στο θρεπτικό μέσο, είτε χημικής τροποποίησής τους με προσθήκη καρβουλοξομάδων ή αμινομάδων των αμινοξέων. Για παράδειγμα, οι κόκκινες χρωστικές είναι εύκολα εμπορεύσιμες λόγω της διαλυτότητάς τους στο νερό. Επίσης είναι σταθερές σε ένα μεγάλο εύρος θερμοκρασίας (30-60°C) και σε pH 6-8, χωρίς απαραίτητα να αλλάζει η σταθερότητά τους σε πιο ακραίες συνθήκες. Είναι ευαίσθητες στην ηλιακή και υπεριώδη ακτινοβολία, ενώ τα αμινοξικά παράγωγά τους και οι διαλυτές χρωστικές είναι πιο σταθερές σε σύγκριση με τις γνήσιες 6 χρωστικές. Τέλος, παρουσία μικρής ποσότητας μεταλλικών ιόντων  $Na^+$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $K^+$ ,  $Al^{3+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ , and  $Zn^{2+}$ , παρουσιάζουν κάποια σταθερότητα, σε αντίθεση με τα ιόντα  $Fe^{3+}$  και  $Fe^{2+}$  (Feng et al., 2012)

### 1.13. Βιοχημεία χρωστικών MPs

Μέχρι στιγμής, υπάρχει λίγη γνώση σχετικά με τη ρύθμιση γονιδίων που εμπλέκονται στην έκφραση δευτερογενών μεταβολιτών, ειδικά σε περιοχές του γονιδιώματος όπου παραμένουν ανενεργές για πολύ διάστημα, ή εκφράζονται μόνο κάτω από συνθήκες στρες (παραγωγή δευτερογενών μεταβολιτών). Κατά συνέπεια, η βιοσύνθεση των χρωστικών των διαφόρων μονοπατιών που εμπλέκονται στο σχηματισμό πολυκετιδίων, μεταξύ των οποίων και οι χρωστικές, αποτελεί ακόμα θολό σημείο. Παρόλα αυτά, το βιοχημικό μονοπάτι των πολυκετιδίων είναι το κύριο μεταβολικό μονοπάτι βιοσύνθεσης όλων των δευτερογενών μεταβολιτών για τους νηματοειδείς μύκητες (Chandler *et al.*, 1992). Το γένος *Monascus* αποτελεί το πιο μελετημένο μικροοργανισμό αναφορικά με την παραγωγή χρωστικών, ώστε να θεωρείται κατά κάποιο τρόπο πρότυπο για τη βιοσύνθεση χρωστικών πολυκετιδικής δομής. Με βάση μελέτες που έχουν γίνει με αυτό το μύκητα, εξηγείται το βιοχημικό μονοπάτι παραγωγής χρωστικών σε κάθε άλλο ασκομύκητα ο οποίος παράγει ίδιας χημικής δομής, χρωστικές ουσίες, (Mapari *et al.*, 2010).

Ιστορικά, η έρευνα γύρω από το βιοχημικό μονοπάτι ξεκίνησε τις αρχές δεκαετίας του '60, χρησιμοποιώντας ανάλυση πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (Kurono *et al.*, 1963). Με βάση προηγούμενες αλλά και σύγχρονες μελέτες, η βιοσύνθεση των πολυκετιδίων πραγματοποιείται στο κυτταρόπλασμα, ως εξής : 1 mol ακετικού οξέος (ή ακετυλο-CoA) αντιδρά μέσω συμπύκνωσης (απελευθέρωση CO<sub>2</sub>) με 5 mol μηλονικού οξέος (ή μηλονυλο-CoA) σχηματίζοντας ένα χρωμοφόρο εξακετίδιο μέσω του πολυκετιδικού βιοσυνθετικού μονοπατιού. Ταυτόχρονα, μέσω της βιοσύνθεσης λιπαρών οξέων, για παράδειγμα του οκτανοϊκού οξέος και το σχηματισμό β-κετοξέος, έχει σαν αποτέλεσμα την trans-εστεροποίηση (ή αποκαρβοξυλίωση) του β-κετοξέος με το χρωμοφόρο πολυκετίδιο, αντίδραση η οποία οδηγεί στο σχηματισμό της πορτοκαλί χρωστικής monascorubrin, ή της rubropunctatin (εστεροποίηση με εξανοϊκό οξύ). Η περαιτέρω αντίδραση συμπύκνωσης της πορτοκαλί χρωστικής monascorubrin οδηγεί στη δημιουργία της κίτρινης χρωστικής ankaflavin (ή αντίστοιχα της χρωστικής monascin), ενώ η αμίνωση (υποκατάσταση οξυγόνου με άζωτο) πορτοκαλί χρωστικών οδηγεί στη σύνθεση των κόκκινων χρωστικών monascorubramine και rubropunctamine (Chen *et al.*, 2015).

Για πρώτη φορά αναφέρεται η αλληλούχιση γονιδίων που εμπλέκονται στην παραγωγή MPs (Feng et al., 2012) μετά από συνδυαστική έρευνα σε στελέχη *M. ruber* (έγινε κλωνοποίηση περιοχής που κωδικοποιεί τη συνθάση του πολυκετιδίου) και του *M. purpureus* (έγινε τυχαία μεταλλαξογένεση, απενεργοποιώντας τη περιοχή κωδικοποίησης της συνθάσης πολυκετιδίου), που είχε ως αποτέλεσμα την παρεμπόδιση παραγωγής χρωστικών. Επομένως, επιβεβαιώνεται ότι η συνθάση του πολυκετιδίου PKS εμπλέκεται στην παραγωγή χρωστικών. Με βάση αυτό, η αλληλούχιση γονιδίων (gene cluster), έχει συμβάλει στη βαθύτερη κατανόηση της βιοσύνθεσης χρωστικών MPs. Παρόλα αυτά, το μονοπάτι αυτό είναι αρκετά σύνθετο, καθώς οι χρωστικές μπορούν εύκολα να οξειδωθούν, να αντιδράσουν με άλλες ενώσεις όπως αμινοξέα, με αποτέλεσμα να σχηματίζονται διάφορα παράγωγά τους (Dufosse et al., 2005), ενώ είναι γνωστό ότι και οι συνθήκες καλλιέργειας έχουν επίδραση στα συστατικά των χρωστικών (Hajjaj et al., 2012).



**Γράφημα 1.8:** Σχηματική απεικόνιση της αλληλούχισης γονιδίων (53kb) που εμπλέκεται στην παραγωγή χρωστικών, καθώς και της βιοσύνθεσης των πορτοκαλί, κόκκινων και κίτρινων MPs χρωστικών (Chen et al., 2015). (A): Αλληλούχιση γονιδιακής περιοχής που εμπλέκεται στην βιοσύνθεση χρωστικών, η οποία προέρχεται από το γονιδίωμα του *M. ruber* M7. Τα βέλη δείχνουν τη κατεύθυνση γονιδιακής μεταγραφής. Οι αποστάσεις των γονιδίων αντιπροσωπεύουν τα σχετικά μεγέθη τους. (B): Δυνητικές λειτουργίες των γονιδίων (αριστερά τα ονόματα γονιδίων και δεξιά του βέλους, τα ένζυμα/πρωτεΐνες που κωδικοποιού). (Γ): Γενικός αποδεκτό μονοπάτι βιοσύνθεσης χρωστικών (Hajjaj et al., 2012).

Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι μέχρι σήμερα έχει χαρτογραφηθεί όλο το γονιδίωμα τεσσάρων στελεχών του γένους *Monascus* (*M. purpureus* NRRL 1596, *M. purpureus* YY-1, *M. ruber* NRRL 1597, and *M. ruber* M7), κάτι το οποίο θα βοηθήσει στην καλύτερη κατανόηση όλης της βιολογίας του μικροοργανισμού αυτού, αλλά και της

συγγένειάς του με άλλους μικροοργανισμούς που παράγουν τις ίδιες χρωστικές (Chen et al., 2015).

### 1.14. Παράγοντες που επιδρούν στην παραγωγή χρωστικής

Η σύνθεση των χρωστικών από τα μυκητιακά στελέχη επηρεάζεται από διάφορους παράγοντες, όπως αντίστοιχα και κάθε δευτερογενής μεταβολίτης. Μείζονος σημασίας ρόλο στην παραγωγή χρωστικών διαδραματίζουν οι συνθήκες καλλιέργειας και ειδικότερα η θερμοκρασία, η τιμή pH, η αρχική υγρασία και το μέγεθος κόκκων του υποστρώματος όσον αφορά στις ζυμώσεις στερεάς κατάστασης. Αντίστοιχα, στις υγρές καλλιέργειες σημαντική επίδραση παρουσιάζει η ανάδευση, ο αερισμός, η συγκέντρωση του εμβολίου, η φάση ανάπτυξης του μύκητα, η πηγή αζώτου και ο λόγος άνθρακα προς άζωτο (carbon to nitrogen ratio, C/N). Επιπρόσθετα, μετά το πέρας της ζύμωσης προς την παραγωγή χρωστικών, ιδιαίτερα σημαντικός είναι και ο τρόπος εκχύλισης και παραλαβής των χρωστικών. Ο Πίνακας 1.13-1 απεικονίζει διαφορετικούς τρόπους εκχύλισης που χρησιμοποιούνται εντός του γένους *Monascus* sp.

**Πίνακας 1.5:** Συνοπτική παρουσίαση δοκιμασμένων τρόπων εκχύλισης στο γένος *Monascus* sp., με βάση τη μελέτη του Syed, 2015.

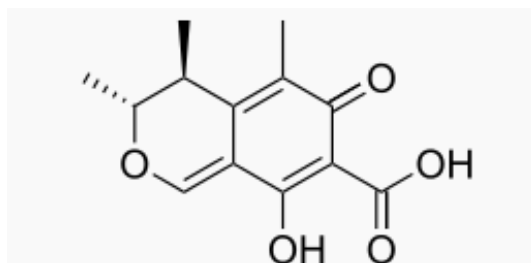
Microorganisms	Type of Pigments	Solvents used	OD	References
<i>Monascus</i> mutant strain	yellow , orange and red pigments	Et-OH 96%	400 nm and 510 nm	(Ungureanu et al., 2004)
<i>Monascus</i> sp	Red pigments	Methanol	500 nm	(Evans and Wang, 1984)
<i>Monascus</i>	Red pigments	Dimethyl sulfoxide(DMSO),hexane,ethyl Ether, ethyl alcohol, methyl alcohol and acetonitrile(analysis grade) and water(deionized)	500 nm	(Carvalho et al., 2007)
<i>M. purpureus</i>	Red pigments	25 mL of 95% ethanol	500 nm	(Nimnoi, 2009)
<i>M. ruber</i>	red and yellow pigments	50 mL of 80% ethanol	510 and 410 nm	(Vidyalakshmi et al., 2009)
<i>M. purpureus</i>	red and yellow pigments	90% methanol	510 and 410 nm	(Babitha et al., 2007)
<i>M. purpureus</i>	Red pigments	NS	500 nm	(Silveira et al., 2008)

Ειδικότερα, όσον αφορά στη ζύμωση στερεάς κατάστασης (solid state fermentation) η αρχική υγρασία του υποστρώματος αποτελεί σημαντική παράμετρο για την ανάπτυξη του μύκητα. Η ζύμωση στερεάς κατάστασης ορίζεται ως η ζύμωση που

πραγματοποιείται απουσία ελεύθερου νερού στο υπόστρωμα, παρέχοντας ωστόσο την απαραίτητη υγρασία ώστε να διασφαλίζεται η ανάπτυξη και οι φυσιολογικές λειτουργίες του μύκητα (Babhita *et al.*, 2006; Pandey, 1992, 2003).

### 1.15. Ασφάλεια των χρωστικών MPs σε τρόφιμα- Η περίπτωση της κιτρινίνης

Ένας σημαντικός δευτερογενής μεταβολίτης που παράγεται μαζί με τις χρωστικές είναι η κιτρινίνη (χαρακτηρίστηκε από τον Blanc *et al.*, 1995a) ή αλλιώς μονασκιδίνη A (monascidin A) και γνωστή από το 1931, όπου και απομονώθηκε από τον μύκητα *Penicillium citrinum*. Βρέθηκε, για πρώτη φορά το 1977 στο είδος *M. purpureus* (Wong και Bau, 1977). Η κιτρινίνη αποτελεί μια νεφροτοξική τοξίνη, η οποία έχει βρεθεί σε στελέχη του γένους *Monascus* αλλά και του *Penicillium* (Sabater *et al.*, 1999). Η ακριβής ονομασία κατά IUPAC είναι 3R,4S.-4,6-dihydro-8-hydroxy-3,4,5-trimethyl-6-oxo-3H-2-benzopyran-7-carboxylicacid. Η μέγιστη απορρόφηση της στο φασματοφωτόμετρο υπεριώδους είναι στα 250-331nm, ενώ το μοριακό της βάρος είναι στα 250,25g/mol. Η παραγωγή κιτρινίνης επηρεάζεται από την πηγή αζώτου (με προσθήκη μεθειονίνης έχει 0 mg/L, ενώ με νιτρικό αμμώνιο έχει βρεθεί στα 100 mg/L (Blanc, 1995b).



Γράφημα 1.9: Δομή της κιτρινίνης

Όσον αφορά την τοξικότητα, από μελέτες έχει βρεθεί ότι η θανατηφόρα δόση (LD<sub>50</sub>) είναι 35–58 mg/kg για το ποντίκι, 50 mg/kg για τον αρουραίο, 50 mg/kg για την πάπια, 95 mg/kg για το κοτόπουλο και 134 mg/kg για το κουνέλι (Hanika και Carlton, 1994). Επίσης, μετά από αρκετές μελέτες έχει φανεί ότι η παραγωγή χρωστικών από το γένος *Monascus* στα τρόφιμα, είναι ασφαλής στις ποσότητες που εξετάζεται. Όμως, η τοξικότητα της κιτρινίνης κατά την παραγωγή MPs χρωστικών οδήγησε σε διαμάχη γύρω από την ασφάλεια των τροφίμων. Βέβαια, μέχρι στιγμής, στις Ανατολικές χώρες οι χρωστικές που παράγονται από στελέχη *Monascus* αναγνωρίζονται σαν GRAS (Generally Recognized As Safe) και χρησιμοποιούνται σε πάνω από 20 είδη τροφίμων, με το μόνο

περιορισμό ύπαρξης της ποσότητας της κιτρινίνης στις χρωστικές στο 1 mg/kg (Κίνα) και 0.2 mg/kg (Ιαπωνία) (Feng et al., 2012). Από την άλλη μεριά, δεν έχουν εγκριθεί στην Ευρώπη από τον οργανισμό EFSA, ενώ στην Αμερική ο οργανισμός FDA έχει νομοθετήσει σαν ανώτατο όριο κιτρινίνης, σε τρόφιμα προς πώληση τα 0.02mg/mL (Shi και Pan, 2011), ενώ η χρήση της κόκκινης χρωστικής ως συμπλήρωμα διατροφής έχει απαγορευθεί (Samsudin et al., 2014). Παρόλα αυτά η αύξηση κατανάλωσης της κόκκινης μαγιάς ρυζιού η οποία χρησιμοποιείται ως συμπλήρωμα διατροφής, αυξήθηκε κατά 80% τα τελευταία χρόνια στην Αμερική, όπου υπήρχε αύξηση καρδιαγγειακών παθήσεων, (Becker et al., 2008. ).

Επομένως, προς αυτή την κατεύθυνση εξετάζονται: 1) συνθήκες καλλιέργειας που ελαχιστοποιούν την παραγωγή κιτρινίνης, 2) γενετική μηχανική για παραγωγή στελεχών που δε συνθέτουν την κιτρινίνη και 3) για επιλογή στελεχών άλλων γενών που παράγουν ίδιες ή παραπλήσιες χρωστικές (πολυκετίδια) (Dufosse et al., 2014).

### **1.16. Επιλογή στελεχών που δεν παράγουν μυκοτοξίνες ως μελλοντικό εργαλείο παραγωγής χρωστικών**

Με βασικό γνώμονα την ανάδειξη της έρευνας αναφορικά με τα νέα στελέχη μυκήτων που θα χρησιμοποιηθούν στην παραγωγή χρωστικών στα τρόφιμα, μείζονος σημασίας κριτήριο είναι αυτά τα στελέχη να μη παράγουν τοξίνες και να μην είναι παθογόνα για τον άνθρωπο, αλλά και να μπορούν να παράγουν χρωστικές τόσο σε στερεά όσο και σε υγρά υποστρώματα.

Πρόσφατα έχει αναφερθεί ότι κάποια στελέχη του γένους *Penicillium* παράγουν χρωστικές, χωρίς ταυτόχρονα να παράγουν κιτρινίνη και τα οποία διασφαλίζουν καλύτερο ποιοτικό έλεγχο και ταυτοποίηση χρωστικών, καθώς δε παράγουν πληθώρα χρωστικών ουσιών όπως το γένος *Monascus*. Επίσης, έχουν τη δυνατότητα να παράγουν νέας γενιάς λειτουργικά τρόφιμα με βιοενεργές ενώσεις, (Dufosse et al., 2014). Οι χρωστικές που παράγουν, είναι ίδιες με αυτές του *Monascus*, με παρόμοια χρωμοφόρα (Mendez et al., 2011). Φυλογενετικά έχει αναφερθεί ότι το γένος *Penicillium* έχει μακρινή συγγένεια με το γένος *Monascus* (Marari et al. 2009).

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζεται στην κόκκινη χρωστική πολυκετιδικής δομής, η οποία μέχρι σήμερα παράγεται εμπορικά από τον *Monascus*, αλλά επίσης δύναται να παραχθεί από στελέχη του γένους *Penicillium* sp. Πιο συγκεκριμένα το

ενδιαφέρον στρέφεται σε συγκεκριμένα στελέχη όπως το *Penicillium purpurogenum*, τα οποία βάσει χημειοταξινομικών αναλύσεων (Mapari et al., 2008, Mapari et al., 2009), δεν φαίνεται να παράγουν κάποιες από τις ήδη γνωστές μυκοτοξίνες (citrinin, rubratoxin, luteoskyrin, islandtoxin, rugulosin, cyclochlorotine, erythrokyrin, emodin, spiculisporic acid, rugulovasine A και B) οι οποίες σχετίζονται με τους ασκομύκητες (Frisvad et al., 2004). Οι χημειοταξινομικές αναλύσεις συνδυάζουν εργαλεία Ταξινομικής (απαντούν στο ερώτημα ποιοί ασκομύκητες είναι γνωστοί ότι παράγουν κίτρινες, πορτοκαλί και κόκκινες χρωστικές, δεν είναι παθογόνοι, και δε παράγουν τοξίνες μέσα από φυλογενετικές συγκρίσεις συγκεκριμένων γονιδίων που σχετίζονται με την έκφραση δευτερογενών μεταβολιτών) και Χημείας (επιλογή των στελεχών μέσα από συνδυαστικές αναλύσεις όπως η υψηλή ανάλυση υγρής χρωματογραφίας με ανιχνευτή συστοιχίας φωτοδιοδίων και η φασματοσκοπία μάζας, ή αλλιώς LC-DAD-MS).

Με βάση τη μελέτη των Frisvad et al., (2013) φαίνεται η δυναμικότητα σε πολλά στελέχη του *Penicillium purpurogenum* να παράγουν MPs διαλυτές χρωστικές (με βάση τη μέθοδο HPLC-DAD), οι οποίες εκχυλίζονται εύκολα, αλλά και αναπτύσσονται τόσο σε στερεά όσο και σε υγρά υποστρώματα. Στο παρακάτω γράφημα φαίνεται ότι το στέλεχος CBS 113139, που ερευνάται στην συγκεκριμένη εργασία, παράγει κίτρινη (monascin) και κόκκινη (monascorubramine) χρωστική (Frisvad et al., 2013, Mapari et al., 2009), ενώ δεν παράγει κιτρινίνη. Μέχρι στιγμής δεν έχει πραγματοποιηθεί αντίστοιχη μελέτη παραγωγής χρωστικών με το συγκεκριμένο στέλεχος.



**Πίνακας 1.6:** Απεικόνιση των χρωστικών που παράγονται από διάφορα στελέχη του *Penicillium purpurogenum* και παρουσιάζουν εμπορικό ενδιαφέρον ιδιαίτερα για τις κόκκινες χρωστικές.

Στέλεχος	Εξωκυττάρειες ουσίες
CBS 133450	<i>monascorubin, PP-R, purpuride, purpuroquinone A,</i>
CBS 113154	<i>N-glutarylmonascorubramine, monascorubrin, PP-O, PP-R, purpuride, purpuroquinone A</i>
CBS 123796	<i>FK17-P2b2, N-glutarylmonascorubramine, mitorubrin, mitorubrinol, monascorubrin,, PP-O,</i>
CBS 257.37	<i>PP-R, purpuride, purpuroquinone A, purpurogenone</i>
CBS 234.60	<i>monascorubramine, purpuride, several Monascus-red pigments</i>
CBS 391.96	<i>monascorubramine, purpuride</i>
CBS 364.48	<i>monascorubramine, PP-R, purpuride, rubropunctatin</i>
CBS 133447	<i>Purpuride</i>
CBS 133442	<i>monascorubramin, purpuride, rubropunctatin</i>
CBS 113153	<i>mitorubrin, monascorubramine, monascirubrin, purpuride</i>
<b>CBS 113139</b>	<b><i>monascin, monascorubramine</i></b>
IBT 3933	<i>mitorubrin, monascorubramin, a purpactin</i>
IBT 20955	<i>monascorubramine, monascorubrin, purpuride</i>
IBT 23082	<i>PP-R( only tested for Monascus pigments)</i>
CBS 133443	<i>monascorubramine, purpuride</i>
CBS 133449	<i>monascorubrin, purpuride</i>
JCM 23216	<i>monascorubramine, purpuride, mitorubrin, mitorubrinic acid</i>

### 1.17. Σκοπός της παρούσας μελέτης

Όπως παρουσιάστηκε και προηγουμένως, το στέλεχος *Monascus purpureus* ATCC 16365 παράγει τριών ειδών χρωστικές ουσίες, ήτοι κόκκινη, κίτρινη και πορτοκαλί, οι οποίες δύνανται να χρησιμοποιηθούν σε διάφορες εφαρμογές αντικαθιστώντας τις συμβατικές χρωστικές. Συνεπώς στην παρούσα μελέτη θα μελετηθούν οι συνθήκες καλλιέργειας που συντελούν στη μέγιστη παραγωγή χρωστικών ουσιών. Αρχικά θα πραγματοποιηθεί μελέτη σε ζύμωση στερεάς κατάστασης χρησιμοποιώντας απόβλητα της βιομηχανίας τροφίμων και ειδικότερα πορτοκάλια που απομένουν μετά τη χυμοποίηση. Θα εξεταστούν παράμετροι που επηρεάζουν την αύξηση του μικροοργανισμού και την παραγωγή. Στα εκχυλίσματα των χρωστικών θα προσδιοριστεί επίσης και η αντιοξειδωτική τους ικανότητα μέσω των μεθόδων DPPH και Folin Ciocalteu.

Εν συνεχεία, θα πραγματοποιηθεί μελέτη σε ζυμώσεις βυθού αξιολογώντας ως υποστρώματα εκχυλίσματα από υπολείμματα και παρα-προϊόντα της βιομηχανίας τροφίμων, όπου θα μελετηθεί αντίστοιχα η παραγωγή χρωστικών. Επιπρόσθετα θα μελετηθεί σε ζυμώσεις στερεάς και υγρής κατάστασης στις ίδιες συνθήκες καλλιέργειας το στέλεχος *Penicillium purpurogenum* CBS 113139. Το προαναφερθέν στέλεχος σύμφωνα με δημοσιευμένες μελέτες σχετικά με χημειοταξινομικά χαρακτηριστικά δεν παράγει μυκοτοξίνες. Συνεπώς θα μελετηθούν οι συνθήκες που επηρεάζουν την παραγωγή χρωστικών με πιθανή εφαρμογή σε τρόφιμα.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

---

### 2.1. Εργαστηριακή υποδομή

Ο αναγκαίος εργαστηριακός εξοπλισμός (υλικά, αντιδραστήρια, μηχανήματα, συσκευές) για το σύνολο των πειραμάτων που πραγματοποιήθηκαν, εξασφαλίστηκαν από τα εργαστήρια Μηχανικής Τροφίμων Επεξεργασίας και Συντήρησης Γεωργικών Προϊόντων, Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων, και Χημείας Τροφίμων και Ανάλυσης του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών. Για την επιτυχή ολοκλήρωση της πειραματικής μελέτης, χρησιμοποιήθηκαν δύο μικροοργανισμοί, πιο συγκεκριμένα ο μύκητας *Monascus purpureus* ATCC 16365 και ο μύκητας *Penicillium purpurogenum* CBS 113139. Οι καθαρές καλλιέργειες των στελεχών αυτών προήλθαν από συλλογή της ATCC και από συλλογή της CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, αντίστοιχα.

### 2.2. Μικροβιακό υλικό

Όπως αναφέρεται παραπάνω, μελετήθηκαν δύο στελέχη μυκήτων, το στέλεχος *Monascus purpureus* ATCC 16365 και το στέλεχος *Penicillium purpurogenum* CBS 113139, η καλλιέργεια, συντήρηση και αποθήκευση των οποίων έγινε με βάση τις βέλτιστες συνθήκες ανάπτυξής τους.

#### 2.2.1. Συνθήκες καλλιέργειας

Τα δύο στελέχη αναπτύχθηκαν τόσο σε στερεά θρεπτικά υποστρώματα (τρυβλία Petri) όσο και σε υγρές καλλιέργειες (κωνικές φιάλες), σε τεχνητά και φυσικά υποστρώματα. Πιο συγκεκριμένα, πληροφορίες για τις συνθήκες καλλιέργειας ακολουθούν στον Πίνακα 2.1.

**Πίνακας 2.1:** Συνθήκες καλλιέργειας για τα δύο στελέχη μηκότων που χρησιμοποιήθηκαν στο πείραμα

Όνομα-Ταξόν	<i>Monascus purpureus</i>	<i>Penicillium purpurogenum</i>
Αλλαγές ονοματολογίας:	-	<i>Penicillium purpurogenum</i> ; <i>Talaromyces purpurogenus</i>
Επιμέλεια:	Frits Went, Βοτανολόγος (1863-1935) → CBS→ ATCC	Frits Went→CBS
Απομονώθηκε:	Ζυμούμενος μωβ κόκκος ρυζιού: “ang-quac”	Άγνωστη πηγή
Χώρα:	Java (Ινδονησία)	Άγνωστο
Άλλες συλλογές:	CBS 109.07, ATCC 16365, IFO 4513, IMI 210765, NRRL 1596	IBT 3967; NRRL 1147
Επίπεδο ασφάλειας:	1 (U.S. Public Health Service Guidelines)	1 (U.S. Public Health Service Guidelines)
Ατμοσφαιρικές συνθήκες:	Τυπικό αερόβιο	Τυπικό αερόβιο
Θερμοκρασία ανάπτυξης:	25-30°C	25°C
Χρόνος ανάπτυξης:	Μετά από 3-4 μέρες επώασης (ο χρόνος ποικίλλει από στέλεχος σε στέλεχος)	Μετά από περίπου 7 μέρες
Θρεπτικό μέσο:	Potato dextrose agar (ATCC Medium 336)	Czapek agar (ATCC Medium 312)
Χρωστική:	Κόκκινη, κίτρινη, πορτοκαλί	Κόκκινη, κίτρινη

### 2.2.2. Αποθήκευση σε γλυκερόλη (Glycerol stock)

Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται σε στείρες συνθήκες, είτε από φρέσκια καλλιέργεια, είτε με τρυβλία που έχουν ανακαλλιεργηθεί πρόσφατα, στο θάλαμο νηματικής ροής και/ή με την παρουσία λύχνου. Πραγματοποιείται εμβολιασμός από στερεή καλλιέργεια σε 50 mL κωνικής φιάλης (250 mL) με θρεπτικό μέσο Potato Dextrose Agar (για το μύκητα *Monascus purpureus* ATCC 16365) και σε Czapek agar (για το μύκητα *Penicillium purpurogenum* CBS 113139) και επώαση, έως τη λογαριθμική τους φάση (στους 30°C για 4-7 μέρες, στις 180 rpm). Στη συνέχεια, γίνεται μεταφορά κυτταρικού εναιωρήματος σε αποστειρωμένο διάλυμα 100% (v/v) γλυκερόλης σε cryovial (2 mL), με έντονη ανακίνηση (vortex) ώστε να επιτευχθεί πλήρης ανάμειξη, και αποθήκευση στους -80°C.

### 2.2.3. Προετοιμασία εμβολίου

Η επαναφορά των κυττάρων από τους -80°C όπου και είναι αποθηκευμένα σε διάλυμα γλυκερόλης σε cryovials, γίνεται με την ανακαλλιέργειά τους σε τρυβλίο Petri. Πιο

συγκεκριμένα, απλώνεται ποσότητα 200μL από το αντίστοιχο cryovial, υπό στείρες συνθήκες, από κύτταρα των στελεχών ATCC 16365 και CBS 113139 σε τρυβλίο με θρεπτικό μέσο Potato Dextrose Agar (PDA) και Czapek agar (CzA) αντίστοιχα, και επωάζονται για 7 ημέρες περίπου έως ότου καλυφθεί όλη η επιφάνεια του τρυβλίου με το αντίστοιχο στέλεχος. Οι συνθήκες είναι αερόβιες, σε κλίβανο στους 30°C (ATCC 16365) και στους 25 °C (CBS 113139). Μετά την επώαση σε κλίβανο, προστίθεται ποσότητα 2mL απεσταγμένου αποστειρωμένου ύδατος και διασπείρεται σε όλη την επιφάνεια του τρυβλίου, για την μέγιστη διασπορά των σπορίων. Με τη βοήθεια πιπέτας μεταφέρεται 1mL εναιωρήματος σπορίων σε κωνική φιάλη των 250mL η οποία περιέχει θρεπτικό μέσο 50mL PDA και CzA, αντίστοιχα. Η επώαση επαναλαμβάνεται στις ίδιες συνθήκες για το κάθε στέλεχος για 4-7 ημέρες περίπου, στο πέρας των οποίων, προστίθενται 50 mL απεσταγμένου αποστειρωμένου ύδατος μέσα στην κωνική φιάλη. Με τη βοήθεια ενός αποστειρωμένου διανομέα γίνεται διασπορά των κυττάρων μέσα στο εναιώρημα, και μετράται ο αρχικός αριθμός σπορίων του αρχικού υγρού εμβολίου, το οποίο θα χρησιμοποιηθεί για όλες τις ζυμώσεις που μελετώνται στην συγκεκριμένη εργασία.



*Γράφημα 2.1: Αριστερά: Επωαστήρες ζύμωσης. Δεξιά: Θάλαμος νηματικής ροής.*

#### **2.2.4. Υπολογισμός κυτταρικού πληθυσμού (σπορίων)**

Ο αρχικός αριθμός των σπορίων των δύο μυκήτων καταμετράται με τη βοήθεια οπτικού μικροσκοπίου σε υγρό δείγμα καλλιέργειας (το αρχικό εμβόλιο), και σε ειδική αντικειμενοφόρο πλάκα τύπου Neubauer, η οποία είναι χαραγμένη σε μικρά τετράγωνα γνωστού όγκου (16 τετράγωνα, βάθους 0,1mm και εμβαδού 0,0025mm<sup>2</sup>). Η εκτίμηση των σπορίων γίνεται ανά μονάδα όγκου του κάθε τετραγώνου και συνεπώς αναγωγή σε

mL εναιωρήματος αρχικής καλλιέργειας με βάση το μέσο όρο των συνολικών τετραγώνων που μετρώνται. Με βάση αυτό, αλλά και τη συγκεκριμένη διαδικασία προετοιμασίας εμβολίου που πραγματοποιείται, ο αρχικός αριθμός πληθυσμός υπολογίζεται από  $10^6$ - $10^7$  σπόρια/mL.

### **2.3. Παρασκευή θρεπτικών υποστρωμάτων**

Τα θρεπτικά υποστρώματα που παρασκευάζονται προκειμένου να καλύψουν τις απαιτήσεις των προς μελέτη μικροοργανισμών, πρέπει να περιέχουν στα συστατικά τους πηγή άνθρακα, αζώτου, αλάτων (ανόργανων ή/και οργανικών), διαφόρων ιχνοστοιχείων και νερού. Ως θρεπτικά ανάπτυξης των δυο μυκήτων χρησιμοποιούνται υγρά και στερεά, φυσικά και τεχνητά. Για την παρασκευή όλων των θρεπτικών υποστρωμάτων, αναδεύονται καλά ώστε να διαλυθούν τα επιμέρους συστατικά τους και μετράται/διορθώνεται το pH αν χρειάζεται, ώστε να είναι περίπου το ίδιο σε όλα τα υποστρώματα για τα στελέχη ATCC 16365 και CBS 113139 (pH: 6.0-6.5). Συμπληρώνεται ο όγκος με τη βοήθεια σιφωνίου (10mL) με απιονισμένο νερό έως ότου φτάσει στο 1L και αποστειρώνονται στο αυτόκαυστο για 15 min στους 121°C. Μετά την αποστείρωση, φυλάσσονται σε θερμοκρασία ψύξης 4°C, σε σκοτεινό μέρος.

### 2.3.1. Συνθετικά θρεπτικά υποστρώματα

Τα συστατικά συνθετικών θρεπτικών υποστρώματων που χρησιμοποιήθηκαν (για 1L) παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.2:

**Πίνακας 2.2:** *Συστατικά θρεπτικών υποστρωμάτων και συνθήκες αποστείρωσης*

Όνομασία θρεπτικού μέσου καλλιέργειας:	Potato dextrose agar (PDA)	Czapek agar (CzA)	Czapek broth (CzB)
Άλλες ονομασίες:	aardappel agar, potato glyucose agar, ATCC 336	ATCC 312	
pH:	6.6	6.0-6.5	7.0-7.5
Συνθήκες αποστείρωσης:	15 min, στους 121°C	15 min, στους 121°C	15 min, στους 121°C
Συστατικά:	Εκχύλισμα πατάτας <sup>(1)</sup> 0.33 L, C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> 20g, άγαρ 15g, αποσταγμένο νερό έως 1L	NaNO <sub>3</sub> 3g, K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1g, KCl 0.5g, MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O 0.5g, FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O 0.01g, C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub> 30g, άγαρ 15g, αποσταγμένο νερό έως 1L	NaNO <sub>3</sub> 3g, K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1g, KCl 0.5g, MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O 0.5g, FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O 0.01g, C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub> 30g, αποσταγμένο νερό έως 1L
Εφαρμογή:	ATCC 16365	CBS 113139	CBS 113139

<sup>(1)</sup>: Το εκχύλισμα πατάτας προκύπτει μετά από άλεσμα 5kg πατάτας (χωρίς το φλοιό), μούλιασμα σε νερό με αναλογία 3 L νερού/ kg πατάτας, στους 4°C και στράγγιση σε πανί.

### 2.3.2. Θρεπτικά υποστρώματα από απόβλητα της βιομηχανίας τροφίμων:

Σε αυτή την κατηγορία περιλαμβάνονται όλα εκείνα τα υποστρώματα των οποίων η ακριβής σύσταση δεν είναι πλήρως γνωστή, και τα οποία έχουν προέλθει από απόβλητα επεξεργασίας των βιομηχανιών. Πιο συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκε το χονδρόκοκκο πύτυρο και το ηλιάλευρο (απόβλητα βιομηχανίας αλεύρων), καθώς επίσης και ο φλοιός από πορτοκάλι (*Citrus sinensis*), λεμόνι (*Citrus limon*), και μανταρίνι (*Citrus reticulata*).



*Γράφημα 2.2: Διαφορετικά μεγέθη αποξηραμένων φλοιών πορτοκαλιού, λεμονιού και μανταρινιού*

### **2.3.2.1. Παρασκευή στερεού θρεπτικού υποστρώματος από φλοιό πορτοκαλιού μετά από ξήρανση**

Το μεγαλύτερο κομμάτι της εργαστηριακής μελέτης επικεντρώθηκε στην αξιοποίηση του φλοιού από πορτοκάλι σαν απόβλητο της βιομηχανίας χυμοποίησης, η συλλογή των υπολειμμάτων του οποίου (φλοιός, καρπός, σπόρος), εξασφαλίστηκε από επιχείρηση κλάδου εστίασης. Εν συνεχεία, ακολουθεί διαλογή μόνο του φλοιού, ο οποίος είναι πλούσιος σε αιθέρια έλαια και τεμαχισμός σε ίσα μέρη (με διάμετρο  $<0.5\text{cm}$ ), ώστε να μπορεί να χρησιμοποιηθεί πιο εύκολα για αποθήκευση ή/και περαιτέρω επεξεργασία. Μετά τη διαλογή, αποξηραίνεται στους  $55\text{-}60^{\circ}\text{C}$  για 24h. Τα αποξηραμένα κομμάτια τεμαχίζονται με γρήγορη ανάδευση (blending) στους  $25^{\circ}\text{C}$  για 1min και περνάνε από κόσκινο δύο τύπων διαμέτρου, με  $<2\text{mm}$  και με διάμετρο 2-4mm. Το στερεό αυτό θρεπτικό υπόστρωμα, χρησιμοποιείται σε ζυμώσεις στερεάς (1g/g, 0.6g/g και 0.8 g/g) και ημιστερεάς κατάστασης (20g/L και 50g/L) και για τα δύο στελέχη μυκήτων. Η διαδικασία παρουσιάζεται και στο Γράφημα 2.3.





**Γράφημα 2.3:** Διαδικασία παρασκευής στερεού θρεπτικού υποστρώματος από φλοιό πορτοκαλιού. Α. Επιλογή και τεμαχισμός του φλοιού. Β. Αποξήρανση για 24h στους 55°C. Γ. Τεμαχισμός με γρήγορη ανάδευση. Δ. Διαχωρισμός δύο μεγεθών. Ε. Παρασκευή υποστρώματος από φλοιό με  $d < 2$  mm. ΣΤ. Παρασκευή υποστρώματος από φλοιό με  $d = 2-4$  mm

Να σημειωθεί ότι η επεξεργασία παρασκευής στερεού θρεπτικού υποστρώματος αναφορικά με την αξιοποίηση του αποξηραμένου φλοιού λεμονιού και μανταρινιού, ακολουθείται με τον ίδιο ακριβώς τρόπο, με τη μόνη διαφορά ότι χρησιμοποιείται μόνο το ένα κόσκινο ( $d < 2$ mm).

### **2.3.2.2. Παρασκευή στερεού και υγρού θρεπτικού υποστρώματος από φλοιό πορτοκαλιού, χωρίς αιθέρια έλαια, μετά από απόσταξη (hydrodistillation, HD)**

Η υδροαπόσταξη είναι η διαδικασία παραλαβής των αιθέριων ελαίων που υπάρχουν στο φλοιό του πορτοκαλιού. Τα αιθέρια έλαια αποτελούν υγρά μίγματα άχρωμων πτητικών ουσιών (υδρογονανθράκων) χαμηλού μοριακού βάρους τα οποία προσδίδουν στο φυτό χαρακτηριστική οσμή. Η διαδικασία παραλαβής/απομάκρυνσής τους γίνεται για δύο λόγους στο θρεπτικό υπόστρωμα: 1) τα αιθέρια έλαια που υπάρχουν στο φλοιό του πορτοκαλιού, αποτελούν μείζονος σημασίας συστατικά για το κλάδο

φαρμάκων/καλλυντικών, αλλά παράλληλα αποτελούν προϊόν προστιθέμενης αξίας για τον κλάδο των τροφίμων και 2) για να μελετηθεί η αντιμικροβιακή τους δράση στις ζυμώσεις με υπόστρωμα το φλοιό πορτοκαλιού και από τα δύο στελέχη. Πραγματοποιείται με τη βοήθεια μιας σφαιρικής φιάλης στην οποία τοποθετούνται (μετά από blending) κομμάτια φλοιού πορτοκαλιού με νερό (σε αναλογία 1:6, ζυγίζονται 50g νωπού φλοιού σε 300mL νερού), η οποία συνδέεται με τη συσκευή Clevenger, όπου οι παραγόμενοι υδρατμοί από το βρασμένο μίγμα συμπυκνώνονται στο σύστημα ψύξης και συλλέγονται/διαχωρίζονται στον διαβαθμισμένο σωλήνα με βάση το διαφορετικό σημείο ζέσεως (πρώτα το νερό, μετά τα αιθέρια έλαια). Ο βρασμός έχει διάρκεια 3h, (Γαρδέλη, 2009).

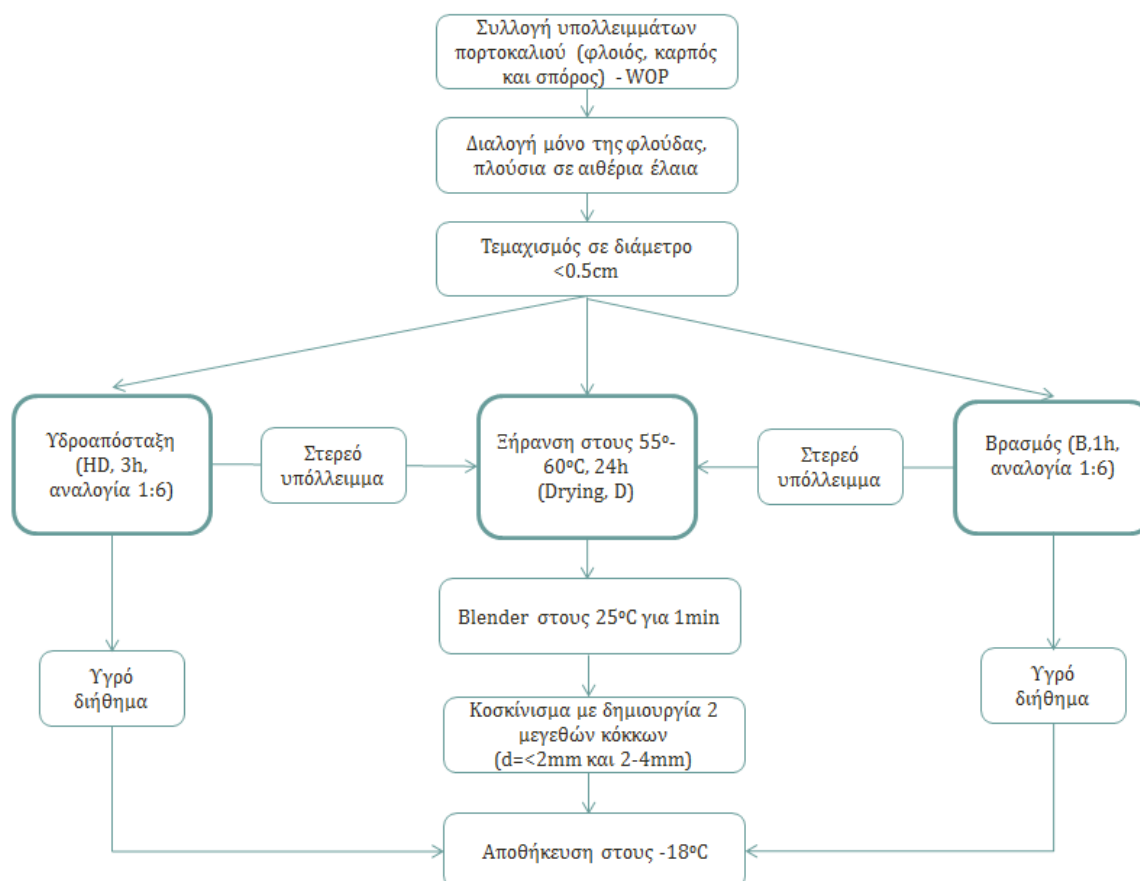
Στη συνέχεια, γίνεται διαχωρισμός του ετερογενούς μίγματος (στερεού-υγρού) που υπάρχει στη σφαιρική φιάλη με απλή διήθηση, με διηθητικό χαρτί. Το υγρό διήθημα το οποίο προκύπτει, χρησιμοποιείται ως υγρό θρεπτικό υπόστρωμα σε ζυμώσεις βυθού, ενώ το νωπό στερεό μέρος του φλοιού πορτοκαλιού τοποθετείται για ξήρανση στους 55-60°C για 24h και τεμαχίζεται/κοσκινίζεται με τον ίδιο ακριβώς τρόπο που περιγράφεται παραπάνω, ώστε να χρησιμοποιηθεί σε μικρούς κόκκους διαμέτρου <2mm και 2-4mm, σε ζυμώσεις στερεάς κατάστασης.

### **2.3.2.3. Παρασκευή στερεού και υγρού θρεπτικού υποστρώματος από φλοιό πορτοκαλιού, με 91% απομάκρυνση των αιθέριων ελαίων, μετά από βρασμό (boiling, B)**

Μελέτες έχουν δείξει ότι η προσθήκη νερού στην ακατέργαστη φλούδα πορτοκαλιού σε αναλογία 1:6 (w/v) και βρασμό του εναιωρήματος για 1h, επιτυγχάνει μέγιστη απομάκρυνση του λιμονένιου (D-limonene), κυρίαρχου αιθέριου ελαίου στο φλοιό πορτοκαλιού, με απόδοση 91% (σύμφωνα με τη μέθοδο που προτείνεται από τους Scott και Veldhuis, 1966). Με βάση αυτό, ζυγίζονται 50gr νωπού τεμαχισμένου φλοιού πορτοκαλιού και βράζονται σε 300mL ύδατος για 1h (σε κατσαρόλα με ανοιχτό καπάκι). Εν συνεχεία, πραγματοποιείται διήθηση, διαχωρισμός και συλλογή του στερεού και του υγρού μέρους του αρχικού ετερογενούς μίγματος. Κατά τον ίδιο τρόπο, ο αποξηραμένος φλοιός πορτοκαλιού χρησιμοποιείται σε ζυμώσεις στερεάς κατάστασης, ενώ το υγρό διήθημα σε ζυμώσεις βυθού.

### 2.3.2.4. Συνοπτική παρουσίαση παρασκευής των φυσικών υποστρωμάτων μετά από επεξεργασία φλοιού πορτοκαλιού

Συνοπτικά το διάγραμμα ροής της επεξεργασίας φλοιού πορτοκαλιού για την παρασκευή στερεών και υγρών θρεπτικών υποστρωμάτων παρουσιάζεται στο Γράφημα 2.4:



**Γράφημα 2.4:** Διάγραμμα ροής επεξεργασίας φλοιού πορτοκαλιού για την Παρασκευή υγρών και στερεών θρεπτικών υποστρωμάτων. Παρατηρούμε ότι μετά τον τεμαχισμό των φλοιών ακολουθούμε δύο διαδικασίες με τις οποίες παραλαμβάνεται υγρό διήθημα το οποίο θα χρησιμοποιηθεί για το υγρό θρεπτικό υπόστρωμα, ενώ το στερεό υπόλειμμα που εμφανίζεται και στις δύο περιπτώσεις περνά από κατεργασία ώστε να χρησιμοποιηθεί για την Παρασκευή του στερεού θρεπτικού. Και στην περίπτωση του στερεού και σε αυτή του υγρού, τα παρασκευάσματα αποθηκεύονται στους  $-18^{\circ}\text{C}$

## 2.4. Ζυμώσεις

### 2.4.1. Ζυμώσεις στερεάς κατάστασης (Solid State Fermentation, SSF) με τα στελέχη μυκήτων *Monascus purpureus* ATCC 16365 *Penicillium purpurogenum* CBS 113139

Σκοπός των ζυμώσεων αυτών είναι η μελέτη παραγωγής χρωτικών MPs σε συγκεκριμένες συνθήκες καλλιέργειας (θρεπτικό υπόστρωμα, μέγεθος κόκκων και αερισμό, αρχική υγρασία, pH, συγκέντρωση αρχικού εμβολίου, μέθοδος εμβολιασμού, παρουσία/απουσία αιθέριων ελαίων). Και για τα δύο στελέχη ο τρόπος είναι ίδιος, όσον αφορά στην προετοιμασία του υποστρώματος, αλλά διαφοροποιείται στην προετοιμασία αρχικού εμβολίου (4 μέρες περίπου χρόνος επώασης σε PDA για τον ATCC 16365 και 7 μέρες περίπου χρόνος επώασης σε CzA για τον CBS 113139) και στις συνθήκες ανάπτυξης (επώαση στους 30°C για τον ATCC 16365 και στους 25°C για τον CBS 113139).

Σε κωνική φιάλη (250mL), ζυγίζονται και αποστειρώνονται σε αυτόκαυστο 5g (d.b.) φλοιού πορτοκαλιού. Μετά την αποστείρωση σε αυτόκαυστο (121°C, 20min), προστίθεται στην κωνική φιάλη, υπό στείρες συνθήκες, μέρος του αρχικού εμβολίου (με εύρος 8-9mL ή αλλιώς 16-19% του αρχικού εμβολίου, όπως αυτό περιγράφεται παραπάνω), ώστε να εξασφαλιστεί αρχική υγρασία περίπου 65%. Στη συνέχεια, τοποθετείται σε κλίβανο επώασης, σε στατικές συνθήκες αερισμού. Ανάλογα με την παράμετρο που μελετάται, ο χρόνος επώασης για την παραγωγή χρωστικής είναι διαφορετικός (για παράδειγμα για την μελέτη κινητικής πορείας παραγόμενης χρωστικής, μετρώνται συγκεκριμένα χρονικά σημεία ανά 2 ή 3 μέρες, ή για τη μελέτη επίδρασης ενός συγκεκριμένου παράγοντα που συμβάλλει στην παραγόμενη χρωστική, μετράται ένα σημείο κατά τη διάρκεια ζύμωσης). Ταυτόχρονα με τις κωνικές φιάλες στις οποίες προστίθεται αρχικό εμβόλιο με τις συγκεκριμένες συνθήκες καλλιέργειας, δημιουργείται και μια κωνική φιάλη η οποία αντί για εμβόλιο, περιέχει τον ίδιο όγκο αποστειρωμένου απιονισμένου νερού, η οποία αποτελεί και το τυφλό σημείο στην φωτομέτρηση των χρωστικών,

Η ίδια διαδικασία ακολουθείται και για τη ζύμωση στερεάς κατάστασης χονδρόκοκκου πίτυρου.

Τέλος, στην περίπτωση μελέτης της επίδρασης εμπλουτισμού του στερεού θρεπτικού υποστρώματος φλοιού πορτοκαλιού με ηλιάλευρο (πλούσιο σε άζωτο υπόστρωμα), ακολουθείται η ίδια πορεία, με τη διαφορά ότι αντί για 5g (d.b) φλοιού πορτοκαλιού, μεταφέρονται 3g (d.b) και 4g (d.b), και η υπόλοιπη ποσότητα (2 και 1g αντίστοιχα) συμπληρώνεται στην κωνική φιάλη με αποξηραμένο ηλιάλευρο.

#### **2.4.2. Ζυμώσεις ημι-στερεάς κατάστασης (semi Solid State Fermentation, semi-SSF) με τα στελέχη μυκήτων *Monascus purpureus* ATCC 16365 *Penicillium purpurogenum* CBS 113139**

Οι ζυμώσεις αυτές πραγματοποιούνται με σκοπό να γίνει σύγκριση του εναιωρήματος φλοιού πορτοκαλιού με 2 διαφορετικές συγκεντρώσεις, με τις ζυμώσεις στερεάς κατάστασης, και για τα δύο στελέχη μυκήτων, ως προς τις παραγόμενες χρωστικές. Επομένως και στις δύο περιπτώσεις, ζυγίζονται 1g και 2.5g (μεγέθους κόκκων <2mm), τα οποία προστίθενται αντίστοιχα σε κωνικές φιάλες (250mL), στις οποίες έχουν προηγουμένως προστεθεί 48mL απιονισμένου ύδατος με τη βοήθεια ογκομετρικού κυλίνδρου. Το ετερογενές αυτό μίγμα της κωνικής φιάλης, κλείνεται με βαμβάκι και αποστειρώνεται σε αυτόκαυστο (121°C, 20min). Προστίθενται 2mL αρχικού εμβολίου (ή αλλιώς 4% αρχικού εμβολίου), υπό στείρες συνθήκες, ώστε ο τελικός όγκος να συμπληρωθεί στα 50mL και οι αρχικές συγκεντρώσεις του φλοιού πορτοκαλιού να είναι 20g/L και 50g/L (d.b), αντίστοιχα. Οι κωνικές φιάλες τοποθετούνται σε κλιβάνους επώασης των 30°C (ATCC 16365) και των 25°C (CBS 113139), με ανάδευση, στις 180 rpm, με συνολική διάρκεια επάωσης 16 μέρες (d). Ανά δύο μέρες μετρώνται οι παραγόμενες χρωστικές για τα δύο στελέχη και γίνονται περαιτέρω χημικές αναλύσεις.

Ταυτόχρονα με τις κωνικές φιάλες στις οποίες προστίθεται αρχικό εμβόλιο με τις συγκεκριμένες συνθήκες καλλιέργειας, δημιουργείται και μια κωνική φιάλη η οποία αντί για εμβόλιο, περιέχει τον ίδιο όγκο αποστειρωμένου απιονισμένου νερού, η οποία αποτελεί και το τυφλό σημείο στην φωτομέτρηση των χρωστικών.

### **2.4.3. Ζυμώσεις βυθού (Submerged Fermentation, SmF) με τα στελέχη μυκήτων *Monascus purpureus* ATCC 16365 *Penicillium purpurogenum* CBS 113139**

Οι ζυμώσεις βυθού πραγματοποιούνται για να μελετηθεί συγκριτικά η κινητική πορεία παραγωγής χρωστικών των δύο στελεχών, παράλληλα με τη δυνατότητα παραγωγής χρωστικών μετά από πλήρη (HD, υδροαπόσταξη) ή και σχεδόν πλήρη (B, βρασμός) απομάκρυνση των αιθέριων ελαίων του φλοιού πορτοκαλιού. Έτσι, προστίθενται σε κωνικές φιάλες, 48mL από τα διηθήματα-υποστρώματα μετά την επεξεργασία υδροαπόσταξη και βρασμό (διήθημα HD και διήθημα B) και αποστειρώνονται σε αυτόκαυστο (121°C, 20min). Σε κάθε κωνική, προστίθεται 2mL αρχικού εμβολίου (ή αλλιώς 4% αρχικού εμβολίου), υπό στείρες συνθήκες, ώστε ο τελικός όγκος να συμπληρωθεί στα 50mL. Οι κωνικές φιάλες τοποθετούνται σε κλιβάνους επώασης των 30°C (ATCC 16365) και των 25°C (CBS 113139), με ανάδευση, στις 180 rpm, με συνολική διάρκεια επάωσης 16 μέρες (d). Ανά δύο μέρες μετρώνται οι παραγόμενες χρωστικές για τα δύο στελέχη και πραγματοποιούνται περαιτέρω χημικές αναλύσεις.

Ταυτόχρονα με τις κωνικές φιάλες στις οποίες προστίθεται αρχικό εμβόλιο με τις συγκεκριμένες συνθήκες καλλιέργειας, δημιουργείται και μια κωνική φιάλη η οποία αντί για εμβόλιο, περιέχει τον ίδιο όγκο αποστειρωμένου απιονισμένου νερού, η οποία αποτελεί και το τυφλό σημείο στην φωτομέτρηση των χρωστικών.

## **2.5. Αναλυτικές μέθοδοι**

### **2.5.1. Εκχύλιση χρωστικών**

Πέρα από τους παράγοντες που επηρεάζουν την πορεία ζύμωσης, όπως αναφέρονται παραπάνω, στην εκχύλιση χρωστικών παίζει σημαντικό ρόλο, ο διαλύτης (πολικός, μη πολικός), η καθαρότητα του (100%, ή σε αναλογία), η εφαρμογή σε νωπό ή ξηρό ζυμούμενο υπόστρωμα, και η τεχνική εξαγωγής. Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι για τις ζυμώσεις στερεάς κατάστασης, η εξαγωγή γίνεται για το σύνολο των χρωστικών που μπορούν να εκχυλιστούν (εσωκυττάρια και εξωκυττάρια μαζί), ενώ στις ζυμώσεις ημιστερεάς κατάστασης και βυθού γίνεται μόνο στις εσωκυττάρια διότι οι εξωκυττάρια

μετρούνται στο υπερκείμενο όγκο της κάθε κωνικής φιάλης με μία απλή φυγοκέντρωση. Πιο συγκεκριμένα:

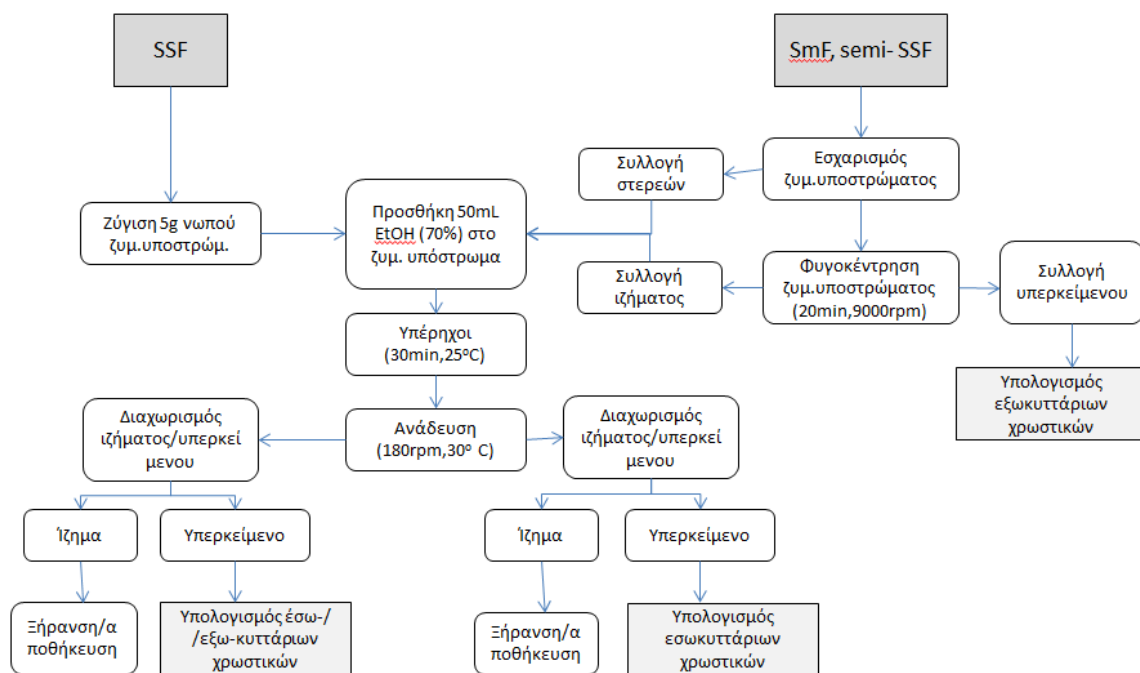
Εξωκυττάρια χρωστικές: Γίνεται εσχαρισμός όλου του περιεχομένου της κωνικής φιάλης των SmF και semi-SSF ζυμώσεων, για να διαχωριστεί ένα μεγάλο μέρος στερεών (κύτταρα ή στερεά ουσία). Φυγοκεντρείται το υπερκείμενο για 20min, στις 9000 rpm. Συλλέγονται τα εναπομείναντα ιζήματα/στερεά από τον εσχαρισμό και από τη φυγοκέντρωση. Ταυτόχρονα, μετράται και καταγράφεται μετά τη συλλογή των στερεών, ο όγκος του διαλύτη (στην προκειμένη περίπτωση νερού) για τον υπολογισμό της εξωκυττάριας χρωστικής.

Εσωκυττάρια χρωστικές: Συλλέγεται όλη η κυτταρική μάζα (από εσχαρισμό και φυγοκέντρωση) από την κάθε κωνική φιάλη. Προστίθενται 50mL διαλύματος αιθανόλης (70%) και το ετερογενές μίγμα τοποθετείται στους υπερήχους για 30min στους 25°C. Στη συνέχεια, μεταφέρεται σε κλίβανο επώασης στους 30°C με ανάδευση στις 180rpm, για 1h. Φυγοκεντρείται ξανά το μίγμα, για 20min, στις 9000rpm. Διαχωρίζεται το ίζημα από το εκχύλισμα. Το εκχύλισμα αποθηκεύεται για τον υπολογισμό εσωκυττάριας χρωστικών.

Όσον αφορά στις ζυμώσεις SSF, η διαδικασία της εκχύλισης όλων των χρωστικών μαζί γίνεται προσθέτοντας 5g νεπού ζυμούμενου στερεού υποστρώματος σε 50mL διαλύματος αιθανόλης (70%). Στη συνέχεια, το ετερογενές μίγμα τοποθετείται στους υπερήχους για 30min στους 25°C και έπειτα μεταφέρεται σε κλίβανο επώασης στους 30°C με ανάδευση στις 180rpm, για 1h. Φυγοκεντρείται ξανά το μίγμα, για 20min, στις 9000rpm. Διαχωρίζεται το ίζημα από το εκχύλισμα. Το εκχύλισμα αποθηκεύεται για τον υπολογισμό συνολικών χρωστικών.

Ταυτόχρονα με την εκχύλιση παραγόμενων από τα στελέχη, χρωστικών, γίνεται εκχύλιση χρωστικών και στο μάρτυρα (κωνική φιάλη στην οποία δεν έχει προστεθεί εμβόλιο), με τον ίδιο τρόπο, ώστε να αφαιρεθούν οι χρωστικές που προυπήρχαν στα αρχικά φυσικά υποστρώματα.

Συνολικά η διαδικασία κατά την εκχύλιση χρωστικών συνοψίζεται στο παρακάτω διάγραμμα (Γράφημα 2.5):



**Γράφημα 2.5:** Διάγραμμα στο οποίο περιγράφεται η διαδικασία εκχύλισης χρωστικών χρησιμοποιώντας είτε SSF είτε SmF ή semi-SSF ζυμώσεις

## 2.5.2. Ποιοτικός προσδιορισμός παραγόμενων χρωστικών, με φασματοφωτόμετρο UV-VIS

Η μετρήση χρωστικών γίνεται στο φασματοφωτόμετρο σε τρία μήκη κύματος που αντιστοιχούν στην κίτρινη (400nm), πορτοκαλί (470nm) και κόκκινη (500 nm) χρωστική. Όπως αναφέρεται και παραπάνω για τις ζυμώσεις στερεάς κατάστασης μετρώνται οι συνολικές χρωστικές, ενώ για τις ζυμώσεις ημιστερεάς κατάστασης και βυθού, μπορούν να μετρηθούν ξεχωριστά εσωκυττάρια και εξωκυττάρια χρωστικές. Το τυφλό είναι το μη ζυμούμενο υπόστρωμα, το οποίο προκύπτει από κωνική φιάλη στην οποία δεν έχει προστεθεί εμβόλιο. Επομένως οι συνολικές χρωστικές για τις εκφράζονται ως εξής:

Ζυμώσεις στερεάς κατάστασης (SSF):

$$\frac{(ABS \times \text{dilution}) \times \text{solvent volume (mL)}}{\text{dried fermented substrate (gr)}}$$

Ζυμώσεις ημι-στερεάς κατάστασης (semi-SSF) και βυθού (SmF):

$$\frac{(ABS_{\text{extra}} \times \text{dilution}) \times \text{solvent volume (mL)} + (ABS_{\text{intra}} \times \text{dilution}) \times \text{solvent volume (mL)}}{\text{extract of fermented volume (mL)}}$$



### 2.5.3. Προσδιορισμός βιομάζας

Για τις ζυμώσεις βυθού, η μέτρηση παραγόμενης βιομάζας των δύο στελεχών μυκήτων με φυγοκέντρηση για 30min με 9000rpm, και προσεχτική απομάκρυνση του υπερκείμενου όγκου του ζυμούμενου υποστρώματος. Στη συνέχεια, μετράται σε ογκομετρικό κύλινδρο ο όγκος του υπερκείμενου μίγματος, ενώ στο ίζημα (παραγόμενη βιομάζα) γίνεται εκ νέου φυγοκέντρηση 20min με 9000rpm (για καλύτερο καθαρισμό). Εν συνεχεία το κυτταρικό ίζημα μεταφέρεται σε προζυγισμένα φιαλίδια τύπου McCartney ξηραίνεται στους 60°C για 24h (όπου έχει ήδη σταματήσει να μεταβάλλεται το βάρος του). Μετράται το βάρος του σε ζυγό ακριβείας τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων (αφού πρώτα έχει τοποθετηθεί με απευθείας μεταφορά σε αφυγραντήρα για 30h έως ότου το δείγμα φτάσει σε θερμοκρασία περιβάλλοντος). Η παραγόμενη βιομάζα εκφράζεται ως συνολική ξηρή βιομάζα (Total Dry Weight) ως εξής:

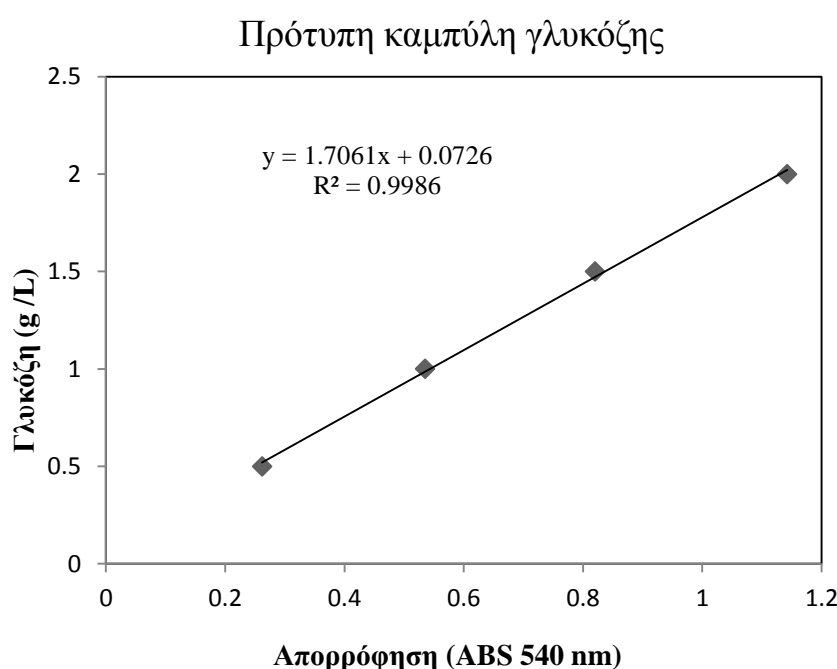
$$(TDW) = \frac{\text{Ξηρή βιομάζα υποστρώματος (gr)}}{\text{Όγκος ζυμούμενου μίγματος (L)}}$$

### 2.5.4. Ποιοτικός προσδιορισμός ανάγοντων σακχάρων

Γίνεται με τη βοήθεια της φωτομετρικής μεθόδου του δινιτροσαλικυλικού οξέος (χημικός τύπος-C<sub>7</sub>H<sub>4</sub>N<sub>2</sub>O<sub>7</sub>), ή αλλιώς DNS. Η αρχή της μεθόδου (Miller 1959) βασίζεται σε οξειδοαναγωγική αντίδραση, στην οποία το αναγωγικό σάκχαρο, το οποίο έχει ελεύθερο ημιακεταλικό υδροξύλιο, αντιδρά με το δινιτροσαλικυλικό οξύ (οξειδωτικό μέρος), σε υψηλή θερμοκρασία (συνθήκες βρασμού νερού), δημιουργώντας σύμπλοκο με μέγιστο απορρόφησης στα 540nm. Η γλυκόζη (και η φρουκτόζη) θεωρείται ανάγον σάκχαρο, επομένως μπορεί να υπολογιστεί με βάση αυτή τη μέθοδο, με βάση την πρότυπη καμπύλη αναφοράς της γλυκόζης στα 540nm (κατά την αντίδραση με DNS).

Πιο συγκεκριμένα, για την κατασκευή καμπύλης αναφοράς χρησιμοποιείται πρότυπο διάλυμα γλυκόζης συγκέντρωσης 2g/L, το οποίο αραιώνεται με απιονισμένο νερό ώστε να προκύψουν οι συγκεντρώσεις 0.5g/L, 1g/L, 1.5g/L και 2g/L. Στη συνέχεια, προστίθενται 0.5mL DNS σε όγκο 0.5mL, σε κάθε ένα από τα διαλύματα των 4 διαφορετικών συγκεντρώσεων, αλλά και σε 0.5mL από όσα διαλύματα άγνωστης συγκέντρωσης γλυκόζης είναι προς μέτρηση, μέσα σε δοκιμαστικό σωλήνα. Οι επαναλήψεις για κάθε γνωστή και άγνωστη συγκέντρωση γλυκόζης, είναι δύο. Στη συνέχεια, αναδεύονται (vortex) και θερμαίνονται στους 100°C για 5min, ενώ έπειτα

μεταφέρονται αμέσως σε υδατόλουτρο στους 20°C, προκειμένου να σταματήσει η αντίδραση. Προστίθενται 5mL απιονισμένου νερού σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα, και μετά από ανάδευση, μετράται η απορρόφηση του κάθε διαλύματος στα 540nm (ξεκινώντας πρώτα με τις απορροφήσεις των πρότυπων διαλυμάτων, για να κατασκευαστεί η καμπύλη αναφοράς). Στο φασματοφωτόμετρο χρησιμοποιείται για τυφλό διάλυμα το οποίο αντί για το αντιδραστήριο περιέχει απιονισμένο νερό ίδιου όγκου (έχει υποστεί ακριβώς την παραπάνω διαδικασία). Στο Γράφημα 2.6 φαίνεται η καμπύλη αναφοράς γλυκόζης με την μέθοδο DNS με βάση την οποία υπολογίζεται η συγκέντρωση των ανάγοντων σακχάρων στα άγνωστα δείγματα.



*Γράφημα 2.6: Πρότυπη καμπύλη βαθμονόμησης της γλυκόζης με τη μέθοδο DNS*

### **2.5.5. Ποσοτικός προσδιορισμός σακχάρων**

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης των καταναλωθέντων σακχάρων σε δείγματα υγρών καλλιεργειών μετά από ζύμωση, γίνεται με βάση την αναλυτική ποσοτική μέθοδο της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography- HPLC) (HPLC, Waters 600E). Τα κυριότερα μέρη της HPLC είναι το δοχείο διαλυτών έκλουσης, η αντλία, το σύστημα εισαγωγής του δείγματος, η στήλη διαχωρισμού, ο ανιχνευτής και το σύστημα καταγραφής δεδομένων. Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στον χρόνο κατακράτησης ή ανάσχεσης (Rf), ο οποίος με τη σειρά του

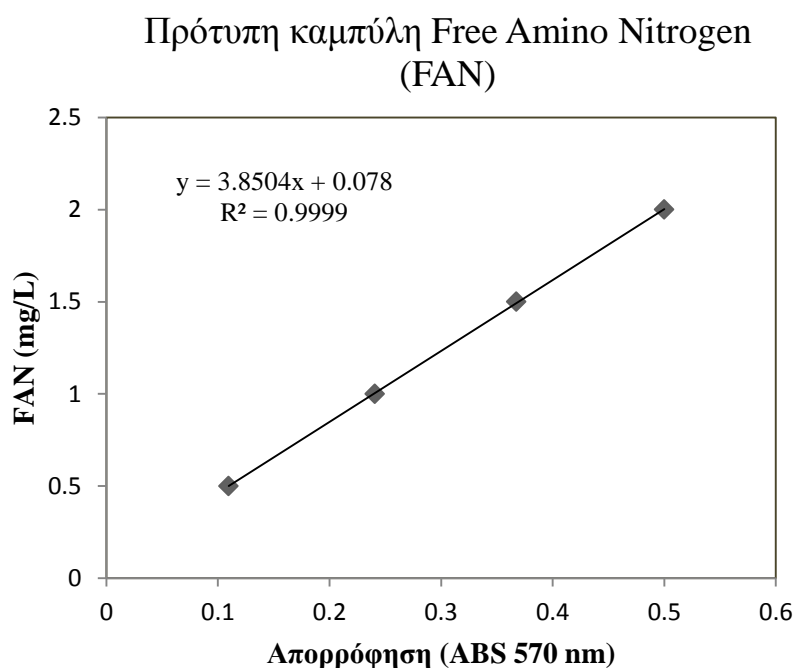
καθορίζεται από την αλληλεπίδραση των συστατικών των χημικών ενώσεων του δείγματος με τη στατική φάση, ο οποίος συγκρίνεται με πρότυπα αναφοράς (γλυκόζη, φρουκτόζη, σουκρόζη). Η κινητή φάση είναι ένα αραιό υδατικό διάλυμα θειϊκού οξέος 10mM (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) με ροή 0,6mL/min, ενώ η στήλη (στατική φάση) με την οποία γίνεται ο διαχωρισμός του δείγματος είναι τύπου Aminex HPX-87H (300mm x 7.8mm, BioRad, USA), σε θερμοκρασία 65°C. Ο όγκος ένεσης ήταν 10μL.

### **2.5.6. Προσδιορισμός Αζώτου των Ελεύθερων Αμινομάδων**

Ο προσδιορισμός του αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων ή free amino nitrogen (FAN) γίνεται με τη βοήθεια της φωτομετρικής μεθόδου της νινυδρίνης, και προσδιορίζει το άζωτο μόνο των ελεύθερων αμινομάδων, με βάση τη μέθοδο κατά Lie (1973). Για την παραγωγή αντιδραστηρίου χρώσης (color reagent) χρησιμοποιείται διάλυμα με συστατικά όξινο φωσφορικό νάτριο (10g/100mL), νινυδρίνη (0.5g/100mL), φρουκτόζη (0.3g/100mL) και δισόξινο φωσφορικό κάλιο (6g/100mL). Για την παραγωγή αντιδραστηρίου αραιώσης χρησιμοποιείται διάλυμα συστατικών ιωδικού καλίου και 96% διάλυμα αιθανόλης. Για την καμπύλη αναφοράς παρασκευάζεται διάλυμα γλυκίνης με τελική συγκέντρωση 2 mg/L.

Ειδικότερα, για την κατασκευή καμπύλης αναφοράς χρησιμοποιείται πρότυπο διάλυμα γλυκίνης συγκέντρωσης 2mg/L, το οποίο αραιώνεται ώστε να προκύψουν γνωστές συγκεντρώσεις 0.5mg/L, 1mg/L, 1.5mg/L και 2mg/L. Στη συνέχεια, προστίθενται 0.5mL αντιδραστηρίου χρώσης σε όγκο 1mL, σε κάθε ένα από τα διαλύματα των 4 διαφορετικών συγκεντρώσεων, αλλά και σε 1mL από όσα διαλύματα άγνωστης συγκέντρωσης είναι προς μέτρηση, μέσα σε δοκιμαστικό σωλήνα. Οι επαναλήψεις για κάθε διάλυμα γνωστής και άγνωστης συγκέντρωσης γλυκίνης, είναι δύο. Στην συνέχεια, οι δοκιμαστικοί σωλήνες αναδεύονται (vortex) και θερμαίνονται στους 100°C για 16min, ενώ έπειτα μεταφέρονται αμέσως σε υδατόλουτρο (20°C) για 20min. Προστίθενται 2.5mL αντιδραστηρίου αραιώσης και οι δοκιμαστικοί σωλήνες αναδεύονται για 20sec, μέχρι την αλλαγή χρώματος. Η μέτρηση της απορρόφησης του κάθε διαλύματος γίνεται στα 570nm (ξεκινώντας πρώτα με τις απορροφήσεις των πρότυπων διαλυμάτων, για να κατασκευαστεί η καμπύλη αναφοράς). Στο φασματοφωτόμετρο χρησιμοποιείται για τυφλό το διάλυμα το οποίο αντί για δείγμα, περιέχει απιονισμένο νερό ίδιου όγκου (έχει υποστεί ακριβώς την παραπάνω διαδικασία). Στο Γράφημα 2.6 φαίνεται η καμπύλη αναφοράς γλυκίνης με τη μέθοδο της νινυδρίνης με

βάση την οποία υπολογίζεται η συγκέντρωση αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων στα άγνωστα δείγματα.



*Γράφημα 2.7: Καμπύλη αναφοράς γλυκίνης με τη μέθοδο της νινυδρίνης με την οποία υπολογίζεται η συγκέντρωση αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων σε άγνωστα δείγματα*

### **2.5.7. Μέτρηση σχετικής υγρασίας σε στερεά υποστρώματα**

Σε προζυγισμένα φιαλίδια τύπου McCartney, προστίθεται ποσότητα στερεού υποστρώματος και καταγράφεται το αρχικό βάρος σε ζυγό ακριβείας τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων. Τα φιαλίδια αυτά θερμαίνονται σε θερμοκρασία 100°C για 3h. Έπειτα μεταφέρονται απευθείας σε αφυγραντήρα (dessicator) για 20min, προκειμένου το δείγμα να αποκτήσει θερμοκρασία περιβάλλοντος, χωρίς να μεταβληθεί η υγρασία του. Μετά την παραμονή τους σε αφυγραντήρα, μετράται το βάρος του κάθε φιαλιδίου σε ζυγό ακριβείας. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται έως ότου το βάρος είναι σταθερό και υπολογίζεται με βάση τον τύπο:

$$\text{Σχετική Υγρασία} = \left( \frac{\text{Νωπό βάρος} - \text{Ξηρό βάρος}}{\text{Νωπό βάρος}} \right) \times 100$$

### 2.5.8. Προσδιορισμός απόδοσης αιθέριων ελαίων

Η απόδοση των αιθέριων ελαίων μετά από υδροαπόσταξη υπολογίζεται με βάση τα mL αιθέριων ελαίων που μετρώνται στον διαβαθμισμένο σωλήνα, μετά το διαχωρισμό τους (με βάση το διαφορετικό σημείο τήξης ύδατος και αιθέριων ελαίων), με τη διαδικασία που περιγράφεται παραπάνω. Εφόσον το αρχικό ετερογενές μίγμα κομματιών νωπού φλοιού πορτοκαλιού (50g) προστίθεται σε 300mL ύδατος, μπορεί να υπολογιστεί ο όγκος (mL) αιθέριων ελαίων/g ξηρού βάρους φλοιού πορτοκαλιού (το ποσοστό υγρασίας του φλοιού πορτοκαλιού είναι 72%) ή σε ποσοστό% =  $\frac{\text{mL αιθέριων ελαίων}}{300\text{mL}} \times 100$ .

### 2.5.9. Εξάτμιση υπερκείμενων διαλυμάτων, μετά από ζύμωση (semi-SSF, SmF)

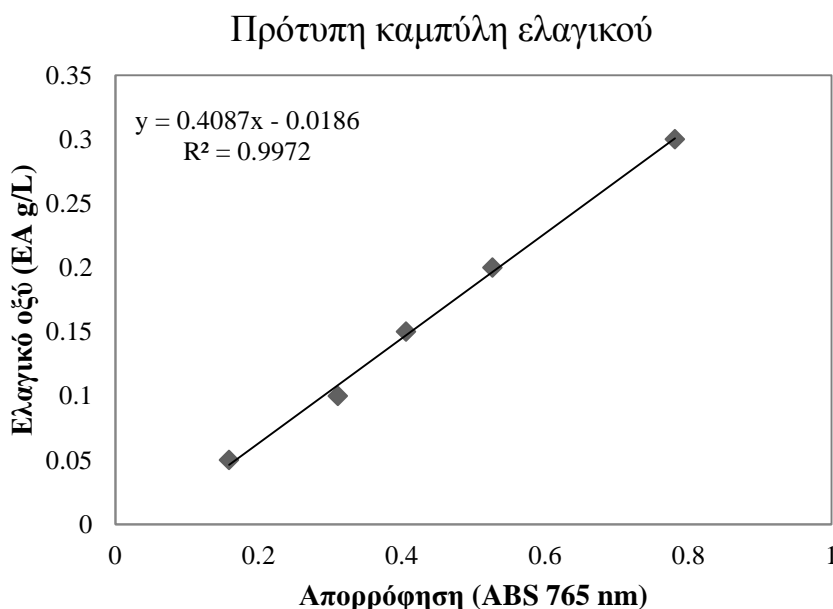
Σε αυτή τη διαδικασία χρησιμοποιούνται τα υδατικά και αιθανολικά διαλύματα που έχουν προέλθει από την εκχύλιση εξωκυττάρων και εσωκυττάρων χρωστικών, αντίστοιχα και είναι αποθηκευμένα σε συνθήκες ψύξης, στους  $-18^{\circ}\text{C}$  (όπως περιγράφεται παραπάνω). Τα απαλλαγμένα από κυτταρική μάζα, διηθήματα, φυγοκεντρώνονται εκ νέου στις 9000rpm για 10min και τοποθετούνται σε αναλογία 1:1 σε προζυγισμένη σε ζυγό ακριβείας σφαιρική φιάλη, σε ένα περιστρεφόμενο εξατμιστήρα (rotary evaporator) στους  $50-60^{\circ}\text{C}$ , έως ότου εξατμιστεί το διάλυμα και παραμείνει μόνο το ακατέργαστο στερεό. Στη συνέχεια, η σφαιρική φιάλη μεταφέρεται αμέσως σε αφυγραντήρα μέχρι να περιέλθει σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και μετράται εκ νέου το βάρος της σφαιρικής φιάλης στον ίδιο ζυγό ακριβείας (ακρίβεια τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων). Η διαφορά του τελικού-αρχικού βάρους, απεικονίζει τα mg συνολικής χρωστικής/mL που υπάρχουν στην εναπομείνουσα ακατέργαστη μάζα της ζυμούμενου υποστρώματος φλούδας πορτοκαλιού.

### 2.5.10. Προσδιορισμός συνολικών φαινολικών στα υπερκείμενα των ζυμούμενων υποστρωμάτων (ssf/semi-ssf/smf)

Οι φαινολικές ενώσεις αποτελούν βιοενεργές ενώσεις και είναι δευτερογενείς μεταβολίτες με αντιφλεγμονώδη, αντικαρκινική, αντιϊκή δράση και αντιβακτηριακή δράση (Cai et al., 2004). Ο προσδιορισμός φαινολών γίνεται με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu, η αρχή της οποίας βασίζεται στην αλλαγή χρώματος με το συγκεκριμένο αντιδραστήριο (FCR) το οποίο ανάγει τις φαινόλες, παρουσία διαλύματος  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . Η

μέθοδος αυτή αντιδρά με όποια ουσία περιέχεται στο διάλυμα και η οποία μπορεί να οξειδωθεί,(Cao et al., 1993). Η διαδικασία που ακολουθείται βασίζεται στη μέθοδο που περιγράφεται από τον Singh et al., 2002, σε φλοιό ροδιού, (Singh et al.,2002).

Για την κατασκευή πρότυπης καμπύλης αναφοράς παρασκευάζεται πυκνό διάλυμα ελαγικού οξέος (αντιοξειδωτική φαινολική ένωση που υπάρχει κυρίως σε φρούτα και λαχανικά) 2g/L (1mg ελαγικού οξέος σε 50mL διαλύματος μεθανόλης-ύδατος 6:4 v/v). Το πυκνό πρότυπο διάλυμα αραιώνεται σε διάλυμα μεθανόλης-ύδατος, ώστε να προκύψουν οι συγκεντρώσεις 0.05g/L, 0.1g/L, 0.15g/L, 0.2g/L και 0.3g/L. Για το κάθε διάλυμα διαφορετικής συγκέντρωσης ελαγικού οξέος, χρησιμοποιούνται δύο δοκιμαστικοί σωλήνες (2 επαναλήψεις) στους οποίους προστίθενται 200μL των παραπάνω διαλυμάτων. Στη συνέχεια προστίθεται 1mL αντιδραστήριου Folin-Ciocalteu (1:10v/v) σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα και το διάλυμα αναδεύεται και αφήνεται σε ηρεμία για 1-2min. Προστίθεται 800μL ανθρακικού νατρίου (7.5% ή 75g/L) και ακολουθεί εκ νέου ανάδευση και τοποθέτηση των διαλυμάτων σε σκοτεινό μέρος για 30min. Τελος, μετράται η απορρόφηση των πρότυπων διαλυμάτων στα 765nm. Για τυφλό χρησιμοποιείται διάλυμα που έχει υποστεί την ίδια διαδικασία, με τη διαφορά προσθήκης 200μL διαλύματος μεθανόλης-ύδατος 6:4v/v αντί για διάλυμα ελαγικού οξέος. Κατασκευάζεται η καμπύλη ελαγικού οξέος εκφρασμένη σε mg/mL.



**Γράφημα 2.8:** Πρότυπη καμπύλη ελαγικού ως καμπύλη αναφοράς για τη μέτρηση ολικών φαινολικών

Αντίστοιχα για την μέτρηση όλων των άγνωστων δειγμάτων ακολουθείται η ίδια διαδικασία (200μL δείγματος σε διπλή επανάληψη, με 1mL Folin και 800μL Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 30min σε σκοτάδι και φωτομέτρηση στα 765nm). Τα συνολικά φαινολικά συστατικά εκφράζονται σε mg (EA)/g (d.b).

### **2.5.11. Προσδιορισμός αντιοξειδωτικής ικανότητας (DPPH Radical Scavenging Method)**

Η φωτομετρική μέθοδος (Blois 1958) στηρίζεται στη δέσμευση (αναγωγή) της ελεύθερης σταθερής ρίζας 2,2-διφαινυλο-πικρυλυδραζόλης (DPPH) από τις αντιοξειδωτικές ουσίες RH των τροφίμων, και στον βαθμό αποχρωματισμού του διαλύματος που μετράται στα 517nm (μέγιστη απορρόφηση της DPPH). Ο αποχρωματισμός που παρατηρείται είναι ανάλογος του βαθμού αναγωγής ή αλλιώς της αντιοξειδωτικής ικανότητας του δείγματος. Έχει εφαρμογή σε στερεά και υγρά δείγματα και αναφέρεται στη συνολική αντιοξειδωτική ικανότητα του κάθε δείγματος και όχι μεμονωμένου συστατικού

Για τον προσδιορισμό συνολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος Moon and Terao (1998), με βάση την οποία σε δοκιμαστικό σωλήνα (με διπλή επανάληψη) προστίθεται 1mL αιθανολικού διαλύματος (97%), 950μL ρυθμιστικού διαλύματος Tris-HCl (0.05M, pH=7,4), 1mL διαλύματος DPPH (0.1mM) σε αιθανόλη (97%) και 50μL δείγματος. Το μίγμα αναδεύεται αμέσως και τοποθετείται σε σκοτεινό μέρος, σε θερμοκρασία δωματίου για 30min. Έπειτα, φωτομετρείται σε φασματοφωτόμετρο UV-VIS στα 517nm. Για το τυφλό ακολουθείται η παραπάνω διαδικασία, χωρίς την προσθήκη DPPH στο διάλυμα προστίθενται 2mL αιθανολικού διαλύματος), ενώ ο μάρτυρας (control) περιέχει 50μL απιονισμένο νερό αντί για δείγμα. Η αντιοξειδωτική ικανότητα εκφράζεται ως:

$$AC(\%) = \left(1 - \frac{A \text{ δείγματος}}{A \text{ μάρτυρα}}\right) \times 100$$

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

---

### 3.1. Παρατήρηση μορφολογίας σε συνθετικό θρεπτικό μέσο, των στελεχών *Monascus purpureus* ATCC 16365 και *Penicillium purpurogenum* CBS 113139

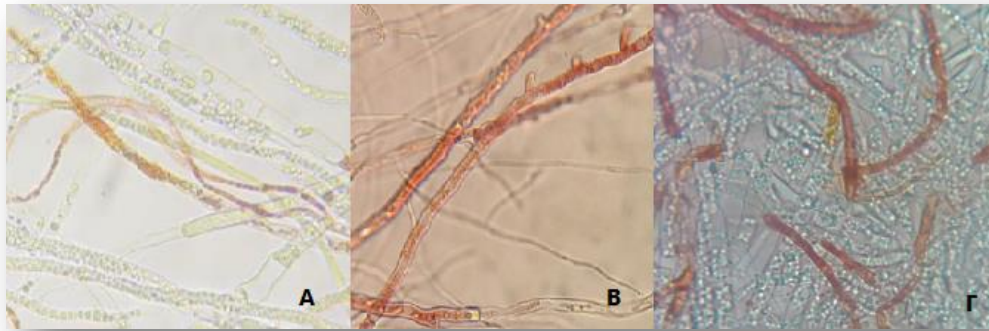
Για να κατανοηθεί η μορφολογία των στελεχών αυτών χρειάζεται να γίνει αναφορά στην ταξινόμησή τους. Και τα δύο ανήκουν στο Βασίλειο των μυκήτων με μυκηλιακό θαλλό (ομοθαλλικοί) και πιο συγκεκριμένα στη Διάρθρωση των ασκομυκήτων (αναπαραγωγή με ασκό, εγγενή ασκοσπόρια τα οποία εκτινάσσονται από την κορυφή του ασκού κατά την ωρίμανση). Οι ασκομύκητες παρουσιάζουν νηματοεδείς υφές και διαφράγματα (σέπτα) καθώς αναπτύσσονται, ενώ αναπαράγονται με σχάση (Υποδιάρθρωση: Pezizomycotina). Ανήκουν και τα δύο στελέχη στην κλάση Eurotiomycetes (ασκοί σε κλειστοθήκια), ενώ η διαφορά τους είναι ότι το στέλεχος *Penicillium purpurogenum* ανήκει πιο συγκεκριμένα στην Τάξη Eurotiales (το τοίχωμα είναι συνήθως ένα σταθερό περίδιο) (Γιαννίτσaros και Γκότση 2004). Το στέλεχος *Monascus purpureus* ATCC 16365 ανήκει στην οικογένεια Monascaceae ενώ το στέλεχος *Penicillium purpurogenum* στην οικογένεια Trichocomaceae. Ειδικότερα χαρακτηριστικά σχετικά με την ταξινόμησή τους παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.1:



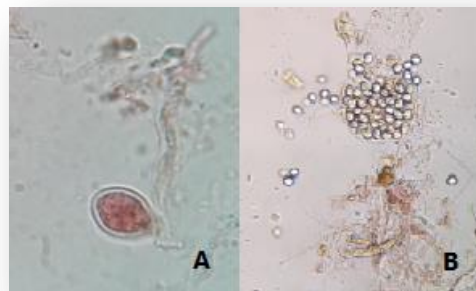
**Πίνακας 3.1:** Συνοπτική παρουσίαση των δύο στελεχών ως προς τα χαρακτηριστικά ταξινόμησής τους.

Σύγχρονη ονομασία:	<i>Monascus purpureus</i> (Went, 1895)	<i>Penicillium purpurogenum</i> (Stoll sensu Raper & Thom, 1945)
Παλιά ονομασία:	-	<i>Talaromyces purpurogenus</i>
Κατηγορία:	Νηματοειδής μύκητας	Νηματοειδής μύκητας
Ταξινόμηση:	Fungi, Ascomycota, Pezizomycotina, Eurotiomycetes, Eurotiomycetidae, Monascaceae, <i>Monascus</i>	Fungi, Ascomycota, Pezizomycotina, Eurotiomycetes, Eurotiomycetidae, Eurotiales, Trichocomaceae, <i>Penicillium</i>
Άλλες συλλογές:	CBS 109.07, ATCC 16365, ATCC 16426, CECT 2955, IFO 4513, IMI 210765, NRRL 1596	IBT 3967, NRRL 1147
Σχετική βιβλιογραφία:	Sheperd και Carels, (1979)	Frisvad et al. (2013)

Για το στέλεχος *Monascus purpureus* ATCC 16365 παρατηρήθηκαν όλες εκείνες οι δομές που το χαρακτηρίζουν, όπως οι υφές (με ακανόνιστες διακλαδώσεις), τα σέπτα, τα κονίδια, τα κλειστοθήκια, όπου περιέχονται τα ασκοσπόρια, με τη βοήθεια οπτικού μικροσκοπίου. Όσον αφορά στις χρωστικές παρατηρήθηκε ότι αρχικά οι παραπάνω δομές είναι άχρωμες, ενώ αργότερα γίνονται πορτοκαλί και κόκκινο χρώμα, σε θρεπτικό μέσο PDA. Όσον αφορά στη μακροσκοπική παρατήρηση σε τρυβλίο, οι υφές που σχηματίστηκαν έχουν ένα λευκό-ρόζ χρώμα, ενώ στα βαθύτερα στρώματα του στερεού θρεπτικού μέσου είναι κόκκινες και διαχέουν μάλιστα τις χρωστικές σε όλη την επιφάνεια του τρυβλίου όσο αυξάνεται ο χρόνος επώασης. Η παρατήρηση των παραπάνω χαρακτηριστικών συμφωνεί με τις παρατηρήσεις του Chairote et al., (2007), ενώ φαίνεται ότι ανάλογα με το θρεπτικό (PDA, MEA, CYA κλπ.), τον αριθμό ασκοσπορίων και κονιδίων, επηρεάζεται το χρώμα που εκλύει ο μύκητας (Carvalho, et al., 2005, Wang et al., 2005, Chairote et al., 2007, Samsudin et al., 2014).



**Γράφημα 3.1:** Μικροσκοπική παρατήρηση *Penicillium purpurogenum* ATCC 16365. (A): Αρχικό στάδιο ανάπτυξης του μύκητα. Παρατηρούνται οι υφές και τα κάθετα σε αυτές διαφράγματα (σέπτα) σε αρχικό στάδιο ανάπτυξης μετά από 5 μέρες επώασης. Οι πορτοκαλί χρωστικές παράγονται μέσα στις υφές. (B), (Γ): Υφές κόκκινες μετά από 7 μέρες επώασης εντός των υφών.

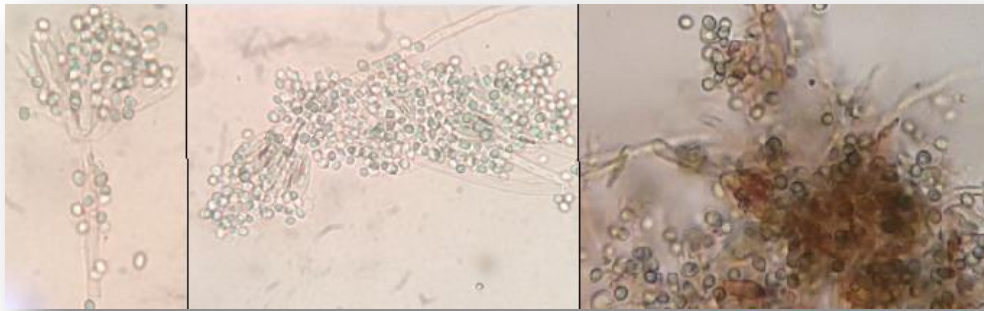


**Γράφημα 3.2:** Μικροσκοπική παρατήρηση (A): κονιδίου στην άκρη κονιδιοφόρου (αγενής αναπαραγωγή) και (B): ασκοσπορίων που απελευθερώνονται από το κλειστοθήκιο κατά την ωρίμανση (εγγενής αναπαραγωγή) του στελέχους ATCC 16365.

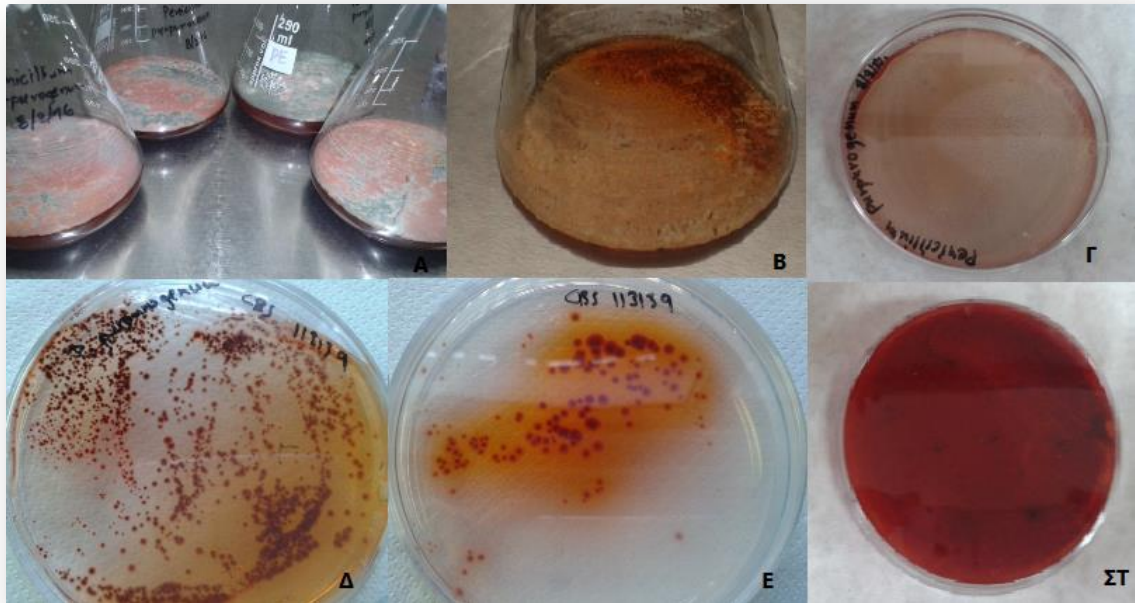


**Γράφημα 3.3:** Μακροσκοπική παρατήρηση. Αριστερά: Διογκωμένες λευκές-ρόζ υφές μυκηλίου του στελέχους ATCC 16365 στα πρώτα στάδια παραγωγής χρωστικής. Μέση: κάτοψη τρυβλίου με αποικία ATCC 16365 παρουσία κόκκινης χρωστικής. Δεξιά: πάνω πλευρά τρυβλίου όπου φαίνεται το λευκό-ρόζ χρωμα κεντρικά του μυκηλίου και οι χρωστικές που έχουν απελευθερωθεί στο θρεπτικό μέσο.

Για το στέλεχος *Penicillium purpurogenum* CBS 113139 παρατηρήθηκαν μικροσκοπικά, οι διακλαδισμένες υφές, τα σέπτα, τα ασκοσπόρια με πορτοκαλο-κόκκινο χρώμα και οι κονιδιοφόροι, οι οποίοι φέρουν πάνω τους τα κονίδια (παρατηρούνται το ένα δίπλα στο άλλο) τα οποία σε αρχικό στάδιο είναι χρώματος λευκού ενώ καθώς μεγαλώνει ο χρόνος επώασης αποκτούν ένα γκρι-πράσινο χρώμα. Τα ίδια ακριβώς χρώματα παρατηρήθηκαν και μακροσκοπικά είτε σε τρυβλίο είτε σε κωνική φιάλη με CzA, (πορτοκαλί, κόκκινος, γκρι-πράσινος θαλλός). Στην αρχή το θρεπτικό μέσο είναι χρώματος λευκού-ροζ, ενώ μετά από δύο εβδομάδες παρατηρήθηκαν σε τρυβλίο (κάτοψη) πλήρης διάχυση κόκκινου χρώματος. Με βάση κυρίως τη μικροσκοπική παρατήρηση των αναπαραγωγικών οργάνων του στελέχους οι εικόνες συμφωνούν με αυτές του Frisvad et al., (2013) ο οποίος περιέγραψε αναλυτικά τα νέα στελέχη του *Penicillium purpurogenum*, τα οποία παρουσιάζουν μεγάλη δυναμική στη παραγωγή χρωστικών, ιδιαίτερα κόκκινων.



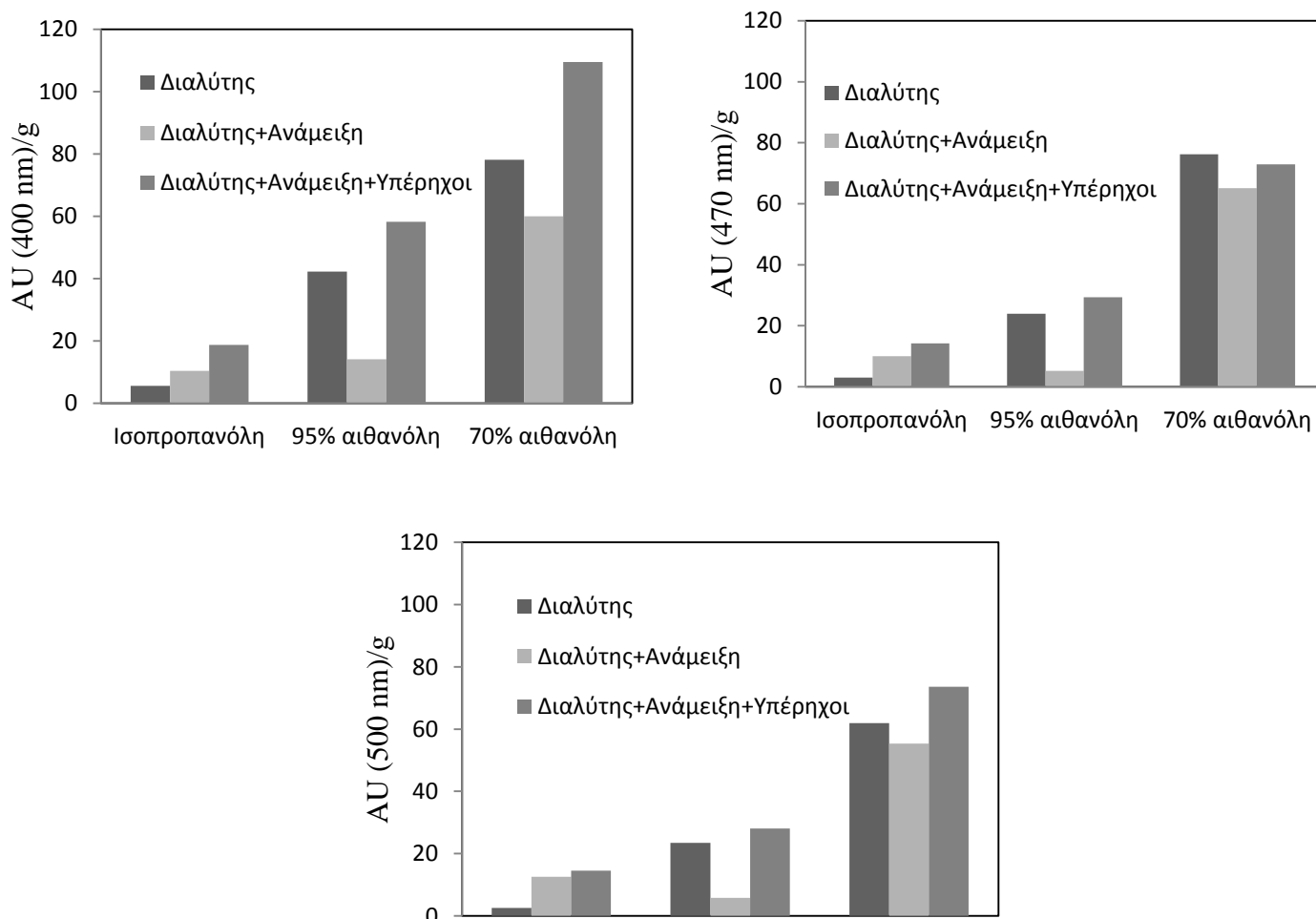
**Γράφημα 3.4:** Αριστερά, Μέση: κονιδιοφόρος με διασκορπισμένα σπόρια. Δεξιά: σπόρια λευκού και κόκκινου χρώματος.



**Γράφημα 3.5:** Μακροσκοπική παρατήρηση του στελέχους CBS 113139 σε CzA: (Α): ανάπτυξη θαλλού χρώματος κόκκινου- γκρι μετά από 10 μέρες επώαση σε PDA. (Β): ανάπτυξη θαλλού μετά από 14 μέρες επώασης. (Γ): πάνω πλευρά τρυβλίου, με πλήρη κάλυψη θαλλού λευκού χρώματος. (Δ): ανάπτυξη μύκητα με παραγωγή κόκκινης χρωστικής. (Ε): απελευθέρωση χρωστικής στο θρεπτικό μέσο. (ΣΤ): πλήρης κάλυψη τρυβλίου με κόκκινη χρωστική.

### 3.2. Επίδραση διαλύτη, τρόπου εκχύλισης σε ζυμούμενο στερεό υπόστρωμα χονδρόκοκκου πίτυρου

Η επίδραση αυτών των παραμέτρων στον προσδιορισμό των χρωστικών είναι πολύ σημαντική, όπως έχει αναφερθεί σε προηγούμενη ενότητα. Έτσι, στο συγκεκριμένο πείραμα χρησιμοποιήθηκε μόνο το στέλεχος *Monascus purpureus* ATCC 16365, ώστε να διαπιστωθούν οι βέλτιστες συνθήκες εκχύλισης των χρωστικών, στο ήδη χρησιμοποιημένο μοντέλο παραγωγής τέτοιων χρωστικών (MPs). Χρησιμοποιώντας λοιπόν χονδρόκοκκο πίτυρο με 61-65% αρχική υγρασία, αρχική μάζα υποστρώματος 5g, μετρήθηκαν οι κίτρινες (400nm), οι πορτοκαλί (470nm) και οι κόκκινες (500nm) χρωστικές, μετά από 7 μέρες επώαση. Μελετήθηκε η επίδραση του διαλύτη χρησιμοποιώντας αιθανόλη σε δυο καθαρότητες, ήτοι 70% και 95%, και ισοπροπανόλη, ενώ επίσης εξετάστηκε η επίδραση της χρησιμοποιήσης υπερήχων.



**Γράφημα 3.6 :** Προσδιορισμός χρωστικών στα 400 nm (κίτρινες), 470 nm (πορτοκαλί) και 500nm (κόκκινες). Οι διαλύτες που εξετάζονται είναι η ισοπροπανόλη, η αιθανόλη 95% και 70%, ενώ οι τρόποι εκχύλισης τρεις (1: μόνο με διαλύτη, 2: με διαλύτη και ανάμειξη για 1h, 180 rpm, 30°C, 3: με διαλύτη, ανάμειξη και υπερήχους).

Με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα παρατηρήθηκε ότι για την εκχύλιση και των τριών χρωστικών του στελέχους *Monascus purpureus* ATCC 16365, καλύτερος διαλύτης είναι η αιθανόλη (70% v/v) και ακολούθως η αιθανόλη (95% v/v) και η ισοπροπανόλη, με αραιώση 1:10 (g/mL). Αυτό πιθανά συμβαίνει καθώς τα αιθανολικά διαλύματα έχουν καλύτερη αντιμικροβιακή δράση κοντά στο 70% (v/v) διότι προκαλούν μεγαλύτερη διαταραχή στο δυναμικό της μεμβράνης παρουσία νερού, παρά από την απουσία του (95% v/v). Γενικά η αιθανόλη αποτελεί ένα μη τοξικό, πτητικό οργανικό διαλύτη, ώστε να μπορεί να χρησιμοποιηθεί στην εκχύλιση χρωστικών σε τρόφιμα και βιβλιογραφικά έχει βρεθεί ότι έχει μόνο 8% μικρότερη απόδοση εκχύλισης σε σχέση με τον καλύτερο από όλους, διαλύτη για εκχύλιση χρωστικών, τη μεθανόλη, η οποία είναι

τοξική (Carvalho et al., 2007). Αντίστοιχα, η ισοπροπανόλη θεωρείται ένας καλός οργανικός διαλύτης ο οποίος χρησιμοποιείται ευρέως στις βιομηχανίες. Παρόλα αυτά δεν έχει επιλεγεί για εκχύλιση MPs χρωστικών μέχρι στιγμής, βιβλιογραφικά διότι πιθανά τα αποτελέσματα κατά την εκχύλιση δεν είναι τόσο ικανοποιητικά σε σύγκριση με την αιθανόλη.

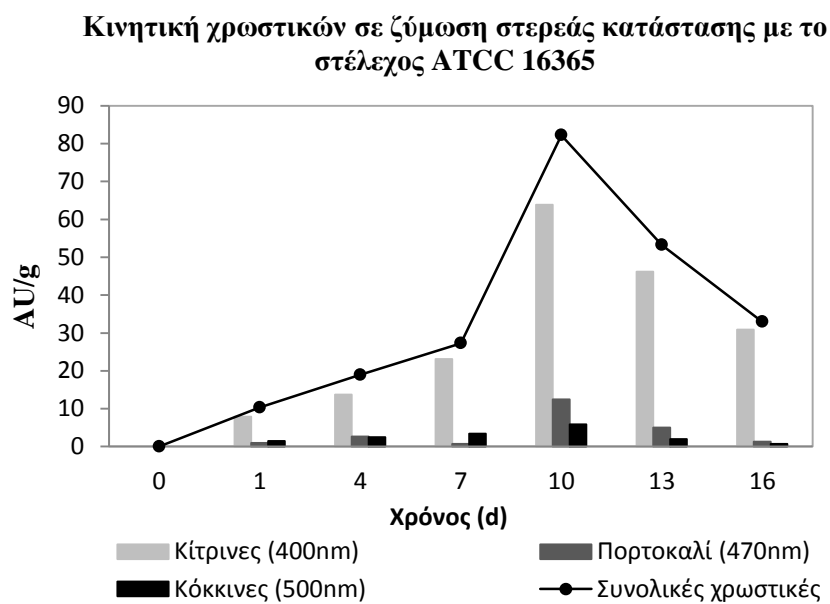
Επιπλέον, ο καλύτερος τρόπος εκχύλισης για τις κίτρινες (400nm) και τις κόκκινες (500nm) χρωστικές που παράγουν και τα δύο στελέχη, είναι ο συνδυασμός της εκχύλισης μετά από μηχανική κατεργασία (τοποθέτηση σε υπερήχους και γρήγορη ανάμειξη) ώστε να σπάσει η κυτταρική μεμβράνη και να απελευθερωθούν όλες οι χρωστικές (οι βασικές MPs χρωστικές είναι όλες διαλυτές στην αιθανόλη, όπως αναφέρεται εισαγωγικά). Γενικά, στη βιομηχανία έχουν αναφερθεί διάφοροι τρόποι λύσης των κυττάρων, με τις μηχανικές μεθόδους να είναι οι επικρατέστερες, ειδικά σε μικροοργανισμούς όπως οι μύκητες, όπου για να σπάσουν οι δεσμοί που συγκρατούν τη χιτίνη και τη γλυκάνη στο κυτταρικό τους τοίχωμα, χρειάζεται έντονη κατεργασία. Επομένως ο συνδυασμός χημικής προκατεργασίας (με αιθανόλη) και στη συνέχεια με υπερήχους και ανάδευση (μηχανική κατεργασία), μεγιστοποιεί την εκχύλιση κυρίως των εσωκυττάρων χρωστικών, οι οποίες βρίσκονται εσωτερικά του μύκητα με βάση τη μελέτη Hamano et al, (2005), η οποία έδειξε ότι μεταξύ 7 στελεχών του γένους *Monascus*, το στέλεχος ATCC 16365 είχε μεγαλύτερη παραγόμενη ενδοκυττάρια από ότι εξωκυττάρια χρωστική (60-40 %). Όσον αφορά στις πορτοκαλί χρωστικές, μέγιστη παραγόμενη χρωστική εξασφαλίστηκε με απλή εκχύλιση με διαλύτη στο νωπό ζυμούμενο στερεό υπόστρωμα (76.3 AU/g), με μικρή διαφορά από τον τρίτο τρόπο εκχύλισης (διαλύτης, ανάμειξη, υπέρηχοι, 72.9 AU/g).

Με βάση τα παραπάνω, η μέγιστη παραγόμενη κίτρινη χρωστική στο πίτυρο, βρέθηκε 109.5 AU/g και η μέγιστη κόκκινη χρωστική 73.6 AU/g, ενώ στο συγκεκριμένο υπόστρωμα φαίνεται ότι ευνοείται η παραγωγή κίτρινης χρωστικής σε σχέση με την πορτοκαλί και κόκκινη.

### 3.3. Παραγωγή MPs χρωστικών από το στέλεχος *Monascus purpureus* ATCC 16365 σε ζύμωση στερεάς κατάστασης σε φλοιό πορτοκαλιού

Το επόμενο μέρος της πειραματικής μελέτης αποτέλεσε η αξιοποίηση του φλοιού πορτοκαλιού ως υπόστρωμα για την παραγωγή χρωστικών μέσω της ανάπτυξης του μύκητα *M. purpureus*. Αρχικά, πραγματοποιήθηκαν κάποια προκαταρκτικά πειράματα ώστε να διαπιστωθεί η ικανότητα του μύκητα να αναπτύσσεται και να παράγει χρωστικές στο συγκεκριμένο υπόστρωμα.

Πραγματοποιήθηκε ζύμωση στερεάς κατάστασης με αρχική υγρασία 60-65%, και μέγεθος κόκκων <2mm, για 16 μέρες και μετρήθηκαν οι κίτρινες (400nm), οι πορτοκαλί (470nm) και οι κόκκινες (500nm) χρωστικές (AU/g) σε φασματοφωτόμετρο UV-VIS.



*Γράφημα 3.7: Κινητική πορεία παραγόμενων χρωστικών.*



**Πίνακας 3.2:** Συνοπτική παρουσίαση προσδιορισμού κίτρινων (400nm), πορτοκαλί (470nm) και κόκκινων (500nm) χρωστικών σε διάφορους χρόνους ζύμωσης.

	Χρόνος επώασης (d)	400nm	470nm	500nm
		AU/g		
<i>Monascus purpureus</i> ATCC 16365	0	0	0	0
	1	7.89	0.93	1.50
	4	13.77	2.69	2.50
	7	23.10	0.74	3.42
	<b>10</b>	<b>63.88</b>	<b>12.46</b>	<b>5.88</b>
	13	46.20	5.05	1.97
	16	30.89	1.32	0.73

Όπως φαίνεται στον Πίνακα 3.2 και στο Γράφημα 3.7, η μέγιστη παραγωγή χρωστικών παρατηρήθηκε την 10<sup>η</sup> μέρα ζύμωσης (και οι τρεις χρωστικές παρουσιάζουν μέγιστη παραγωγή την 10<sup>η</sup> μέρα), στα 63.88 AU/g για τις κίτρινες, 12.46 AU/g για τις πορτοκαλί και 5.88 AU/g για τις κόκκινες.



**Γράφημα 3.8:** Μακροσκοπική παρατήρηση στελέχους ATCC 16365 σε ζύμωση (SSF) σε φλοιό πορτοκαλιού. Από αριστερά προς δεξιά απεικονίζεται η μορφολογία του μύκητα στις 7,10,13 και 16 μέρες ζύμωσης, (αριστερή εικόνα:πάνω πλευρά κωνικής φιάλης, δεξιά εικόνα: κάτω πλευρά φιάλης). Φαίνεται μέγιστη ανάπτυξη μυκηλίου την 10<sup>η</sup> μέρα.

### 3.4. Μελέτη παραγόντων που επιδρούν στη ζύμωση στερεάς κατάστασης σε φλοιό πορτοκαλιού

Σε επόμενο στάδιο και δεδομένου ότι το στέλεχος *M. purpureus* δύναται να αναπτυχθεί και να παράξει χρωστικές χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα το φλοιό

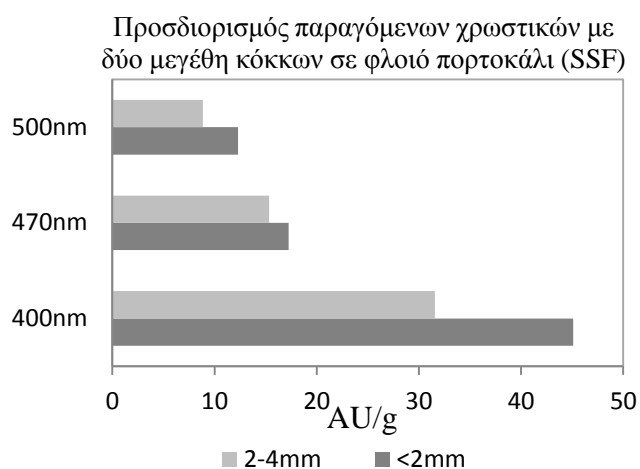


πορτοκαλιού, μελετήθηκαν διάφοροι παράγοντες που διαδραματίζουν μείζονος σημασίας στη ζύμωση στερεάς κατάστασης, όπως το μέγεθος των κόκκων του υποστρώματος, ο χρόνος ζύμωσης, η προσθήκη πηγής αζώτου στο υπόστρωμα, η αφαίρεση αιθέριων ελαίων από το υπόστρωμα και η εκχύλιση.

### 3.4.1. Επίδραση του μεγέθους των κόκκων του υποστρώματος στην παραγωγή χρωστικών.

Σύμφωνα με τον Pandey (2008), τα στερεά υποστρώματα πρέπει να έχουν μεγάλη επιφάνεια ανά μονάδα όγκου. Τα μικρότερα σωματίδια του υποστρώματος ζυμώνονται πιο εύκολα από τους μικροοργανισμούς, αλλά η μικρότερη επιφάνεια δημιουργεί πρόβλημα στον αερισμό. Γι αυτό, για παράδειγμα το πίτυρο σιταριού, χρησιμοποιείται σε δύο μορφές: λεπτόκοκκου και χονδρόκοκκου. Για βέλτιστη παραγωγή χρωστικών σε ζυμώσεις στερεάς κατάστασης, χρησιμοποιούνται διάφοροι συνδυασμοί κόκκων σε διαφορετικές αναλογίες. Για παράδειγμα, σε πείραμα με φρούτα όπως μπανάνα και παπάγια έχει χρησιμοποιηθεί μέγεθος μικρότερο από 315 $\mu$ m. (Shazwani, Nadzri, 2012).

Στην παρούσα μελέτη, εξετάστηκαν δύο διαφορετικά μεγέθη κόκκων, ήτοι 2-4 mm και <2 mm, τα οποία διαχωρίστηκαν με τη χρήση κόσκινου με οπές διαφορετικής διαμέτρου. Όπως φαίνεται και στο Γράφημα 3.9, και για τα τρία μήκη κύματος, η μεγαλύτερη παραγωγή χρωστικών επιτυγχάνεται με το μέγεθος κόκκων φλοιού πορτοκαλιού <2mm (45.12 AU/g, 17.25 AU/g και 12.3 AU/g για κίτρινες, πορτοκαλί και κόκκινες, αντίστοιχα).

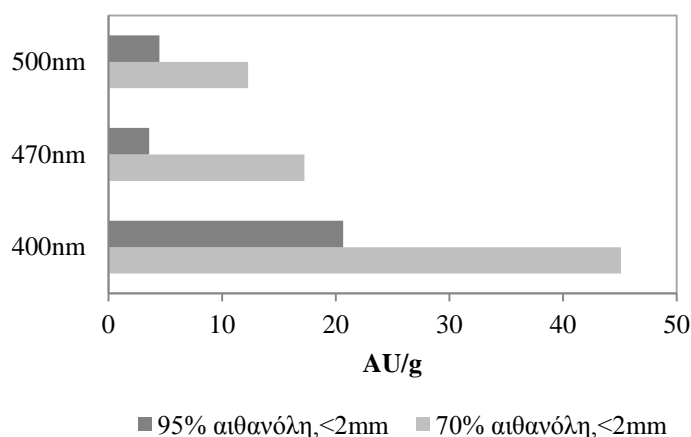


**Γράφημα 3.9:** Συγκριτική παρουσίαση παραγόμενων χρωστικών σε ζύμωση στερεάς κατάστασης, χρησιμοποιώντας δύο μεγέθη κόκκων (<2mm, και 2-4 mm)

### 3.4.2. Επίδραση του οργανικού διαλύτη και του υποστρώματος στην εκχύλιση των χρωστικών (φύση διαλύτη και φύση υποστρώματος)

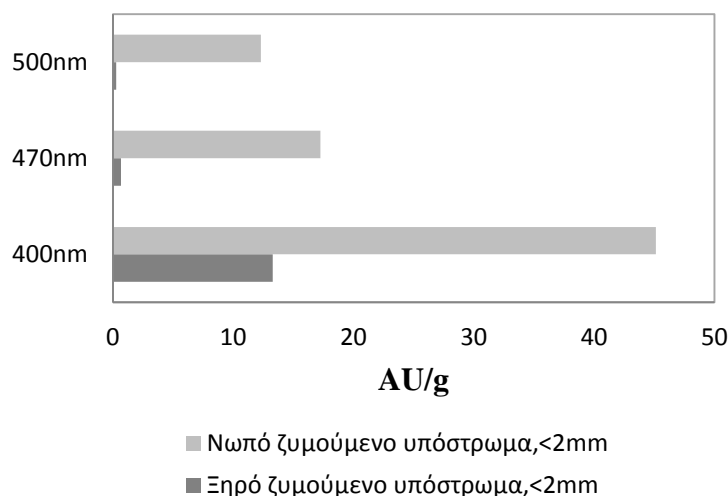
Με βάση τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν με το πίτυρο ως υπόστρωμα, χρησιμοποιήθηκαν οι δύο βέλτιστοι διαλύτες, ήτοι αιθανόλη 70% και αιθανόλη 95%, προκειμένου να επιβεβαιωθεί η βέλτιστη δυνατή εκχύλιση των χρωστικών με το φλοιό πορτοκαλιού ως υπόστρωμα στη ζύμωση στερεάς κατάστασης. Το Γράφημα 3.10 παρουσιάζει την παραγωγή χρωστικών χρησιμοποιώντας ως διαλύτη εκχύλισης την αιθανόλη στις δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις ενώ το Γράφημα 3.11 παρουσιάζει την επίδραση της φύσης του υποστρώματος (νωπό και έπειτα από ξήρανση) στην εκχύλιση των χρωστικών.

**Προσδιορισμός παραγόμενων χρωστικών με εκχύλιση αιθανόλης, σε φλοιό πορτοκάλι (SSF)**



**Γράφημα 3.10:** Συγκριτική παρουσίαση παραγόμενων χρωστικών σε ζύμωση στερεάς κατάστασης, μετά από εκχύλιση με διάλυμα αιθανόλης (95% v/v και 70% v/v).

### Επίδραση υποστρώματος στην εκχύλιση (με 70% αιθανόλη)



*Γράφημα 3.11: Συγκριτική παρουσίαση παραγόμενων χρωστικών σε ζύμωση στερεάς κατάστασης, μετά από εκχύλιση σε νωπό και ξηρό ζυμούμενο υπόστρωμα, με διάλυμα αιθανόλης (70% v/v).*

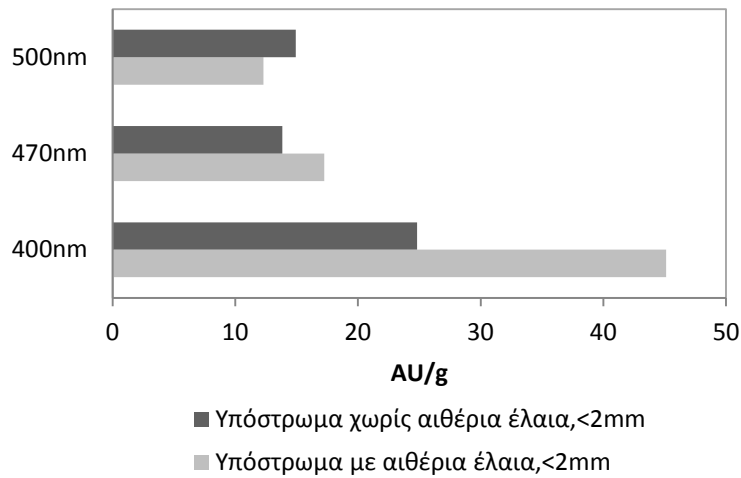
Συγκρίνοντας τα παραπάνω γραφήματα, παρατηρούνται μέγιστες χρωστικές σε φλοιό πορτοκαλιού, με εκχύλιση σε 70% (v/v) αιθανόλη και σε νωπό ζυμούμενο στερεό υπόστρωμα (45.12 AU/g κίτρινες, 17.25 AU/g πορτοκαλί και 12.3 AU/g κόκκινες).

Συνεπώς ως τρόπος εκχύλισης επιλέχθηκε η αιθανόλη 70% σε νωπό ζυμούμενο υπόστρωμα για την περαιτέρω μελέτη.

#### 3.4.3. Επίδραση των αιθερίων ελαίων στην παραγωγή χρωστικών

Παράλληλα με τη μελέτη παραγωγής χρωστικών με αποξηραμένο φλοιό πορτοκαλιού σε ζύμωση στερεάς κατάστασης, πραγματοποιήθηκε αξιολόγηση του υποστρώματος φλοιού πορτοκαλιού, από το οποίο είχε αφαιρεθεί προηγουμένως το 91% των αιθερίων ελαίων μετά από βρασμό νωπού πορτοκαλιού και ξήρανση στους 50-60°C, ως προς την παραγωγή χρωστικών. Το Γράφημα 3.12 παρουσιάζει τα αποτελέσματα από τη σύγκριση των δύο αυτών υποστρωμάτων και για τους τρεις τύπους χρωστικών (400, 470 και 500 nm).

### Προσδιορισμός παραγόμενων χρωστικών με παρουσία/απουσία α.ε. σε φλοιό πορτοκάλι (SSF)



**Γράφημα 3.12:** Συγκριτική παρουσίαση παραγόμενων χρωστικών σε ζύμωση στερεάς κατάστασης, σε υπόστρωμα αποξηραμένου φλοιού πορτοκαλιού και αποξηραμένου φλοιού πορτοκαλιού μετά από βρασμό (υπόστρωμα χωρίς αιθέρια έλαια).

Όπως φαίνεται στο παραπάνω γράφημα, μέγιστη κίτρινη και πορτοκαλί χρωστική με το μέγεθος κόκκων <2mm σε νωπό ζυμούμενο φλοιό πορτοκαλιού και με εκχύλιση σε 70% αιθανόλη, παρατηρείται παρουσία αιθέριων ελαίων (κίτρινη 45.12 AU/g, πορτοκαλί 17.25 AU/g). Αντίθετα, η απουσία των αιθέριων ελαίων στο υπόστρωμα φαίνεται ότι ευνοεί την παραγωγή των κόκκινων χρωστικών στη ζύμωση στερεάς κατάστασης με μέγιστη κόκκινη χρωστική 14.92 AU/g (η κόκκινη χρωστική παρουσία αιθέριων ελαίων είναι 12.3 AU/g). Έτσι, ευνοείται η αύξηση κόκκινης χρωστικής κατά 21% από τη ζύμωση του *Monascus purpureus* ATCC 16365. Βιβλιογραφικά, όπως αναφέρεται και εισαγωγικά η παρουσία των αιθέριων ελαίων σε υποστρώματα δυσκολεύει την ανάπτυξη μικροοργανισμών. Επιπρόσθετα, η απομάκρυνση των αιθερίων ελαίων συνεπάγεται την παραγωγή ενός ακόμα προϊόντος υψηλής προστιθέμενης αξίας, γεγονός που αυξάνει τη βιωσιμότητα της αναπτυσσόμενης βιοδιεργασίας.

#### 3.4.4. Επίδραση της προσθήκης πηγής αζώτου στο υπόστρωμα

Κατά τη διάρκεια αυτών των πειραμάτων μελετήθηκε η επίδραση της προσθήκης πηγής αζώτου στο υπόστρωμα χρησιμοποιώντας ηλιάλυρο σε συνδυασμό με το φλοιό πορτοκαλιού. Το ηλιάλυρο περιέχει υψηλό ποσοστό πρωτεΐνης (26.6%), η οποία είναι σημαντική για την ανάπτυξη της βιομάζας του μύκητα και κατά συνέπεια της παραγωγής χρωστικών. Η προσθήκη του ηλιαλεύρου στο υπόστρωμα πραγματοποιήθηκε σε δύο

διαφορετικά ποσοστά, ήτοι 20% (0.2g/gr) και 40% (0.4g/gr), και συγκρίθηκε με το υπόστρωμα φλοιού πορτοκαλιού στο οποίο δεν έγινε προσθήκη ηλιόλευρου (0g/gr). Ο Πίνακας 3.3, παρουσιάζει τις μέγιστες χρωστικές που παρατηρούνται στα τρία αυτά υποστρώματα.

**Πίνακας 3.3:** Συνοπτική παρουσίαση κίτρινων (400nm), πορτοκαλί (470nm) και κόκκινων (500nm) χρωστικών σε υπόστρωμα 100% από φλοιό πορτοκαλιού, υπόστρωμα 80-20% (πορτοκάλι-ηλιόλευρο) και 60-40% (πορτοκάλι-ηλιόλευρο).

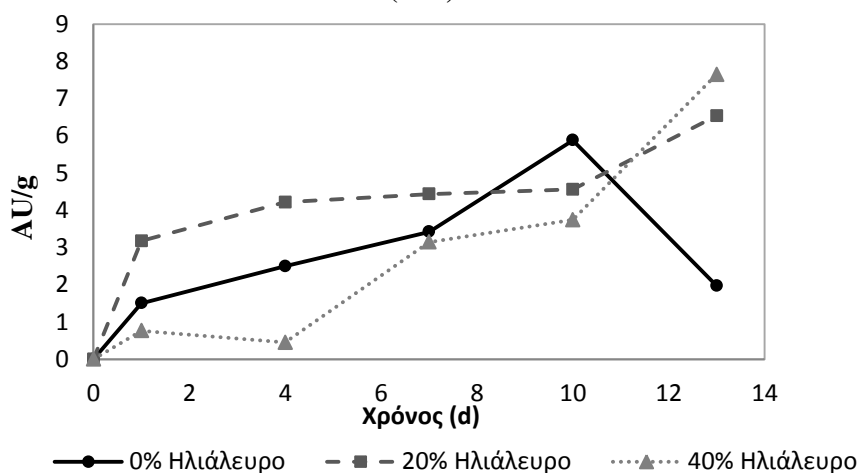
	Μήκος κύματος	0 g/gr <sup>(1)</sup>	0,2 g/gr <sup>(2)</sup>	0,4 g/gr <sup>(3)</sup>
AU/g	400nm	63,88	45,74	47,29
	470nm	12,46	6,76	10,87
	500nm	5,88	6,54	7,65

(1): Η μέγιστη παραγόμενη χρωστική παρατηρείται στην 10η μέρα ζύμωσης.

(2): Η μέγιστη παραγόμενη χρωστική παρατηρείται στην 13η μέρα ζύμωσης.

(3): Η μέγιστη παραγόμενη χρωστική παρατηρείται στην 13η μέρα ζύμωσης.

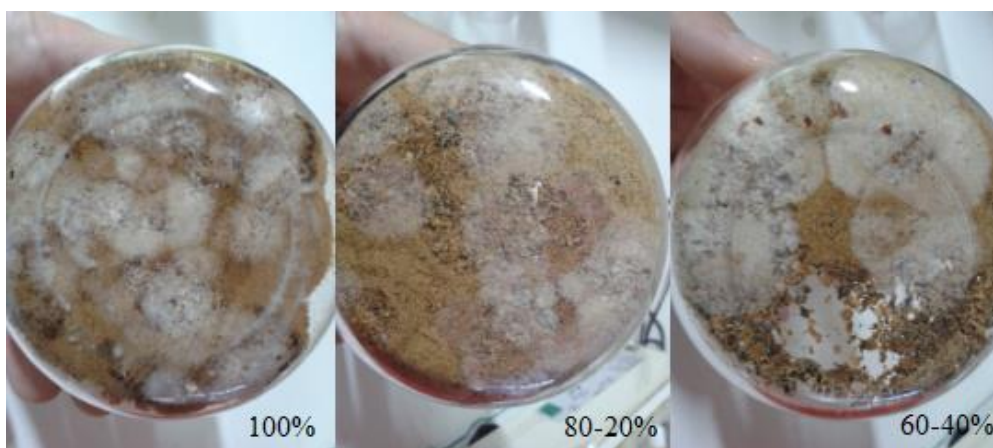
**Κινητική παραγόμενης κόκκινης χρωστικής (500nm), μετά από προσθήκη 0, 20 και 40% ηλιόλευρου σε φλοιό πορτοκάλι (SSF)**



**Γράφημα 3.13:** Προσδιορισμός κόκκινων χρωστικών του στελέχους ATCC 16365 σε τρία διαφορετικά υποστρώματα (0%, 20% και 40% εμπλουτισμός με ηλιόλευρο).

Με βάση το παραπάνω γράφημα και πίνακα, παρατηρείται ότι η προσθήκη 40% ηλιόλευρου έχει τη καλύτερη επίδραση στην παραγωγή κόκκινης χρωστικής σε σχέση με την προσθήκη 20%, με παραγόμενη χρωστική 7.65 AU/g. Επίσης, φαίνεται ότι η προσθήκη πηγής αζώτου αυξάνει την παραγωγή μόνο της κόκκινης χρωστικής (δε παρουσιάζεται αύξηση στις κίτρινες και πορτοκαλί χρωστικές), κάτι που επαληθεύεται

βιβλιογραφικά καθώς η πηγή αζώτου συνδέεται άμεσα με τις κόκκινες χρωστικές. Με βάση μελέτη των Padmavathi et al., (2013), μέγιστες χρωστικές παρατηρήθηκαν όταν προστέθηκε σογιάλευρο στο κόκκινο ρύζι ή αντίστοιχα με προσθήκη γάλακτος σόγιας (Shepherd και Carels, 1983). Επίσης, οι Dikshit και Tallapragada, (2013) δείχνουν ότι η προσθήκη πεπτόνης έχει ως αποτέλεσμα τη μέγιστη παραγόμενη κόκκινη χρωστική για τον *Monascus*, ενώ οι Babitha et al., (2007), για το γένος *Penicillium*. Οι τελευταίοι αναφέρουν ότι η πηγή αζώτου αποτελεί μείζονος σημασίας παράγοντα τόσο για την ανάπτυξη, αλλά και για την παραγωγή κόκκινων χρωστικών.



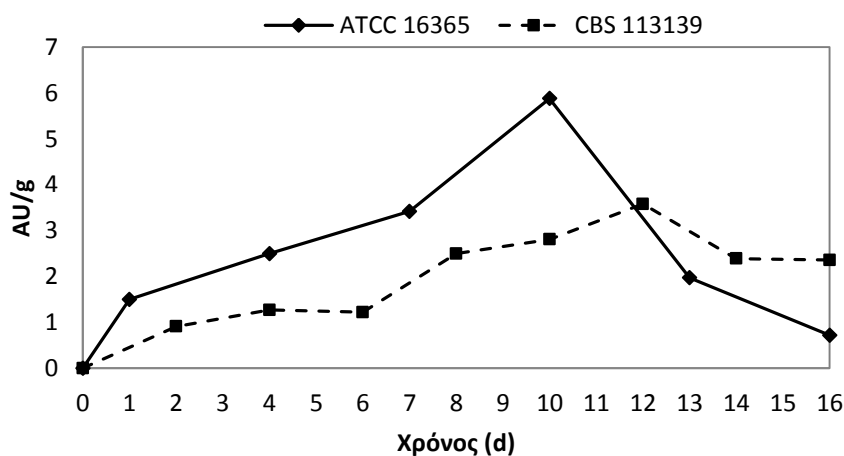
**Γράφημα 3.14:** Μακροσκοπική παρατήρηση κωνικών φιάλων σε ζύμωση στερεάς κατάστασης των υποστρωμάτων φλοιού πορτοκαλιού και φλοιού πορτοκαλιού-ηλιάλευρου σε δύο αναλογίες (80-20% και 60-40%).

### 3.5. Ζυμώσεις στερεάς κατάστασης

#### 3.5.1. Συγκριτική αξιολόγηση των στελεχών *Monascus purpureus* ATCC 16365 και *Penicillium purpurogenum* CBS 113139 ως προς την παραγόμενη κόκκινη

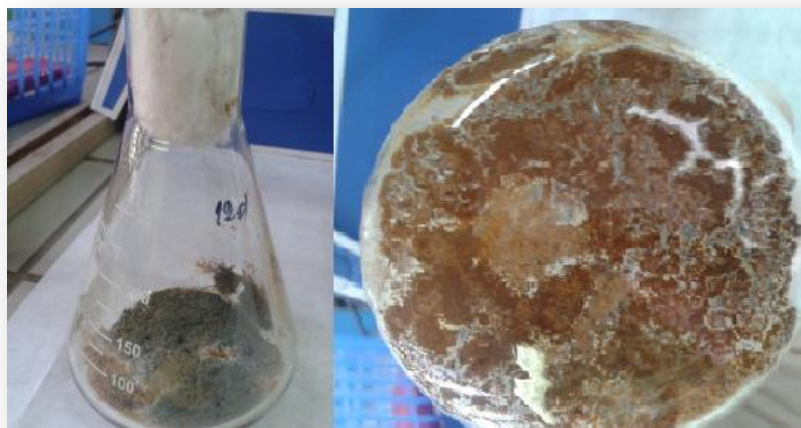
Εν συνεχεία, εφόσον προσδιορίστηκε το βέλτιστο μέγεθος κόκκων υποστρώματος και η μέθοδος εκχύλισης των χρωστικών, πραγματοποιήθηκε μια συγκριτική μελέτη μεταξύ των δύο στελεχών αναφορικά με την παραγωγή χρωστικών στις βέλτιστες συνθήκες καλλιέργειας.

### Προσδιορισμός κόκκινης παραγόμενης χρωστικής σε φλοιό πορτοκάλι (SSF)



*Γράφημα 3.15: Σύγκριση στελεχών ATCC 16365 και CBS 113139, ως προς την παραγόμενη κόκκινη χρωστική συναρτήσει χρόνου ζύμωσης στερεάς κατάστασης.*

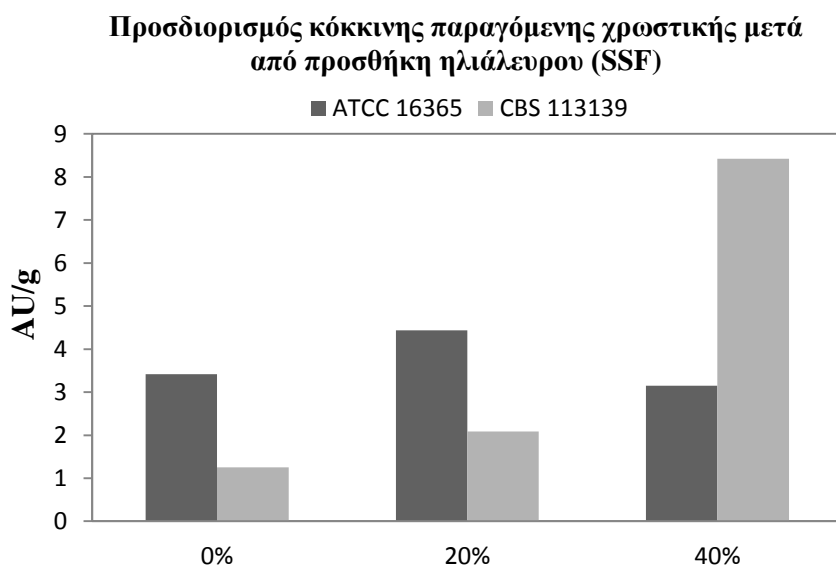
Με βάση το Γράφημα 3.15, παρατηρείται μέγιστη παραγόμενη κόκκινη χρωστική για το στέλεχος ATCC 16365 την 10<sup>η</sup> μέρα ζύμωσης με 5.88AU/g, ενώ για το CBS 113139 την 12<sup>η</sup> μέρα με 3.58 AU/g, ενώ μέχρι και την 12<sup>η</sup> μέρα το στέλεχος ATCC 16365 παράγει περισσότερη κόκκινη χρωστική σε σχέση με το στέλεχος CBS 113139 (από την 12<sup>η</sup>-16<sup>η</sup> μέρα και μετά ισχύει στο αντίθετο).



*Γράφημα 3.16: Μακροσκοπική παρατήρηση ανάπτυξης στελέχους CBS 113139 σε ζύμωσης στερεάς κατάστασης με φλοιό πορτοκαλιού. Παρατηρείται αριστερά η σχεδόν πλήρης κάλυψη του υποστρώματος από το μυκηλιακό γκρί-λευκό θαλλό σε χρόνο μέγιστης παραγόμενης για το στέλεχος, κόκκινης χρωστικής, ενώ δεξιά φαίνεται η κάλυψη της κωνικής φιάλης στον ίδιο χρόνο.*

### 3.5.2. Συγκριτική αξιολόγηση των στελεχών *Monascus purpureus* ATCC 16365 και *Penicillium purpurogenum* CBS 113139 ως προς την παραγόμενη κόκκινη χρωστική, μετά από προσθήκη ηλιάλευρου.

Το παρακάτω πείραμα αποτελεί συνέχεια της μελέτης των παραγόντων που επιδρούν στην παραγωγή χρωστικών και ιδιαίτερα της κόκκινης, στην οποία εστιάζεται και το δεύτερο μέρος της μελέτης. Αυτό συμβαίνει διότι η κόκκινη χρωστική monascorubramine, όχι μόνο έχει αποκτήσει μεγάλη εμπορική αξία σε πολλά τρόφιμα, αλλά παράγεται και από τα δύο στελέχη. Το Γράφημα 3.17 παρουσιάζει την αξιολόγηση των δύο στελεχών, ως προς την παραγωγή κόκκινης χρωστικής σε τρία υποστρώματα (φλοιός πορτοκάλι, 80-20% και 60-40% πορτοκάλι-ηλιάλευρο, μετά από μια εβδομάδα ζύμωσης).



*Γράφημα 3.17: Σύγκριση στελεχών ATCC 16365 και CBS 113139 και αξιολόγηση της επίδρασης προσθήκης αζώτου, ως προς την παραγόμενη κόκκινη χρωστική.*

Η σύγκριση παραγόμενης κόκκινης χρωστικής από τα δύο στελέχη, με βάση το παραπάνω γράφημα, δε γίνεται στη μέγιστη τιμή τους αλλά σε τυχαίο χρόνο ζύμωσης (7d), όπου παρατηρείται ότι στο στέλεχος CBS 113139 επιδρά περισσότερο η προσθήκη ηλιάλευρου, σε σημείο μάλιστα που η παραγόμενη χρωστική 8.43AU/g (7d) να ξεπερνά τη μέγιστη παραγόμενη κόκκινη χρωστική από προηγούμενο διάγραμμα (7.65AU/g, 13d). Για το στέλεχος ATCC 16365 φαίνεται ότι στις 7 ημέρες καλύτερο υπόστρωμα για την



κόκκινη χρωστική είναι το εμπλουτισμένο με 20% ηλιάλευρο, ενώ ακολουθεί με 0% προσθήκη και τέλος με 40% προσθήκη, (4.44 AU/g, 3.41 AU/g και 3.14 AU/g, αντίστοιχα).

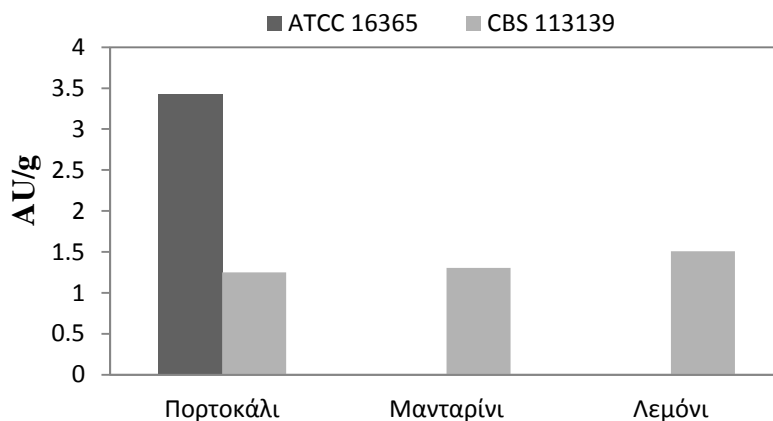


**Γράφημα 3.18:** Μακροσκοπική παρατήρηση στην ανάπτυξη του στελέχους *Penicillium purpurogenum* μετά από 7 μέρες ζύμωσης με υπόστρωμα το φλοιό πορτοκαλιού εμπλουτισμένο με 20% (αριστερά) και 40% (δεξιά) ηλιάλευρου. Στην αριστερή πλευρά κάθε εικόνας φαίνεται το υπόστρωμα χωρίς την ανάπτυξη του μύκητα, ενώ στη δεξιά πλευρά φαίνονται οι δύο επαναλήψεις.

### 3.5.3. Σύγκριση υποστρωμάτων εσπεριδοειδών ως προς την παραγόμενη κόκκινη χρωστική

Επειδή ακριβώς οι ζυμώσεις στερεάς κατάστασης αποτελούν ένα αρκετά φθινό τρόπο αξιοποίησης των αποβλήτων και δεδομένου ότι ο μύκητας *Penicillium purpurogenum* CBS 113139, παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον στην εναλλακτική αξιοποίηση των αποβλήτων, όσον αφορά τις χρωστικές, πραγματοποιήθηκε συγκριτική αξιολόγηση του υποστρώματος φλοιού πορτοκαλιού με άλλα δύο εσπεριδοειδή (μανταρίνι, λεμόνι) που ευδοκιμούν στη χώρα μας, ώστε να διαπιστωθεί η δυνατότητα αξιοποίησής του και από άλλα υποστρώματατα οποία προκύπτουν από απόβλητα χυμοποίησης. Το Γράφημα 3.19 παρουσιάζει τη παραγωγή κόκκινης χρωστικής σε ζύμωση στερεάς κατάστασης με 60-65% αρχική υγρασία και για τα τρία υποστρώματα, μετά από 7 μέρες επώασης.

### Προσδιορισμός κόκκινης παραγόμενης χρωστικής σε φλοιούς εσπεριδοειδών (SSF)



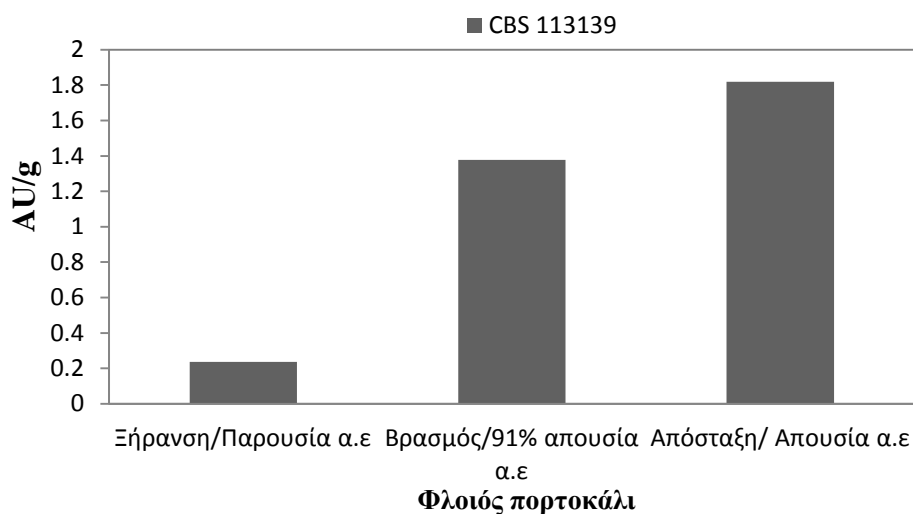
**Γράφημα 3.19:** Προσδιορισμός κόκκινης χρωστικής σε τρία υποστρώματα (πορτοκάλι, μανταρίνι και λεμόνι) με το στέλεχος CBS 113139 και σύγκριση αυτών με το στέλεχος ATCC 16365 (σε ζύμωση φλοιού πορτοκαλιού).

Μετά από 7 μέρες επώασης, η παραγόμενη κόκκινη χρωστική για το στέλεχος ATCC 16365 στο φλοιό πορτοκαλιού προσδιορίστηκε 3,42 AU/g, ενώ για το στέλεχος CBS 113139, 1,25 AU/g (φλοιός πορτοκάλι), 1,31 AU/g (φλοιός μανταρίνι) και 1,51 AU/g (φλοιός λεμόνι), γεγονός το οποίο δείχνει τη δυνατότητα παραγωγής χρωστικών και σε άλλα υποστρώματα, με μεγαλύτερη απόδοση, αλλά όχι τόσο μεγάλη ώστε να ξεπερνά την παραγωγή χρωστικής με το στέλεχος ATCC 16365.

#### 3.5.4 Επίδραση αιθέριων ελαίων με το στέλεχος *Penicillium purpurogenum* CBS 113139

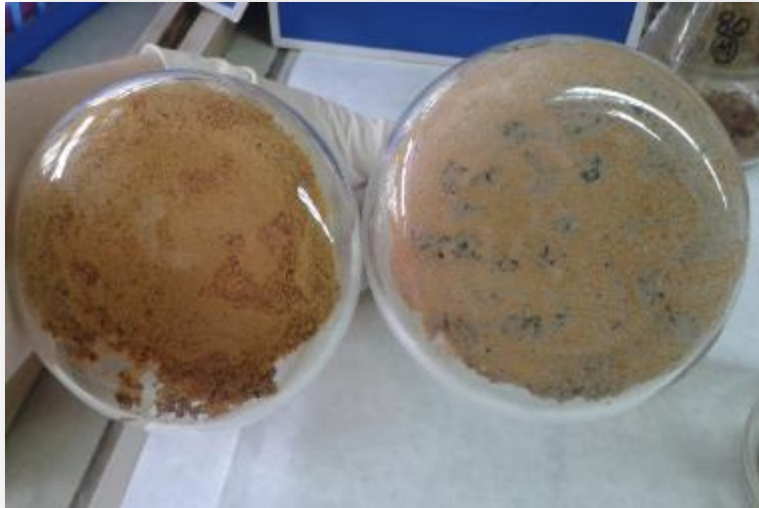
Παρόμοια με το στέλεχος ATCC 16365, εξετάστηκε η επίδραση των αιθέριων ελαίων στη ζύμωση στερεάς κατάστασης από το στέλεχος CBS 113139. Στο παρακάτω Γράφημα παρουσιάζεται συγκριτικά η παραγόμενη κόκκινη χρωστική. Τα υποστρώματα είναι ο αποξηραμένος φλοιός πορτοκάλι και αποξηραμένος φλοιός πορτοκαλιού μετά από βρασμό και μετά από απόσταξη, μετά από 7 μέρες ζύμωσης.

### Προσδιορισμός κόκκινων χρωστικών, παρουσία/απουσία αιθέριων ελαίων (SSF)



**Γράφημα 3.20:** Σύγκριση χρωστικών σε υπόστρωμα με παρουσία, και απουσία χρωστικών (91% και 100%)

Η αφαίρεση αιθέριων ελαίων ευνοεί την παραγωγή κόκκινων χρωστικών σε ζύμωση στερεάς κατάστασης για το στέλεχος *Penicillium purpurogenum* CBS 113139. Η παραγόμενη χρωστική χωρίς την αφαίρεση αιθέριων ελαίων μετά από 7 μέρες ζύμωση σε φλοιό πορτοκαλιού είναι 0.24 AU/g, ενώ μετά από βρασμό (όπου έχει αφαιρεθεί το 91% των αιθέριων ελαίων) είναι 1.38 AU/g και μετά από απόσταξη (αφαίρεση 100% αιθέριων ελαίων) είναι 1.82 AU/g. Επομένως, φαίνεται ότι η απόσταξη είναι η καλύτερη κατεργασία για παραγωγή κόκκινων χρωστικών από το στέλεχος *Penicillium purpurogenum* CBS 113139.



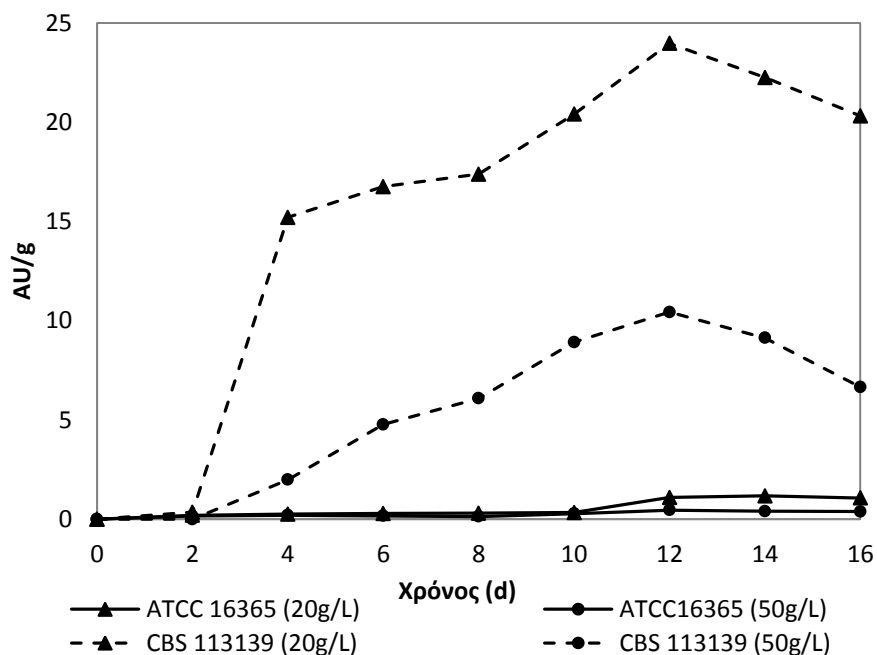
*Γράφημα 3.21: Μακροσκοπική παρατήρηση κωνικών φιάλων. Στην αριστερή πλευρά κάθε εικόνας φαίνεται το υπόστρωμα χωρίς την ανάπτυξη του μύκητα, ενώ στη δεξιά πλευρά φαίνεται η παραγόμενη χρωστική από το στελέχος CBS 113139.*

### **3.6. Ζυμώσεις ημιστερεάς κατάστασης**

#### **3.6.1. Συγκριτική αξιολόγηση των στελεχών *Monascus purpureus* ATCC 16365 και *Penicillium purpurogenum* CBS 113139 ως προς την παραγόμενη κόκκινη χρωστική**

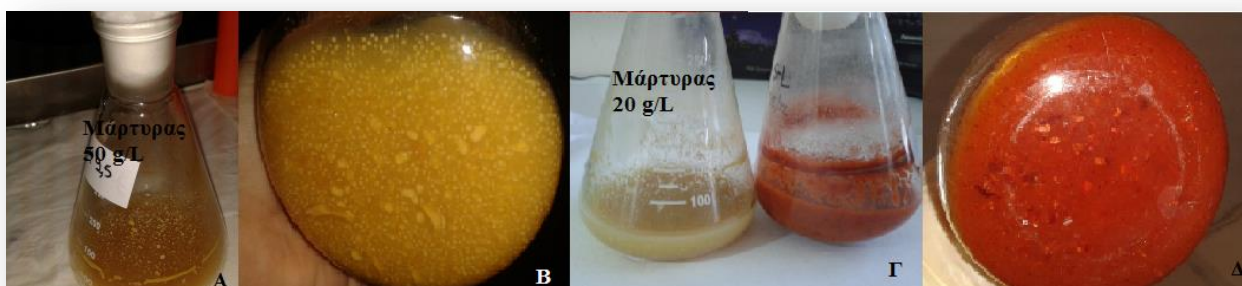
Μετά την συγκριτική μελέτη των δύο στελεχών για τις ζυμώσεις στερεάς κατάστασης, αλλά και τους παράγοντες που επιδρούν σε αυτές, έγινε αξιολόγηση και σε υποστρώματα εναιωρήματος αποξηραμένου φλοιού πορτοκαλιού σε δύο συγκεντρώσεις (20 g/L και 50g/L), με pH 5.5-6.5 καθόλη τη διάρκεια των ζυμώσεων αυτών. Στο Γράφημα 3.22 φαίνονται συγκριτικά οι κόκκινες χρωστικές που παρήχθησαν και από τα δύο στελέχη σε διαφορετικούς χρόνους ζύμωσης.

### Προσδιορισμός κόκκινων χρωστικών σε semi-SSF ζύμωση σε φλοιό πορτοκαλιού



**Γράφημα 3.22:** Παρουσίαση αποτελεσμάτων παραγόμενης χρωστικής και απο τα δύο στελέχη σε υποστρώματα εναιωρήματος φλοιού πορτοκαλιού (20 g/L και 50g/L).

Μέγιστες χρωστικές για το στέλεχος ATCC 16365 είναι 1,17 AU/g (για τα 20g/L, 14<sup>η</sup> μέρα) και 0.45 AU/g (για τα 50g/L, 12<sup>η</sup> μέρα). Αντίστοιχα για το στέλεχος CBS 113139 είναι 23.97 AU/g (για τα 20g/L, 12<sup>η</sup> μέρα) και 10.44 AU/g (για τα 50g/L, 12<sup>η</sup> μέρα). Και για τα δυο στελέχη ευνοείται η παραγωγή χρωστικών στο υπόστρωμα φλοιού πορτοκαλιού (με 20g/L), ενώ μεγιστή παραγόμενη χρωστική και για τα δύο υποστρώματα φλοιού πορτοκαλιού παρουσιάζει το στέλεχος CBS 113139.



**Γράφημα 3.23:** Μακροσκοπική παρατήρηση ημιστερεών ζυμώσεων. (Α): υπόστρωμα εναιωρήματος φλοιού (50g/L). (Β): Σχηματισμός μικρών κίτρινων συσσωματωμάτων (pellets) του στελέχους ATCC 16365 είχε τη μικρότερη απόδοση σε παραγωγή χρωστικής (μέγιστη 0.45 AU/g). (Γ): Αριστερά υπόστρωμα

εναιωρήματος 20g/L χωρίς μύκητα και δεξιά χρωματισμός ζυμούμενου με το στέλεχος CBS 113139, υποστρώματος που είχε την καλύτερη απόδοση κόκκινης χρωστικής στις ημιστερεές ζυμώσεις (23.97 AU/g). (Δ): χρωματισμός όλου του υποστρώματος εναιωρήματος 20g/L από τον CBS 113139.

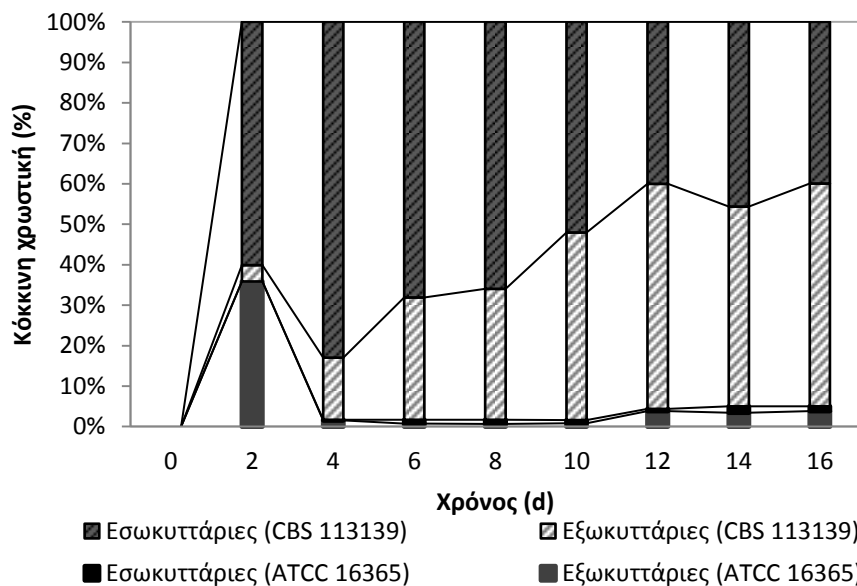
### 3.6.2. Συγκριτική αξιολόγηση των στελεχών *Monascus purpureus* ATCC 16365 και *Penicillium purpurogenum* CBS 113139 ως προς την παραγόμενη εσωκυττάρια και εξωκυττάρια χρωστική

Ο Πίνακας 3.4 και τα Γραφήματα 3.24-3.29, παρουσιάζουν συγκριτικά την παραγόμενη εσωκυττάρια και εξωκυττάρια χρωστική των δύο στελεχών στις ζυμώσεις στερεάς κατάστασης.

**Πίνακας 3.4:** Συνοπτική παρουσίαση εσωκυττάρια και εξωκυττάρια χρωστικών των δύο στελεχών σε υποστρώματα εναιωρήματος φλοιού πορτοκαλιού συγκεντρώσεων 20 g/L και 50g/L.

Χρόνος ζύμωσης (d)	20g/L				50g/L			
	ATCC 16365		CBS 113139		ATCC 16365		CBS 113139	
	extra	intra	extra	intra	extra	intra	extra	intra
	AU/g							
0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0.20	0	0.02	0.33	0.16	0	0	0
4	0.24	0.021	2.37	12.84	0.18	0.02	0.49	1.50
6	0.13	0.16	5.15	11.61	0.094	0.075	2.05	2.72
8	0.12	0.18	5.72	11.67	0.10	0.03	2.31	3.77
10	0.17	0.17	9.62	10.80	0.16	0.12	4.10	4.81
12	0.95	0.14	13.94	10.03	0.42	0.03	4.95	5.49
14	0.81	0.36	11.56	10.69	0.35	0.06	4.57	4.56
16	0.82	0.25	11.78	8.54	0.34	0.05	3.24	3.41

**Αναλογική σύγκριση εξω-/εσω-κυττάρων χρωστικών  
σε εναιώρημα φλοιού (20 g/L)**

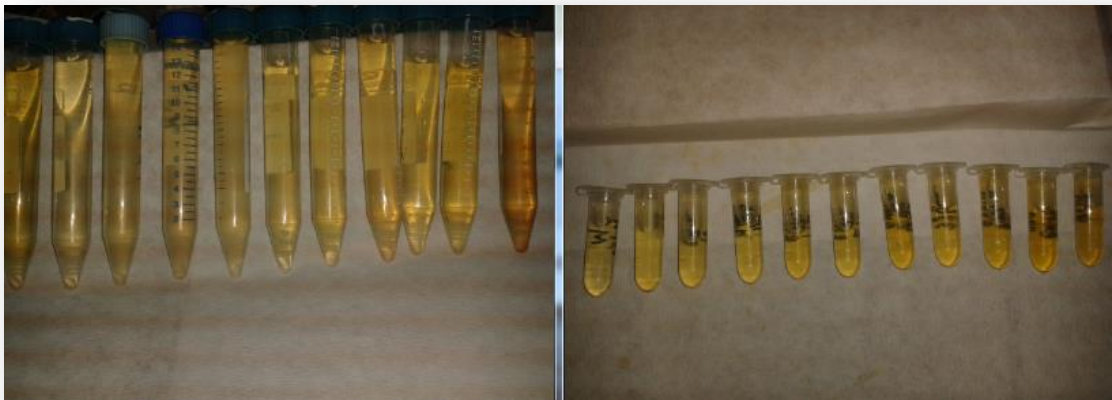


*Γράφημα 3.24: Προσδιορισμός κόκκινης εσωκυττάριας και εξωκυττάριας χρωστικής των δύο στελεχών σε υποστρώματα εναιωρήματος φλοιού πορτοκαλιού συγκεντρώσεως 20 g/L.*

Το παραπάνω γράφημα απεικονίζει την αναλογική σύγκριση παραγόμενης χρωστικής, ανάμεσα και στα δύο στελέχη, και πιο συγκεκριμένα συγκρίνει αναλογικά τις εξωκυττάριας και εσωκυττάριας χρωστικές που παράγονται και για τις δύο ζυμώσεις, στο υπόστρωμα εναιωρήματος φλοιού πορτοκαλιού (20g/L). Φαίνεται ότι, πέρα από τη μέγιστη χρωστική στη ζύμωση με το στέλεχος CBS 113139 που αναφέρεται παραπάνω, το συγκεκριμένο στέλεχος υπερτερεί εσωκυττάριας από ότι εξωκυττάριας χρωστικών (2<sup>η</sup>-10<sup>η</sup> μέρα), ενώ καθώς προχωρά η διαδικασία ζύμωσης, η αναλογία αλλάζει (12<sup>η</sup>-16<sup>η</sup>). Στη μέγιστη του χρωστική (12<sup>η</sup> μέρα) οι εξωκυττάριας είναι περισσότερες από ότι οι εσωκυττάριας. Αντίστοιχα για το στέλεχος ATCC 16365 φαίνεται ότι μέχρι και την 4<sup>η</sup> μέρα, η αναλογία εσωκυττάριας/εξωκυττάριας είναι μεγαλύτερη, ενώ στην 12<sup>η</sup>-16<sup>η</sup> μέρα υπερτερούν οι εξωκυττάριας (στην 12<sup>η</sup>-16<sup>η</sup> μέρα παράγονται οι μέγιστες χρωστικές για το στέλεχος στη συγκεκριμένη ζύμωση).



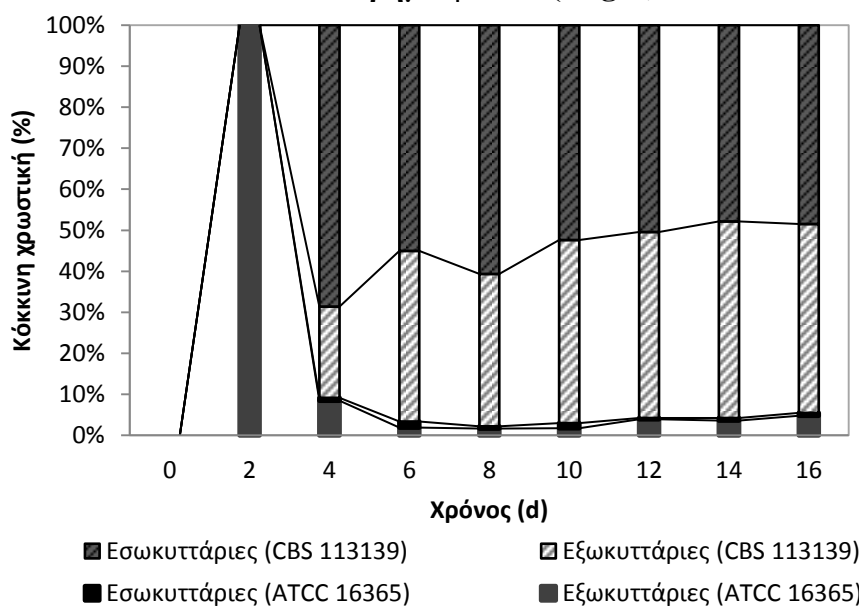
*Γράφημα 3.25: Παρουσίαση αλλαγής χρώματος του στελέχους CBS 113139 σε ζύμωση ημιστερεάς κατάστασης (εναιώρημα  $c=20$  g/L), συναρτήσει χρόνου. Αριστερά παρουσιάζονται τα αιθανολικά εκχυλίσματα εσωκυττάρων χρωστικών και δεξιά τα υδατικά διαλύματα εξωκυττάρων χρωστικών.*



*Γράφημα 3.26.: Παρουσίαση αλλαγής χρώματος του στελέχους ATCC 16365 σε ζύμωση ημιστερεάς κατάστασης (εναιώρημα  $c=20$  g/L), συναρτήσει χρόνου. Αριστερά παρουσιάζονται τα αιθανολικά εκχυλίσματα εσωκυττάρων χρωστικών και δεξιά τα υδατικά διαλύματα εξωκυττάρων χρωστικών.*



**Αναλογική σύγκριση εξω-/εσω-κυττάρων χρωστικών σε εναιώρημα φλοιού (50 g/L)**



*Γράφημα 3.27: Προσδιορισμός κόκκινης εσωκυττάριας και εξωκυττάριας χρωστικής των δύο στελεχών σε υποστρώματα εναιωρήματος φλοιού πορτοκαλιού συγκεντρώσης 50 g/L.*

Αντίστοιχα στο Γράφημα 3.28 ζύμωσης σε εναιώρημα φλοιού (50g/L), παρατηρείται μεγαλύτερη παραγόμενη χρωστική από το στέλεχος CBS 113139. Με μικρές διαφορές, η αναλογία εσωκυττάρων και εξωκυττάρων χρωστικών από το συγκεκριμένο στέλεχος έχει την ίδια τάση με το προηγούμενο γράφημα, δηλαδή μέχρι τη 10<sup>η</sup> μέρα οι εσωκυττάρια είναι περισσότερες, ενώ από την 12<sup>η</sup> μέρα είναι οι εξωκυττάρια. Αντίθετα, με το προηγούμενο διάγραμμα, οι εξωκυττάρια χρωστικές που παράγει το στέλεχος ATCC 16365 είναι σε όλη τη διάρκεια περισσότερες από ότι τις εσωκυττάρια.



**Γράφημα 3.28:** Παρουσίαση αλλαγής χρώματος του στελέχους CBS 113139 σε ζύμωση ημιστερέας κατάστασης (εναιώρημα  $c=50$  g/L), συναρτήσει χρόνου. Αριστερά παρουσιάζονται τα αιθανολικά εκχυλίσματα εσωκυττάρων χρωστικών και δεξιά τα υδατικά διαλύματα εξωκυττάρων χρωστικών.



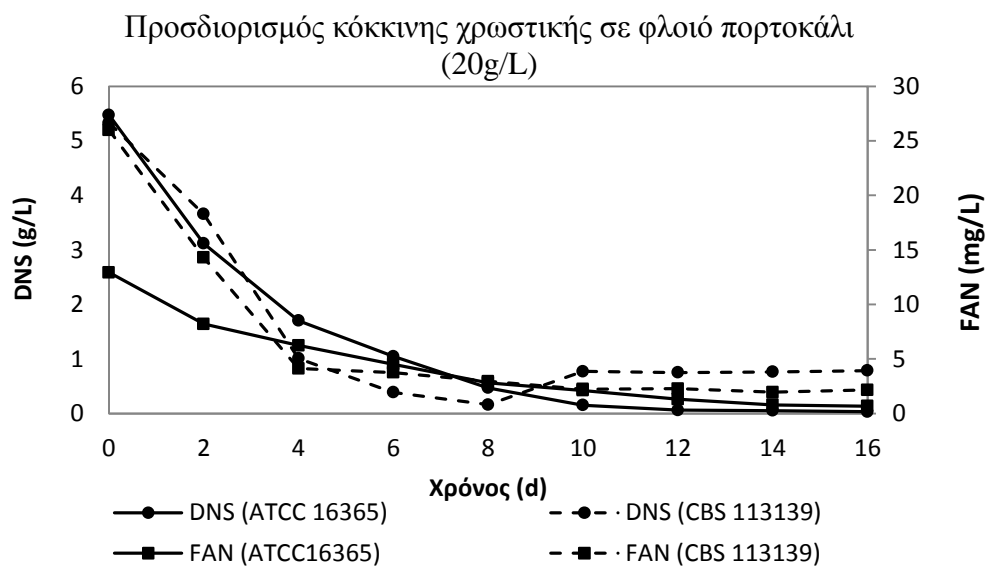
**Γράφημα 3.29:** Παρουσίαση αλλαγής χρώματος του στελέχους ATCC 16365 σε ζύμωση ημιστερέας κατάστασης (εναιώρημα  $c=50$  g/L), συναρτήσει χρόνου. Αριστερά παρουσιάζονται τα αιθανολικά εκχυλίσματα εσωκυττάρων χρωστικών και δεξιά τα υδατικά διαλύματα εξωκυττάρων χρωστικών.

### 3.6.3. Συγκριτική αξιολόγηση των στελεχών *Monascus purpureus* ATCC 16365 και *Penicillium purpurogenum* CBS 113139 ως προς την κατανάλωση σακχάρων (DNS) και αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων (FAN)

Για να γίνει πιο κατανοητή η συμπεριφορά στην ανάπτυξη των στελεχών και κατά συνέπεια στην παραγωγή κόκκινης χρωστικής, πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις κατανάλωσης σακχάρων και αζώτου για την κάθε ζύμωση συναρτήσει χρόνου. Τα αποτελέσματα απεικονίζονται στα παρακάτω Γραφήματα 3.30 και 3.31, καθώς και από τον συγκεντρωτικό Πίνακα 3.5.

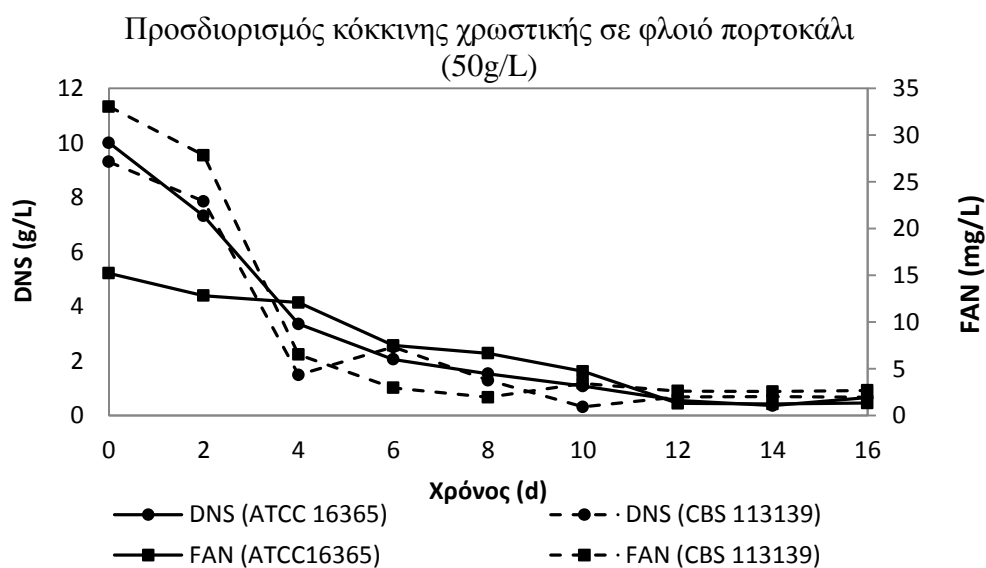
**Πίνακας 3.5:** Παρουσίαση αποτελεσμάτων των δύο στελεχών για τα δύο υποστρώματα (εναιώρημα 20 g/L και 50 g/L), ως προς την κατανάλωση σακχάρων και αζώτου ελεύθερων αμινομάδων (%) και ως προς την κόκκινη παραγόμενη χρωστική (AU/g).

	Χρόνος επώασης (d)	20g/L			50g/L		
		DNS (%)	FAN (%)	Κόκκινη χρωστική (AU/g)	DNS (%)	FAN (%)	Κόκκινη χρωστική (AU/g)
ATCC 16365	4	68.9	51.69	0,25	66.47	20.63	0,2
	8	91.42	78.23	0,3	84.7	56.26	0,13
	12	98.88	89.84	1,09	94.5	91.57	0,45
	16	99.38	94.7	1,07	93.4	91.3	0,39
CBS 113139	4	81.02	84.14	15,2	84.04	80.27	1,5
	8	96.98	88.65	17,38	86.18	94.14	3,77
	12	85.86	91.27	23,97	92.64	92.08	5,49
	16	85.19	91.72	20,32	92.84	91.91	3,41



*Γράφημα 3.30: Κατανάλωση σακχάρων (μέθοδος DNS) και αζώτου (μέθοδος FAN) των δύο στελεχών σε υποστρώματα εναιωρήματος φλοιού πορτοκαλιού συγκεντρώσεως 20 g/L.*

Παρατηρείται ότι και για τα δύο στελέχη η κατανάλωση της γλυκόζης αλλά και του αζώτου ελεύθερων αμινομάδων τις πρώτες τέσσερις μέρες είναι πάνω από 50%, κάτι το οποίο επιβεβαιώνει ότι οι χρωστικές αποτελούν δευτερογενείς μεταβολίτες, των οποίων η ανάπτυξη ευνοείται όταν οι συνθήκες ανάπτυξής τους δεν είναι επαρκείς. Επίσης, μετά την 4<sup>η</sup> μέρα που έχει καταναλωθεί και στα δύο υποστρώματα πάνω από το 80% των σακχάρων και αζώτου, παράγονται οι μέγιστες συγκριτικά χρωστικές από το στέλεχος CBS 113139..



*Γράφημα 3.31: Κατανάλωση σακχάρων (μέθοδος DNS) και αζώτου (μέθοδος FAN) των δύο στελεχών σε υποστρώματα εναιωρήματος φλοιού πορτοκαλιού συγκεντρώσεως 50 g/L.*

Αντίστοιχα, από το παραπάνω γράφημα από το οποίο φαίνεται ότι το συγκεκριμένο υπόστρωμα έχει αρχική συγκέντρωση σακχάρων περίπου 10 g/L για τον ATCC 16365 και 9,3 g/L για τον CBS 113139, η κατανάλωση των θρεπτικών από τον CBS 113139 και τον ATCC 16365 είναι υψηλότερη μέχρι την 4<sup>η</sup> μέρα, ενώ και σε αυτό το υπόστρωμα, επιτυγχάνεται παραγωγή μέγιστων χρωστικών μετά την κατανάλωση όλων των θρεπτικών.

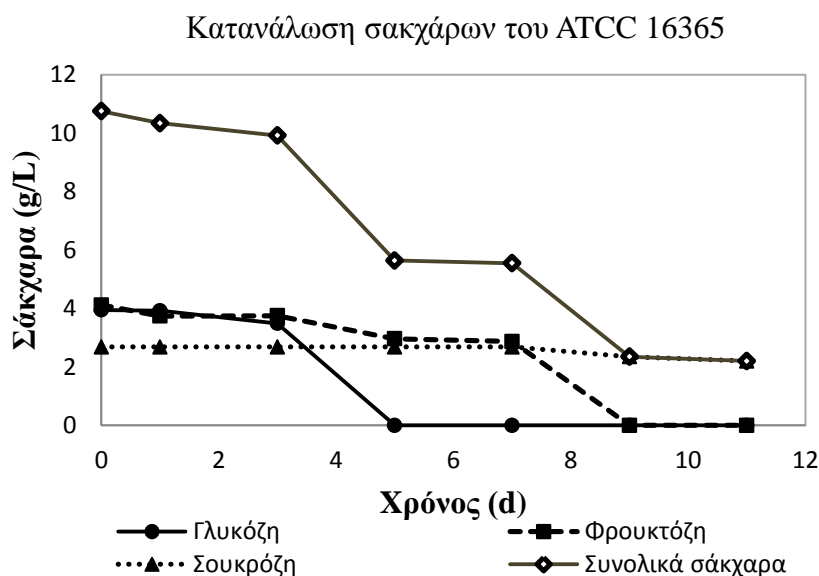
### 3.7. Ζυμώσεις βυθού

#### 3.7.1. Ποσοτικός προσδιορισμός κατανάλωσης σακχάρων με HPLC *Monascus purpureus* ATCC 16365 σε διήθημα βρασμένου φλοιού πορτοκαλιού

Στο διήθημα του βρασμένου φλοιού πορτοκαλιού πραγματοποιήθηκε ανάλυση με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) προκειμένου να χαρακτηριστούν τα επιμέρους σάκχαρα που περιέχονται. Επίσης, προσδιορίστηκε η κατανάλωση των σακχάρων κατά τη διάρκεια της ζύμωσης από το συγκεκριμένο στέλεχος, όπως παρουσιάζεται στον Πίνακα 3.6

**Πίνακας 3.6:** παρουσίαση κατανάλωση σακχάρων του στελέχους ATCC 16365.

Χρόνος ζύμωσης (d)	Γλυκόζη	Φρουκτόζη (g/L)	Σουκρόζη	Συνολικά σάκχαρα (g/L)	(%)
0	3.95	4.12	2.68	10.75	-
1	3.92	3.74	2.68	10.34	3.81
3	3.49	3.75	2.68	9.92	7.72
5	0	2.96	2.68	5.64	47.53
7	0	2.87	2.68	5.55	48.37
9	0	0	2.35	2.35	78.14
11	0	0	2.2	2.2	79.53

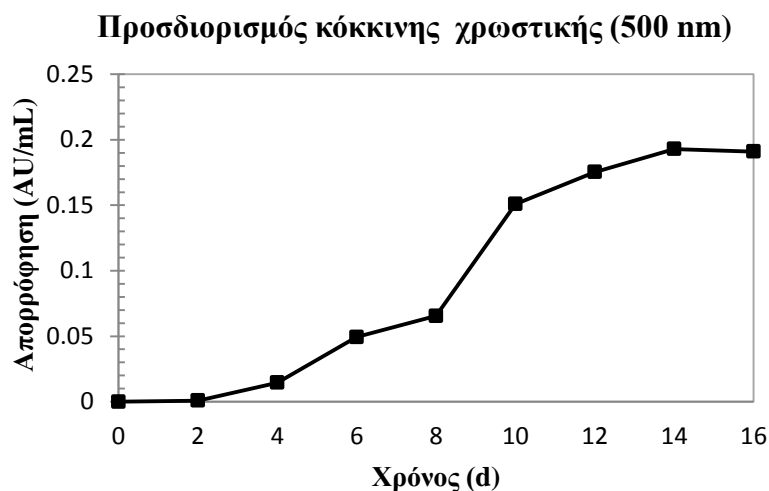


*Γράφημα 3.32: Κατανάλωση σακχάρων με HPLC συναρτήσει χρόνου ζύμωσης.*

Από το Γράφημα 3.32 και τον Πίνακα 3.6, φαίνεται ότι το στέλεχος ATCC 16365 καταναλώνει πρώτα τη γλυκόζη, μετά τη φρουκτόζη και μετά τη σακχαρόζη, ενώ φαίνεται ότι μέχρι και την 11<sup>η</sup> μέρα έχει παραμείνει μόνο η σακχαρόζη σαν πηγή άνθρακα στο υγρό υπόστρωμα (2.2 g/L), το οποίο έχει αρχική συγκέντρωση σακχάρων 10.75 g/L.

### **3.7.2. Προσδιορισμός κόκκινης χρωστικής, TDW (g/L), κατανάλωσης σακχάρων και αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων σε υπόστρωμα Czapek Broth με το στέλεχος *Penicillium purpurogenum*.**

Σκοπός του συγκεκριμένου πειράματος ήταν να διαπιστωθεί η κινητική πορεία παραγωγής χρωστικών, με βάση την οποία εξασφαλίζονται ευνοϊκές συνθήκες για το συγκεκριμένο στέλεχος (το συγκεκριμένο υπόστρωμα είναι αυτό που ενδείκνυται άλλωστε για την ανάπτυξη του μύκητα βάσει της συλλογής CBS). Οι τιμές pH κυμαίνονται 5-6.5 στη διάρκεια της ζύμωσης.



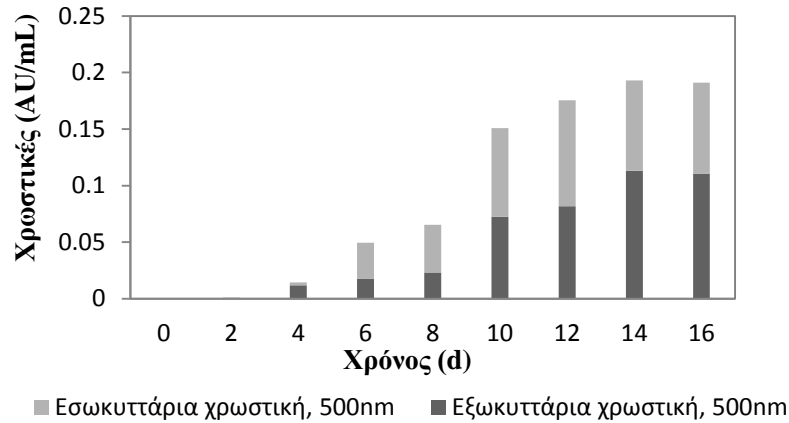
**Γράφημα 3.33:** Κινητική πορεία παραγωγής κόκκινης χρωστικής του *Penicillium purpurogenum*.

Παρατηρείται ότι η μέγιστη παραγόμενη κόκκινη χρωστική είναι την 14<sup>η</sup> μέρα ζύμωσης με 0.193 AU/mL. Επίσης, μετά την 8<sup>η</sup> μέρα ζύμωσης παρατηρούνται οι μεγαλύτερες τιμές των χρωστικών.



**Γράφημα 3.34:** Παραγωγή χρωστικών (κίτρινης, κόκκινης) από το *Penicillium purpurogenum* σε διάφορες χρονικές στιγμές ζύμωσης.

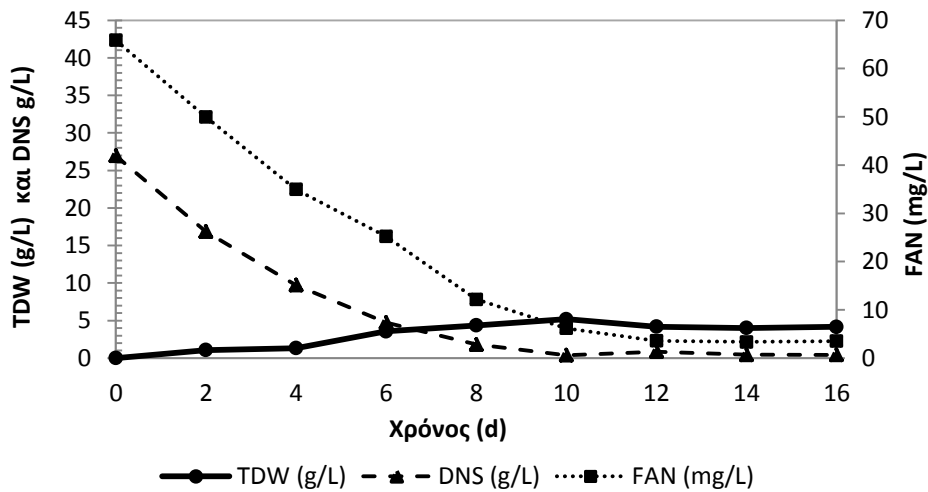
### Αναλογική σύγκριση εξωκυττάριας/ εσωκυττάριας κόκκινης χρωστικής



**Γράφημα 3.35:** Προσδιορισμός εσωκυττάριας και εξωκυττάριας χρωστικής.

Στο παραπάνω γράφημα, παρατηρείται ότι μέχρι και την 4<sup>η</sup> μέρα δεν υπάρχει παραγωγή εσωκυττάριας χρωστικής, ενώ ακολούθως από την 6<sup>η</sup>-8<sup>η</sup> μέρα υπερτερούν οι εσωκυττάριας χρωστικές από τις εξωκυττάριας. Μετά την 8<sup>η</sup> μέρα μέχρι και το τέλος της ζύμωσης, φαίνεται ότι οι εξωκυττάριας χρωστικές υπερτερούν των εσωκυττάριας.

### Προσδιορισμός DNS, FAN, TDW του CBS 113139



**Γράφημα 3.36:** Προσδιορισμός DNS, FAN, TDW του CBS 113139

Σύμφωνα με το Γράφημα 3.36, παρατηρείται ότι η αρχική τιμή μέτρησης DNS είναι 26.9 g/L, ενώ η αρχική μέτρηση FAN 65.88 mg/L. Επίσης παρατηρούμε ότι ουσιαστικά ο μικροοργανισμός αρχίζει να αναπτύσσεται με γρηγορότερο ρυθμό μετά την 4<sup>η</sup> μέρα ζύμωσης με μέγιστη βιομάζα την 10<sup>η</sup> μέρα (5.20 g/L). Λαμβάνονται υπόψη και



το προηγούμενο Γράφημα 3.35 τεκμαίρεται ότι ενώ η μέγιστη βιομάζα είναι την 10<sup>η</sup> μέρα, η μέγιστη χρωστική είναι την 14<sup>η</sup> μέρα.

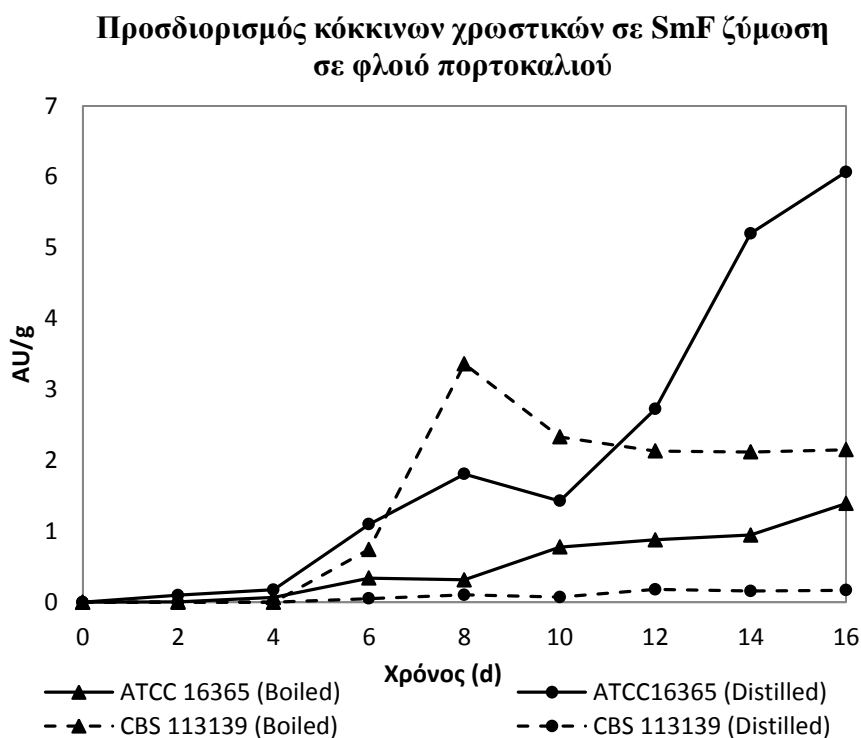
**Πίνακας 3.7:** Παραγόμενη χρωστική και βιομάζα, % κατανάλωση σακχάρων και αζώτου, συναρτήσει χρόνου του στελέχους CBS 113139.

Χρόνος ζύμωσης (d)	Κόκκινη χρωστική (AU/mL)	DNS (%)	FAN (%)	TDW (g/L)
0	0	37.5	24.15	0
2	0.001	63.87	46.95	1.07
4	0.014	82.38	61.72	1.33
6	0.049	93.29	81.53	3.57
8	0.065	98.55	90.63	4.35
10	0.151	96.85	94.55	5.20
12	0.175	98.33	94.90	4.18
14	0.193	98.44	94.67	4.01
16	0.191	37.5	24.15	4.16

Τα συγκεντρωτικά αποτελέσματα παρουσιάζουν ότι μετά την 8<sup>η</sup> μέρα όπου και έχει καταναλωθεί πάνω από το 90% της γλυκόζης και του αζώτου ελεύθερων αμινομάδων υπάρχει η μέγιστη βιομάζα, ενώ ταυτόχρονα υπάρχει μεγαλύτερος ρυθμός παραγόμενης χρωστικής, καθώς από εκείνο το σημείο και μετά οι συνθήκες σταματάνε να ευνοούν την αύξηση του μύκητα και επομένως αυξάνονται και οι δευτερογενείς μεταβολίτες, ένας από τους οποίους και η χρωστική.

### 3.7.3. Συγκριτική αξιολόγηση των στελεχών *Monascus purpureus* ATCC 16365 και *Penicillium purpurogenum* CBS 113139 ως προς την παραγόμενη κόκκινη χρωστική

Στα επόμενα πειράματα αξιολογήθηκε η δυνατότητα ανάπτυξης και παραγωγής χρωστικών των δύο μυκητιακών στελεχών σε υγρές καλλιέργειες χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα το υγρό που προέρχεται από το βράσιμο και την απόσταξη του φλοιού πορτοκαλιού. Στο παρακάτω Γράφημα 3.37, παρουσιάζεται η παραγωγή χρωστικών κατά τη διάρκεια της ζύμωσης και για τα δύο στελέχη χρησιμοποιώντας τα δυο υποστρώματα.



*Γράφημα 3.37: Προσδιορισμός κόκκινων χρωστικών σε SmF ζύμωση σε φλοιό πορτοκαλιού (μετά από βρασμό και μετά από απόσταξη).*

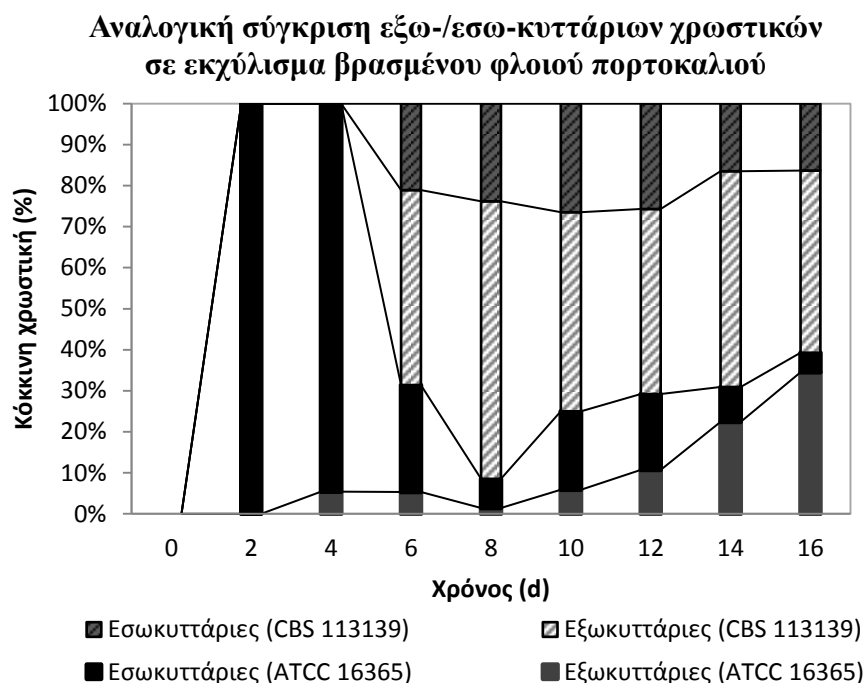
Με βάση το Γράφημα 3.37, παρατηρείται ότι καλύτερο υπόστρωμα για παραγωγή κόκκινης χρωστικής είναι το διήθημα φλοιού μετά από απόσταξη σε σύγκριση με το εκχύλισμα φλοιού μετά από βρασμό. Επίσης, αναφορικά με το στέλεχος ATCC 16365 παρατηρείται ότι ευνοεί την παραγωγή χρωστικής και στα δύο υποστρώματα σε σχέση με το στέλεχος CBS 113139, με μέγιστες χρωστικές τα 6.07 AU/g (16<sup>η</sup> μέρα) για το υπόστρωμα από αποσταγμένο φλοιό και 1.4 AU/g (16<sup>η</sup> μέρα) για το υπόστρωμα από βρασμένο φλοιό, έναντι των 0.18 AU/g (12<sup>η</sup> μέρα) και 3.36 AU/g (8<sup>η</sup> μέρα), αντίστοιχα. Ο καλύτερος συνδυασμός για τη χρωστική είναι το στέλεχος ATCC 16365 σε υγρό υπόστρωμα από αποσταγμένο φλοιό και μετά ακολουθεί το στέλεχος CBS 113139 σε υγρό υπόστρωμα από βρασμένο φλοιό.

#### **3.7.4. Συγκριτική αξιολόγηση των στελεχών *Monascus purpureus* ATCC 16365 και *Penicillium purpurogenum* CBS 113139 ως προς την αναλογία εσωκυττάριας/εξωκυττάριας χρωστικής**

Ο Πίνακας 3.8 και τα Γραφήματα 3.38- 3.43, παρουσιάζουν συγκριτικά την παραγόμενη εσωκυττάρια και εξωκυττάρια χρωστική των δύο στελεχών στις ζυμώσεις βυθού.

**Πίνακας 3.8:** Συνοπτική παρουσίαση εσωκυττάρων και εξωκυττάρων χρωστικών των δύο στελεχών σε υποστρώματα βρασμένου και απεσταγμένου διηθήματος.

Χρόνος ζύμωσης (d)	Boiled				Distilled			
	ATCC 16365		CBS 113139		ATCC 16365		CBS 113139	
	extra	intra	extra	intra	extra	intra	extra	intra
	AU/g							
0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0.0061	0	0	0.10	0	0	0
4	0.004	0.06	0	0	0.06	0.11	0.001	0
6	0.057	0.28	0.52	0.23	0.11	0.98	0.001	0.051
8	0.05	0.26	2.48	0.87	0.10	1.71	0.03	0.07
10	0.18	0.59	1.51	0.82	0.04	1.39	0.03	0.04
12	0.32	0.56	1.36	0.77	0.15	2.57	0.14	0.04
14	0.69	0.26	1.61	0.51	0.43	4.77	0.096	0.06
16	1.22	0.17	1.57	0.58	0.54	5.53	0.12	0.05



**Γράφημα 3.38:** Προσδιορισμός κόκκινης εσωκυττάριας και εξωκυττάριας χρωστικής των δύο στελεχών σε υπόστρωμα βρασμένου υγρού από φλοιό πορτοκαλιού.

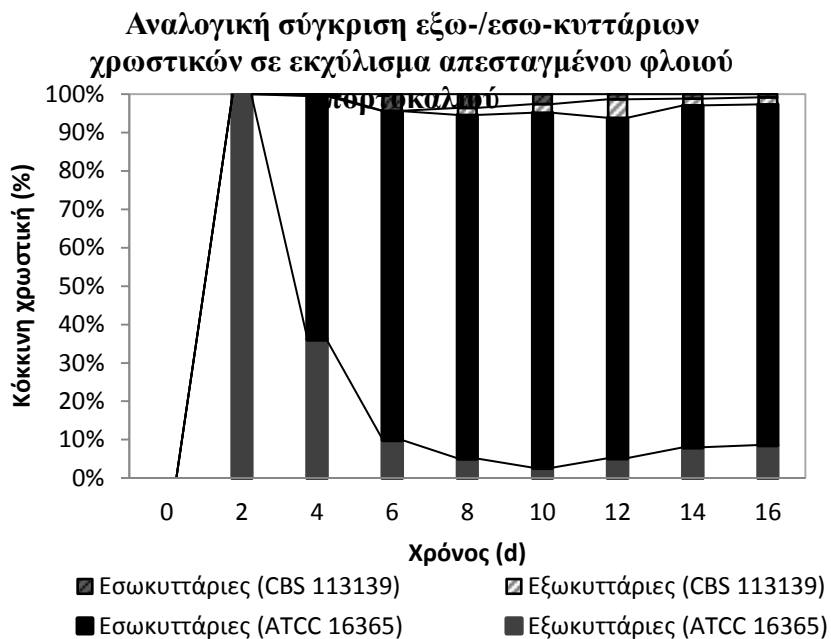
Για το υγρό υπόστρωμα βρασμένου φλοιού πορτοκαλιού, στο οποίο είχε μεγαλύτερη παραγόμενη χρωστική το στέλεχος CBS 113139, παρατηρείται ότι από την 6<sup>η</sup> μέρα και μετά, το συγκεκριμένο στέλεχος παράγει περισσότερες εξωκυττάρια από ότι εσωκυττάρια χρωστικές (όπως και στην 8<sup>η</sup> μέρα που έχει μέγιστη χρωστική). Παρόμοια, το στέλεχος ATCC 16365, μέχρι και την 12<sup>η</sup> μέρα παράγει περισσότερες εσωκυττάρια .



**Γράφημα 3.39:** Παρουσίαση αλλαγής χρώματος του στελέχους CBS 113139 σε ζύμωση βυθού (υγρό από βρασμένο πορτοκάλι), συναρτήσει χρόνου. Αριστερά παρουσιάζονται τα αιθανολικά εκχυλίσματα εσωκυττάρων χρωστικών και δεξιά τα υδατικά διαλύματα εξωκυττάρων χρωστικών.



**Γράφημα 3.40:** Παρουσίαση αλλαγής χρώματος του στελέχους ATCC 16365 σε ζύμωση βυθού (υγρό από βρασμένο πορτοκάλι), συναρτήσει χρόνου. Αριστερά παρουσιάζονται τα αιθανολικά εκχυλίσματα εσωκυττάρων χρωστικών και δεξιά τα υδατικά διαλύματα εξωκυττάρων χρωστικών.

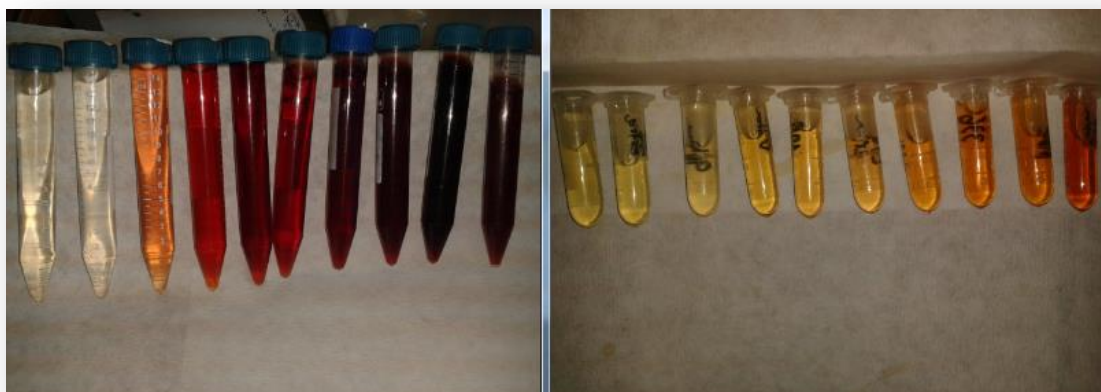


*Γράφημα 3.41: Προσδιορισμός κόκκινης εσωκυττάριας και εξωκυττάριας χρωστικής των δύο στελεχών σε υπόστρωμα αποσταγμένου υγρού από φλοιό πορτοκαλιού.*

Αναφορικά με το υγρό υπόστρωμα αποσταγμένου φλοιού πορτοκαλιού, στο οποίο είχε μεγαλύτερη παραγόμενη χρωστική το στέλεχος ATCC 16365, παρατηρείται ότι από την 4<sup>η</sup> μέρα και μετά, το συγκεκριμένο στέλεχος παράγει περισσότερες εσωκυττάριας από ότι εξωκυττάριας χρωστικές (όπως και στην 16<sup>η</sup> μέρα που έχει μέγιστη χρωστική). Αντίστοιχα, το στέλεχος CBS 113139, μέχρι και την 10<sup>η</sup> μέρα παράγει περισσότερες εσωκυττάριας χρωστικές, ενώ από τη 12<sup>η</sup>-16<sup>η</sup> μέρα που παράγεται και η μέγιστη χρωστική (16<sup>η</sup>), οι εξωκυττάριας υπερτερούν.



*Γράφημα 3.42: Παρουσίαση αλλαγής χρώματος του στελέχους CBS 113139 σε ζύμωση βυθού (υγρό από αποσταγμένο πορτοκάλι), συναρτήσει χρόνου. Αριστερά παρουσιάζονται τα αιθανολικά εκχυλίσματα εσωκυττάριας χρωστικών και δεξιά τα υδατικά διαλύματα εξωκυττάριας χρωστικών.*



**Γράφημα 3.43:** Παρουσίαση αλλαγής χρώματος του στελεχούς ATCC 16365 σε ζύμωση βυθού (υγρό από αποσταγμένο πορτοκάλι), συναρτήσει χρόνου. Αριστερά παρουσιάζονται τα αιθανολικά εκχυλίσματα εσωκοιτιών χρωστικών και δεξιά τα υδατικά διαλύματα εξωκοιτιών χρωστικών.

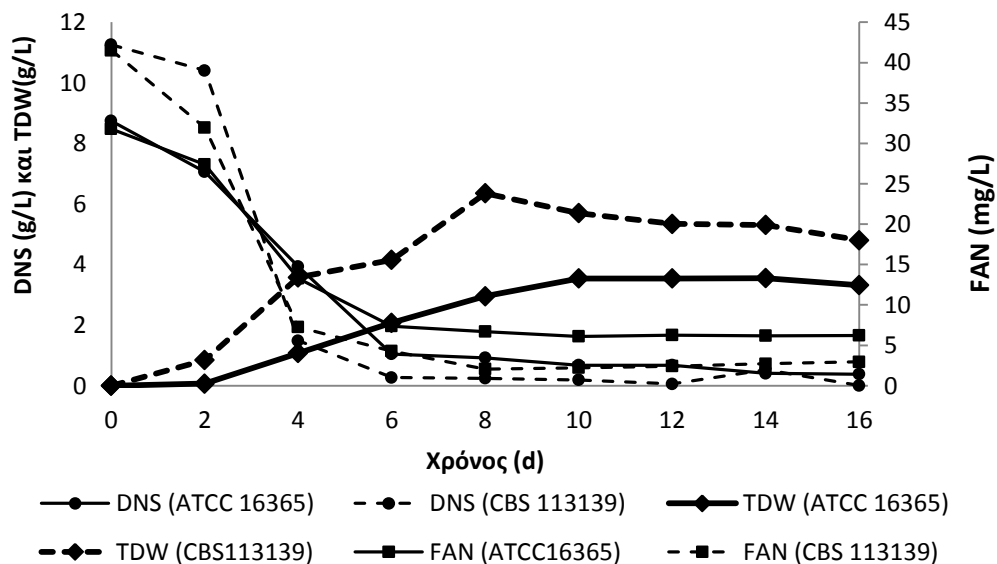
### 3.7.5. Συγκριτική αξιολόγηση των στελεχών *Monascus purpureus* ATCC 16365 και *Penicillium purpurogenum* CBS 113139 ως προς την κατανάλωση σακχάρων (DNS) αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων (FAN) και βιομάζας (TDW)

Αντίστοιχη αξιολόγηση με τις ζυμώσεις ημιστερεάς κατάστασης, έγινε και στην περίπτωση των ζυμώσεων βυθού, ώστε να εξεταστεί αναλυτικότερα η ανάπτυξη στελεχών και η παραγωγής χρωστικής. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.9 και στα Διαγράμματα 3.44-3.46:

**Πίνακας 3.9:** Παρουσίαση αποτελεσμάτων των δύο στελεχών για τα δύο υποστρώματα (βρασμένο διήθημα, αποσταγμένο διήθημα), ως προς την κατανάλωση σακχάρων και αζώτου ελεύθερων αμινομάδων (%) και ως προς την κόκκινη παραγόμενη χρωστική (AU/g) αλλά και βιομάζα (g/L).

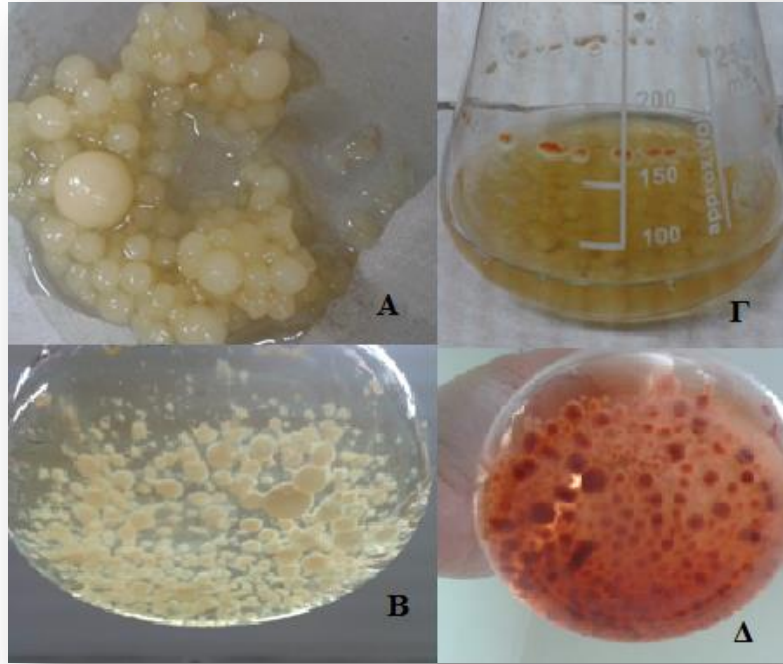
	Χρόνος επώασης (d)	Βρασμένο διήθημα				Απεσταγμένο διήθημα			
		DNS (%)	FAN (%)	TDW (g/L)	Κόκκινη χρωστική (AU/g)	DNS (%)	FAN (%)	TDW (g/L)	Κόκκινη χρωστική (AU/g)
ATCC 16365	4	54,99	58,23	1,08	0,07	50,24	46,86	1,23	0,18
	8	89,50	78,94	2,95	0,31	91,29	75,47	3,91	1,8
	12	92,25	80,28	3,54	0,88	93,92	83,07	4,31	2,72
	16	95,66	80,43	3,32	<b>1,39</b>	94,26	88,45	4,05	<b>6,07</b>
CBS 113139	4	86,83	82,53	3,58	0	30,83	82,70	5,47	0
	8	97,84	95,03	6,35	<b>3,36</b>	98,67	83,35	7,84	0,1
	12	99,47	94,20	5,34	2,13	94,41	91,44	6,25	<b>0,18</b>
	16	99,94	92,87	4,8	2,15	95,03	91,10	5,95	0,17

Προσδιορισμός κόκκινης χρωστικής σε βρασμένο φλοιό πορτοκάλι

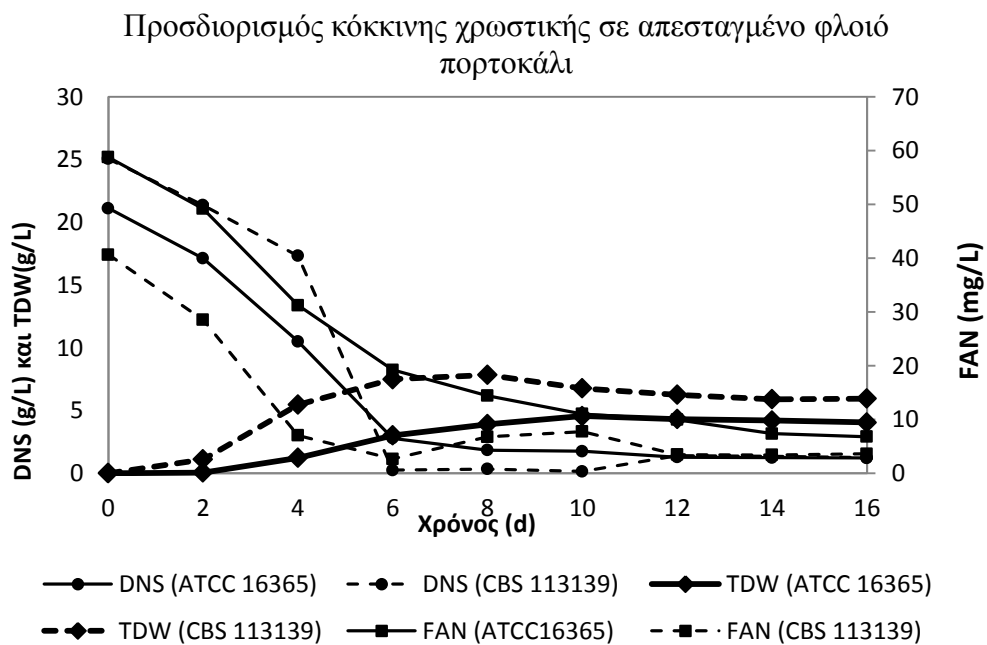


*Γράφημα 3.44: Κατανάλωση σακχάρων (μέθοδος DNS) και αζώτου (μέθοδος FAN) και παραγωγή βιομάζας (g/L) των δύο στελεχών σε υγρό υποστρώματα μετά από βρασμό νεπού φλοιού πορτοκαλιού.*

Με βάση το παραπάνω γράφημα φαίνεται ότι το στέλεχος ATCC 16365 μετά την 6<sup>η</sup> μέρα αρχίζει να αναπτύσσεται με γρηγορότερο ρυθμό (σε εκείνη την ημέρα έχουν καταναλωθεί >88% γλυκόζης και αζώτου ελευθερών αμινομάδων) με μέγιστη βιομάζα την 10<sup>η</sup> μέρα (3.54 g/L). Αντίστοιχα για το στέλεχος CBS 113139 μετά την 6<sup>η</sup> μέρα παρατηρείται κατανάλωση DNS, FAN >80%, η οποία έχει ως αποτέλεσμα τη μέγιστη βιομάζα, η οποία καταγράφεται την 8<sup>η</sup> μέρα (6.7 g/L). Η κατανάλωση δηλαδή των θρεπτικών και σε αυτή την περίπτωση ευνοεί τη παραγόμενη χρωστική και μάλιστα στο μέγιστό της την 8<sup>η</sup> μέρα ζύμωσης.



**Γράφημα 3.45:** Δημιουργία συσσωματωμάτων του στελέχους ATCC 16365 σε ζύμωση βυθού (υγρό από βρασμένο πορτοκάλι) και χρωματική αλλαγή κατά τα πρώτα στάδια ανάπτυξης του μύκητα (A,B) και πιο προχωρημένα (Γ, Δ).



**Γράφημα 3.46:** Κατανάλωση σακχάρων (μέθοδος DNS) και αζώτου (μέθοδος FAN) και παραγωγή βιομάζας (g/L) των δύο στελεχών σε υγρό υποστρώματα μετά από απόσταξη νωπού φλοιού πορτοκαλιού.



Με βάση το παραπάνω γράφημα φαίνεται ότι το στελέχος ATCC 16365 παρουσιάζει μέγιστη βιομάζα την 10<sup>η</sup> μέρα (4.55 g/L), όπου και έχουν καταναλωθεί επίσης πάνω από >87% DNS και FAN. Αντίστοιχα το στελέχος CBS 113139 παρουσιάζει μέγιστη βιομάζα την 8<sup>η</sup> μέρα (7.84 g/L).



*Γράφημα 3.47: Δημιουργία συσσωματωμάτων του στελέχους ATCC 16365 σε ζύμωση βυθού (υγρό από αποσταγμένο πορτοκάλι) και διάχυση χρωστικών στο υδατικό εναιώρημα.*

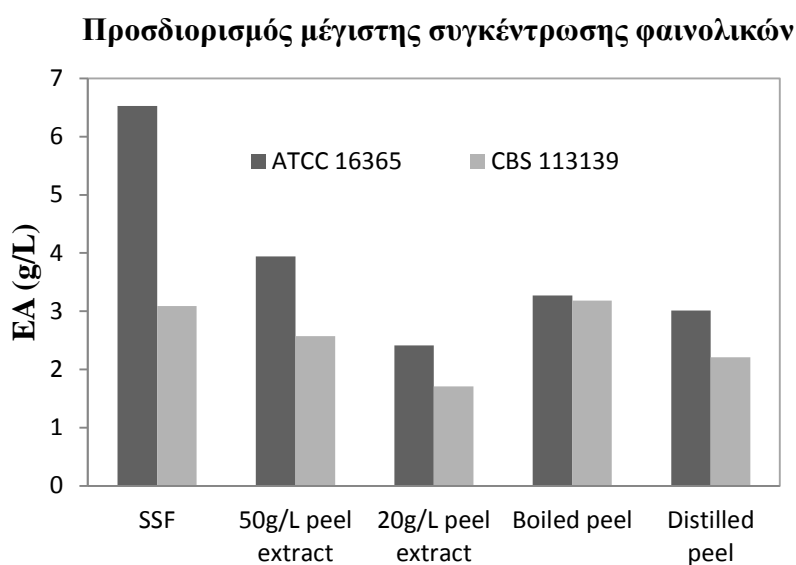
Συμπερασματικά, και για τα δύο στελέχη η κατανάλωση σακχάρων αλλά και του αζώτου ελεύθερων αμινομάδων ευνοεί την παραγωγή χρωστικής (στην 8<sup>η</sup> μέρα σε όλα τα υποστρώματα υπάρχει περίπου 90 ή >90% κατανάλωση σε DNS και >75% FAN). Όσον αφορά στην αξιολόγηση των υποστρωμάτων, φαίνεται ότι ευνοείται περισσότερο η παραγωγή χρωστικών στο υγρό υπόστρωμα με αποσταγμένο διήθημα φλοιού, όπου παράγονται οι μέγιστες χρωστικές 6.07 AU/g (ATCC 16365) και ακολουθεί το υγρό υπόστρωμα με βρασμένο εκχύλισμα φλοιού με χρωστική 3.36 AU/g (CBS 113139).

### **3.8. Σύγκριση συγκέντρωσης φαινολικών και αντιοξειδωτικής ικανότητας στα στελέχη *Monascus purpureus* ATCC 16365 και *Penicillium purpurogenum* CBS 113139 σε ζυμώσεις στερεάς, ημιστερεάς κατάστασης και βυθού.**

Ο φλοιός πορτοκαλιού αποτελεί μια πλούσια πηγή φαινολικών συστατικών με κύριες την ναριγκίνη, εσπεριδίνη, ναριρουτίνη και νεοεσπεριδίνη (Hiri et al., 2015). Οι φαινολικές ενώσεις ως φυσικές αντιοξειδωτικές ουσίες, σχετίζονται με τη μείωση χρόνιων ασθενειών όπως ο καρκίνος, οι καρδιοπάθειες, οι ηπατοπάθειες, οι

νευροεκφυλιστικές ασθένειες, οι οστεοαρθρίτιδες, οι οφθαλμικές διαταραχές. Αυτή τους η ιδιότητα στα τρόφιμα μπορεί να αποτρέψει την οξείδωση και την τάγγισή τους και να αντικαταστήσει άλλες χημικές αντιοξειδωτικές ουσίες (πχ. BHAs και BHTs), στις οποίες εμφανίζεται τοξικότητα, (Boukroufa *et al.*, 2015). Γι αυτό το σκοπό, στο τελικό στάδιο της παρούσας μελέτης εξετάστηκε συγκριτικά η συγκέντρωση φαινολικών συστατικών, μετά από ζύμωση με τα δύο στελέχη, σε όλα τα προς εξέταση υποστρώματα, αλλά και η αντιοξειδωτική ικανότητα των εκχυλισμάτων μετά τις ζυμώσεις αυτές.

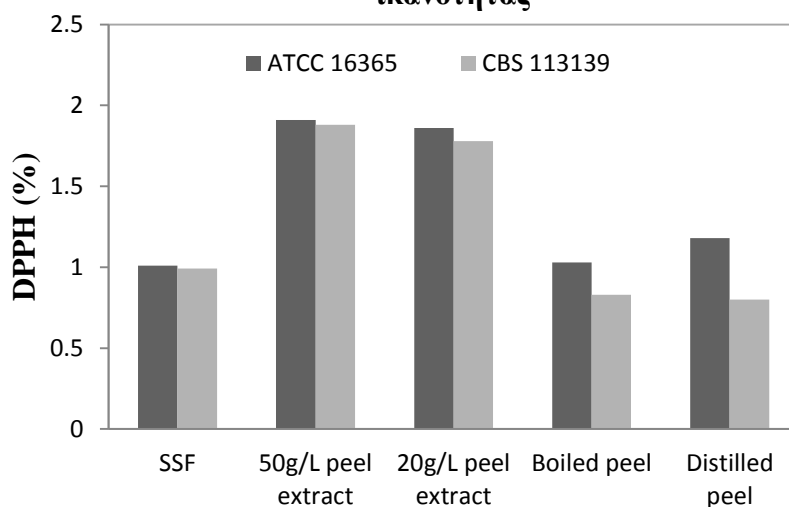
Στα παρακάτω Γραφήματα 3.48 και 3.49, φαίνονται τα αποτελέσματα μέτρησης εκχυλισμάτων σε φαινολικά συστατικά, και αντιοξειδωτική ικανότητα, ενώ στον Πίνακα 3.10, παρουσιάζονται τα αποτελέσματα συγκέντρωσης φαινολικών συστατικών και αντιοξειδωτικής ικανότητας σε όλα τα υποστρώματα τη χρονική στιγμή μέγιστης παραγώμενης χρωστικής.



**Γράφημα 3.48:** Σύγκριση φαινολικών συστατικών των δύο στελεχών στα διαφορετικά υποστρώματα.

Παρατηρείται ότι και στα πέντε υποστρώματα οι μέγιστες φαινολικές ενώσεις είναι περισσότερες για τις ζυμώσεις του στελέχους ATCC 16365 από ότι του CBS 113139. Επίσης, καλύτερο υπόστρωμα στο οποίο μετρήθηκαν οι περισσότερες φαινολικές ενώσεις με διαφορά από τα υπόλοιπα, είναι ο αποξηραμένος φλοιός πορτοκάλι σε ζύμωση στερεάς κατάστασης (6.53g/L).

### Προσδιορισμός μέγιστης αντιοξειδωτικής ικανότητας



**Γράφημα 3.49:** Σύγκριση αντιοξειδωτικής ικανότητας των δύο στελεχών στα διαφορετικά υποστρώματα.

Αντίστοιχα, και σε αυτό το διάγραμμα, παρατηρείται ότι οι όλες ζυμώσεις στελέχους ATCC 16365 υπερτερούν αντιοξειδωτικής ικανότητας, με το καλύτερο υπόστρωμα το εναίωρημα φλοιού συγκέντρωσης 50g/L (1.91%). Όπως αναφέρεται και εισαγωγικά για το στέλεχος ATCC 16365 έχει βρεθεί σημαντική δυνατότητα παραγωγής βιοενεργών ουσιών με αντιοξειδωτικές ικανότητες.

**Πίνακας 3.10:** Παρουσίαση συγκέντρωσης φαινολικών συστατικών και αντιοξειδωτικής ικανότητας σε όλα τα υποστρώματα τη χρονική στιγμή μέγιστης παραγόμενης χρωστικής, σε σύγκριση με τη συγκέντρωση φαινολικών συστατικών και αντιοξειδωτικής ικανότητας των υποστρωμάτων πριν την έναρξη ζύμωσης.

	Υπόστρωμα	Μέγιστη χρωστική AU/g	$t_{(pig)=max}$ (d)	Φαινολικές ενώσεις (g/L)		DPPH (%)	
				$t=0$	$t_{(pig)=max}$	$t=0$	$t_{(pig)=max}$
<i>Monascus purpureus</i> ATCC 16365	SSF	5.88	10	4.16	5.54	1.41	1.01
	50 g/L peel extract	0.46	12	3.95	4.08	1.87	1.88
	20 g/L peel extract	1.18	14	2.41	1.98	1.85	1.85
	Boiled peel	1.39	16	1.83	2.12	0.57	0.62
	Distilled peel	<b>6.07</b>	16	2.04	2.51	1	1.07
<i>Penicillium purpurogenum</i> CBS 113139	SSF	3.58	12	2.91	2.99	0.989	0.986
	50 g/L peel extract	10.44	12	1.71	1.3	1.77	1.77
	20 g/L peel extract	<b>23.97</b>	12	2.03	1.75	1.75	1.74
	Boiled peel	3.36	8	2.45	2.73	0.5	0.7
	Distilled peel	0.18	12	2.12	2.15	1.78	1.8

Στον παραπάνω πίνακα παρουσιάζεται ο προσδιορισμός φαινολικών συστατικών και αντιοξειδωτικής ικανότητας που έχουν όλα τα υποστρώματα που εξετάζονται στην παρούσα μελέτη ( $t=0$ ). Φαίνεται ότι ανάλογα με το υπόστρωμα η τάση (αύξησης ή μείωσης των φαινολικών, και της DPPH) δεν είναι συγκεκριμένη. Για τον *Monascus purpureus* ATCC 16365, η μέγιστη χρωστική (στο υγρό υπόστρωμα μετά από απόσταξη φλοιού) συνδέεται με την αύξηση φαινολικών και DPPH, ενώ για το *Penicillium purpurogenum* CBS 113139, η μέγιστη χρωστική (εναιώρημα φλοιού  $c=20$  g/L) συνδέεται με μείωση φαινολικών και DPPH. Σε όλες τις περιπτώσεις πάντως, οι φαινολικές ενώσεις συνδέονται άμεσα με την αντιοξειδωτική ικανότητα των εκχυλισμάτων (έχουν ίδια τάση αύξησης ή μείωσης), κάτι το οποίο είναι κοινώς γνωστό, καθώς η μέτρηση φαινολικών βασίζεται στην ικανότητά τους να οξειδώνονται. Το υπόστρωμα που έχει μεγαλύτερη αύξηση φαινολικών στο χρόνο μέγιστης παραγόμενης χρωστικής, είναι η ζύμωση στερεάς κατάστασης με ATCC 16365, και αυτό με τη μεγαλύτερη αύξηση αντιοξειδωτικής ικανότητας παρουσιάζεται στο υγρό διήθημα μετά από βρασμό του φλοιού πορτοκαλιού.

Βιβλιογραφικά τα συνολικά φαινολικά συστατικά στο φλοιό πορτοκαλιού έχουν βρεθεί 8.25 g/20kg (wb) (Boukroufa et al., 2015), ενώ σε άλλη μελέτη η σύστασή τους τους κυμαίνεται από 1.13-7.3 g/100g d.b (Cheynier 2006; Kammoun et al. 2011). Επίσης με βάση τη μελέτη των Hiri et al., (2015), έχει βρεθεί συγκέντρωση φαινολικών σε φλοιό πορτοκαλιού 2.7 g/100g d.b και μέτρηση αντιοξειδωτικής ικανότητας 0.014% g TEAC/100g d.b.

Αξιοσημείωτο, πέρα από τη μεγάλη διακύμανση που παρουσιάζεται και στις δύο αυτές ιδιότητες, είναι το γεγονός ότι τα απόβλητα κατά τη διάρκεια χυμοποίησης και σε διάφορα στάδια της παραγωγής μπορεί να οξειδωθούν ενζυματικά χάνοντας έτσι την αντιοξειδωτική ικανότητα σύστασης σε βιοενεργές ενώσεις. Γι αυτό, προκειμένου να μην υποβαθμιστούν, υφίσταται μεθόδους ξήρανσης. Παρόλα αυτά, αυτές μπορεί να συμβάλλουν στην απώλεια φαινολικών μέχρι και 85.06% (στους 60°C για 120 min), (Hiri et al., 2015).

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

---

### 4.1. Η αναγκαιότητα αξιοποίησης των χρωστικών στον κλάδο τροφίμων

Η ιστορική χρήση των φυσικών χρωστικών αντικατέστησε πολλές από τις συνθετικές χρωστικές στα τέλη του 19<sup>ου</sup> αιώνα, που από τότε έως και σήμερα, χρησιμοποιούνται σε πολλούς τομείς της οικονομίας (φάρμακα, καλλυντικά, τρόφιμα). Αυτή η ανάπτυξη χαρακτηρίζεται κυρίως από ευκολότερη και πιο οικονομική σύνθεση, αλλά και από ανώτερες χρωματικές ιδιότητες (Marari et al., 2010). Συγκεκριμένα στον κλάδο τροφίμων, το χρώμα αποτελεί μια από τις ιδιότητες οι οποίες γίνονται άμεσα αντιληπτές από τις ανθρώπινες αισθήσεις, και παίζει καθοριστικό ρόλο στην ελκυστικότητα του τροφίμου και κατά συνέπεια στην κατανάλωσή του. Σήμερα, επειδή ακριβώς οι επιτρεπόμενες συνθετικές χρωστικές έχουν μειωθεί εξαιτίας των ανεπιθύμητων ιδιοτήτων τους (τοξικότητα, μεταλλαξογένεση, καρκινογένεση) (Vidyalakshmi et al., 2009), το ενδιαφέρον της βιομηχανίας στρέφεται προς τις φυσικές χρωστικές και ιδιαίτερα αυτές που παράγονται βιοτεχνολογικά (με τη βοήθεια μικροοργανισμών) εξαιτίας της ευέλικτης χρήσης τους στην παραγωγική διαδικασία και της πιο εύκολης βιοδιεργασίας. Ο πιο πολυσυζητημένος και μελετημένος μικροοργανισμός, που έχει χρησιμοποιηθεί μέχρι και σήμερα για αυτό το σκοπό, για πάνω από ένα αιώνα, ανήκει στο γένος *Monascus* sp., του οποίου τα οφέλη και οι παρενέργειες (πιθανή τοξικότητα υπό συγκεκριμένες συνθήκες), είναι ήδη γνωστές στη βιομηχανία τροφίμων.

Παράλληλα, η ανησυχία από τη συσσώρευση των αγροτοβιομηχανικών αποβλήτων συνεχώς αυξάνει, καθώς το οικονομικό και κοινωνικό κόστος που επιφέρει από τη ρύπανση του περιβάλλοντος είναι ανεπιθύμητο στη βιομηχανία τροφίμων, ιδιαίτερα στον κλάδο χυμοποίησης όπου υπάρχει πάνω από 50% απώλεια κατά την παραγωγική διαδικασία. Επομένως, η βιοτεχνολογική αξιοποίησή χαμηλού κόστους αλλά και διαθέσιμων αποβλήτων προς παραγωγή χρωστικών μπορεί να αποτελέσει μια καλή στρατηγική στη βιομηχανία τροφίμων.

Κατά συνέπεια, ο συνδυασμός αυτών των δύο τάσεων, οδηγεί σήμερα στο ερώτημα προς τα πού πρέπει να στραφεί η έρευνα ώστε να δοθεί μια συμφέρουσα λύση: εναλλακτική αξιοποίηση άλλων μικροοργανισμών που δεν επιφέρουν αρνητικές

συνέπειες για την ανθρώπινη υγεία και έχουν αποδοτική παραγωγή χρωστικών, ή/και μελέτη συνθηκών του *Monascus*, στις οποίες εξασφαλίζεται η ασφάλεια των τροφίμων, η μέγιστη αξιοποίηση των αποβλήτων αλλά και η δυναμικότητα παραγωγής καινοτόμων φυσικών χρωστικών. Σε αυτή την εργασία ερευνάται το πρώτο ερώτημα, συγκρίνοντας τη παραγωγή χρωστικής από τον μύκητα *Penicillium purpurogenum* CBS 113139 (δεν παρουσιάζει τοξικότητα ή παθογένεια), με το μύκητα *Monascus purpureus* ATCC 16365 σε υπόλειμμα αποβλήτων χυμοποίησης πορτοκαλιού (το φλοιό).

Στην παρούσα μελέτη γίνεται για πρώτη φορά αξιολόγηση στην παραγωγή χρωστικών του *Monascus* (κίτρινες, πορτοκαλί, κόκκινες), αλλά και παρατήρηση μορφολογίας και ανάπτυξης του συγκεκριμένου στελέχους σε στερεό υποστρώμα αποξηραμένου φλοιού πορτοκαλιού, σε ημιστερεό υπόστρωμα συγκέντρωσης 20 g/L 50g/L αλλά και σε υγρό υπόστρωμα το οποίο προκύπτει μετά από βρασμό νωπού φλοιού πορτοκαλιού (1:6) και μετά από υδροαπόσταξη (1:6). Επίσης, για πρώτη φορά μελετήθηκαν παράγοντες μείζονος σημασίας για την παραγωγή χρωστικών στο φλοιό πορτοκαλιού, τα αποτελέσματα των οποίων χρησιμοποιήθηκαν για περαιτέρω συγκριτική αξιολόγηση των κόκκινων χρωστικών του *Monascus* με το στέλεχος *Penicillium purpurogenum*. Το συγκεκριμένο στέλεχος δύναται να παράγει κόκκινη χρωστική ίδιας χημικής δομής με αυτής του *Monascus*. Τέλος μελετήθηκε συγκριτικά η σύσταση των εκχυλισμάτων σε φαινολικά συστατικά και αντιοξειδωτική ικανότητα κατά τη διαδικασία ζύμωσης.

#### **4.2. Παράγοντες που επιδρούν στην βελτίωση παραγόμενων χρωστικών**

Όσον αφορά στο **μέγεθος των κόκκων** στερεού υποστρώματος φλοιού πορτοκαλιού επιλέγεται η διάμετρος σωματιδίων <2mm για μέγιστη παραγωγή όλων των χρωστικών σε σχέση με τη διάμετρο 2-4mm. Οι μέγιστες χρωστικές που μετρήθηκαν ήταν 45.12 AU/g, 17.25 AU/g και 12.3 AU/g (κίτρινες, πορτοκαλί και κόκκινες αντίστοιχα). Πιθανά, η αναλογία επιφάνειας/όγκου των σωματιδίων να εξασφαλίζει καλύτερη διείσδυση σε θρεπτικά συστατικά για ανάπτυξη του μύκητα και παραγωγή χρωστικών στο φλοιό πορτοκαλιού.

Η προσθήκη **πηγής αζώτου** δεν αποτελεί καλή πρακτική για τη βελτίωση απόδοσης όλων των χρωστικών, παρά μόνο για τις κόκκινες, οι οποίες παρουσιάζουν

μεγαλύτερη συγγένεια με αζωτούχες ενώσεις σε σχέση με τις κίτρινες και τις πορτοκαλί. Άλλωστε, οι δύο κυριότερες κόκκινες (rubropunctamine, monascorubramine) που παράγονται από τον *Monascus*, είναι οι μόνες οι οποίες έχουν στο μόριό τους άζωτο. Γι αυτό το λόγο η προσθήκη πηγής αζώτου (στην παρούσα μελέτη ηλιάλευρου) σε ζύμωση στερεάς κατάστασης έδειξε θετική επίδραση στην βελτίωση παραγόμενων κόκκινων χρωστικών στον *Monascus purpureus* και στο *Penicillium purpurogenum*. Πιο συγκεκριμένα, η αναλογία πορτοκαλιού-ηλιάλευρου 60-40% έδωσε τα καλύτερα αποτελέσματα παραγόμενης κόκκινης χρωστικής και στους δύο μύκητες (7.65 AU/g για το στέλεχος ATCC 16365 και 8.43 AU/g για το στέλεχος CBS 113139). Γενικά η προσθήκη αζώτου και στις δύο αναλογίες (80-20 και 60-40%) είχε καλύτερες αποδόσεις στη βελτίωση της κόκκινης χρωστικής, σε σχέση με το υπόστρωμα από 100% από φλοιό πορτοκαλιού.

Όσον αφορά στην ύπαρξη **αιθέριων ελαίων**, κυρίως του D- λεμονένιου (κυρίαρχο αιθέριο έλαιο σε όλα τα εσπεριδοειδή) είναι γνωστή η αντιμικροβιακή του ιδιότητα και η παρεμπόδιση ανάπτυξης σε μύκητες, όπως αναφέρεται εισαγωγικά. Δεν είναι γνωστό όμως με ποιο τρόπο επιδρά στην παραγωγή δευτερογενών μεταβολιτών και συγκεκριμένα των χρωστικών μετά από βιοτεχνολογική αξιοποίηση, που στην παρούσα μελέτη επικεντρώνεται στο φλοιό πορτοκαλιού. Στην παρούσα μελέτη, δεν εμφανίστηκε ίδια τάση (παρεμπόδιση ή διευκόλυνση) για όλες τις χρωστικές στα υποστρώματα στα οποία εξετάστηκε, κάτι το οποίο δείχνει ότι δεν αποτελεί τον καθοριστικότερο παράγοντα επίδρασης στην παραγωγή χρωστικών. Πιο συγκεκριμένα, εξετάστηκε η απουσία των αιθέριων ελαίων σε 2 υποστρώματα. Αυτά ήταν: ο αποξηραμένος φλοιός πορτοκαλιού μετά από 1h βρασμού με απομάκρυνση περίπου 91% των αιθέριων ελαίων και ο αποξηραμένος φλοιός πορτοκαλιού μετά από 3h υδροαπόσταξης με 100% απομάκρυνση των αιθέριων ελαίων. Η αφαίρεση των αιθέριων ελαίων στο στερεό υπόστρωμα από βρασμένο φλοιό, έδειξε να βελτιώνει μόνο την παραγωγή κόκκινης χρωστικής (14.92 AU/g από 13.2 AU/g σε ζύμωση στερεάς κατάστασης με τον ATCC 16365 και 1.388 AU/g από 0.24 AU/g σε ζύμωση στερεάς κατάστασης με τον CBS 113139) όπως και στο στερεό υπόστρωμα από απεσταγμένο φλοιό (1.82 AU/g από 0.24 AU/g σε ζύμωση στερεάς κατάστασης με CBS 113139). Το αντίθετο όμως συνέβη στις κίτρινες και πορτοκαλί χρωστικές όπου η απουσία των αιθέριων ελαίων όχι μόνο δεν ευνόησε την βελτίωση παραγωγής τους, αλλά είχε σαν αποτέλεσμα μικρότερες κίτρινες (24.82 AU/g απουσία, 45.12 παρουσία) και πορτοκαλί (13.8 AU/g απουσία, 17.25 AU/g παρουσία)

χρωστικές σε σχέση με αυτές που προέκυψαν από τα υποστρώματα που περιείχαν τα αιθέρια έλαια στο φλοιό.

Η **εκχύλιση** δεν επιδρά στη διαδικασία ζύμωσης, αλλά στο αποτέλεσμα αυτής, που στη συγκεκριμένη περίπτωση είναι η όσο το δυνατόν αποτελεσματικότερη εξαγωγή των χρωστικών από το ζυμούμενο υπόστρωμα. Για αυτό εξετάστηκε ο τρόπος εκχύλισης (απλή εκχύλιση, μηχανική κατεργασία με γρήγορη ανάδευση και υπέρηχους) σε υπόστρωμα χονδρόκοκκου πίτυρου και φλοιού πορτοκαλιού, ο οργανικός διαλύτης (ισοπροπανόλη, αιθανόλη σε αναλογίες 95% και 70% v/v) αλλά και η φύση του ζυμούμενου υποστρώματος (ξηρό, νωπό). Διαπιστώθηκε ως καλύτερος τρόπος εκχύλισης ο συνδυασμός μηχανικής κατεργασίας (χρήσης υπερήχων και ανάδευσης) με οργανικό διαλύτη αιθανόλης 70% σε νωπό ζυμούμενο υπόστρωμα, κι αυτό διότι εξασφαλίζεται η λύση των κυττάρων του μύκητα ώστε να απελευθερωθούν στο εκχύλισμα ακόμα και οι εσωκυττάρειες χρωστικές, παρουσία διαλύτη του οποίου η φύση (πολικός, οργανικός) βοηθά στην καλύτερη δέσμευση των πολυκετιδίων. Τέλος στο νωπό ζυμούμενο υπόστρωμα δεν υπάρχει κίνδυνος απώλειας χρωστικών λόγω αύξησης της θερμοκρασίας. Στο πίτυρο η συγκεκριμένη μέθοδος εκχύλισης έδωσε κίτρινη χρωστική 109.5 AU/g και στο πορτοκάλι 63.88 AU/g.

### **4.3. Επιλογή καλύτερου υποστρώματος (από αγροτοβιομηχανικά απόβλητα) ως προς την παραγωγή χρωστικών.**

#### **4.3.1. Ζύμωση στερεάς κατάστασης, αξιοποιώντας τα στελέχη *Monascus purpureus* ATCC 16365 και *Penicillium purpurogenum* CBS 113139**

Η ζύμωση στερεάς κατάστασης, πέρα από το χαμηλότερο κόστος, εξασφαλίζει καλύτερες συνθήκες ανάπτυξης του μύκητα (καλύτερος αερισμός, μέγιστη εξάπλωση των υφών, βέλτιστος εφοδιασμός του μέσου σε θρεπτικά συστατικά, καλύτερη προσομοίωση του μικροπεριβάλλοντος των μυκήτων, χαμηλότερες απαιτήσεις σε νερό, λόγω της χαμηλής ενεργότητάς του) (Pandey, 2003, Babitha et al., 2006). Η παραγωγή χρωστικών επικεντρώθηκε στην αξιοποίηση του πορτοκαλιού και γι αυτό αξιολογήθηκε για 16 μέρες ζύμωσης σε αποξηραμένο φλοιό πορτοκαλιού, ενώ σε άλλα υποστρώματα αξιολογήθηκε (χονδρόκοκκο πίτυρο, λεμόνι, μανταρίνι) στις πρώτες 7 μέρες ζύμωσης. Όσον αφορά στο φλοιό του πορτοκαλιού, καταγράφηκε μέγιστη κίτρινη χρωστική **63.88** AU/g (10d,



ATCC 16365), ενώ ακολουθούν μέγιστη πορτοκαλί **12.46** AU/g (10d, ATCC 16365), μέγιστη κόκκινη **5.88** AU/g (ATCC 16365,10d) και **3.58** AU/g (12d, CBS 113139). Όσον αφορά στην παραγωγή κόκκινης χρωστικής στα άλλα υποστρώματα καταγράφηκε στο πίτυρο **78.6** AU/g (ATCC 16365, 7d), στο μανταρίνι **1.31** AU/g (CBS 113139, 7d) και **1.51** AU/g (CBS 113139, 7d).

#### **4.3.2. Ζύμωση ημι-στερεάς κατάστασης, αξιοποιώντας τα στελέχη *Monascus purpureus* ATCC 16365 και *Penicillium purpurogenum* CBS 113139**

Η ζύμωση ημιστερεάς κατάστασης πραγματοποιήθηκε αντίστοιχα για 16 μέρες ζύμωσης σε υποστρώματα εναιωρήματος αποξηραμένου φλοιού σε συγκέντρωση 20 g/L (αρχικά σάκχαρα περίπου 5.5 g/L) και 50 g/L (αρχικά σάκχαρα περίπου 9.5 g/L). Σε αυτές τις ζυμώσεις πραγματοποιήθηκε αξιολόγηση μόνο της κόκκινης παραγόμενης χρωστικής με μέγιστη τιμή **23.97** AU/g (12d, CBS 113139, c=20 g/L), ενώ ακολουθούν **10.44** AU/g (12d, CBS 113139, c=50 g/L), **1.17** AU/g (14d, ATCC 16365, c=20 g/L) και **0.45** AU/g (12d, ATCC 16365, c=50 g/L). Από τα δύο αυτά υποστρώματα δυναμικότητα βέλτιστης χρωστικής παρουσιάζει με σημαντική διαφορά το εναιώρημα πορτοκαλιού c=20 g/L.

#### **4.3.3. Ζύμωση βυθού, αξιοποιώντας τα στελέχη *Monascus purpureus* ATCC 16365 και *Penicillium purpurogenum* CBS 113139**

Παρόλο που στις ζυμώσεις βυθού (σε σχέση με τις ζυμώσεις στερεάς κατάστασης), υπάρχει η δυνατότητα καλύτερου ελέγχου παραμέτρων όπως ο αερισμός, η ανάδευση, η θερμοκρασία, και το pH (Shazwani και Nadzri, 2012), η απόδοση σε παραγωγή χρωστικών είναι χαμηλότερη. Ακολούθως, η ζύμωση βυθού, πραγματοποιήθηκε για 16 μέρες σε υποστρώματα υγρού μετά από βρασμό (1h) (αρχικά σάκχαρα περίπου 10 g/L) και μετά από απόσταξη (3h) του νωπού φλοιού πορτοκαλιού (αρχικά σάκχαρα περίπου 20 g/L). Και σε αυτές τις ζυμώσεις πραγματοποιήθηκε αξιολόγηση μόνο της κόκκινης παραγόμενης χρωστικής με μέγιστη τιμή **6.07** AU/g (16d, ATCC 16365, μετά από υδροαπόσταξη), ενώ ακολουθούν **3.36** AU/g (8d, CBS 113139, μετά από βρασμό), **1.4** AU/g (16d, ATCC 16365, μετά από βρασμό) και **0.18** AU/g (12d, ATCC 16365, μετά από υδροαπόσταξη). Από τα δύο αυτά υποστρώματα καλύτερο ως

προς την παραγόμενη κόκκινη χρωστική είναι το υγρό μετά από απόσταξη (3h) του νωπού φλοιού πορτοκαλιού με το στέλεχος ATCC 16365 (αρχικά σάκχαρα περίπου 20 g/L).

Συγκεντρωτικά, επιβεβαιώνεται ότι η μέγιστη παραγόμενη κίτρινη χρωστική επιτυγχάνεται σε ζύμωση στερεάς κατάστασης με το στέλεχος ATCC 16365 (63.88 AU/g). Σε αυτή τη ζύμωση μετρήθηκε η μέγιστη συγκέντρωση φαινολικών (6.53 g/L EA). Παρόλα αυτά δεδομένου ότι η κόκκινη χρωστική αποτελεί ύψιστης σημασίας στο κλάδο τροφίμων και γι αυτό το λόγο επικεντρώνεται εκεί η μελέτη, αρκετά δυναμικές ως προς τις κόκκινες χρωστικές φαίνονται οι ζυμώσεις ημιστερεάς κατάστασης 23.97 AU/g (12d, CBS 113139, c=20 g/L) και 10.44 AU/g (12d, CBS 113139, c=50 g/L). Σε αυτές τις ζυμώσεις μετρήθηκε η μέγιστη συγκέντρωση φαινολικών συστατικών και η μέγιστη αντιοξειδωτική ικανότητα με το στέλεχος ATCC 16365. Τέλος, η καλύτερη απόδοση κόκκινης χρωστικής 6.07 AU/g στη ζύμωση υγρής καλλιέργειας μετά από απόσταξη νωπού φλοιού (16d, ATCC 16365) αποτελεί από τη μια πλευρά επιλογή με υψηλό ενεργειακό κόστος, η οποία όμως μπορεί να εξασφαλίσει υψηλή απόδοση στην εκχύλιση αιθέριων ελαίων, ως προϊόν υψηλής προστιθέμενης αξίας.

#### **4.4. *Monascus purpureus* ATCC 16365: Ο μικροοργανισμός μοντέλο στην παραγωγή χρωστικών**

Για πρώτη φορά, με βάση τη βιβλιογραφική ανασκόπηση, παρουσιάζονται αποτελέσματα αξιοποίησης του προς την παραγωγή χρωστικών (σε SSF, semi-SSF, smF) σε ένα υπόστρωμα ελάχιστα μελετημένο σε σχέση με πολλά άλλα αγροτοβιομηχανικά απόβλητα από τα οποία έχουν παραχθεί MPs χρωστικές.

Όσον αφορά στην ικανότητα ανάπτυξής του, επαληθεύεται ότι σε υποστρώματα που υπάρχουν σάκχαρα όπως η γλυκόζη, η φρουκτόζη και η σουκρόζη, το συγκεκριμένο στέλεχος καταναλώνει πρώτα τη γλυκόζη, μετά τη φρουκτόζη (ισομερείς μονοσακχαρίτες) και τέλος τη σουκρόζη. Αυτό συμβαίνει διότι η γλυκόζη προέρχεται απευθείας από το μονοπάτι της γλυκόλυσης, και του κύκλου κιτρικού οξέος, που οδηγεί στην παραγωγή ακετυλ-CoA, το οποίο είναι βασικό για τη βιοσύνθεση χρωστικών (Padmavathi,2013). Όσον αφορά στον συνδυασμό μέγιστης ανάπτυξης και μέγιστης παραγόμενης χρωστικής, οι Marari et al., 2008b βρήκαν ότι δεν υπάρχει κάποια άμεση συσχέτιση στον *Monascus*, κάτι το οποίο έρχεται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα

παρούσας μελέτης όπου στις ζυμώσεις βυθού η μέγιστη παραγόμενη βιομάζα είναι 3.54 g/L (10<sup>η</sup> μέρα, σε υγρή καλλιέργεια από βρασμό πορτοκαλιού) με μέγιστη χρωστική την 16<sup>η</sup> μέρα, (1.4 AU/g) και 4.55 g/L (10<sup>η</sup> μέρα, σε υγρή καλλιέργεια από απόσταξη πορτοκαλιού) με μέγιστη χρωστική την 16<sup>η</sup> μέρα, (6.07 AU/g). Παρόλα αυτά η καλύτερη ανάπτυξη του μύκητα προάγει τη παραγωγή μέγιστης κόκκινης χρωστικής (4.55 g/L δίνουν 6.07 AU/g κόκκινης χρωστικής).

Στην παρούσα μελέτη τα αποτελέσματα σύγκρισης κόκκινης χρωστικής σε ζύμωση στερεάς κατάστασης (5.88 AU/g) και βυθού (6.07 AU/g), έρχονται σε αντίθεση με τα μέχρι τώρα δεδομένα της ικανότητας παραγωγής μέγιστων χρωστικών του *Monascus* σε ζυμώσεις στερεάς κατάστασης παρά βυθού (Shepherd και Carels, 1983). Από την άλλη μεριά η μέγιστη παραγόμενη χρωστική εξασφαλίστηκε σε ζύμωση στερεάς κατάστασης (63.88 AU/g στα 400nm). Τέλος όσον αφορά στις ζυμώσεις ημιστερεάς κατάστασης, φαίνεται ότι δεν ευνοήθηκαν οι συνθήκες ανάπτυξής του ώστε να εξασφαλιστεί μέγιστη απόδοση χρωστικών.

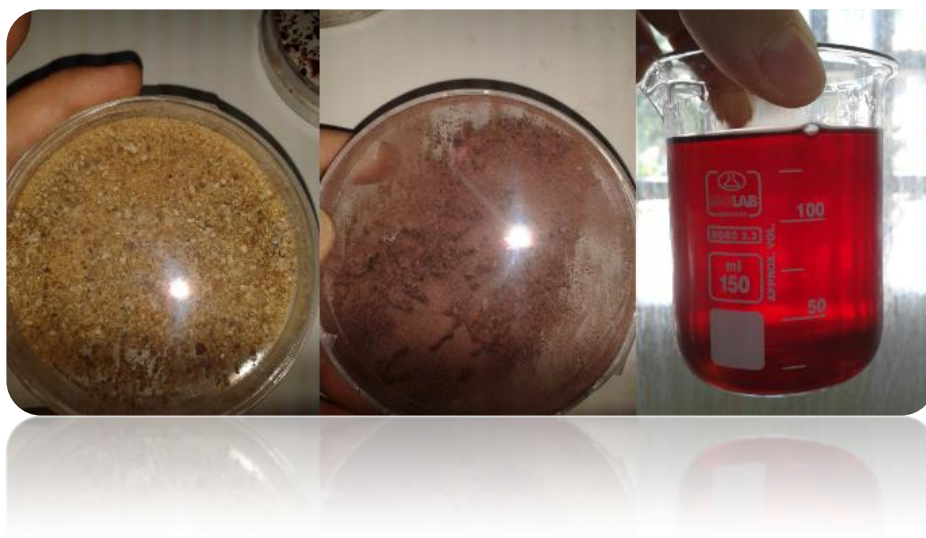
Αξιοσημείωτη παρατήρηση για τη συμπεριφορά του μύκητα είναι ότι στις ζυμώσεις που έχουν παραχθεί οι μέγιστες χρωστικές (6.07 AU/g- βυθού και 1.17 AU/g- ημιστερεάς κατάστασης), οι εσωκυττάρια είναι περισσότερες σε σχέση με τις εξωκυττάρια, ενώ η τάση αυτή δεν είναι ίδια στις ζυμώσεις που έχει χαμηλότερη παραγωγή κόκκινης χρωστικής (βυθού στο διήθημα από βρασμό και στο εναιώρημα φλοιού c=50 g/L). Με βάση τους Lin *et al.*, (1992), Jiang *et al.*, (2005), έχει βρεθεί για τον *Monascus* ότι οι ενδοκυττάρια χρωστικές βρίσκονται σε μεγαλύτερη συγκέντρωση σε σχέση με τις εξωκυττάρια που απελευθερώνονται, στις υγρές καλλιέργειες.

Τέλος, η ήδη γνωστή ικανότητα παραγωγής πολλών βιοενεργών ενώσεων αλλά και οι ιδιότητες των δευτερογενών μεταβολιτών που αυτός παράγει, μπορεί να αποτελούν εξήγηση για το γεγονός ότι σε όλα τα υποστρώματα σε όλες τις ζυμώσεις ο *Monascus purpureus* ATCC 16365 παρουσίασε καλύτερη συγκέντρωση φαινολικών συστατικών στα εκχυλίσματά του καθώς και μέγιστη αντιοξειδωτική ικανότητα.

#### **4.5. *Penicillium purpurogenum* CBS 113139: Πλεονεκτήματα και προοπτική**

Όπως αναφέρεται και εισαγωγικά, στο συγκεκριμένο στέλεχος έχουν ταυτοποιηθεί (ανάλυσεις HPLC, MS) δύο χρωστικές ίδιας χημικής δομής με του

*Monascus*, η monascin (κίτρινη) και η monascorubramine (κόκκινη). Η κόκκινη χρωστική έχει ήδη πολλές εφαρμογές στις βιομηχανίες τροφίμων, φαρμάκου, καλλυντικών, χημικών, τύπου και χάρτου, δερμάτων. Αυτός ήταν ο ένας λόγος, για τον οποίο η μελέτη εστίασε στην αξιολόγηση ικανότητας της κόκκινης χρωστικής από το συγκεκριμένο στέλεχος και η σύγκριση με το μικροοργανισμό μοντέλο, ως προς τη βέλτιστη χρωστική. Ο δεύτερος λόγος ήταν ασφάλεια χρήσης του συγκεκριμένου στελέχους εξαιτίας της απουσίας τοξικότητας. Στις εικόνες φαίνεται η δυνατότητα παραγωγής σημαντικής ποσότητας χρωστικής τόσο σε υγρή όσο και σε στερεή μορφή.



**Γράφημα 4.1:** Αποθήκευση χρωστικής του στελέχους CBS 113139 τόσο σε στερεή μορφή όσο και σε υγρή (δεξιά). Αριστερά φαίνεται ο αποξηραμένος φλοιός πορτοκαλιού πριν τη ζύμωση και στη μέση φαίνεται η παραγόμενη χρωστική σε ξηρό ζυμούμενο υπόστρωμα φλοιού πορτοκαλιού.

Στην παρούσα μελέτη επιτεύχθηκε η παραγωγή κόκκινης χρωστικής σε όλα τα υποστρώματα. Πριν από αυτό όμως, αξιολογήθηκε η παραγωγή χρωστικής σε ζύμωση βυθού (CzB), όπου με βάση τη συλλογή CBS εξασφαλίζονται οι βέλτιστες συνθήκες ανάπτυξης. Το αποτέλεσμα που βρέθηκε έδειξε μέγιστη παραγωγή βιομάζας 5.2 g/L (10<sup>η</sup> μέρα) με αρχική συγκέντρωση σακχάρων 26.9 g/L, η κατανάλωση των οποίων (>90% την 10<sup>η</sup> μέρα) οδήγησε στη παραγωγή μέγιστης χρωστικής 0.193 AU/mL (14<sup>η</sup> μέρα).

Επίσης, όσον αφορά στην ανάπτυξη του συγκεκριμένου στελέχους συγκριτικά με τον *Monascus purpureus*, παρατηρήθηκε μεγαλύτερη μέγιστη βιομάζα την 8<sup>η</sup> μέρα (6.7 g/L για το υγρό από βρασμό πορτοκαλιού και 7.84 g/L για το υγρό από απόσταξη πορτοκαλιού). Αυτό δύναται να αυξήσει την παραγωγικότητα της διεργασίας αναφορικά με την παραγωγή χρωστικών.

Επιπλέον, αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι κατά την κινητική πορεία παραγωγής μέγιστων χρωστικών ( $10^{11}$ - $16^{11}$ ) οι εξωκυττάρια είναι περισσότερες από τις εσωκυττάρια. Σε αντίθεση με το στέλεχος ATCC 16365, η τάση αυτή είναι ίδια παντού (στις μέγιστες τιμές κόκκινης χρωστικής υπερτερούν οι εξωκυττάρια χρωστικές), γεγονός που προτιμάται καθώς η αυξημένη διαλυτότητα τις κόκκινης χρωστικής σε υδατικά διαλύματα προοπτικά αποτελεί οικονομικά αποδοτική διαδικασία για την ανάπτυξη βιοδιεργασίας.

Παρόλο που το συγκεκριμένο στέλεχος δε συνέβαλε στην παραγωγή μέγιστης χρωστικής σε υπόστρωμα στερεάς κατάστασης (3.58 AU/g έναντι 5.88 AU/g ATCC 16365), όταν στο υπόστρωμα προστέθηκε πηγή αζώτου σε ποσοστό 40%, η παραγόμενη χρωστική αυξήθηκε στα 7.65 AU/g. Επομένως, ο συνδυασμός του φλοιού πορτοκαλιού με κάποιο άλλο απόβλητο πλούσιο σε πρωτεΐνες θα μπορούσε να αυξήσει περαιτέρω την απόδοση σε κόκκινη χρωστική. Εκτός αυτού όμως η υπεροχή του στην παραγωγή χρωστικών στις ζυμώσεις ημιστερεάς κατάστασης και στις δύο συγκεντρώσεις εναιωρήματος φλοιού πορτοκαλιού (23.97 AU/g,  $c=20\text{g/L}$  και 10.44 AU/g,  $c=50\text{g/L}$ ), σε συνδυασμό με τη γρηγορότερη ανάπτυξή του σε όλα τα υποστρώματα δείχνει ότι υπό συνθήκες, το στέλεχος *Penicillium purpurogenum* CBS 113139 παρουσιάζει τεράστιο ενδιαφέρον ως ένα εργαλείο για την εναλλακτική αξιοποίηση αγροτοβιομηχανικών αποβλήτων προς παραγωγή χρωστικών.

#### **4.6. Φλοιός πορτοκάλι και στρατηγική βιοτεχνολογικής αξιοποίησης**

Στην παρούσα μελέτη τεκμαίρεται ότι ο φλοιός πορτοκαλιού, με βάση τη σύσταση και τις ιδιότητες που παρουσιάζει, αποτελεί ένα αποτελεσματικό και χαμηλού κόστους θρεπτικό μέσο όχι μόνο για τη μελέτη παραγωγής σημαντικών ενώσεων (αναφέρονται εισαγωγικά), αλλά και για την μελέτη παραγωγής φυσικών χρωστικών. Δύναται να αξιοποιηθεί με πολλούς τρόπους (ως ξηρό ή υγρό υπόστρωμα) και να παράγει σημαντική ποσότητα χρωστικών τόσο κίτρινων (63.88 AU/g), πορτοκαλί (12.46 AU/g) και κόκκινων (23.97 AU/g) χρωστικών σε όλες όλους τους τύπους ζυμώσεων. Από ότι φάνηκε ανάλογα με το μικροοργανισμό κυριαρχούν διαφορετικές χρωστικές στο συγκεκριμένο υπόστρωμα (κίτρινες με τον ATCC 16365 και κόκκινες με τον CBS 113139).

Περαιτέρω μελέτη δύναται να πραγματοποιηθεί αναφορικά με τη δυναμικότητα του στελέχους CBS 113139, μέσω της διερεύνησης όλων των συνθηκών που μπορούν να βελτιστοποιήσουν την παραγωγή κόκκινης χρωστικής, αλλά και να επικεντρωθεί η έρευνα γύρω από την ταυτοποίηση, απομόνωση, ποσοτικοποίηση χρωστικής με τη βοήθεια αναλυτικών μεθόδων, καθώς έχει βρεθεί απόκλιση στον προσδιορισμό χρωστικών με τη χρήση φασματοφωτομετρίας σε σχέση με την HPLC (Syed, 2015).

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

---

1. **Ahmad AS**, Ahmad WYW, Zakaria ZK, Yosof NZ. **2012**. Applications of bacterial pigments as colorant: the Malaysian perspective. New York: Springer Briefs in Molecular Science
2. **Ainsworth GC**. **2008**. Ainsworth & Bisby's dictionary of the fungi. Wallingford: CABI Publishing
3. **Anwar**, F., Naseer R., Bhangar, M. I., Ashraf, S., Talpur, F. N. and Aladedunye, F. A. **2008**. Physico-Chemical Characteristics of *Citrus* Seeds and Seed Oils from Pakistan. Journal of American Oil Chemist Society 85: 321–330
4. **Arad**, S., Yaron, A. **1992**. Natural pigments from red microalgae for use in food and cosmetics. Trends Food Sci. Tech.3:92-97
5. **Babitha**, S., C.R.Soccol, and A.Pandey. **2007**. Solid-state fermentation for the production of *Monascus* pigments from jackfruit seed. Bioresource Technol. 98: 1554-1560.
6. **Becker D. J.**, R. Y. Gordon, P. B. Morris, **2008**. Simvastatin vs therapeutic lifestyle changes and supplements: randomized primary prevention trial, Mayo Clinic Proceedings, vol. 83, no. 7, pp. 758–764.
7. **Bejar**, Mihoubi, Kechaou, **2012**. Moisture sorption isotherms – Experimental and mathematical investigations of orange (*Citrus sinensis*) peel and leaves. Food Chemistry 132, pp.1728–1735
8. **Bicu I.**, Mustata F. **2011**. Cellulose extraction from orange peel using sulfite digestion reagents, Bioresource Technology 102:10013–10019.
9. **Blanc P.J.**, Laussac J, Le Bars J, Le Bars P, Loret M, Pareilleux A, Prome D, Prome J, Santerre A, Goma G. **1995a**. Characterization of monascidin A from *Monascus* as citrinin. Int J Food Microbiol 27(2):201–13.
10. **Blanc P.J.**, Loret M.O., Goma G. **1995b**. Production of citrinin by various species of *Monascus*. Biotechnology Letters. 17(3): 291-294

11. **Bocco A**, Cuvelier M.E, Richard H, Berset C, **1998**. Antioxidant activity and phenolic composition of citrus peel and seed extracts. *J Agric Food Chem* 46 (6): 2123–2129
12. **Boukroufa Meryem**, Chahrazed Boutekedjiret, Loic Petigny, Njara Rakotomanomana, Farid Chemat. **2011**. Bio-refinery of orange peels waste: A new concept based on integrated green and solvent free extraction processes using ultrasound and microwave techniques to obtain essential oil, polyphenols and pectin. *Ultrasonics Sonochemistry*, 24:72-79,
13. **Braddock R J**, Cadwallader K R.**1992** Citrus by-products manufacture for food use. *Food Technol*, 46 (2) 105-1 10.
14. **Braddock, R.J.**, Temelli, F., Cadwallader, K.R., **1986**. Citrus essential oils – a dossier for material safety data sheets. *Food Technol.* 40 (11), 114–116.
15. **Cai Y.**, Luo, Q., Sun, M. and Corke, H. **2004**. Antioxidant Activity and Phenolic Compounds of 112 Traditional Chinese Medicinal Plants Associated with Anticancer. *Life Sci.*, 74: 2157–2184
16. **Cao G**, Alessio H, Cutler R, **1993**. Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidant. *Free Radic Biol Med* 14(3): 303–11.
17. **Carvalho J.C.**, Bruno Oliva Oishi, Ashok Pandey and Carlos Ricardo Soccol. **2005**. Biopigments from *Monascus*: Strains Selection, Citrinin Production and Color Stability. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, Vol.48 (6):885-894
18. **Carvalho J.C**, Bruno O Oishi, Adenise L Woiciechowski, Ashok Pandey, Sumathy Babitha & Carlos R S. **2007**. Effect of substrates on the production of *Monascus* biopigments by solid-state fermentation and pigment extraction using different solvents. *Indian Journal of Biotechnology*. 6:194-199.
19. **Chandler, M.**, McIntyre, C.R. and Simpson, T.J. **1992**. Biosynthesis of LL-D253a, a polyketide chromanone metabolite of *Phoma pigmeritivora*: Incorporation of <sup>13</sup>C, <sup>2</sup>H and <sup>18</sup>O labelled precursors. *Journal of the Chemical Society Perkin Transactions I*: 2285-2293



20. **Chang ST**, Lau OW, Cho KY. **1981**. The cultivation and nutritional value of *Pleurotus sajor-eaju*. *Eur J Appl Microbiol Biotechnol* 12:58—62
21. **Chairote E.**, Griangsak Chairote, Suganya Wongpornchai, Saisamorn Lumyong. **2007**. Preparation of red yeast rice using various Thai glutinous rice and *Monascus purpureus* CMU001 isolated from commercial Chinese red yeast rice sample. *Sci. Tech. J.*,7:1
22. **Cheyrier V**, Sarni-Manchado P, **2006**. Les polyphénols en agroalimentaire. 50-59. Lavoisier- Tec & Doc, Paris.
23. **Chen Wanping** , Yi He, Youxiang Zhou, Yanchun Shao, Yanli Feng, Mu Li, and Fusheng Chen. **2015**. Edible Filamentous Fungi from the Species *Monascus*: Early Traditional Fermentations, Modern Molecular Biology, and Future Genomics. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. Vol.14
24. **Davoli, P.**, Weber, R.W.S. **2002**. Carotenoid pigments from the red mirror yeast *Sporobolomyces roseus*. *Mycologist*. 16:102-108
25. **Dikshit R.**, Tallapragada P. **2013**. Comparative study of *Monascus sanguineus* and *Monascus purpureus* for red pigment production under stress condition. *International Food Research Journal* 20(3): 1235-1238
26. **Djilas S.** Canadanovic-Brunet J, Cetkovic, G., **2009**. By-products of fruits processing as a source of phytochemicals. *Chem Ind Chem Eng Q* 15 (4): 191-202.
27. **Downham, A.** and Collins, P., **2000**. Colouring our foods in the last and next millennium. *Int. J. Food Sci. Technol.* 35, 5–22.
28. **Dufosse L.****2006**. Microbial Production of Food Grade Pigments. *Food Technol. Biotechnol.* 44 (3) 313–321
29. **Dufosse L**, Galaup P, Yaron A, Arad SM, Blanc P, Chidambara Murthy KN, Ravishankar GA. **2005**. Microorganisms and microalgae as sources of pigments for food use: a scientific oddity or an industrial reality? *Trends Food Sci Tech* 16(9):389–406.

30. **Dufosse L**, Mireille Fouillaud, Yanis Caro, Sameer AS Mapari and Nuthathai Sutthiwong. **2014**. Filamentous fungi are large-scale producers of pigments and colorants for the food industry. *Current Opinion in Biotechnology*, 26:56–61.
31. [faostat.fao.org](http://faostat.fao.org)
32. [fao.org/fao-who-codexalimentarius/en](http://fao.org/fao-who-codexalimentarius/en)
33. **Feng Y**, Shao Y, Chen F. **2012**. *Monascus* pigments. *Appl Microbiol Biotechnol* 96(6):1421–40.
34. **Franco G**, Tables of Food Chemistry composition 9th edn (Atheneu, Rio de Janeiro) **1992**
35. **Frisvad JC**, Thrane U, **2004**. Mycotoxin production by common filamentous fungi. Samson RA, Hoekstra ES, Frisvad JC. Utrecht: Centraalbureau voor Schimmelcultures; 2004:321-330.
36. **Frisvad J.C.**, Neriman Yilmaz, Ulf Thrane, Kasper Bøwig Rasmussen, Jos Houbraeken, Robert A Samson. **2013**. *Talaromyces atroroseus*, a New Species Efficiently Producing Industrially Relevant Red Pigments. *PLoS ONE* 8(12): 84-102.
37. **Gaden E L**, Petsiavas D N, Winoker J., **1954**. Microbial production of riboflavin and citric acid from citrus molasses. *J Agric Food Chem* 2 632-638.
38. **Gardeli X.**, **2009**. Study of essential oil composition of some aromatic plants of greek flora. Agricultural university of Athens
39. **Graumlich T R**. **1983** Potential fermentation products from citrus processing wastes. *Food Technol* 37( 12) 94-97.
40. **Hamano P.S.**, Orozco S.F.B., Kilikian B.V.**2005**. Concentration determination of extracellular and intracellular red pigments produced by *Monascus* sp. *Brazilian Archives of Biology and Technology*.48:43-49
41. **Hanika C**, Carlton WW., **1994**. Toxicology and pathology of citrinin. *Biodeterioration research*. 4:41–63

42. **Harvey, E.M.; Rygg, G.L.J., 1936.** Physiological changes in the rind of California oranges during growth and storage. *J. Agric. Food Chem.* 52, 723-46.
43. **Hajjaj H, Francois J-M, Goma G, Blanc PJ., 2012.** Effect of amino acids on red pigments and citrinin production in *Monascus ruber*. *J Food Sci* 77(3):156–9.
44. **Hiri N.M., Ioannou I., Ghoul M., Boudhrioua N.M. 2015.** Proximate chemical composition of orange peel and variation of phenols and antioxidant activity during convective air drying. *Journal of new sciences, Agriculture and Biotechnology, JS-INAT(9)*, 881-890
45. **Hossain M, Brooks J D, Maddox I.S., 1984.** The effect of the sugar source on citric acid production by *Aspergillus niger*. *Appl Microbiol Biotechnol* 19 393-397
46. **Hull, W.Q., Lindsay, C.W., Baier, W.E., 1953.** Chemicals from oranges. *Ind. Eng. Chem.* 45 (5), 876–890.
47. **Jauri KS, Lakshmi Kumari M, Sen A., 1978.** Production of protein by fungi from agricultural wastes. *Zbl Bakt II Abt Bd* 133:588—596
48. **Jiang, Y., Li, H. B., Chen, F., & Hyde, K. D., 2005.** Production potential of water-soluble *Monascus* red pigment by a newly isolated *Penicillium* sp. *J. Agric. Technol*, 1(1), 113-126
49. **Kamal, G. M., Anwar, F., Hussain, A. I., Sarri, N.Ashraf, M. Y., 2011.** Yield and chemical composition of Citrus essential oils as affected by drying pretreatment of peels. *International Food Research Journal* 18(4): 1275-1282
50. **Kammoun Bejar A, Ghanem N, Mihoubi D, Kechaou N, Boudhrioua Mihoubi N. 2011.** Effect of infrared drying on drying kinetics, color, total phenols and water and oil holding capacities of orange (*Citrus sinensis*) peel and leaves. *Int J Food Eng* 7: 5-11.

51. **Kim C, Jung H, Kim YO, Shin CS., 2006.** Antimicrobial activities of amino acid derivatives of *Monascus* pigments. FEMS Microbiol Lett. 264, 117–124.
52. **Kongruang Sasithorn. 2011.** Growth kinetics of biopigment production by Thai isolated *Monascus purpureus* in a stirred tank bioreactor. J Ind Microbiol Biotechnol.38:93–99
53. **Kulandaisamy Venil Chidambaram, Perumalsamy Lakshmanaperumalsamy. 2009.** An Insightful Overview on Microbial Pigment, Prodigiosin. Electronic Journal of Biology, 5(3): 49-61
54. **Kumar A, Hari Shankar Vishwakarma, Jyoti Singh, Shipra Dwivedi and Mahendra Kumar. 2015.** Microbial pigments and their applications in various industries. IJPCBS, 5(1), 203-212
55. **Kurono M., K. Nakanishi, K. Shindo and M.Tada., 1963.** Biosynthesis of monascubrine and monascoflavin. Chemical Pharmacological Bulletin 11: 358-362.
56. **Lapuerta, M., Hernández, J.J., Pazo, A., López, J., 2008.** Gasification and cogasification of biomass wastes: effect of the biomass origin and the gasifier operating conditions. Fuel Process. Technol. 89 (9), 828–837.
57. **Lin T.F., Yakushijin, K., Büchi, G.H. and Demain, A.L., 1992.** Formation of water-soluble *Monascus* red pigments by biological and semi-synthetic processes. Journal of Industrial Microbiology. 9: 173-179.
58. **Ma E. Cervera, Q., Mejía Sánchez, G.M., 1993.** Integrated utilization of orange peel. Bioresour. Technol. 44, 61-63.
59. **Ma Y, Chen J, Liu D, Ye X., 2009.** Simultaneous extraction of phenol compounds of citrus peel extracts: Effect of ultrasound. Ultrason Sonochem 16: 57-62.
60. **Mahmood A. U., J. Greenman, and A. H. Scragg, 1998.** Orange and potato peel extracts: Analysis and use as *Bacillus* substrates for the production of extracellular enzymes in continuous culture. Enzyme Microb. Technol. 22:130-136

61. **Manchand** PS, Whalley WB. **1973**. Isolation and structure of ankaflavin: a new pigment from *Monascus anka*. *Phytochemistry* 12(10):2531–2.
62. **Mapari** SAS, Hansen ME, Meyer AS, Thrane U, **2008<sup>a</sup>**. Computerized screening for novel producers of *Monascus*-like food pigments in *Penicillium* species. *J Agric Food Chem*, 56:9981-9989. 7.
63. **Mapari**, S.A.S., Meyer, A.S., Thrane, U., **2008b**. Evaluation of *Epicoccum nigrum* for growth, morphology and production of natural colorants in liquid media and on solid rice medium. *Biotechnol. Lett.*, 30(12):2183-2190.
64. **Mapari** SAS, Meyer AS, Thrane U, Frisvad JC, **2009**. Identification of potentially safe promising fungal cell factories for the production of polyketide natural food colorants using chemotaxonomic rationale. *Microb Cell Fact*, 8:24.
65. **Mapari** SA, Thrane U, Meyer AS. **2010**. Fungal polyketide azaphilone pigments as future natural food colorants? *Trends Biotechnol.* 28(6):300-7
66. **Martín** M.A., J.A. Siles, A.F. Chica, A. Martín, **2010**. Biomethanization of orange peel waste. *Bioresource Technology.* 101: 8993–8999
67. **Mendez**, A.C. Perez, J.C. Montanez, G. Martinez, and C.N. Aguilar. 2011. Red pigment production by *Penicillium purpurogenum* GH2 is influenced by pH and temperature. *J.Zhejiang Univ.Sci B* 12:961-968.
68. **Mondello**, L., Casilli, A., Tranchida, P. Q., Dugo, P. and Dugo, G. **2005**. Comprehensive two-dimensional GC for the analysis of Citrus essential oils. *Flavour and Fragrance Journal* 20: 136-140.
69. **Moon** J- H, Terao J., **1998**. Antioxidant Activity of Caffeic Acid and Dihydrocaffeic Acid in Lard and Human Low-Density Lipoprotein †. *J Agric Food Chem* 46: 5062–5065
70. **Nicolini** L, Malvezzi Campeggi L, von Hunolstein C, Carilli A., **1983**. Single cell protein production from agricultural wastes. *Proceedings of the 20th Congr Naz Soc Ital Microbiol, Gardone, Riviera, Italy.* pp 142-143

71. **Ogihara, J., Kato, J., Oishi, K., Fujimoto, Y. 2001.** PP-R 7-(2-hydroxyethyl)-monascubramine, a red pigment produced in the mycelia of *Penicillium* sp. *AZ.J.Biosc.Bioeng.* 91:44-47
72. **Osmanova N., Schultze W., Ayoub N., 2010.** Azaphilones: a class of fungal metabolites with diverse biological activities. *Phytochem Rev*, 9:315-342
73. **Pandey Ashok, 2008.** Solid-state fermentation. *Bioprocess Engineering & Technology*
74. **Padmavathi T., Tanvi Prabhudessai, 2013.** A Solid Liquid State Culture Method to Stimulate *Monascus* Pigments by Intervention of Different Substrates. *International Research Journal of Biological Sciences.* Vol. 2(10), 22-29),
75. **Patakova P. Monascus secondary metabolites, 2013.** Production and biological activity. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 40:169–181].
76. **Plessas, S., Bekatorou, A., Koutinas, A.A., Soupioni, M., Banat, I.M., Marchant, R., 2007.** Use of *Saccharomyces cerevisiae* cells immobilized on orange as biocatalyst for alcoholic fermentation. *Bioresour. Technol.* 98 (4), 860–865
77. **Panesar R, Shubhneet Kaur and Parmjit S Panesar, 2015.** Production of microbial pigments utilizing agro-industrial waste: a review. *Current Opinion in Food Science*, 1:70–76
78. **Rivas, B.; Torrado, A.; Torre, P.; Converti, A.; Domínguez, J.M. 2008.** Submerged citric acid fermentation on orange peel autohydrolysate. *J. Agric. Food Chem.* 56, 2380–2387
79. **Saidani, M., Dhifi, W. and Marzouk, B. 2004.** Lipid evaluation of some Tunisian Citrus seeds. *Journal of Food Lipids* 11: 242–250
80. **Sabater-Vilar M, Maas RFM, Fink-Gremmels J. 1999.** Mutagenicity of commercial *Monascus* fermentation products and the role of citrinin contamination. *Mutat Res.* 444, 7–16.

81. **Salomon H, Karrer P. 1932.** Pflanzenfarbstoffe XXXVIII. Ein Farbstoff aus “rotem” Reis, Monascin. *Helv Chim Acta* 15:18–22.
82. **Samsudin N.I.P. and Noorlidah Abdullah. 2014.** Prevalence of viable *Monascus* van Tieghem species in fermented red rice at consumer level in Selangor, Malaysia. *JOBIMB*, Vol 2, No 2, 57-60
83. **Shao Y, Lei M, Mao Z, Zhou Y, Chen F. 2014.** Insights into *Monascus* biology at the genetic level. *Appl Microbiol Biotechnol* 98(9):3911–22
84. **Shazwani Nur, Binti Nadzri 2012.** The optimization of red pigment by *Monascus purpureus* FTC5356 in solid state fermentation
85. **Sheperd και Carels, 1979.** Red pigment production. U.S. Patent 4,145,154
86. **Shepherd D. and Carels M.,** Product formation and differentiation in fungi, *Fungal Differentiation*, Smith, J.E. (Ed.), Dekker, New York, 515 (1983).  
**Shi YC, Pan TM 2011.** Beneficial effects of *Monascus purpureus* NTU 568-fermented products: a review. *Appl Microbiol Biotechnol* 90:1207–1217
87. **Silalahi, J. 2002.** Anticancer and health protective properties of Citrus fruit components. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition* 11: 79–84
88. **Siles, J.A., Li, Q., Thompson, I., 2010.** Biorefinery of waste orange peel. *Crit. Rev. Biotechnol.* 30 (1), 63–69.
89. **Sinclair, W.B.; Crandall, P.R. 1953.** Polyuronides fraction and soluble and insoluble carbohydrates of orange peel. *Bot. Gaz.* 115, 162-73
90. **Singh, R.P., Murthy, K.N.C. and Jayaprakasha, G.K. 2002.** Studies on the antioxidant activity of pomegranate (*Punica granatum*) peel and seed extracts using in vitro models. *J. Agric. Food Chem.* 50(1): 81-86
91. **Smyth, T.A., Lambert, D.R., 1998.** Biodegradable Liquid Degreaser and Parts Cleaner Composition. US Patent No. 5965512
92. **Spears, K., 1988.** Developments in food colourings: the natural alternatives. *Trends Biotechnol.* 6:283–288

93. **Stich E., Y. Chaundry, C. Schnitter, 2002.** Colour, you eat with your eyes, *Int. Food Ingrid.* 1:6–8.
94. **Stoll sensu Raper & Thom, 1945.** A manual of the *Penicillia*: 563-633
95. **Syed Mahin Basha. 2015.** Production and application of natural food colorants from the fungal genus *Monascus*. *IJAPMMBS.* 2:178-188
96. **Vidyalakshmi R, Paranthaman R, Muruges S, Singaravadivel K., 2009.** Stimulation of *Monascus* Pigments by Intervention of Different Nitrogen Sources. *Global J B B.* 4, 25-28.
97. **Wang Y., Qian Zhao, Shou-Yu Guo and Xiao-Yong Liu. 2005.** A further analysis of *Monascus* species based on molecular data with a reappraisal of *Monascus*. 137-146
98. **Wilkins, M.R., Suryawati, L., Maness, N.O., Chrz, D., 2007a.** Ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae* and *Kluyveromyces marxianus* in the presence of orange-peel oil. *World J Microbiol. Biotechnol.* 23 (8), 1161–1168.
99. **Went, 1895.** *Ann. Sci. Nat. Bot. Sér.:* 1
100. **Wheatley, A., 1990.** *Anaerobic Digestion: A Waste Treatment Technology.* Elsevier, London.
101. **Wicker, L., Hart, H. E.. and Parish, M. E. 2005.** Recovery and utilization of by-products from citrus processing wastes. *ACS Symp. Ser.* 1989,405:368-380
102. **Wong H-C, Bau Y-S. 1977.** Pigmentation and antibacterial activity of fast neutron-and X-ray-induced strains of *Monascus purpureus* Went. *Plant Physiol* 60(4):578–81.
103. [www.gcsf.gr/index.asp?a\\_id=99&txt=y&show\\_sub=1](http://www.gcsf.gr/index.asp?a_id=99&txt=y&show_sub=1)
104. [www.mycobank.org](http://www.mycobank.org)
105. [www.sigmaaldrich.com](http://www.sigmaaldrich.com)
106. [www.usda.gov](http://www.usda.gov)



107. **Zhang**, H.C., Zhan, J.X., Su, K.M., 2006. A kind of potential food additive produced by *Streptomyces coelicolor*: characteristics of blue pigment and identification of a novel compound  $\lambda$ -actinorhodin. *Food Chem.* 95:186-192.