



**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ  
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΗΧΑΝΙΚΗΣ ΚΑΙ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ**

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ  
ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ, ΣΥΝΤΗΡΗΣΗ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΕΣ ΔΙΕΡΓΑΣΙΕΣ  
ΤΡΟΦΙΜΩΝ, ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΒΙΟ-ΟΙΚΟΝΟΜΙΑΣ**

**Μεταπτυχιακή διατριβή**

Μελέτη της παραγωγής φουμαρικού οξέος μέσω ζυμώσεων με χρήση του οργανικού κλάσματος αστικών δημοτικών απορριμάτων

**Χρυσάνθη Χ. Τάτση**

Επιβλέπων καθηγητής:  
Κουτίνας Αποστόλης, Καθηγητής ΓΠΑ

**ΑΘΗΝΑ 2021**

**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ  
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΗΧΑΝΙΚΗΣ ΚΑΙ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ**

**Μεταπτυχιακή διατριβή**

Μελέτη της παραγωγής φουμαρικού οξέος μέσω ζυμώσεων με χρήση του οργανικού κλάσματος αστικών δημοτικών απορριμάτων

«Study of fumaric acid production via fermentation with the use of municipal solid waste organic fraction»

**Χρυσάνθη Χ. Τάτση**

Εξεταστική Επιτροπή:

Κουτίνας Απόστολης, Αναπληρωτής Καθηγητής ΓΠΑ (επιβλέπων)

Παπανικολάου Σεραφείμ, Καθηγητής ΓΠΑ

Κούκος Ιωάννης, Καθηγητής Πολυτεχνείου Πατρών

## **Μελέτη της παραγωγής φουμαρικού οξέος μέσω ζυμώσεων με χρήση του οργανικού κλάσματος αστικών δημοτικών απορριμάτων**

ΠΜΣ: Επεξεργασία, Συντήρηση και Βιοτεχνολογικές Διεργασίες Τροφίμων, Ανάπτυξη προϊόντων βιοοικονομίας

Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου

Εργαστήριο Μηχανικής και Επεξεργασίας Τροφίμων

### **ΠΕΡΙΛΗΨΗ**

Στη παρούσα μεταπτυχιακή μελέτη εξετάστηκε η διαδικασία παραγωγής φουμαρικού οξέος μέσω μικροβιακών ζυμώσεων με τη χρήση του μικροοργανισμού *Candida blankii* (CBS 6734). Τα πειράματα στόχευαν στη βελτιστοποίηση της διαδικασίας και στην αξιοποίηση του οργανικού κλάσματος στερεών αστικών αποβλήτων για την παραγωγή φουμαρικού οξέος. Τέλος, μελετήθηκε η διαδικασία διαχωρισμού του φουμαρικού άλατος που παράγεται. Για το σκοπό αυτό διερευνήθηκε η διαλυτότητα του φουμαρικού οξέος και η χρήση ηλεκτροχημικού κελιού.

Σε πρώτο στάδιο μελετήθηκε η επίδραση του οξυγόνου και η συγκέντρωση εκχυλίσματος ζύμης στην παραγωγή του φουμαρικού οξέος και στην ανάπτυξη του μικροοργανισμού με τη χρήση γλυκόζης ως πηγή άνθρακα. Παράλληλα όμως μελετήθηκε και η διαδικασία ζύμωσης για παραγωγή φουμαρικού οξέος με την χρήση διαφορετικών σακχάρων τα οποία περιέχονται στο υδρόλυμα αστικών αποβλήτων. Ακόμη, το υδρόλυμα αστικών αποβλήτων χρησιμοποιήθηκε ως πηγή άνθρακα και αζώτου. Η ζύμωση με πηγή άνθρακα τη γλυκόζη στις βέλτιστες συνθήκες έδωσε ικανοποιητικά αποτελέσματα, με τη συγκέντρωση φουμαρικού οξέος να είναι ίση με 46,86 g/L και ταυτόχρονη παραγωγή μηλικού οξέος 22,53 g/L. Στην περίπτωση του υδρολύματος αστικών αποβλήτων παρατηρήθηκε μικρότερη παραγωγή φουμαρικού οξέος ίση με 16,57g/L.

Στη συνέχεια, αξιολογήθηκε η διαλυτότητα του φουμαρικού άλατος που παράγεται από τη ζύμωση σε διαφορετικές τιμές pH, παρατηρώντας μείωση της διαλυτότητάς του με τη μείωση του pH. Τέλος, χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικά ηλεκτρόδια για την μελέτη διαχωρισμού ή όχι του φουμαρικού άλατος. Το ηλεκτρόδιο PbO αξιολογήθηκε ως καταλληλότερο για το διαχωρισμό διότι δεν μετέτρεπε το φουμαρικό οξύ σε κανένα άλλο οξύ κατά την διάρκεια της κατάλυσης. Επίσης, με τη χρήση ηλεκτροχημικού κελιού ήταν επιτυχής ο διαχωρισμός του φουμαρικού άλατος της ζύμωσης.

**Επιστημονική περιοχή:** Αξιοποίηση αποβλήτων για παραγωγή προϊόντων προστιθέμενης αξίας

**Λέξεις κλειδιά:** φουμαρικό οξύ, υδρόλυμα αστικών αποβλήτων, *Candida blankii*, ημι-συνεχείς ζυμώσεις, ηλεκτροχημικό κελί

## **Study of fumaric acid production via fermentation with the use of municipal solid waste organic fraction**

*MSC: Food processing, preservation and biotechnological work, development of bioeconomy products  
Department of Food Science and Human Nutrition  
Laboratory of Food Process Engineering*

### **ABSTRACT**

In the present study, the process of fumaric acid production through microbial fermentation was examined using the microorganism *Candida blankii* (CBS 6734). The experiments were aimed at optimizing the process and utilizing the organic fraction of municipal solid waste for the production of fumaric acid. Finally, the process of separation of the fumarate is studied. For this purpose, the solubility of fumaric acid and the use of an electrochemical cell were investigated.

In the first stage, the effect of oxygen and the concentration of yeast extract on the production of fumaric acid and the growth of the microorganism using glucose as a carbon source was studied. At the same time, the fermentation process for the production of fumaric acid was studied using different sugars contained in the municipal waste. The municipal solid waste was also used as a source of carbon and nitrogen. Fermentation with carbon source glucose under optimal conditions gave satisfactory results, with the concentration of fumaric acid being 46,86 g/L and simultaneous production of malic acid 22,53 g/L. In the case of municipal solid waste, a lower production of fumaric acid equal to 16.57g / L was observed.

Then, the solubility of fumarate at different pH values was evaluated, observing a decrease in its solubility with decreasing pH. Finally, different electrodes were used to study the separation or not of fumarate. The PbO electrode was evaluated as the most suitable for separation because it did not convert fumaric acid to any other acid during catalysis. Also, with the use of an electrochemical cell the separation of the fumarate was successful.

**Scientific area: Waste recovery for the production of value added products**

**Key words:** fumaric acid, organic fraction of municipal solid waste, *Candida blankii*, fed-batch fermentation, electrochemical cell

## Ευχαριστίες

Η παρούσα μεταπτυχιακή μελέτη πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Μηχανικής και Επεξεργασίας Τροφίμων του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών στα πλαίσια του Π.Μ.Σ: Επιστήμη & Τεχνολογία Τροφίμων & Διατροφή του Ανθρώπου.

Θα ήθελα να εκφράσω τις θερμότερες ευχαριστίες μου στον επιβλέποντα καθηγητή, κύριο Κουτίνα Αποστόλη, για την ευκαιρία που μου έδωσε να ασχοληθώ με το συγκεκριμένο θέμα, καθώς και για την επιστημονική του καθοδήγηση.

Ιδιαίτερα θερμά θα ήθελα να ευχαριστήσω την κα. Πατεράκη Χρυσάνθη για τις εύστοχες συμβουλές, την καθοδήγηση και για την συνεργασία της κατά την διεξαγωγή της πειραματικής διαδικασίας της μεταπτυχιακής διατριβής.

Πιο πολύ ευχαριστώ όλους τους συμφοιτητές του Π.Μ.Σ., τους υποψήφιους διδάκτορες και μεταδιδάκτορες καθώς και το προσωπικό των εργαστηρίων, για την συνεργασία και τη στήριξη κατά την διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας.

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

# ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

|          |   |    |
|----------|---|----|
| <b>1</b> | <b>ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b> .....   | 8  |
| 1.1      | Φουμαρικό οξύ.....  | 8  |
| 1.2      | Ιδιότητες και Εφαρμογές φουμαρικού οξέος .....  | 9  |
| 1.3      | Παραγωγή φουμαρικού οξέος.....  | 10 |
| 1.4      | Στελέχη που παράγουν φουμαρικό οξύ μέσω μικροβιακών ζυμώσεων .....                          | 11 |
| 1.4.1    | <i>Candida Blankii</i> .....  | 11 |
| 1.5      | Πρώτες ύλες .....   | 12 |
| 1.5.1    | Στερεά αστικά απόβλητα .....  | 12 |
| 1.6      | Διαλυτότητα .....   | 13 |
| 1.7      | Ηλεκτροχημικό κελί .....  | 14 |
| 1.8      | Σκοπός της μελέτης .....  | 16 |
| <b>2</b> | <b>ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ</b> .....  | 16 |
| 2.1      | Βιολογικό υλικό, ανάπτυξη και συντήρηση .....   | 16 |
| 2.2      | Θρεπτικά υποστρώματα.....   | 17 |
| 2.3      | Συνθήκες ζύμωσης σε κωνικές φιάλες.....   | 18 |
| 2.4      | Συσχέτιση βιομάζας DCW - OD.....  | 18 |
| 2.4.1    | Υγρό εμβόλιο-Θρεπτικά υποστρώματα .....   | 18 |
| 2.5      | Διαλυτότητα φουμαρικού και μηλικού οξέος σε διαφορετικά pH.....                             | 19 |
| 2.5.1    | Δημιουργία αλάτων φουμαρικού και μηλικού οξέος.....   | 19 |
| 2.5.2    | Οξίνιση διαλυμάτων .....  | 19 |
| 2.5.3    | Προσδιορισμός φουμαρικού και μηλικού οξέος .....  | 19 |
| 2.6      | Επιλογή ηλεκτροδίων για το διαχωρισμό ή όχι αλάτων του φουμαρικού και του μηλικού οξέος 20  |    |
| 2.6.1    | Δημιουργία αλάτων φουμαρικού και μηλικού οξέος.....   | 20 |
| 2.6.2    | Περιγραφή ηλεκτροδίων.....  | 20 |
| 2.6.3    | Επιλογή ηλεκτροδίων για το διαχωρισμό ή όχι φουμαρικού άλατος του υγρού ζύμωσης 20          |    |
| 2.6.4    | Χρήση ηλεκτροχημικού κελιού για τον διαχωρισμό ή όχι φουμαρικού άλατος του υγρού ζύμωσης 20 |    |
| 2.7      | Αναλυτικές μεθόδους .....   | 21 |
| 2.7.1    | Μέτρηση ξηρού βάρους της βιομάζας .....   | 21 |
| 2.7.2    | Μέτρηση Οπτικής πυκνότητας .....  | 21 |
| 2.7.3    | Μέθοδος υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC) .....                                   | 21 |
| 2.7.4    | Προσδιορισμός λαδιού .....  | 22 |
| 2.7.5    | Προσδιορισμός αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων (FAN analysis).....                           | 22 |
| 2.7.6    | Προσδιορισμός ανόργανου φωσφόρου (IP analysis) .....  | 24 |

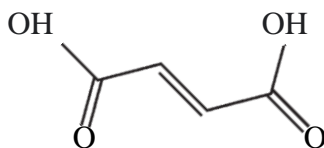
|              |   |           |
|--------------|---|-----------|
| <b>3</b>     | <b>ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ</b>  | <b>25</b> |
| <b>3.1</b>   | <b>Παραγωγή φουμαρικού οξέος μέσω ημισυνεχών ζυμώσεων</b>   | <b>25</b> |
| <b>3.1.1</b> | <b>Ζυμώσεις για συσχέτιση βιομάζας και οπτικής πυκνότητας με πηγή άνθρακα γλυκόζη</b>                                   | <b>25</b> |
| <b>3.1.2</b> | <b>Παραγωγή φουμαρικού οξέος από γλυκόζη σε διαφορετικές ταχύτητες ανάδευσης</b>  | <b>26</b> |
| <b>3.1.3</b> | <b>Παραγωγή φουμαρικού οξέος από γλυκόζη σε διαφορετικές συγκεντρώσεις πηγής αζώτου</b>                                 | <b>33</b> |
| <b>3.1.4</b> | <b>Παραγωγή φουμαρικού οξέος από διαφορετικές πηγές άνθρακα</b>   | <b>36</b> |
| <b>3.1.5</b> | <b>Ζυμώσεις για συσχέτιση βιομάζας και οπτικής πυκνότητας με πηγή άνθρακα λάδι από υδρολυμένα αστικά απόβλητα (MSW)</b> | <b>43</b> |
| <b>3.1.6</b> | <b>Παραγωγή φουμαρικού οξέος από υδρολυμένα αστικά απόβλητα (MSW)</b>   | <b>46</b> |
| <b>3.2</b>   | <b>Διαλυτότητα φουμαρικού και μηλικού οξέος σε διαφορετικά pH</b>   | <b>51</b> |
| <b>3.2.1</b> | <b>Μέτρηση διαλυτότητας φουμαρικού οξέος</b>  | <b>51</b> |
| <b>3.2.2</b> | <b>Μέτρηση διαλυτότητας μηλικού οξέος</b>   | <b>53</b> |
| <b>3.3</b>   | <b>Χρήση ηλεκτροδίων για το διαχωρισμό ή όχι αλάτων του φουμαρικού και του μηλικού οξέος</b>                            | <b>57</b> |
| <b>3.3.1</b> | <b>Χρήση ηλεκτροδίων για τον διαχωρισμό αλάτων του φουμαρικού οξέος</b>   | <b>57</b> |
| <b>3.3.2</b> | <b>Χρήση ηλεκτροδίων για τον διαχωρισμό αλάτων του μηλικού οξέος</b>  | <b>59</b> |
| <b>3.3.3</b> | <b>Χρήση ηλεκτροδίων για το διαχωρισμό αλάτων των οξέων που περιέχονται στο υγρό της ζύμωσης</b>                        | <b>60</b> |
| <b>3.4</b>   | <b>Χρήση ηλεκτροχημικού κελιού για τον διαχωρισμό ή όχι του άλατος του φουμαρικού οξέος στο υγρό της ζύμωσης</b>        | <b>62</b> |
| <b>4</b>     | <b>ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ</b>   | <b>64</b> |
| <b>5</b>     | <b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b>   | <b>66</b> |

# 1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η αυξανόμενη έλλειψη ορυκτών πρώτων υλών, σε συνδυασμό με την ανάγκη ανάπτυξης νέων διεργασιών και τεχνολογίας βασισμένων σε ανανεώσιμες πηγές, έχουν ενισχύσει την έννοια των βιοδιυλιστηρίων (Martin-Dominguez V. et al., 2018). Η αυξανόμενη ανησυχία για την ασφάλεια των τροφίμων και των προσθέτων των γαλακτομικών προϊόντων σε συνδυασμό με το αυξανόμενο κόστος των χημικών ουσιών με βάση το πετρέλαιο έχουν αναζωπυρώσει τον ενδιαφέρον για τις διαδικασίες ζύμωσης για την παραγωγή φουμαρικού οξέος (Qing Xu et al., 2012). Το φουμαρικό οξύ και οι περισσότερες ενώσεις που εμπλέκονται στον κύκλο Krebs, θεωρούνται βασικές χημικές ουσίες πλατφόρμας, όχι μόνο για όξινα και πρόσθετα στη βιομηχανία τροφίμων, αλλά και για την πιθανή χρήση τους ως μονομερών (Martin-Dominguez V. et al., 2018). Το δυναμικό του φουμαρικού οξέος ως πρώτη ύλη στη βιομηχανία πολυμερών και η αύξηση του κόστους του φουμαρικού οξέος με βάση το πετρέλαιο αυξάνει το ενδιαφέρον για τις διαδικασίες ζύμωσης για την παραγωγή αυτής της ένωσης από ανανεώσιμες πηγές (Roa Engel et al., 2008). Σε αυτό το πλαίσιο, πολλές μελέτες επικεντρώνονται στη βελτίωση της διαδικασίας ζύμωσης όχι μόνο χρησιμοποιώντας ανανεώσιμες πρώτες ύλες και γενετικά τροποποιημένους μικροοργανισμούς, αλλά και αναπτύσσοντας και εφαρμόζοντας διαφορετικές τεχνικές για εύκολη ανάκτηση του φουμαρικού οξέος από τον ζυμωμένο ζωμό (Plica R. A. et al., 2019).

## 1.1 Φουμαρικό οξύ

Το φουμαρικό οξύ ( $\text{HO}_2\text{CCH}=\text{CHCO}_2\text{H}$ ) είναι ένα φυσικό δικαρβοξυλικό οργανικό οξύ. Συναντάται στη βιβλιογραφία με τις ονομασίες, (E)-2- βουτενοδιοϊκό οξύ (IUPAC ID) ή trans-1,2-αιθυλενο-δικαρβοξυλικό οξύ. Είναι λευκό στερεό και εμφανίζεται ευρέως στη φύση. Παράγεται ως άχρωμο, κρυσταλλικό και σε σκόνη με γέυση που μοιάζει με φρούτα (οξύ φρούτων). Είναι ασθενές οξύ και έχει χαμηλή διαλυτότητα στο νερό (Goldberg et al., 2009). Η χαμηλή διαλυτότητά του είναι της τάξης  $7 \cdot 10^{-3} \text{g/L}$ , σε θερμοκρασία  $25^\circ\text{C}$  (Yalkowsky et al., 2003). Παρουσιάζει τιμές  $\text{pK}_a$  ίσες με 3,1 και 4,64 (Das et al., 1980).

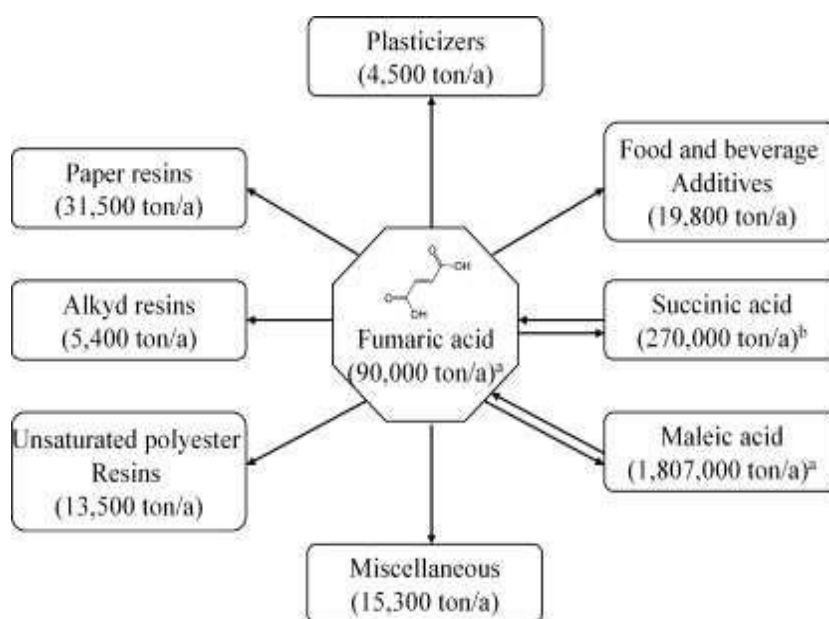


Σχήμα 1: Χημική δομή του φουμαρικού οξέος (Yalkowsky et al., 2003).



## 1.2 Ιδιότητες και Εφαρμογές φουμαρικού οξέος

Λόγω της δομής του που περιλαμβάνει έναν διπλό δεσμό άνθρακα-άνθρακα και δύο ομάδες καρβοξυλικών οξέων, το φουμαρικό οξύ μπορεί εύκολα να εστεροποιηθεί και να πολυμεριστεί (Roa Engel et al., 2008). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα η κύρια εφαρμογή του ως χημική πρώτη ύλη να είναι η παραγωγή ρητινών χαρτιού, ακόρεστων πολυεστερικών ρητινών, αλκυδικών ρητινών, πλαστικοποιητές και διάφορα βιομηχανικά προϊόντα (Koutinas et al., 2014). Επιπλέον, το φουμαρικό οξύ έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως ως όξινο πρόσθετο συστατικό στα τρόφιμα και στα ποτά λόγω της μη τοξικής φύσης του και της μοναδικής γεύσης του (Mcginn S. M., 2004). Λόγω όλων αυτών των διαφορετικών εφαρμογών, το φουμαρικό οξύ έχει αναγνωριστεί ως ένα από τα κορυφαία δέκα χημικά συστατικά. Η παγκόσμια ζήτηση για φουμαρικό οξύ ήταν 225,2 kt το 2012, το οποίο αναμένεται να είναι πάνω από 300 kt το 2020 ( Papadaki et al., 2017).



Σχήμα 2: Ετήσια παραγωγή και εφαρμογές του φουμαρικού οξέος (Roa-Engel et al, 2008).

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

διατροφής των αγροτικών ζώων. Μελέτη έδειξε ότι, μεγάλη μείωση, περίπου 70%, στην εκπομπή μεθανίου στα βοοειδή επιτυγχάνεται προσθέτοντας το φουμαρικό οξύ στη διατροφή των ζώων και συμπληρώνει ότι αυξάνει την απόδοση της τροφής στα πουλερικά και στους χοίρους (Mcginn S. M., 2004). Ακόμη, άλατα του φουμαρικού οξέος μπορούν να μετατραπούν ενζυμικά σε L-ασπαρτικό οξύ και L-μηλικό οξύ από την ασπαρτάση και τη φουμαράση, αντίστοιχα (Liese et al., 2006). Τέλος, μια εντελώς διαφορετική εφαρμογή του φουμαρικού οξέος είναι η χρήση του στην ιατρική επιστήμη. Αρκετές μελέτες εδώ και αρκετά χρόνια αναφέρουν την συνεισφορά στην θεραπεία της ψωρίασης (Reichet al., 2009). Επίσης, οι δι-μεθυλεστέρες του φουμαρικού οξέος, είναι πολλά υποσχόμενοι στη θεραπεία της σκλήρυνσης κατά πλάκας (Killestein et al., 2011).

### 1.3 Παραγωγή φουμαρικού οξέος

Επί του παρόντος, το φουμαρικό οξύ συντίθεται κυρίως με χημικές μεθόδους μέσω του ισομερισμού μηλεϊνικού οξέος υπό την κατάλυση ανόργανων οξέων (Roa-Engel et al., 2008). . Αυτή η πετροχημική μέθοδος είναι η πιο ευρέως εφαρμοσμένη διαδικασία για την παραγωγή φουμαρικού οξέος λόγω της υψηλής απόδοσης παραγωγής. Ωστόσο, η διαδικασία ισομερισμού συνήθως συμβαίνει σε υψηλές θερμοκρασίες, που οδηγούν στο σχηματισμό υποπροϊόντων και η κατανάλωση ενέργειας είναι τεράστια (Lohbeck et al., 2000). Αυτό οδήγησε σε έρευνα της ενζυμικής μετατροπής του μηλεϊνικού οξέος σε φουμαρικό οξύ. Μικροοργανισμοί που παράγουν μηλεϊνική ισομεράση είναι είδη *Pseudomonas*, *Alcaligenes faecalis*, και *Pseudomonas fluorescens* (Roa Engel et al., 2008). Ωστόσο, η μηλεϊνική ισομεράση είναι ασταθής ακόμη και σε μέτριες θερμοκρασίες και επομένως είναι επιθυμητό ένα σταθερό στη θερμότητα ένζυμο μηλεϊνικής ισομεράσης. Αυτό το ένζυμο παράγεται από τα βακτήρια *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus brevis* και *Bacillus sp. MI- 105* (Goto et al., 1998). Σύμφωνα με τους συγγραφείς, η χρήση των ενζύμων από αυτά τα βακτήρια μπορεί να βελτιώσει τη διαδικασία παραγωγής του φουμαρικού οξέος. Επιπλέον, σε μια πιο πρόσφατη μελέτη χρησιμοποιώντας το βακτήριο *Pseudomonas alcaligenes* XD-1, αναφέρθηκαν υψηλά ποσοστά μετατροπής μηλεϊνικού οξέος σε φουμαρικό οξύ (Nakajima-Kambe et al., 1997). Εναλλακτικά, η διαδικασία μικροβιακής ζύμωσης έχει προσελκύσει μεγάλα συμφέροντα που κατέχουν τη βιωσιμότητα και φιλικές προς το περιβάλλον ιδιότητες. Η μικροβιακή ζύμωση για την παραγωγή φουμαρικού οξέος έχει δείξει πολλά υποσχόμενες προοπτικές, και πολλές μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί, συμπεριλαμβανομένης της απομόνωσης και της βελτίωσης του στελέχους, της επιλογής υποστρώματος, τη βελτιστοποίηση διαδικασίας και τον διαχωρισμό (Guo et al., 2020).

## 1.4 Στελέχη που παράγουν φουμαρικό οξύ μέσω μικροβιακών ζυμώσεων

Μερικά βακτήρια συμπεριλαμβανομένων των *Zymomonas Mobilis*, *Bacillus macerans*, *Thermoanaerobacter ethanolicus* και ζυμομύκητες συμπεριλαμβανομένων των *Scheffersomyces stipitis*, *Brettanomyces* ή *Brett*, *Pachysolen tannophilus* και *Candida blankii* έχουν αναγνωρισθεί ως παραγωγοί φουμαρικού οξέος (Liao et al., 2007; Tamakawa et al., 2012). Ωστόσο, οι μύκητες εξακολουθούν να είναι οι κύριοι παραγωγοί, συμπεριλαμβανομένων των *Rhizopus nigricans* (Foster et al., 1938), *R. arrhizus*, *R. oryzae* και *R. Formosa* (Gangl et al., 1990; Xu et al., 2017; Foster et al., 1938). Επίσης μύκητες που ανήκουν στα γένη *Cunninghamella*, *Cirinella* και *Penicillium* μπορούν να παράξουν φουμαρικό οξύ. Τα *Aspergillus glaucus* και *Caldariomyces fumago* ταυτοποιήθηκαν επίσης ως παραγωγοί φουμαρικού οξέος (Mondala, 2015). Ανάμεσα σε αυτά τα στελέχη, ο *R. arrhizus* θεωρήθηκε κάποτε το καταλληλότερο στέλεχος για παραγωγή φουμαρικού οξέος με την υψηλότερη παραγωγή 121,0g/L φουμαρικού οξέος (Lee et al., 2019). Ωστόσο, η απαίτηση για πλούσια θρεπτικά συστατικά του *R. arrhizus* επιβαρύνει το κόστος βιολογικής διαδικασίας. Εναλλακτικά, ο *R. oryzae* με χαμηλότερες διατροφικές απαιτήσεις έχει γίνει ο κύριος παραγωγός (Cao et al., 1996; Wang et al., 2015).

### 1.4.1 *Candida Blankii*

Η *Candida blankii* ανακαλύφθηκε τη δεκαετία του 1960, μετά την ανάλυση των οργάνων μολυσμένης νυφίτσας στον Καναδά από τον F. Blank. Αυτές οι νυφίτσες μολύνθηκαν με την άγνωστη ζύμη και όλοι πέθαναν από μυκητίαση. Περιγράφηκε το 1968 από τους HR Buckley και N. van Uden, οι οποίοι την ονόμασαν έτσι προς τιμήν του Blank. Η περιγραφή δημοσιεύθηκε στο περιοδικό *Mycopathologia et Mycologia Applicata*, μαζί με περιγραφές τεσσάρων άλλων νέων ειδών (Buckley H. R. et al., 1968).

Η ζύμη *Candida Blankii* η οποία είχε απομονωθεί από το έδαφος συσσωρεύει αξιοσημείωτες ποσότητες φουμαρικού οξέος στο ζωμό καλλιέργειας (Furukawa et al., 1970). Όπως πολλές οι ζύμες, η *Candida blankii* έχει αποτελέσει αντικείμενο διαφόρων βιοτεχνολογικών μελετών. Σύμφωνα με τις δοκιμές ταυτοποίησης, η *Candida blankii* μπορεί να αφομοιώσει: γλυκόζη, σακχαρόζη, γαλακτόζη, διαλυτό άμυλο, ξυλόζη, L-αραβινόζη, D-αραβινόζη και γλυκερόλη μεταξύ άλλων πηγών άνθρακα. Η ζύμη αυτή έχει αποδειχθεί ότι παράγει φουμαρικό οξύ. Ο μεταβολισμός όμως της ζύμης αυτής είναι εντελώς άγνωστος. Επίσης, η ζύμη αυτή μπορεί να είναι επικίνδυνο παθογόνο και ανθεκτικό στη θεραπεία σε ανθρώπινους ξενιστές. Η έρευνα της ζύμης έχει θεραπευτικό, ιατρικό και βιομηχανικό ενδιαφέρον (<https://www.gbif.org/species/165531879>).

## 1.5 Πρώτες ύλες

Για την ανάπτυξη μιας αειφόρου βιοτεχνολογικής διεργασίας για παραγωγή χημικών προστιθέμενης υψηλής αξίας πρέπει να χρησιμοποιούνται χαμηλής αξίας υποστρώματα, τα οποία ενδεχομένως να προέρχονται από απόβλητα.

### 1.5.1 Στερεά αστικά απόβλητα

Σύμφωνα με τις Οδηγίες της Ευρωπαϊκής Ένωσης 75/442/EEC και 91/156/EEC, ο όρος «απόβλητα» περιλαμβάνει όλες τις ουσίες και τα αντικείμενα τα οποία απορρίπτονται ή προβλέπεται να απορριφθούν ή απαιτείται να απορριφθούν: α) Βιομηχανικά υγρά απόβλητα, β) Αστικά και βιομηχανικά στερεά απόβλητα και ιλύς, γ) Αστικά λύματα, δ) Στερεά και υγρά παραπροϊόντα της εκμετάλλευσης ορυκτών πόρων, ε) Απόβλητα κτηνοτροφικών εκμεταλλεύσεων, καθώς και λοιπές ανθρώπινες ενέργειες όπως γεωργικές δραστηριότητες, ατυχήματα από μεταφορά χημικών ουσιών, αστοχία τεχνικών έργων, ανεξέλεγκτη απόρριψη αποβλήτων ή και τυχαίες διαφυγές ρύπων από χώρους αποθήκευσης. Επομένως, ως Αστικά στερεά απόβλητα σύμφωνα με τον πρόσφατο ορισμό της Ευρωπαϊκής Ένωσης θεωρούνται τα οικιακά απόβλητα καθώς και άλλα απόβλητα τα οποία λόγω φύσης ή σύνθεσης είναι παρόμοια με τα οικιακά. Ο ορισμός αυτός αν και ασαφής, διαχωρίζει τα αστικά στερεά απόβλητα από τρεις άλλες βασικές κατηγορίες, τα επικίνδυνα απόβλητα (κυρίως βιομηχανικά ή μολυσματικά), τα αδρανή απόβλητα (κυρίως από οικοδομικές εργασίες) και τις ιλύες, για τα οποία προβλέπεται χωριστή συλλογή και επεξεργασία/διάθεση (Ανδρεαδάκης κ.ά., 2008).

Η ταχεία αύξηση του πληθυσμού και της αστικοποίησης συνέβαλε σημαντικά στην αυξημένη ποσότητα στερεών αποβλήτων γεωργικών, βιομηχανικών και δημοτικών. Η διάθεση και διαχείριση στερεών αποβλήτων έχει γίνει ένα σοβαρό ζήτημα στον σημερινό κόσμο, καθώς έχει επιβλαβείς επιπτώσεις στην υγεία και στο περιβάλλον (Khushboo et al., 2020). Το οργανικό κλάσμα των αστικών στερεών αποβλήτων και άλλα εύκολα βιοαποικοδομήσιμα στερεά υποστρώματα (π.χ. αγρο-απόβλητα) πρέπει να υποβάλλονται σε κατάλληλη επεξεργασία για τη μείωση των περιβαλλοντικών επιπτώσεων και την ανάκτηση της ενέργειας, ενώ οι μαζικές επεξεργασίες διάθεσης (π.χ. χώροι υγειονομικής ταφής ή καύση) πρέπει να αποφεύγεται (Bolzonella et al., 2005). Έχουν διεξαχθεί μια ποικιλία ερευνητικών έργων για τη δημιουργία ορισμένων στρατηγικών που σχετίζονται με τη χρήση στερεών αποβλήτων για την παραγωγή βιοκαυσίμων. Ακόμη, τα απόβλητα μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως δυνητικός άνθρακας και πηγή ενέργειας για την παραγωγή καυσίμων και διαφόρων χημικών, συμπεριλαμβανομένων πετροχημικών προϊόντων (Khushboo et al., 2020). Μια επίσης επιλογή για να επιτευχθεί αυτός ο στόχος δίνεται από την αναερόβια πέψη και τις διεργασίες συν-πέψης για την παραγωγή μεθανίου. Ωστόσο, οι αναερόβιες βιοδιεργασίες στερεής κατάστασης

μπορούν να χρησιμοποιηθούν και για την παραγωγή πολύτιμων προϊόντων ( Bolzonella et al., 2005).

## 1.6 Διαλυτότητα

Ο όρος «διαλυτότητα» ορίζεται ως η μέγιστη ποσότητα διαλυμένης ουσίας που μπορεί να διαλυθεί σε μία δεδομένη ποσότητα διαλύτη. Μπορεί επίσης να οριστεί ποσοτικά και ποιοτικά. Ποσοτικά ορίζεται ως η συγκέντρωση της διαλυμένης ουσίας σε ένα κορεσμένο διάλυμα σε μια συγκεκριμένη θερμοκρασία. Σε ποιοτικούς όρους, η διαλυτότητα μπορεί να οριστεί ως η αυθόρμητη αλληλεπίδραση δύο ή περισσότερων ουσιών για να σχηματίσουν ομοιογενή μοριακή διασπορά. Ένα κορεσμένο διάλυμα είναι αυτό στο οποίο η διαλυμένη ουσία βρίσκεται σε ισορροπία με τον διαλύτη (Martin A. Et al., 1994). Τα ασθενή οξέα και οι ασθενείς βάσεις υφίστανται ιονισμό σε διάλυμα. Η έκταση του ιονισμού της κάθε ένωσης σε ένα διάλυμα εξαρτάται από τη σταθερά διαχωρισμού και το pH του μέσου. Για παράδειγμα, τα αλκαλοειδή άλατα είναι πιο διαλυτά σε όξινο pH και αρχίζουν να καθιζάνουν καθώς αυξάνεται το pH. Και το αντίστροφο, τα όξινα άλατα είναι πιο διαλυτά σε αλκαλικό pH και αρχίζουν να καθιζάνουν καθώς το pH μειώνεται.

Το pH μιας ουσίας σχετίζεται με τη pKa και τη συγκέντρωση των ιονισμένων και μη ιονισμένων μορφών της ουσίας από την εξίσωση:

$$pH = pKa + \log [A^- / HA], \text{ όπου } pKa = \text{σταθερά διαχωρισμού}$$

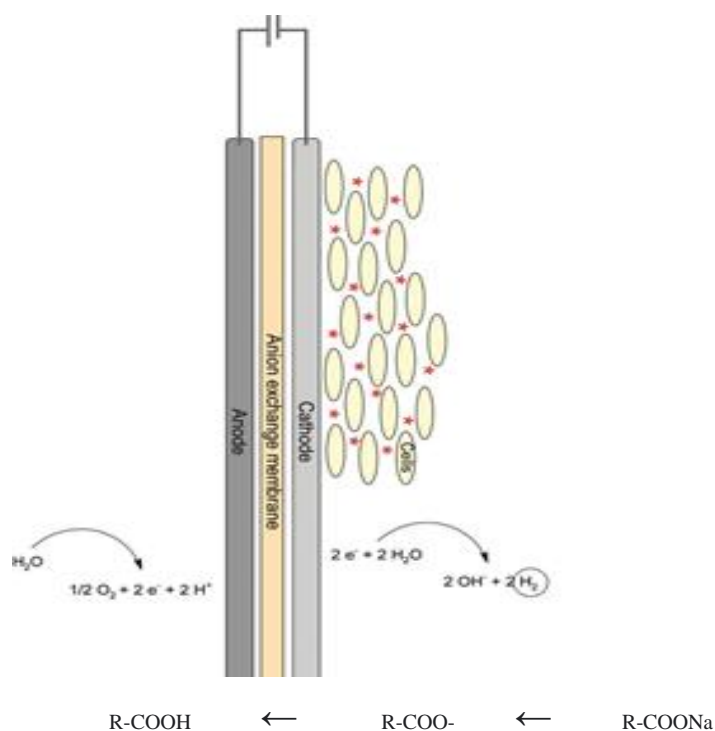
Εάν η ουσία φέρεται έξω από τη pKa τότε η διαλυτότητα θα αλλάξει λόγω της εισαγωγής νέων διαμοριακών δυνάμεων, κυρίως ιοντικές δυνάμεις έλξης. Από την εξίσωση προκύπτει επίσης ότι όταν το pH του διαλύματος είναι μία μονάδα pH πάνω ή κάτω από την τιμή pKa, το διάλυμα περιέχει περίπου 9% μη προστατευμένα ή πρωτονιωμένα είδη, αντίστοιχα. Ομοίως, εάν το pH του διαλύματος είναι δύο μονάδες πάνω ή κάτω από την τιμή pKa, το διάλυμα περιέχει σχεδόν εξ ολοκλήρου (99%) μη προστατευμένα ή πρωτονιωμένα είδη, αντίστοιχα (Bhagavan N. V., 2002).

Προς το παρόν, η γνώση της θερμοδυναμικής ισορροπίας παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στη λειτουργία, το σχεδιασμό, την ανάλυση και τη βελτιστοποίηση του καθαρισμού και του διαχωρισμού σε πολλές βιομηχανίες, συμπεριλαμβανομένων των φαρμακευτικών, βιολογικών, τροφίμων και χημικών (Long et al., 2010). Στην περίπτωση του φουμαρικού οξέος είναι γνωστό ότι η κρυστάλλωση είναι το κρίσιμο βήμα που καθορίζει την ποιότητά του. Ως εκ τούτου, η γνώση της διαλυτότητας είναι μια εξαιρετικά απαραίτητη κατάσταση ώστε να σχεδιαστεί σωστά η διαδικασία κρυστάλλωσης και να βελτιωθεί η καθαρότητα και η απόδοση του φουμαρικού οξέος (Yang et al., 2012).

## 1.7 Ηλεκτροχημικό κελί

Η ηλεκτροδιάλυση (ED) είναι μία από τις κύριες αναπτυσσόμενες εφαρμογές της τεχνολογίας μεμβράνης. Όταν αναφερόμαστε στην τεχνολογία διαχωρισμού μεμβρανών εννοούμε τον μερικό διαχωρισμό ενός μίγματος δύο ή περισσότερων συστατικών με τη χρήση ενός ημι-διαπερατού φράγματος. Οι κινητήριες δυνάμεις μπορεί να είναι υδροστατική πίεση, συγκέντρωση ή ηλεκτρικό δυναμικό. Οι μεμβράνες ανταλλαγής ιόντων χρησιμοποιούνται σε διάφορες διαδικασίες διαχωρισμού, η πιο σημαντική από τις οποίες είναι η ηλεκτροδιάλυση. Τις τελευταίες δεκαετίες, η τεχνολογία μεμβρανών και ο αριθμός των ατόμων που ασχολούνται με τις μεμβράνες αυξάνεται ραγδαία (Mulder Marcel, 1996).

Η ηλεκτροδιάλυση λαμβάνει χώρα σε μια ρύθμιση που ονομάζεται ηλεκτροχημικό κελί. Το κελί αποτελείται από δύο διαμερίσματα και μια μεμβράνη ανταλλαγής ιόντων τοποθετείται μεταξύ δύο ηλεκτροδίων. Το άμεσο ηλεκτρικό πεδίο στη μεμβράνη μεταξύ των ηλεκτροδίων, είναι η κινητήρια δύναμη στη διαδικασία αυτή. Ενώ τοποθετείται ηλεκτρικό ρεύμα στο σύστημα, πραγματοποιείται ηλεκτροχημική αντίδραση. Έτσι, ο σχηματισμός οξυγόνου και η μείωση των πρωτονίων λαμβάνει χώρα στην άνοδο και στην κάθοδο. Η μετακίνηση όλων των ιόντων που διαλύθηκαν σε αυτή τη διαδικασία οφείλεται στην εφαρμοσμένη ηλεκτρική ενέργεια, επομένως τα κατιόντα κινούνται προς την άνοδο, ενώ τα ανιόντα προς την κάθοδο. Στην περίπτωση των ζυμώσεων, η ηλεκτρολυτική μεμβράνη είναι μια τεχνική στην οποία υπάρχουν ηλεκτρόδια στη ζύμωση τα οποία προκαλούν ηλεκτροχημικές αντιδράσεις. Η μεμβράνη επιτρέπει την κατακράτηση κυττάρων στον ζωμό ζύμωσης ενώ εκχylίζει τα φορτισμένα όξινα άλατα. Η τρέχουσα ροή ανιόντων καρβοξυλικού οξέος από τον ζωμό της ζύμωσης στο συμπύκνωμα οξέος καθιστά δυνατή τη συμπύκνωση, την οξίνιση και τον καθαρισμό των προϊόντων ζύμωσης μέσω κρυστάλλωσης. Πράγματι, η μεμβράνη επιτρέπει τη διέλευση πολλών ανιόντων καρβοξυλικού οξέος (π.χ. οξικό / αιθανοϊκό, βουτυρικό / βουτανοϊκό, ηλεκτρικό / βουτανιοϊκό) καθώς και ανόργανα ιόντα, αλλά όχι κυττάρων και στερεών. Επιπλέον, ιόντα υδροξειδίου που δημιουργούνται κατά την καθοδική ηλεκτρόλυση μπορούν να αντικαταστήσουν τον έλεγχο του pH, απομακρύνοντας έτσι δυνητικά δοσολογία της ζύμωσης με βάση. Αντίστροφα, τα πρωτόνια που παράγονται στην άνοδο θα μπορούσε να οξινίσουν τα προϊόντα, επομένως δεν απαιτείται προσθήκη οξέος για οξίνιση (Pateraki C. et al., 2019).



Σχήμα 3: Ηλεκτροχημικό σύστημα (Pateraki C. et al., 2019)

Όπως αναφέραμε προηγουμένως, η διαδικασία της ηλεκτροδιάλυσης λαμβάνει χώρα στο ηλεκτροχημικό κελί. Ένα ηλεκτροχημικό μπορεί να περιγραφεί από τους νόμους της ηλεκτροχημείας. Η ηλεκτροχημεία είναι ένας τομέας της φυσικής χημείας που ασχολείται με τη μελέτη των αντιδράσεων που είτε καταναλώνουν είτε παράγουν ηλεκτρισμό. Αυτές οι αντιδράσεις ονομάζονται ηλεκτροχημικές αντιδράσεις. Τα ηλεκτροχημικά συστήματα ασχολούνται με διαδικασίες και παράγοντες που επηρεάζουν τη μεταφορά φορτισμένων μορίων μέσω της διεπαφής μεταξύ χημικών φάσεων, για παράδειγμα, μεταξύ ενός ηλεκτρονικού αγωγού (ένα ηλεκτρόδιο) και ενός ιονικού αγωγού (ενός ηλεκτρολύτη) (Faulkner et al., 2001). Η παραγωγή ή η κατανάλωση ηλεκτρικής ενέργειας συνδέεται πάντα με την παραγωγή ρεύματος. Έτσι, η τυπική χημική αντίδραση σε ένα διάλυμα ηλεκτρολύτη στο οποίο παρατηρούμε αλλαγές στο ηλεκτρικό φορτίο μπορεί να περιγραφεί από τα ακόλουθα:

- Καθοδική αντίδραση νερού:  $2\text{H}_2\text{O}_{(l)} + 2\text{e}^- \rightarrow \text{H}_{2(g)}\uparrow + 2\text{OH}^-_{(aq)}$
- Ανοδική αντίδραση νερού:  $2\text{H}_2\text{O}_{(l)} \rightarrow \text{O}_{2(g)}\uparrow + 4\text{H}^+_{(aq)} + 4\text{e}^-$

Στο ηλεκτρόδιο που συνδέεται με το θετικό πόλο της ηλεκτρικής πηγής λαμβάνει χώρα μια αντίδραση οξειδωσης, ενώ στο ηλεκτρόδιο που συνδέεται με τον αρνητικό πόλο λαμβάνει χώρα αντίδραση αναγωγής. Σύμφωνα με τη φορά κίνησης των ηλεκτρονίων, το ηλεκτρόδιο της οξειδωσης,

αν και βρίσκεται σε υψηλό δυναμικό, ονομάζεται άνοδος και τα ηλεκτρόνια φεύγουν από αυτό, ενώ το ηλεκτρόδιο της αναγωγής ονομάζεται κάθοδος και τα ηλεκτρόνια πηγαίνουν σε αυτό.

Οι ηλεκτροχημικές αντιδράσεις πραγματοποιούνται πάντα στη διεπαφή μεταξύ του ηλεκτροδίου και του ηλεκτρολύτη. Η εφαρμογή της τάσης (V) είναι το κλειδί για την ενεργοποίηση μιας αντίδρασης ηλεκτροδίου, όπου μπορούμε να δούμε ότι ένα βολτ είναι απλώς η ενέργεια (J) που απαιτείται για να μετακινηθεί το φορτίο (c). Επομένως, η εφαρμογή τάσης σε ηλεκτρόδιο παρέχει ηλεκτρική ενέργεια. Δεδομένου ότι τα ηλεκτρόνια έχουν φορτίο, μια εφαρμοζόμενη τάση μπορεί να αλλάξει την «ενέργεια» των ηλεκτρονίων μέσα σε ένα μεταλλικό ηλεκτρόδιο.

## 1.8 Σκοπός της μελέτης

Στη παρούσα μελέτη επιλέχθηκαν να μελετηθούν οι παράγοντες που δεν έχουν μελετηθεί στο παρελθόν οι οποίοι επηρεάζουν τη ζύμωση για την παραγωγή φουμαρικού οξέος με σκοπό τη βελτιστοποίηση της διεργασίας. Πιο συγκεκριμένα, με τη χρήση της ζύμης *Candida Blankii* μελετήθηκε η επίδραση του οξυγόνου στις μεταβολικές ανάγκες του μικροοργανισμού και η συγκέντρωση εκχυλίσματος ζύμης που προστέθηκε στο θρεπτικό μέσο. Στις βέλτιστες συνθήκες μελετήθηκαν ζυμώσεις από διαφορετικά σάκχαρα εκτός της γλυκόζης. Επίσης, χρησιμοποιήθηκε το υδρόλυμα αστικών αποβλήτων ως υπόστρωμα για την παραγωγή του φουμαρικού οξέος.

Έπειτα, διερευνήθηκε η διαδικασία ως προς το διαχωρισμό του φουμαρικού άλατος που παράγεται. Για το λόγο αυτό μελετήθηκε η διαλυτότητα του φουμαρικού οξέος. Ακόμη, διερευνήθηκε η ανάκτηση του φουμαρικού οξέος μέσω ανιοντικής μεμβράνης με τη χρήση ηλεκτροχημικού κελιού δοκιμάζοντας διαφορετικά ηλεκτρόδια για τον διαχωρισμό ή όχι του φουμαρικού άλατος.

## 2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 2.1 Βιολογικό υλικό, ανάπτυξη και συντήρηση

Στη παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε η ζύμη *Candida blankii* (CBS 6734) από την εταιρεία CBS-KNAW Collections για τη βιοτεχνολογική παραγωγή φουμαρικού οξέος. Για την παρασκευή υγρού εμβολίου χρησιμοποιήθηκε θρεπτικό μέσο το οποίο περιείχε 3g/L yeast extract, 3g/L malt extract, 10g/L γλυκόζη και 5g/L πεπτόνη. Η επώαση διεξήχθη σε κωνικές φιάλες των 250mL με ενεργό όγκο 50mL στις οποίες προστέθηκαν θρεπτικό μέσο και 1mL μέσο το οποίο περιείχε τον μικροοργανισμό. Ο μικροοργανισμός ήταν αποθηκευμένος σε κρυογόνα φιαλίδια. Οι κωνικές φιάλες τοποθετήθηκαν σε αναδευόμενο επωαστικό θάλαμο, σε θερμοκρασία 30°C και σε ταχύτητα ανάδευσης 180rpm για 24 ώρες. Για την ανανέωση του μικροοργανισμού παρασκευάστηκε στερεό θρεπτικό μέσο το οποίο



περιείχε τη σύσταση του υγρού εμβολίου και 20g/L άγαρ. Το θρεπτικό μέσο αυτό τοποθετήθηκε σε τρυβλία Petri στα οποία πραγματοποιήθηκε η εξάπλωση του μικροοργανισμού. Όλα τα δείγματα επώαστηκαν στους 30 °C για 24 ώρες. Μετά την επώαση, επιλεγμένες αποικίες από κάθε τρυβλίο Petri μεταφέρθηκαν με μικροβιολογικό κρίκο σε υγρό θρεπτικό μέσο. Ο μικροοργανισμός αποθηκεύτηκε σε κρυογόνα φυαλίδια των 2mL σε θερμοκρασία -80°C προκειμένου να διατηρηθεί η ζωτικότητα του. Το μέσο στο οποίο αποθηκεύτηκε περιείχε υγρό καλλιέργειας και γλυκερόλη σε αναλογία 1:1. Για την αποφυγή μολύνσεων από άλλους μικροοργανισμούς όλοι οι χειρισμοί έγιναν υπό ασηπτικές συνθήκες σε θάλαμο κάθετης νηματικής ροής. Όλα τα υλικά, τα σκεύη και τα διαλύματα παρασκευάστηκαν και τοποθετήθηκαν σε αυτόκαυστο, για την αποστείρωση τους πριν χρησιμοποιηθούν, στους 121°C για 20 λεπτά.



Εικόνα 1: Στέλεχος *Candida blankii* (CBS 6734)

## 2.2 Θρεπτικά υποστρώματα

Οι ζυμώσεις πραγματοποιήθηκαν σε θρεπτικά υποστρώματα τα οποία περιείχαν ως πηγή άνθρακα γλυκόζη η οποία προστέθηκε σε 2 διαφορετικές συγκεντρώσεις (50 και 100 g/L). Επίσης, η παραγωγή φουμαρικού οξέος διερευνήθηκε και με μαννόζη, αραβινόζη, γαλακτόζη, ξυλόζη, γλυκερόλη και φρουκτόζη ως πηγές άνθρακα, οι οποίες απατώνται στο υδρόλυμα αστικών αποβλήτων, με αρχική συγκέντρωση 100 g/L. Τέλος, χρησιμοποιήθηκε υδρόλυμα αστικών αποβλήτων ως πηγή άνθρακα με συνολική αρχική συγκέντρωση σακχάρων 100 g/L. Ακόμη, περιείχαν 0,4 g/L yeast extract, 3g/L NH<sub>4</sub>Cl, 0,5g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,5g/L K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,5g/L MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O, 0,01g/L FeSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O, 0,0005g/L MnSO<sub>4</sub> 4H<sub>2</sub>O, 0,01g/L CaCl<sub>2</sub> 2H<sub>2</sub>O και 40 g/L CaCO<sub>3</sub>. Στις ζυμώσεις οι οποίες πραγματοποιήθηκαν με πηγή άνθρακα γλυκόζη, χρησιμοποιήθηκαν επίσης θρεπτικά υποστρώματα τα οποία περιείχαν διαφορετικές συγκεντρώσεις yeast extract (1 g/L και

4g/L). Ενώ, στις ζυμώσεις οι οποίες πραγματοποιήθηκαν με πηγή άνθρακα υδρόλυμα αστικών αποβλήτων δεν προστέθηκε καθόλου yeast extract.

### **2.3 Συνθήκες ζύμωσης σε κωνικές φιάλες**

Αρχικά, πραγματοποιήθηκαν ζυμώσεις, με χρήση γλυκόζης ως πηγή άνθρακα, σε κωνικές φιάλες συνολικού όγκου 500mL αλλά και σε κωνικές φιάλες συνολικού όγκου 2L. Ο ενεργός όγκος ήταν 50mL και 200mL αντίστοιχα. Οι φιάλες τοποθετήθηκαν σε αναδευόμενο θάλαμο σε θερμοκρασία 30°C και σε ταχύτητα ανάδευσης 180rpm και 250rpm. Οι υπόλοιπες ζυμώσεις πραγματοποιήθηκαν μόνο σε κωνικές φιάλες συνολικού όγκου 500mL και τοποθετήθηκαν σε αναδευόμενο θάλαμο σε θερμοκρασία 30°C και σε ταχύτητα ανάδευσης 180rpm. Σε όλη τη διάρκεια της ζύμωσης πραγματοποιήθηκε μέτρηση του pH με πεχαμετρο Mettler Toledo και παρατήρηση της καθαρότητας του διαλύματος στο μικροσκόπιο. Για την ρύθμιση του pH προστέθηκε κατά την διάρκεια της ζύμωσης CaCO<sub>3</sub>. Τέλος, κατά τη διάρκεια της ζύμωσης όταν μειωνόταν η ποσότητα της πηγής άνθρακα έγινε προσθήκη της μέχρι τα 70g/L. Πάρθηκαν δείγματα πριν και μετά την προσθήκη σακχάρου κάθε φορά και κατά τη διάρκεια της ζύμωσης. Τα δείγματα στη συνέχεια αναλύθηκαν με την μέθοδο της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης, προσδιορίστηκε η βιομάζα, το άζωτο των ελεύθερων αμινομάδων και ο ανόργανος φώσφορος.

Μετά την προετοιμασία του θρεπτικού μέσου και την αποστείρωσή του ακολούθησε ο εμβολιασμός. Αρχικά, πραγματοποιήθηκε έλεγχος της καθαρότητας της μικροβιακής καλλιέργειας μέσω οπτικού μικροσκοπίου. Στη συνέχεια, εφόσον η καλλιέργεια παρατηρήθηκε καθαρή, στο θρεπτικό υπόστρωμα προστέθηκε υγρό εμβόλιο σε ποσότητα 10% του συνολικού όγκου του θρεπτικού μέσου.

### **2.4 Συσχέτιση βιομάζας DCW - OD**

#### **2.4.1 Υγρό εμβόλιο-Θρεπτικά υποστρώματα**

Αρχικά, για το προσδιορισμό της βιομάζας κατά τη διάρκεια της ζύμωσης πραγματοποιήθηκαν πειράματα με σκοπό τη συσχέτιση της βιομάζας με την οπτική πυκνότητα. Για τη παρασκευή των θρεπτικών υποστρωμάτων χρησιμοποιήθηκαν κωνικές φιάλες συνολικού όγκου 250mL, με ενεργό όγκο 50mL. Ως πηγή άνθρακα χρησιμοποιήθηκε γλυκόζη με συγκέντρωση 20 g/L. Επίσης, ως πηγή άνθρακα χρησιμοποιήθηκε λάδι το οποίο εκχυλίστηκε από το οργανικό κλάσμα αστικών αποβλήτων με συγκέντρωση 20g/L. Στην περίπτωση του λαδιού προστέθηκαν στο διάλυμα δύο διαφορετικοί γαλακτοματοποιητές ώστε το διάλυμα να είναι ομοιογενές. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκε Locust bean gum from Ceratonia, siliqua seeds και tween 60 σε συγκέντρωση 0,2%. Επίσης, το διάλυμα περιείχε 5 g/L πεπτόνη, 3g/L malt extract και 3g/L yeast extract.

## **2.5 Διαλυτότητα φουμαρικού και μηλικού οξέος σε διαφορετικά pH**

### **2.5.1 Δημιουργία αλάτων φουμαρικού και μηλικού οξέος**

Αρχικά, δημιουργήθηκαν διαλύματα φουμαρικού και μηλικού οξέος συγκέντρωσης 0,5M. Για τη δημιουργία των υδατικών διαλυμάτων χρησιμοποιήθηκε εμπορικό φουμαρικό και μηλικό οξύ. Το pH του κάθε διαλύματος ρυθμίστηκε στο 6. Η ρύθμιση του pH πραγματοποιήθηκε με διαφορετικούς τρόπους. Με τη προσθήκη:

- ο καυστικού νατρίου (NaOH)
- ο υδροξειδίου του μαγνησίου ( $Mg(OH)_2$ )
- ο ανθρακικού μαγνησίου ( $MgCO_3$ )

### **2.5.2 Οξίνιση διαλυμάτων**

Η οξίνιση όλων των διαλυμάτων πραγματοποιήθηκε σε αρχικό όγκο 20mL διαλύματος με τη προσθήκη ογκομετρούμενης ποσότητας υδροχλωρικού οξέος 7%. Σε διαφορετικές τιμές pH πάρθηκαν δείγματα για το προσδιορισμό του φουμαρικού και του μηλικού οξέος.

Επίσης, για την πραγματοποίηση ισοζυγίων μάζας σε διάλυμα άλατος φουμαρικού οξέος με καυστικό νάτριο έγινε η εξής διαδικασία. Για την κάθε τιμή pH, σε ξεχωριστά 10mL διαλύματος κάθε φορά προστέθηκε ογκομετρημένη ποσότητα HCL 7% για τη ρύθμιση του pH στις τιμές 5,9, 4,5, 3,5, 3, 2 και 1. Στη συνέχεια, κάθε διάλυμα φυγοκεντρήθηκε για να προσδιοριστεί η ποσότητα φουμαρικού οξέος στο υπερκείμενο διάλυμα και στο ίζημα ξεχωριστά.

### **2.5.3 Προσδιορισμός φουμαρικού και μηλικού οξέος**

Για τη μέτρηση του οξέος στο υπερκείμενο διάλυμα πραγματοποιήθηκε η αναλυτική μέθοδος της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης. Στη περίπτωση του διαλύματος φουμαρικού οξέος με καυστικό νάτριο το ίζημα που απέμεινε μετά τη φυγοκέντρηση ξηράνθηκε σε προζυγισμένα φυαλίδια στους 80°C. Μετά την ξήρανση μεταφέρθηκε σε ξηραντήρα μέχρι σταθεροποίησης του βάρους του και ζυγίστηκε σε αναλυτικό ζυγό.

## **2.6 Επιλογή ηλεκτροδίων για το διαχωρισμό ή όχι αλάτων του φουμαρικού και του μηλικού οξέος**

### **2.6.1 Δημιουργία αλάτων φουμαρικού και μηλικού οξέος**

Για τη διαδικασία αυτή χρησιμοποιήθηκαν διαλύματα φουμαρικού και μηλικού οξέος συγκέντρωσης 0,5M. Για τη ρύθμιση του pH στο 6 χρησιμοποιήθηκε υδροξείδιο του μαγνησίου ( $Mg(OH)_2$ ). Τα διαλύματα αυτά προστέθηκαν σε ποτήρι ζέσεως μέσα στο οποίο τοποθετήθηκαν τα ηλεκτρόδια. Ανά τακτά χρονικά διαστήματα πάρθηκαν δείγματα για τη μέτρηση του pH και το προσδιορισμό των οξέων με τη μέθοδο υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης όπως περιγράφονται στα αντίστοιχα κεφάλαια.

### **2.6.2 Περιγραφή ηλεκτροδίων**

Για τον διαχωρισμό αυτό χρησιμοποιήθηκαν 2 ηλεκτρόδια κάθε φορά τα οποία συνδεόταν μεταξύ τους μέσω μιας ηλεκτρικής πηγής. Στην άνοδο χρησιμοποιήθηκε ηλεκτρόδιο τιτανίου με επικάλυψη οξειδίου του ιριδίου. Καθ' όλη τη διάρκεια των πειραμάτων παρακολουθήθηκε το ηλεκτρικό ρεύμα, όπως και η τάση. Για την κάθοδο κάθε φορά χρησιμοποιήθηκε διαφορετικό ηλεκτρόδιο για να διερευνηθεί το πιο κατάλληλο για το διαχωρισμό των αλάτων. Χρησιμοποιήθηκε:

- γραφίτης
- ανοξείδωτο ατσάλι
- μονοξείδιο του μολύβδου ( $PbO$ )

### **2.6.3 Επιλογή ηλεκτροδίων για το διαχωρισμό ή όχι φουμαρικού άλατος του υγρού ζύμωσης**

Μετά το τέλος της ζύμωσης, υγρό ζύμωσης τοποθετήθηκε σε ποτήρι ζέσεως μαζί με τα ηλεκτρόδια υπό ανάδευση. Ανά τακτά χρονικά διαστήματα πάρθηκαν δείγματα 1ml για τη μέτρηση του pH και το προσδιορισμό των οξέων με τη μέθοδο υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης. Τα ηλεκτρόδια που χρησιμοποιήθηκαν για το διαχωρισμό αυτό περιγράφονται στο κεφάλαιο 1.6.2.

### **2.6.4 Χρήση ηλεκτροχημικού κελιού για τον διαχωρισμό ή όχι φουμαρικού άλατος του υγρού ζύμωσης**

Μετά το τέλος της ζύμωσης, υγρό ζύμωσης περάστηκε από την διάταξη του ηλεκτροχημικού κελιού. Ο θάλαμος της καθόδου συνδέθηκε με ένα εξωτερικό δοχείο το οποίο περιείχε 300mL υγρού ζύμωσης, ενώ ο θάλαμος της ανόδου συνδέθηκε με εξωτερικό δοχείο το οποίο περιείχε 10Mm

K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>. Μία αντλία ανακύκλωνε το υγρό ζύμωσης και το διάλυμα φωσφορικού καλίου διαμέσου της μεμβράνης με παράλληλη ροή. Το ηλεκτρόδιο που χρησιμοποιήθηκε στην άνοδο ήταν τιτάνιο με επικάλυψη οξειδίου του ιριδίου και στην κάθοδο ανοξειδωτο ατσάλι. Το ηλεκτρικό ρεύμα και η τάση ελέγχθηκαν καθ'όλη τη διάρκεια των πειραμάτων. Ανά τακτά χρονικά διαστήματα πάρθηκαν δείγματα 5ml για τη μέτρηση του pH και το προσδιορισμό των οξέων με τη μέθοδο υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης.

## **2.7 Αναλυτικές μεθόδους**

### **2.7.1 Μέτρηση ξηρού βάρους της βιομάζας**

Για τη μέτρηση της βιομάζας δείγμα φυγοκεντρήθηκε και το ίζημα που απέμεινε ξεπλύθηκε με νερό. Στη συνέχεια το ίζημα μαζί με το νερό τοποθετήθηκε σε προζυγισμένα γυάλινα φιαλίδια και ξηράθηκε στους 80°C. Μετά την ξήρανση τοποθετήθηκε σε αφυγραντήρα μέχρι σταθεροποίησης του βάρους του. Το ξηρό υπόλειμμα ζυγίστηκε σε ζυγό ακριβείας.

### **2.7.2 Μέτρηση Οπτικής πυκνότητας**

Ο προσδιορισμός της παραγόμενης βιομάζας κατά τη διάρκεια τη ζύμωσης έγινε έμμεσα με τη μέτρηση της οπτικής πυκνότητας σε φασματοφωτόμετρο (Hitachi U.2000 Spectrophotometer). Δείγματα πριν και μετά τη φυγοκέντρωση αραιώθηκαν με υδροχλωρικό οξύ 7% με σκοπό την εξουδετέρωση του CaCO<sub>3</sub>. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε λήψη της τιμής της απορρόφησης των δειγμάτων σε μήκος κύματος 600nm σε φασματοφωτόμετρο.

### **2.7.3 Μέθοδος υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC)**

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης των καταναλωθέντων σακχάρων και των παραγόμενων οξέων πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης. Τα δείγματα αρχικά φυγοκεντρήθηκαν και το υπερκείμενο διάλυμα τους χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση των σακχάρων και των παραγόμενων οξέων αφού πρώτα έγιναν οι κατάλληλες αραιώσεις. Όλα τα δείγματα αραιώθηκαν με 10mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> και φιλτραρίστηκαν με χρήση φίλτρων whatman που διέθεταν μεμβράνη με πόρους διαμέτρου 0,2μm.

Για τη μέθοδο αυτή χρησιμοποιήθηκε σύστημα Shimadzu. Συγκεκριμένα η στήλη με την οποία επιτεύχθηκε ο διαχωρισμός του δείγματος ήταν Phenomenex Rezex ROA (300mm x 7.8mm). Ως κινητή φάση χρησιμοποιήθηκε 10mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> σε υπερκάθαρο νερό. Η ροή της κινητής φάσης ήταν καθορισμένη στο 0,6mL/min, η θερμοκρασία ήταν στους 65 °C και ο όγκος της ένεσης ήταν 10μL.

### **2.7.3.1 Επεξεργασία δειγμάτων για τον προσδιορισμό του φουμαρικού οξέος**

Λόγω της καθίζησης του φουμαρικού οξέος στο μέσο καλλιέργειας υπό μορφή φουμαρικού ασβεστίου, για τη μέτρηση του φουμαρικού οξέος απαιτήθηκε μία προεργασία των δειγμάτων. Τα δείγματα αραιώθηκαν με απιονισμένο νερό και προστέθηκε σε αυτά διάλυμα θειικού οξέος ( $H_2SO_4$ ) 3M. Στη συνέχεια τα δείγματα θερμάνθηκαν στους  $80^\circ C$ . Με την προσθήκη του  $H_2SO_4$  το pH στο υγρό της ζύμωσης μεταβαλλόταν περίπου στη τιμή 1 όπου διαλυτοποιούταν το φουμαρικό ασβέστιο. Το φουμαρικό οξύ απελευθερωνόταν και ήταν διαλυτό στο υπερκείμενο διάλυμα ενώ προκαλούνταν καθίζηση στο θειικό ασβέστιο. Στη συνέχεια το δείγμα φυγοκεντρώνταν και αναλυόταν με την μέθοδο της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης..

### **2.7.4 Προσδιορισμός λαδιού**

Για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης του καταναλωθέντος λαδιού, αρχικά, 2mL κάθε δείγματος ξηράνθηκε στους  $80^\circ C$ . Στη συνέχεια, το ξηρό δείγμα αναμειχθηκε με 2mL εξανίου για 30 λεπτά σε υπερήχους. Έπειτα, ο διαλύτης μαζί με τις εκχυλισμένες λιπαρές ύλες συλλέχθηκαν με διήθηση με απλό ηθμό. Μετά την ολοκλήρωση της εκχύλισης, ο διαλύτης με τις λιπαρές ύλες μεταφέρθηκαν σε στεγνή και προζυγισμένη φιάλη εξάτμισης. Με περιστροφική εξάτμιση υπό κενό ανακτήθηκε ο διαλύτης και οι λιπαρές ύλες παρέμειναν στα τοιχώματα της φιάλης. Η φιάλη τοποθετήθηκε σε ξηραντήρα και στη συνέχεια ζυγίστηκε.

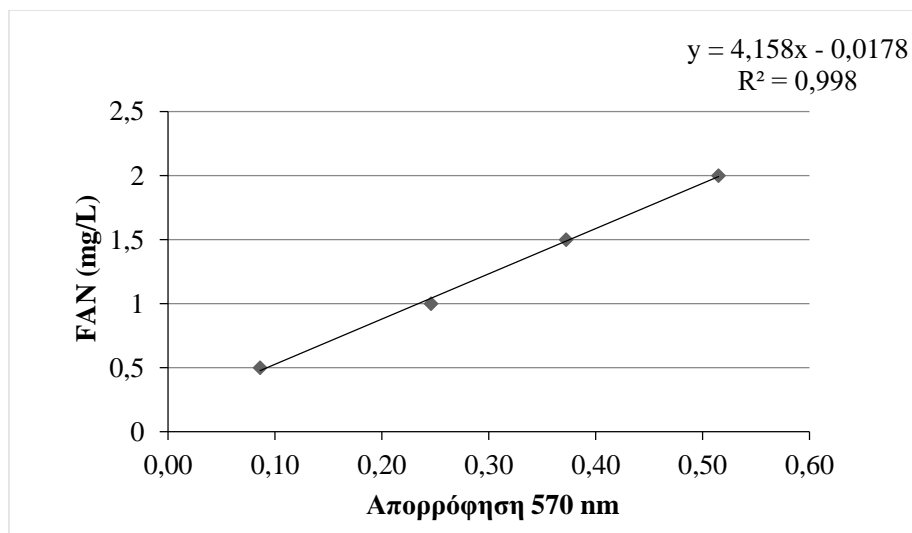
### **2.7.5 Προσδιορισμός αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων (FAN analysis)**

Για το προσδιορισμό του αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος Freeaminonitrogen(FAN) η οποία πραγματοποιείται μέσω φωτομέτρησης τη νινυδρίνης (Lie,1973). Σε δοκιματικό σωλήνα προστίθενται 1mL κατάλληλα αραιωμένου δείγματος , 0,5mL αντιδραστηρίου χρώσης (colour reagent) και ακολουθεί ανάδευση. Οι δοκιμαστικοί σωλήνες πωματίζονται και μεταφέρονται σε υδατόλουτρο στους  $100^\circ C$  για 16 λεπτά. Ακολουθεί ψύξη των δειγμάτων για 20λεπτά. Έπειτα, προστίθενται 2,5mL αντιδραστηρίου αραιώσης (dilution reagent) και ανάδευση μέχρι αλλαγή χρώματος για 20 δευτερόλεπτα. Τέλος, μετράται η απορρόφηση σε φασματοφωτόμετρο (Hitachi U.2000 Spectrophotometer) στα 570nm. Το τυφλό δείγμα για τον μηδενισμό του φασματοφωτόμετρου περιέχει 1mL απιονισμένο νερό. Η συγκέντρωση του δείγματος σε FAN υπολογίζεται από πρότυπες καμπύλες αναφοράς,εκφρασμένη σε mg/L (Διάγραμμα 1). Οι πρότυπες καμπύλες αναφοράς κατασκευάστηκαν χρησιμοποιώντας διαφορετικές αραιώσεις πρότυπου διαλύματος γλυκίνης.

Για τη μέθοδο αυτή χρησιμοποιήθηκαν τα αντιδραστήρια:

| Αντιδραστήρια για την μέτρηση FAN | Σύσταση   |
|-----------------------------------|---|
| Colour reagent                    | 49,71g όξινο φωσφορικό δινάτριο ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ), 5g νινυδρίνη, 3g φρουκτόζη και περίπου 60g όξινο φωσφορικό κάλιο ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) διαλυμένα σε 1L απεσταγμένο νερό<br>pH 6,6-6,8<br>Αποθήκευση 4°C |
| Dilution reagent                  | 2g ιωδικού καλίου ( $\text{KIO}_3$ ) σε 616mL απεσταγμένο νερό και προσθήκη 384mL αιθανόλης (καθαρότητας 100%)  |
| Αποθεματικό διάλυμα γλυκίνης      | 0,1072g γλυκίνης σε 100mL απεσταγμένο νερό<br>Αποθήκευση 4°C  |
| Πρότυπο διάλυμα γλυκίνης          | 1mL διαλύματος γλυκίνης σε 100mL αποστειρωμένο νερό<br>2mL από το παραπάνω διάλυμα περιέχει 2mg/L FAN   |

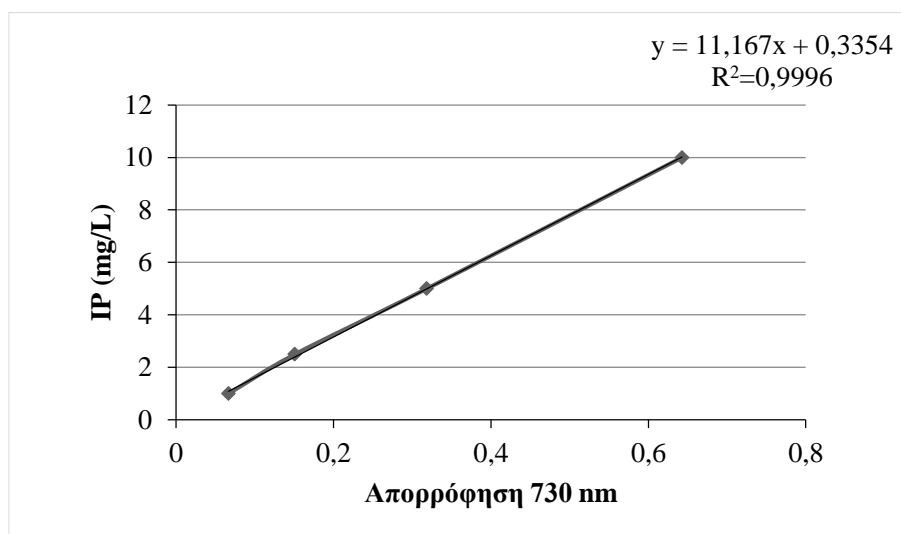
Πίνακας 1: Σύσταση αντιδραστηρίων για την μέτρηση FAN.



Διάγραμμα 1: Πρότυπη καμπύλη αναφοράς για τον υπολογισμό της ποσότητας FAN σε mg/L.

## 2.7.6 Προσδιορισμός ανόργανου φωσφόρου (IP analysis)

Για τον προσδιορισμό αυτό, αρχικά, τα δείγματα αραιώθηκαν σε δοκιμαστικούς σωλήνες μέχρι τελικό όγκο 5mL. Στη συνέχεια, προστέθηκαν 0,4mL 70%(v/v) διαλύματος υπερχλωρικού οξέος και ανακινήθηκαν για 10 δευτερόλεπτα. Έπειτα, προστέθηκαν ακόμη 0.3mL διαλύματος ασκορβικού οξέος 1% (w/v) και ανακινήθηκαν ξανά για 10 δευτερόλεπτα και τέλος προστέθηκαν 0.4mL διαλύματος αμμωνιακού μολύβδου 5% (w/v) και ξανά ανακινήθηκαν για 10 δευτερόλεπτα. Ακολούθησε 10 λεπτά αναμονή ώστε να αναπτυχθεί μπλε χρώμα. Η απορρόφηση μετρήθηκε σε φασματοφωτόμετρο (Hitachi U.2000 Spectrophotometer) στα 730nm. Το τυφλό δείγμα για τον μηδενισμό του φασματοφωτόμετρου περιέχει 1mL απιονισμένο νερό. Η συγκέντρωση του δείγματος σε ανόργανο φώσφορο υπολογίζεται από πρότυπες καμπύλες αναφοράς, εκφρασμένη σε mg/L (Διάγραμμα 2). Οι πρότυπες καμπύλες αναφοράς κατασκευάστηκαν χρησιμοποιώντας διαφορετικές αραιώσεις πρότυπου διαλύματος όξινου φωσφορικού καλίου.



Διάγραμμα 2: Πρότυπη καμπύλη αναφοράς για τον υπολογισμό της ποσότητας IP σε mg/L.

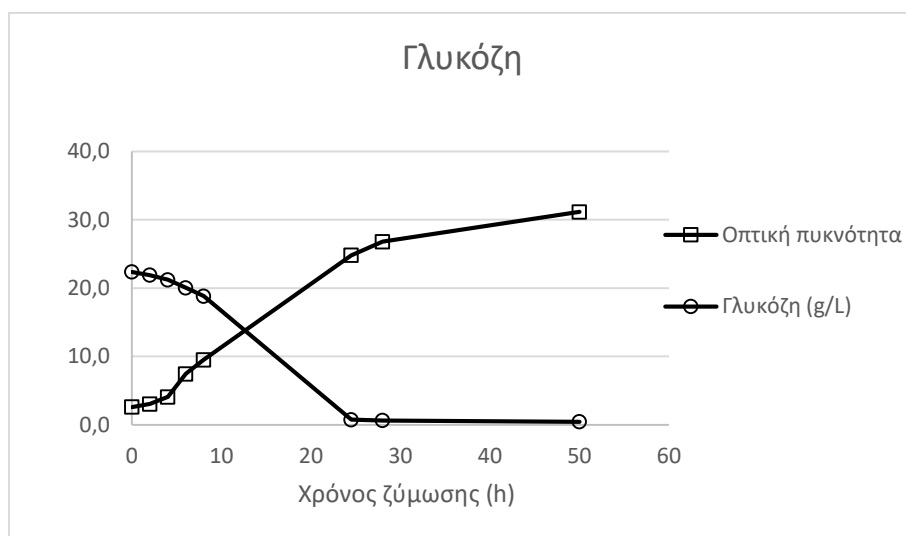


### 3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

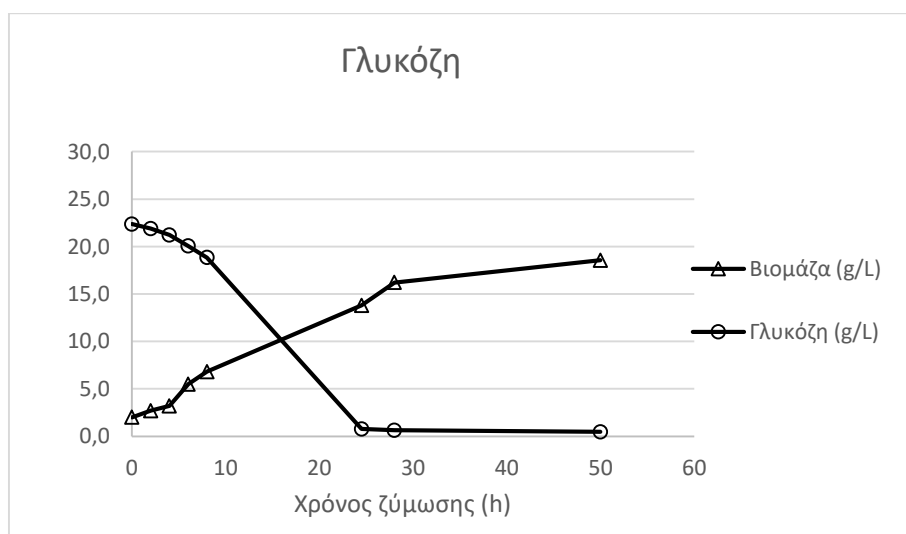
#### 3.1 Παραγωγή φουμαρικού οξέος μέσω ημισυνεχών ζυμώσεων

##### 3.1.1 Ζυμώσεις για συσχέτιση βιομάζας και οπτικής πυκνότητας με πηγή άνθρακα γλυκόζη

Η ζύμωση για τη συσχέτιση της βιομάζας με την οπτική πυκνότητα είχε διάρκεια 50 ώρες. Από τις 4 πρώτες ώρες της ζύμωσης έως τις 28 ώρες παρατηρείται εκθετική αύξηση της βιομάζας και της οπτικής πυκνότητας. Η βιομάζα έφτασε στα 18,5g/L και η τιμή της οπτικής πυκνότητας ήταν 31,2. Ακόμη στις 28 πρώτες ώρες της ζύμωσης ο μικροοργανισμός κατανάλωσε 20g/L γλυκόζη (Διάγραμμα 3,4).

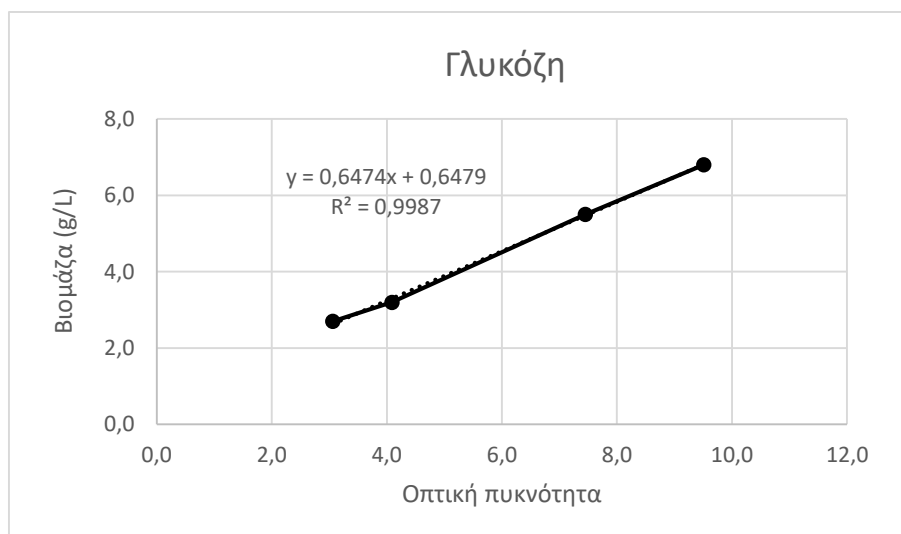


Διάγραμμα 3: Συγκέντρωση γλυκόζης και μέτρηση οπτικής πυκνότητας σε συνάρτηση με το χρόνο σε ζυμώσεις με πηγή άνθρακα γλυκόζη.



Διάγραμμα 4: Συγκέντρωση γλυκόζης και βιομάζας σε συνάρτηση με το χρόνο σε ζυμώσεις με πηγή άνθρακα γλυκόζη.

Όπως περιγράφεται στο Διάγραμμα 5 η βιομάζα σε συνάρτηση με την οπτική πυκνότητα είναι δύο μεγέθη ανάλογα και συνδέονται μεταξύ τους γραμμικά μέσω της σχέσης  $y=0,6474*x+0,6479$ . Μέσω της σχέσης αυτής υπολογίζεται στη συνέχεια η βιομάζα σε ζυμώσεις με χρήση γλυκόζης ως πηγή άνθρακα.



Διάγραμμα 5: Συσχέτιση βιομάζας με την οπτική πυκνότητα σε ζυμώσεις με πηγή άνθρακα γλυκόζη.

### 3.1.2 Παραγωγή φουμαρικού οξέος από γλυκόζη σε διαφορετικές ταχύτητες ανάδευσης

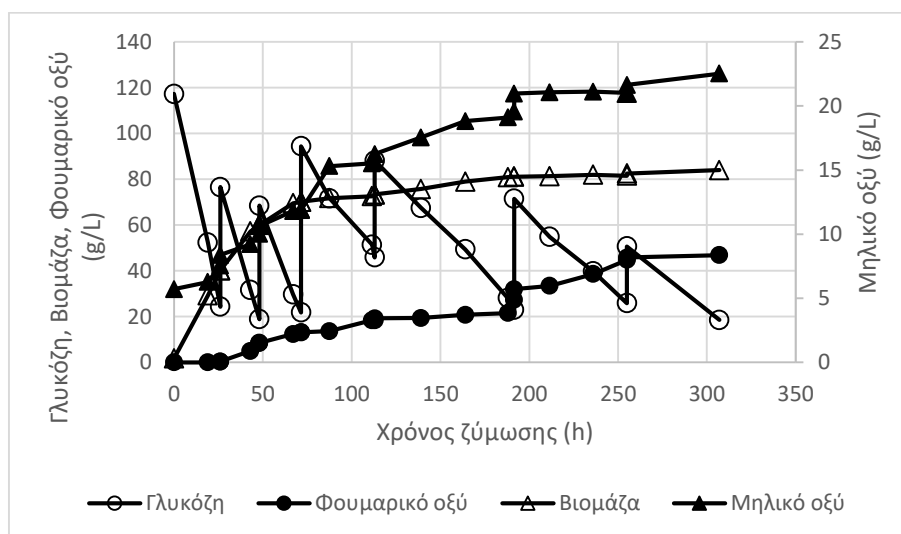
Σε αυτό το μέρος της παρούσας μελέτης πραγματοποιήθηκαν πειράματα μελετώντας τους παράγοντες που επηρεάζουν τη ζύμωση για την παραγωγή φουμαρικού οξέος με σκοπό τη βελτιστοποίηση της διεργασίας. Αρχικά, όπως φαίνεται στον Πίνακα 2 πραγματοποιήθηκαν ζυμώσεις με διαφορετική αρχική συγκέντρωση γλυκόζης, διαφορετικό ολικό όγκο και διαφορετική ταχύτητα ανάδευσης.

|                         | 1        | 2        | 3        | 4        | 5        |
|-------------------------|----------|----------|----------|----------|----------|
| <b>Γλυκόζη</b>          | 50 g/L   | 100 g/L  | 100 g/L  | 100 g/L  | 100 g/L  |
| <b>Yeast extract</b>    | 0,4g/L   | 0,4 g/L  | 0,4 g/L  | 0,4 g/L  | 0,4 g/L  |
| <b>Άλατα</b>            | Εμπορικά | Εμπορικά | Εμπορικά | Εμπορικά | Εμπορικά |
| <b>CaCO<sub>3</sub></b> | 40 g/L   | 40 g/L   | 40 g/L   | 40 g/L   | 40 g/L   |
| <b>Εμβόλιο</b>          | 10%(V/V) | 10%(V/V) | 10%(V/V) | 10%(V/V) | 10%(V/V) |
| <b>Θερμοκρασία</b>      | 30°C     | 30°C     | 30°C     | 30°C     | 30°C     |
| <b>Ανάδευση</b>         | 180rpm   | 180rpm   | 180rpm   | 250rpm   | 250rpm   |
| <b>Ολικός όγκος</b>     | 2L       | 2L       | 500mL    | 2L       | 500mL    |

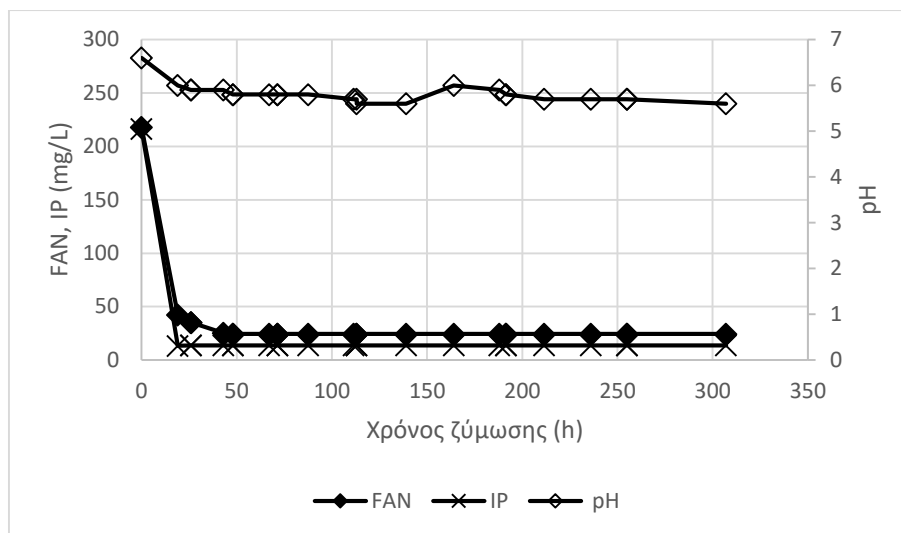
Πίνακας 2: Περιγραφή των ζυμώσεων για τη παραγωγή φουμαρικού οξέος σε διαφορετικές ταχύτητες ανάδευσης.

### 3.1.2.1 Ζυμώσεις για παραγωγή φουμαρικού οξέος με ρυθμό ανάδευσης 180rpm

Αρχικά, παραγματοποιήθηκαν ζυμώσεις σε κωνικές φιάλες συνολικού όγκου 500mL και με ρυθμό ανάδευσης 180rpm. Η αρχική συγκέντρωση γλυκόζης ήταν 100g/L και η σύσταση του θρεπτικού μέσου ήταν ίδια για όλο τον αριθμό πειραμάτων. Η διάρκεια της ζύμωσης ήταν 307 ώρες με παραγόμενο φουμαρικό οξύ 46,86g/L. Η απόδοση ήταν 0,11g/g και η παραγωγικότητα που σημειώθηκε στις 255 ώρες ζύμωσης ήταν 0,13g/L/h. Ακόμη, η παραγωγή του μηλικού οξέος έφτασε στα 22,53g/L. Η παραγωγή φουμαρικού οξέος ξεκίνησε στις 26 ώρες και από τις 112 ώρες ζύμωσης και μετά μια ποσότητα φουμαρικό οξέος έπεσε στο ίζημα. Το ηλεκτρικό οξύ και η αιθανόλη είναι παραπροϊόντα της ζύμωσης σε συγκεντρώσεις 1,88g/L και 0,35g/L. Η βιομάζα αυξανόταν καθ'όλη τη διάρκεια της ζύμωσης και στο τέλος της ζύμωσης έφτασε στα 83g/L (Διάγραμμα 6). Τις πρώτες ώρες ζύμωσης όπου δεν παράχθηκε φουμαρικό οξύ ο μικροοργανισμός καταναλώνει τις πηγές αζώτου και ανόργανου φωσφόρου. Για όλο τον αριθμό πειραμάτων το pH σε όλη τη διάρκεια της ζύμωσης κυμαινόταν στις τιμές 5,7-6 (Διάγραμμα 7).

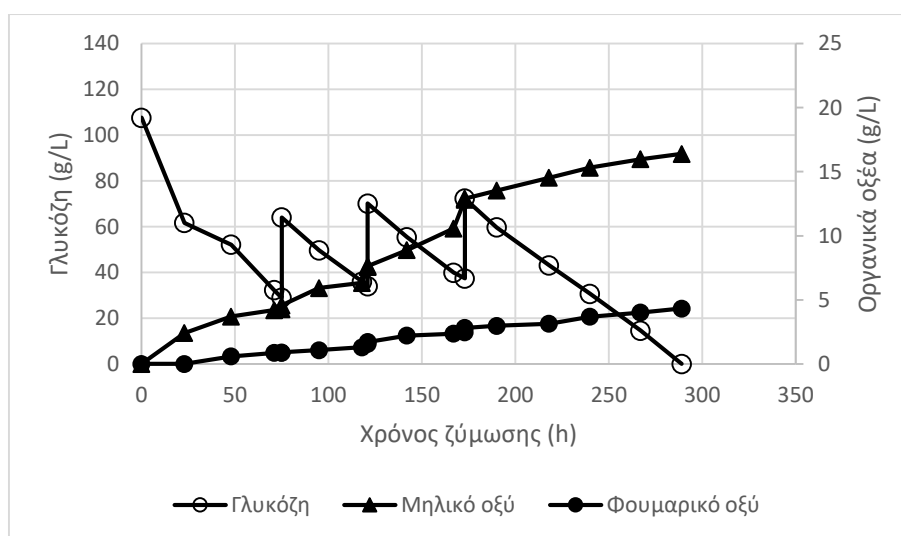


Διάγραμμα 6: Συγκέντρωση γλυκόζης, βιομάζας, φουμαρικού και μηλικού οξέος κατά την διάρκεια της ζύμωσης με αρχική συγκέντρωση γλυκόζης 100g/L, ρυθμό ανάδευσης 180rpm και όγκο φιάλης 500mL.

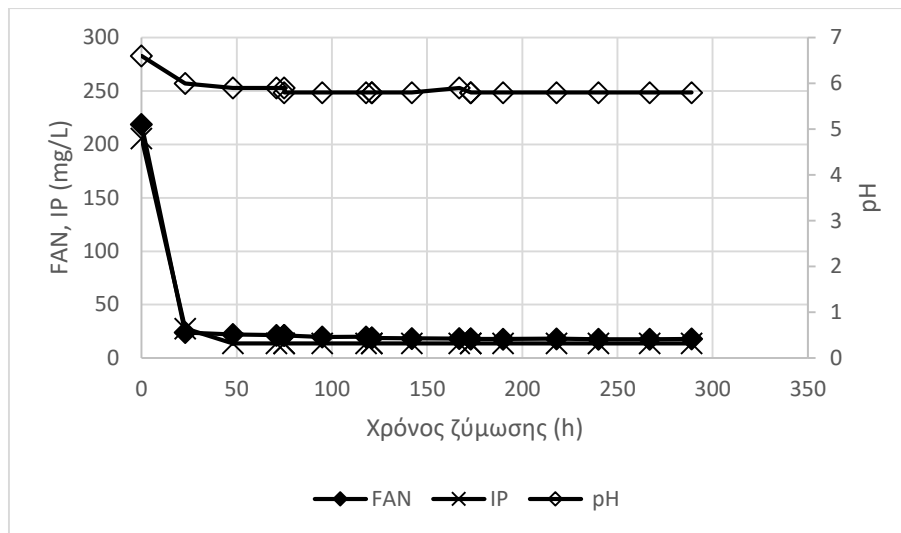


**Διάγραμμα 7:** Συγκέντρωση αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων των αμινοξέων και ανόργανου φωσφόρου και μέτρηση pH κατά την διάρκεια της ζύμωσης με αρχική συγκέντρωση γλυκόζης 100g/L, ρυθμό ανάδευσης 180rpm και όγκο φιάλης 500mL.

Με αρχική συγκέντρωση γλυκόζης 100g/L, πραγματοποιήθηκαν ζυμώσεις σε κωνικές φιάλες συνολικού όγκου 2L με τον ίδιο ρυθμό ανάδευσης. Η διάρκεια της ζύμωσης ήταν 289 ώρες. Στη περίπτωση αυτή παρατηρήθηκε μεγαλύτερη παραγωγή μηλικού οξέος σε σύγκριση με το φουμαρικό οξύ με συγκέντρωση 16,39g/L ενώ το παραγόμενο φουμαρικό οξύ ήταν 4,33g/L. Το ηλεκτρικό οξύ και η αιθανόλη είναι παραπροϊόντα της ζύμωσης σε συγκεντρώσεις 1,87g/L και 1,07g/L. Η απόδοση της ζύμωσης σε μηλικό οξύ ήταν 0,08g/g και η παραγωγικότητα 0,06g/L/h. Η παραγωγή φουμαρικού οξέος ξεκινά όταν ο μικροοργανισμός σταματά να καταναλώνει πηγές αζώτου και ανόργανου φωσφόρου σε αντίθεση με τη παραγωγή μηλικού οξέος η οποία ξεκινά από τις πρώτες ώρες της ζύμωσης (Διάγραμμα 8,9).

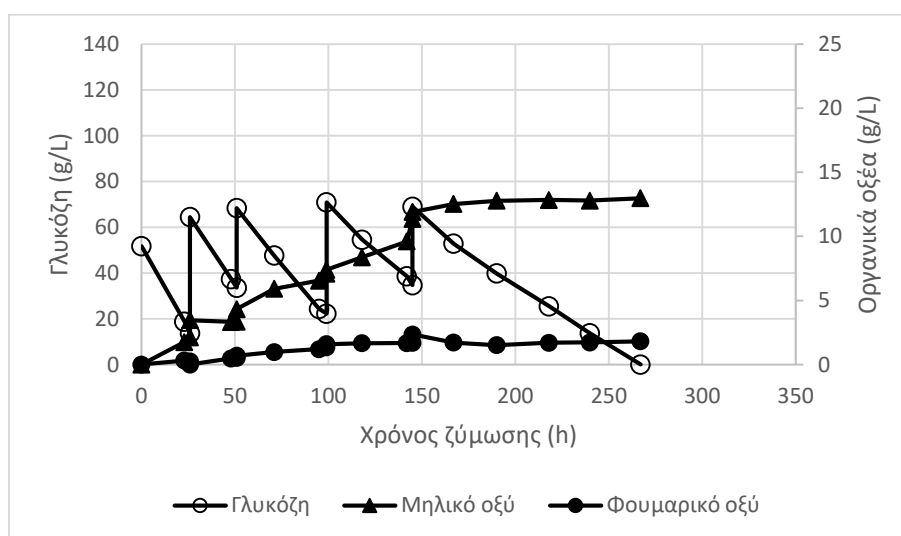


**Διάγραμμα 8:** Συγκέντρωση γλυκόζης, φουμαρικού και μηλικού οξέος κατά την διάρκεια της ζύμωσης με αρχική συγκέντρωση γλυκόζης 100g/L, ρυθμό ανάδευσης 180rpm και όγκο φιάλης 2L.

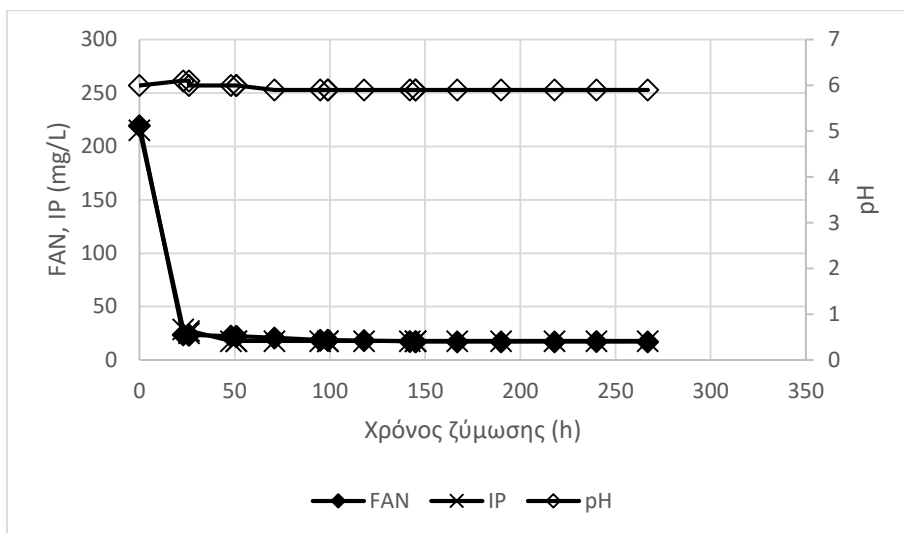


Διάγραμμα 9: Συγκέντρωση αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων των αμινοξέων και ανόργανου φωσφόρου και μέτρηση pH κατά την διάρκεια της ζύμωσης με αρχική συγκέντρωση γλυκόζης 100g/L, ρυθμό ανάδευσης 180rpm και όγκο φιάλης 2L.

Επίσης, σε κωνικές φιάλες συνολικού όγκου 2L πραγματοποιήθηκαν ζυμώσεις με αρχική συγκέντρωση γλυκόζης 50g/L και ρυθμό ανάδευσης 180rpm. Η διάρκεια της ζύμωσης ήταν 267 ώρες με παραγόμενο φουμαρικό οξύ 1,82g/L και μηλικό οξύ 12,98g/L. Το ηλεκτρικό οξύ και η αιθανόλη παράχθηκαν σε συγκεντρώσεις 1,39g/L και 0,99g/L. Η απόδοση της ζύμωσης σε μηλικό οξύ ήταν 0,06g/g και η παραγωγικότητα 0,05g/L/h. Η συγκέντρωση αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων των αμινοξέων είχε αρχική τιμή 220mg/L ενώ η συγκέντρωση του ανόργανου φωσφόρου είχε αρχική τιμή 215mg/L και μετά τις πρώτες ώρες ζύμωσης μειωνόταν στα 23mg/L και στα 29mg/L αντίστοιχα όπου και παρέμενε σταθερή για την υπόλοιπη διάρκεια της ζύμωσης (Διάγραμμα 10,11).



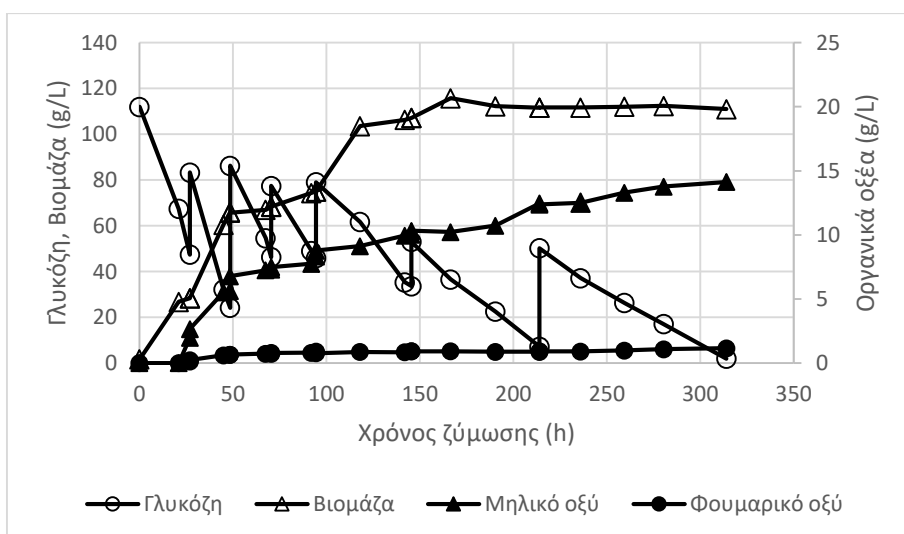
Διάγραμμα 10: Συγκέντρωση γλυκόζης, φουμαρικού και μηλικού οξέος κατά την διάρκεια της ζύμωσης με αρχική συγκέντρωση γλυκόζης 50g/L, ρυθμό ανάδευσης 180rpm και όγκο φιάλης 2L.



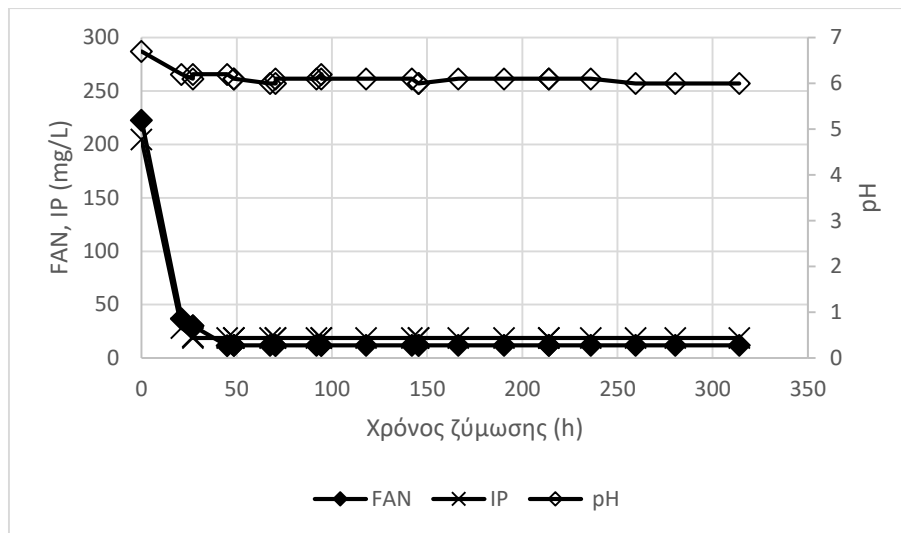
**Διάγραμμα 11:** Συγκέντρωση αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων των αμινοξέων και ανόργανου φωσφόρου και μέτρηση pH κατά την διάρκεια της ζύμωσης με αρχική συγκέντρωση γλυκόζης 50g/L ρυθμό ανάδευσης 180rpm και όγκο φιάλης 2L.

### 3.1.2.2 Ζυμώσεις για παραγωγή φουμαρικού οξέος με ρυθμό ανάδευσης 250rpm

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκαν ζυμώσεις σε κωνικές φιάλες συνολικού όγκου 500mL και με ρυθμό ανάδευσης 250rpm με σκοπό η ζύμωση να πραγματοποιείται με καλύτερο αερισμό. Η αρχική συγκέντρωση γλυκόζης ήταν 100g/L. Η διάρκεια της ζύμωσης ήταν 314 ώρες με παραγόμενο φουμαρικό οξύ 1,15g/L και μηλικό οξύ 14,14g/L. Το ηλεκτρικό οξύ είναι παραπροϊόν της ζύμωσης με συγκέντρωση 0,66g/L. Η απόδοση της ζύμωσης σε μηλικό οξύ ήταν 0,04g/g και η παραγωγικότητα 0,05g/L/h. Η βιομάζα αυξανόταν καθ'όλη τη διάρκεια της ζύμωσης και στο τέλος της ζύμωσης έφτασε στα 110g/L (Διάγραμμα 12,13).

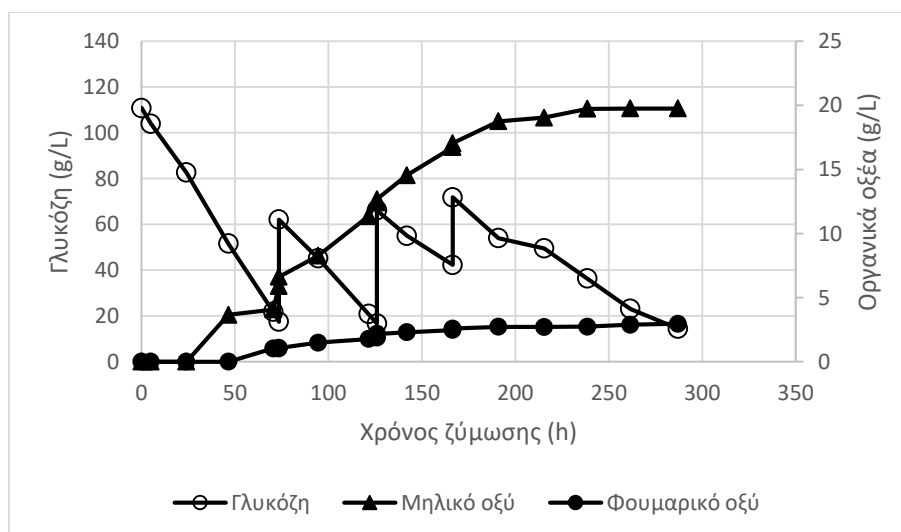


**Διάγραμμα 12:** Συγκέντρωση γλυκόζης, βιομάζας, φουμαρικού και μηλικού οξέος κατά την διάρκεια της ζύμωσης με αρχική συγκέντρωση γλυκόζης 100g/L, ρυθμό ανάδευσης 250rpm και όγκο φιάλης 500mL.

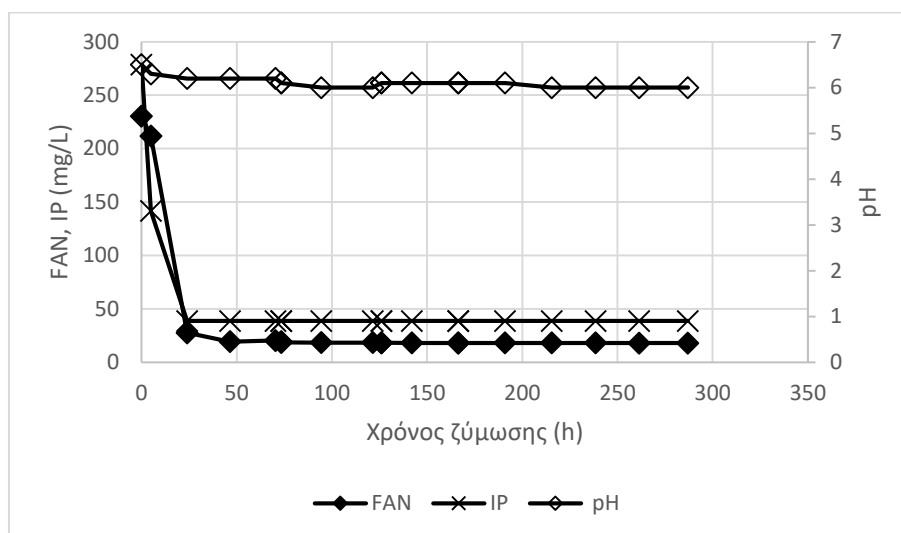


**Διάγραμμα 13:** Συγκέντρωση αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων των αμινοξέων και ανόργανου φωσφόρου και μέτρηση pH κατά την διάρκεια της ζύμωσης με αρχική συγκέντρωση γλυκόζης 100g/L, ρυθμό ανάδευσης 250rpm και όγκο φιάλης 500mL.

Με αρχική συγκέντρωση γλυκόζης 100g/L, πραγματοποιήθηκαν ζυμώσεις με ρυθμό ανάδευσης 250rpm σε κωνικές φιάλες συνολικού όγκου 2L. Σε αυτή την περίπτωση δεν πραγματοποιήθηκαν ζυμώσεις με αρχική συγκέντρωση γλυκόζης 50g/L διότι ο ρυθμός που ο μικροοργανισμός καταναλώνει τη γλυκόζη ήταν πιο αργός σε σύγκριση με τη ζύμωση όπου η αρχική συγκέντρωση γλυκόζης ήταν 100g/L. Η διάρκεια της ζύμωσης ήταν 287 ώρες με παραγόμενο φουμαρικό οξύ 2,96g/L και μηλικό οξύ 19,76g/L. Το ηλεκτρικό οξύ και η αιθανόλη είναι παραπροϊόντα της ζύμωσης σε συγκεντρώσεις 1,85g/L και 1,24g/L. Η απόδοση της ζύμωσης σε μηλικό οξύ ήταν 0,09g/g και η παραγωγικότητα 0,07g/L/h. Το άζωτο των ελεύθερων αμινομάδων και ο ανόργανος φώσφορος που καταναλώθηκαν ήταν 230mg/L και 278mg/L στις πρώτες ώρες ζύμωσης (Διάγραμμα 14,15).



**Διάγραμμα 14:** Συγκέντρωση γλυκόζης, φουμαρικού και μηλικού οξέος κατά την διάρκεια της ζύμωσης με αρχική συγκέντρωση γλυκόζης 100g/L, ρυθμό ανάδευσης 250rpm και όγκο φιάλης 2L.



Διάγραμμα 15: Συγκέντρωση αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων των αμινοξέων και ανόργανου φωσφόρου και μέτρηση pH κατά την διάρκεια της ζύμωσης με αρχική συγκέντρωση γλυκόζης 100g/L, ρυθμό ανάδευσης 250rpm και όγκο φιάλης 2L.

Στο Πίνακα 3 παρουσιάζονται οι τελικές συγκεντρώσεις φουμαρικού και μηλικού οξέος, καθώς και η απόδοση και η παραγωγικότητα των ζυμώσεων με πηγή άνθρακα γλυκόζη σε διαφορετικές ταχύτητες ανάδευσης. Όπως παρατηρείται, η παραγωγικότητα και η απόδοση του φουμαρικού οξέος επηρεάζεται από την ταχύτητα ανάδευσης καθώς και από τον όγκο της φιάλης όπου πραγματοποιείται η ζύμωση. Στις ζυμώσεις όπου υπήρξε καλύτερος αερισμός ή μεγαλύτερη ταχύτητα ανάδευσης παρατηρήθηκε μεγαλύτερη παραγωγή μηλικού και όχι φουμαρικού οξέος. Μόνο στην ζύμωση με ταχύτητα ανάδευσης 180rpm η οποία πραγματοποιήθηκε σε κωνική φιάλη ολικού όγκου 500mL παρατηρήθηκε μεγαλύτερη παραγωγή φουμαρικού οξέος σε σύγκριση με τη παραγωγή μηλικού οξέος. Στην συγκεκριμένη ζύμωση παρατηρήθηκε σημαντική παραγωγή φουμαρικού και μηλικού οξέος. Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω αποτελέσματα οι συνθήκες οι οποίες επιλέχθηκαν για την πραγματοποίηση των υπόλοιπων πειραμάτων ήταν η ταχύτητα ανάδευσης 180rpm και ο ολικός όγκος κωνικής φιάλης 500mL.

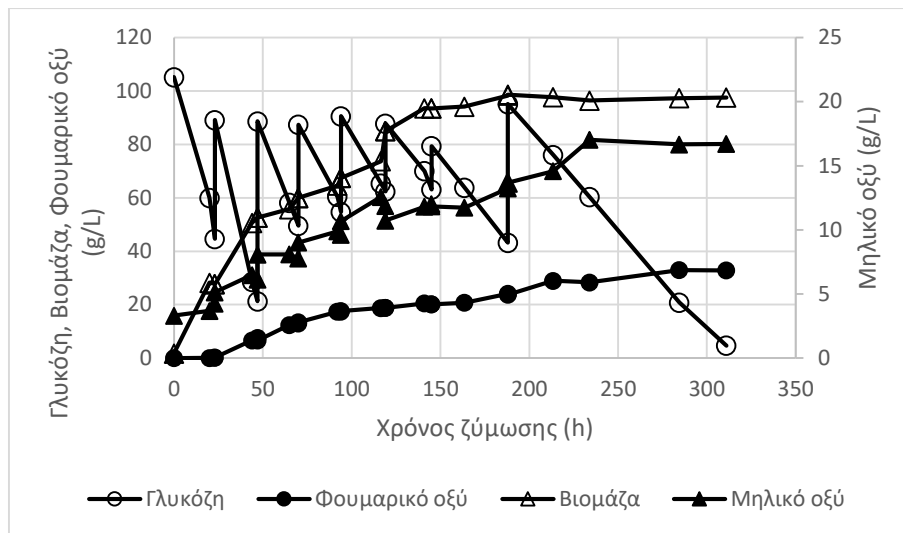


|   | Φουμαρικό οξύ (g/L) | Μηλικό οξύ (g/L) | Απόδοση Φουμαρικού οξέος (g/g) | Απόδοση Μηλικού οξέος (g/g) | Παραγωγικότητα Φουμαρικού οξέος (g/L/h) | Παραγωγικότητα Μηλικού οξέος (g/L/h) |
|---|---------------------|------------------|--------------------------------|-----------------------------|---|--------------------------------------|
| Γλυκόζη 100g/L, V <sub>t</sub> =500mL, 180rpm | 46,86               | 22,53            | 0,11                           | -                           | 0,13                                    | -                                    |
| Γλυκόζη 50g/L, V <sub>t</sub> =2L, 180rpm     | 1,82                | 12,92            | -                              | 0,06                        | -                                       | 0,05                                 |
| Γλυκόζη 100g/L, V <sub>t</sub> =2L, 180rpm    | 4,33                | 16,39            | -                              | 0,08                        | -                                       | 0,06                                 |
| Γλυκόζη 100g/L, V <sub>t</sub> =500mL, 250rpm | 1,16                | 14,14            | -                              | 0,04                        | -                                       | 0,05                                 |
| Γλυκόζη 100g/L, V <sub>t</sub> =2L, 250rpm    | 2,96                | 19,76            | -                              | 0,09                        | -                                       | 0,07                                 |

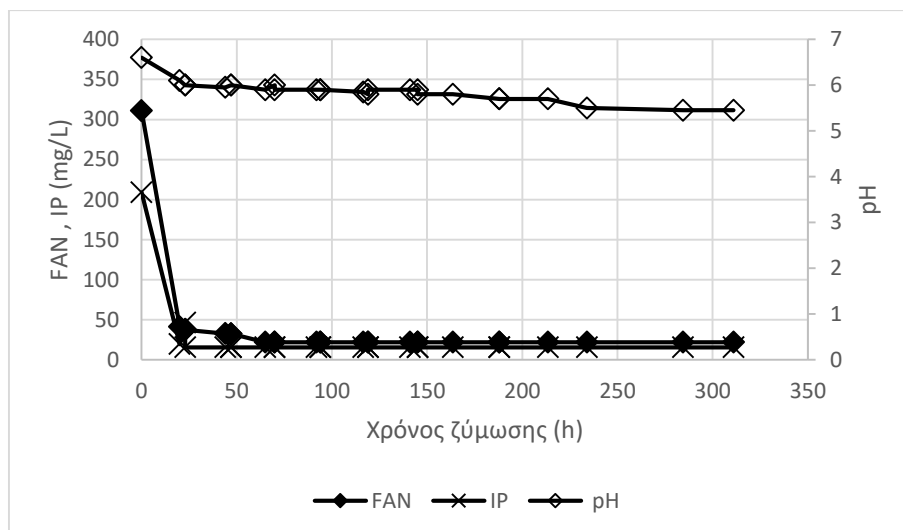
Πίνακας 3: Απόδοση ζυμώσεων με πηγή άνθρακα γλυκόζη σε διαφορετικές ταχύτητες ανάδευσης.

### 3.1.3 Παραγωγή φουμαρικού οξέος από γλυκόζη σε διαφορετικές συγκεντρώσεις πηγής αζώτου

Οι ζυμώσεις πραγματοποιήθηκαν σε κωνικές φιάλες συνολικού όγκου 500mL και με ρυθμό ανάδευσης 180rpm. Η αρχική συγκέντρωση γλυκόζης ήταν 100g/L, η συγκέντρωση της πηγής αζώτου ήταν 1g/L και η σύσταση του θρεπτικού μέσου ήταν ίδια με τον υπόλοιπο αριθμό πειραμάτων. Η διάρκεια της ζύμωσης ήταν 311 ώρες με παραγόμενο φουμαρικό οξύ 32,82g/L. Η απόδοση ήταν 0,09g/g και η παραγωγικότητα που σημειώθηκε στις 284 ώρες ζύμωσης ήταν 0,12g/L/h. Ακόμη, η παραγωγή του μηλικού οξέος έφτασε στα 16,71g/L. Η παραγωγή φουμαρικού οξέος ξεκίνησε στις 23 ώρες και από τις 65 ώρες ζύμωσης και μετά μια ποσότητα φουμαρικό οξέος έπεσε στο ίζημα. Το ηλεκτρικό οξύ είναι παραπροϊόν της ζύμωσης σε συγκέντρωση 1,85g/L. Η βιομάζα αυξανόταν καθ'όλη τη διάρκεια της ζύμωσης και στο τέλος της ζύμωσης έφτασε στα 97g/L (Διάγραμμα 16). Τις πρώτες ώρες ζύμωσης όπου δεν παράχθηκε φουμαρικό οξύ ο μικροοργανισμός καταναλώνει τις πηγές αζώτου και ανόργανου φωσφόρου. Το άζωτο των ελεύθερων αμινομάδων και ο ανόργανος φώσφορος που καταναλώθηκαν ήταν 312mg/L και 212mg/L (Διάγραμμα 17).

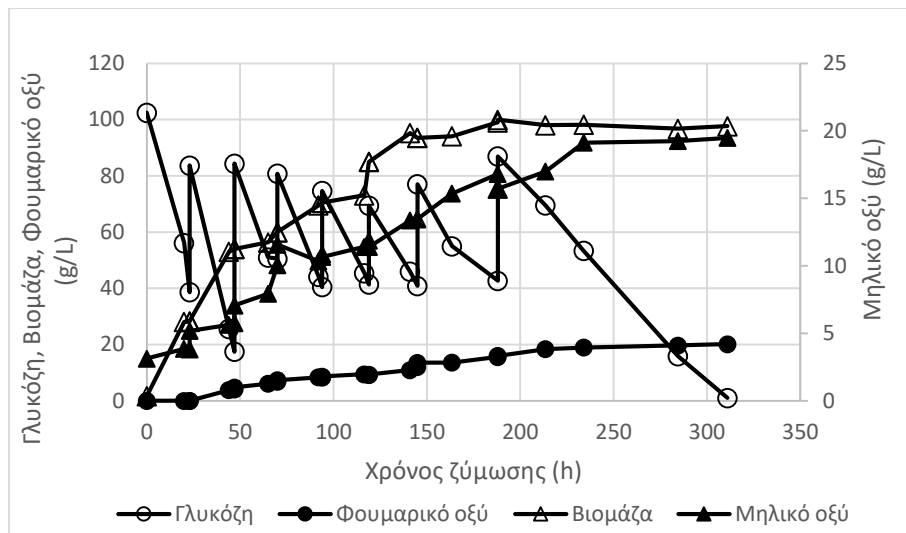


Διάγραμμα 16: Συγκέντρωση γλυκόζης, βιομάζας, φουμαρικού και μηλικού οξέος κατά την διάρκεια της ζύμωσης με συγκέντρωση 1g/L πηγής αζώτου.

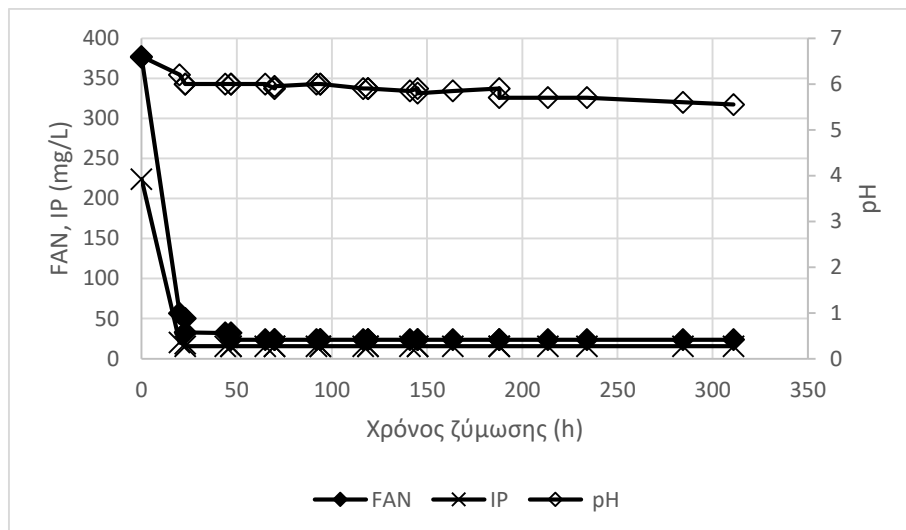


Διάγραμμα 17: Συγκέντρωση αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων των αμινοξέων και ανόργανου φωσφόρου και μέτρηση pH κατά την διάρκεια της ζύμωσης με συγκέντρωση 1g/L πηγής αζώτου.

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκαν ζυμώσεις σε κωνικές φιάλες συνολικού όγκου 500mL, με ρυθμό ανάδευσης 180rpm και με αρχική συγκέντρωση γλυκόζης 100g/L. Η συγκέντρωση της πηγής αζώτου ήταν 4g/L. Η διάρκεια της ζύμωσης ήταν 311 ώρες με παραγόμενο φουμαρικό οξύ 20,14g/L και μηλικό οξύ 19,49g/L. Το ηλεκτρικό οξύ είναι παραπροϊόν της ζύμωσης με συγκέντρωση 2,72g/L. Η απόδοση της ζύμωσης σε φουμαρικό οξύ ήταν 0,05g/g και η παραγωγικότητα 0,06g/L/h. Η βιομάζα η οποία παράχθηκε κατά τη διάρκεια της ζύμωσης ήταν 97g/L. Το άζωτο των ελεύθερων αμινομάδων και ο ανόργανος φώσφορος που καταναλώθηκαν στις πρώτες ώρες ζύμωσης ήταν 376mg/L και 224mg/L αντίστοιχα (Διάγραμμα 18,19).



**Διάγραμμα 18:** Συγκέντρωση γλυκόζης, βιομάζας, φουμαρικού και μηλικού οξέος κατά την διάρκεια της ζύμωσης με συγκέντρωση 4g/L πηγής αζώτου.



**Διάγραμμα 19:** Συγκέντρωση αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων των αμινοξέων και ανόργανου φωσφόρου και μέτρηση pH κατά την διάρκεια της ζύμωσης με συγκέντρωση 4g/L πηγής αζώτου.

Τελικά, όπως παρουσιάζεται στον Πίνακα 4 καλύτερη απόδοση και παραγωγικότητα παρουσιάστηκε στη ζύμωση με 0,4g/L εκχύλισμα ζύμης. Περαιτέρω αύξηση της συγκέντρωσης εκχυλίσματος ζύμης είχε αρνητική επίδραση στη παραγωγή του φουμαρικού οξέος. Φαίνεται ότι η αύξηση της συγκέντρωσης εκχυλίσματος ζύμης παρουσιάζει παρεμπόδιση του μικροοργανισμού και μείωση της απόδοσης και της παραγωγικότητας τη ζύμωσης. Λαμβάνοντας υπόψη τα αποτελέσματα, 0,4g/L συγκέντρωση εκχυλίσματος ζύμης επιλέχθηκε για να μελετηθεί η επίδραση διαφορετικών μονοσακχαριτών και του υδρόλυματος αστικών αποβλήτων ως πηγή άνθρακα στις ζυμώσεις για παραγωγή του φουμαρικού οξέος.

|                          | Φουμαρικό οξύ<br>(g/L) | Μηλικό οξύ<br>(g/L) | Απόδοση<br>(g/g) | Παραγωγικότητα<br>(g/L/h) |
|--------------------------|------------------------|---------------------|------------------|---------------------------|
| Yeast extract<br>0,4 g/L | 46,86                  | 22,53               | 0,11             | 0,13                      |
| Yeast extract<br>1 g/L   | 32,82                  | 16,71               | 0,09             | 0,12                      |
| Yeast extract<br>4 g/L   | 20,14                  | 19,49               | 0,05             | 0,06                      |

**Πίνακας 4:** Απόδοση ζυμώσεων για παραγωγή φουμαρικού οξέος με διαφορετικές συγκεντρώσεις πηγής αζώτου.

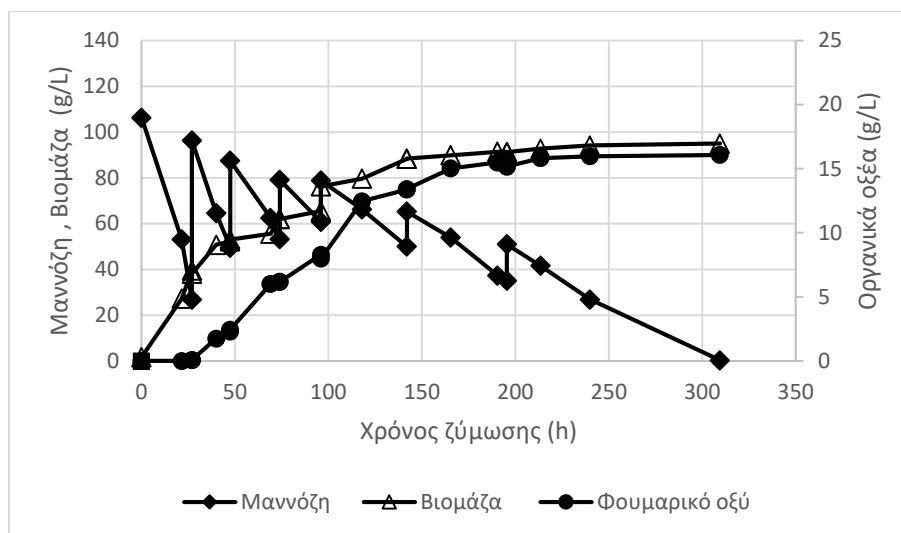
Η επίδραση της πηγής αζώτου στη ζύμωση για παραγωγή φουμαρικού οξέος μελετήθηκε ,επίσης, από τους Tsekona et al., χρησιμοποιώντας ως πηγή άνθρακα παραφίνες. Η μέγιστη τιμή φουμαρικού οξέος 36,5g/L παρατηρήθηκε στις ζυμώσεις με τις βέλτιστες συγκεντρώσεις παραφινών και πηγής αζώτου. Πιο συγκεκριμένα φαίνεται ότι η παραγωγή φουμαρικού οξέος απαιτεί περιορισμό πηγής αζώτου διότι η αύξηση της συγκέντρωσης πηγής αζώτου είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση της απόδοσης και της παραγωγικότητας. Αύξηση της πηγής αζώτου (NH<sub>4</sub>Cl) από 0,2g/L σε 0,4g/L είχε ως αποτέλεσμα μείωση του φουμαρικού οξέος από τα 36,5g/L στα 12,1g/L (Tsekona et al.,1999). Επίσης, οι Yamada et al. μελέτησαν τις συνθήκες ζύμωσης για παραγωγή φουμαρικού οξέος. Η μέγιστη παραγωγή φουμαρικού οξέος 39,1g/L παρατηρήθηκε στη ζύμωση στις βέλτιστες συνθήκες και με πηγή αζώτου 0,4g/L εκχύλισμα ζύμης (Yamada et al.,1970), όπως και στην παρούσα μελέτη.

### 3.1.4 Παραγωγή φουμαρικού οξέος από διαφορετικές πηγές άνθρακα

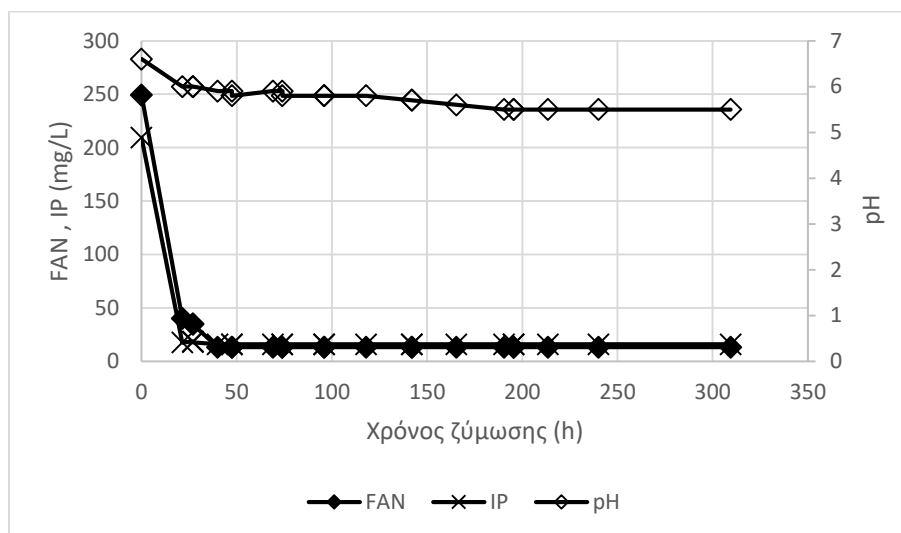
Η παραγωγή φουμαρικού οξέος μέσω ζύμωσης διερευνήθηκε χρησιμοποιώντας διαφορετικούς μονοσακχαρίτες (μαννόζη, ξυλόζη, αραβινόζη, γαλακτόζη, φρουκτόζη και γλυκερόλη) που απαντώνται σε υδρολύματα αστικών στερεών αποβλήτων. Όπως περιγράφεται στα διαγράμματα στη συνέχεια, η παραγωγή φουμαρικού οξέος προέκυψε σε μεγαλύτερη συγκέντρωση από τη μαννόζη και σε μια μικρή ποσότητα από την γαλακτόζη, τη ξυλόζη και τη φρουκτόζη. Όλοι οι υπόλοιποι μονοσακχαρίτες καταναλώθηκαν από τον μικροοργανισμό αλλά δεν παρατηρήθηκε παραγωγή φουμαρικού οξέος.

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε ζύμωση προς παραγωγή φουμαρικού οξέος με την μαννόζη ως πηγή άνθρακα. Η αρχική συγκέντρωση όλων των μονοσακχαριτών ήταν 100g/L και η σύσταση του θρεπτικού μέσου ήταν ίδια για όλο τον αριθμό πειραμάτων. Η διάρκεια της ζύμωσης ήταν 310 ώρες με παραγόμενο φουμαρικό οξύ 16,08g/L. Η απόδοση ήταν 0,06g/g και η παραγωγικότητα που σημειώθηκε στις 214 ώρες ζύμωσης ήταν 0,07g/L/h. Ακόμη, η παραγωγή του ηλεκτρικού οξέος που είναι παραπροϊόν της ζύμωσης έφτασε στα 0,6g/L. Η παραγωγή φουμαρικού οξέος ξεκίνησε στις 27 ώρες και από τις 118 ώρες ζύμωσης και μετά μια ποσότητα φουμαρικού οξέος έπεσε στο ίζημα. Η

βιομάζα αυξανόταν καθ' όλη τη διάρκεια της ζύμωσης και στο τέλος της ζύμωσης έφτασε στα 95g/L (Διάγραμμα 20). Τις πρώτες ώρες ζύμωσης όπου δεν παράχθηκε φουμαρικό οξύ ο μικροοργανισμός καταναλώνει τις πηγές αζώτου και ανόργανου φωσφόρου (Διάγραμμα 21).



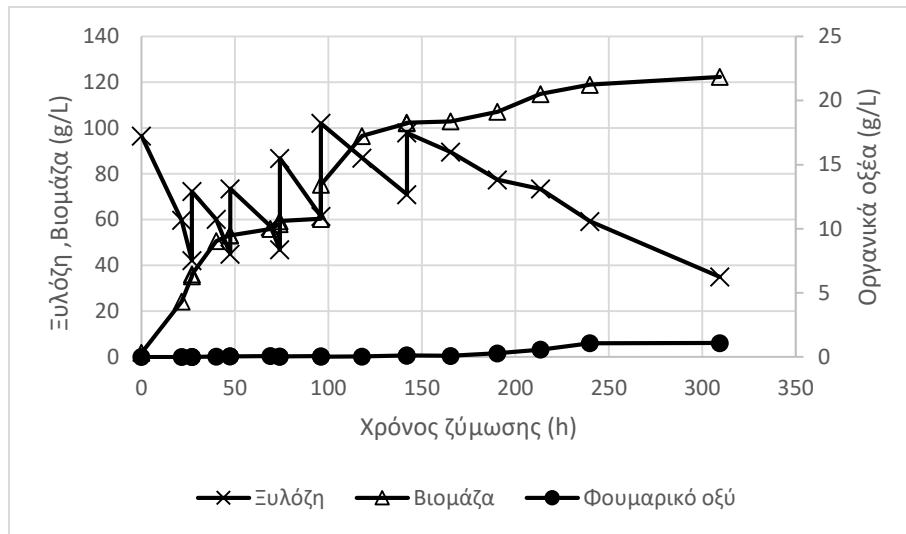
Διάγραμμα 20: Συγκέντρωση μαννόζης, βιομάζας και φουμαρικού οξέος κατά την διάρκεια της ζύμωσης.



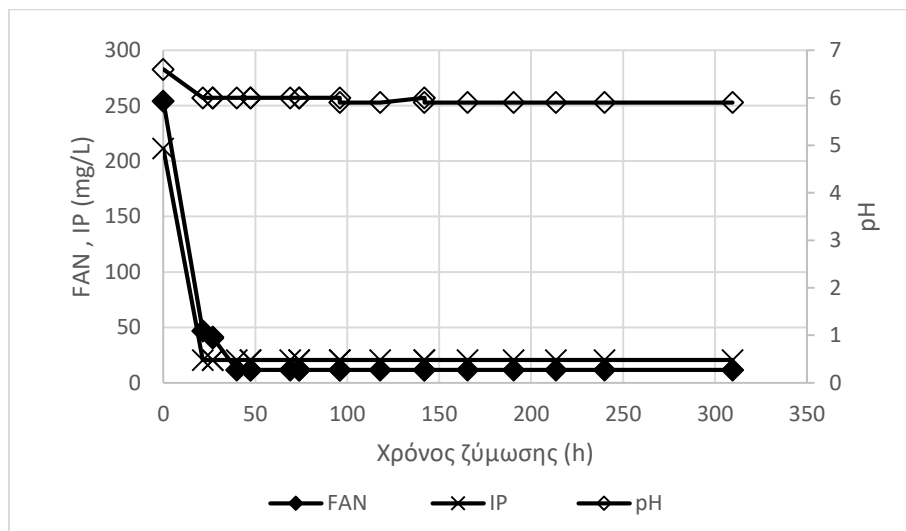
Διάγραμμα 21: Συγκέντρωση αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων των αμινοξέων και ανόργανου φωσφόρου και μέτρηση pH κατά την διάρκεια της ζύμωσης με πηγή άνθρακα τη μαννόζη.

Οι ζυμώσεις που πραγματοποιήθηκαν με πηγή άνθρακα τη ξυλόζη, τη φρουκτόζη και τη γαλακτόζη είχαν διάρκεια 310 ώρες με παραγόμενο φουμαρικό οξύ 1,08g/L, 1,63g/L και 0,58g/L αντίστοιχα. Η βιομάζα στο τέλος της ζύμωσης έφτασε στα 122g/L, 107g/L και 106g/L αντίστοιχα (Διάγραμμα

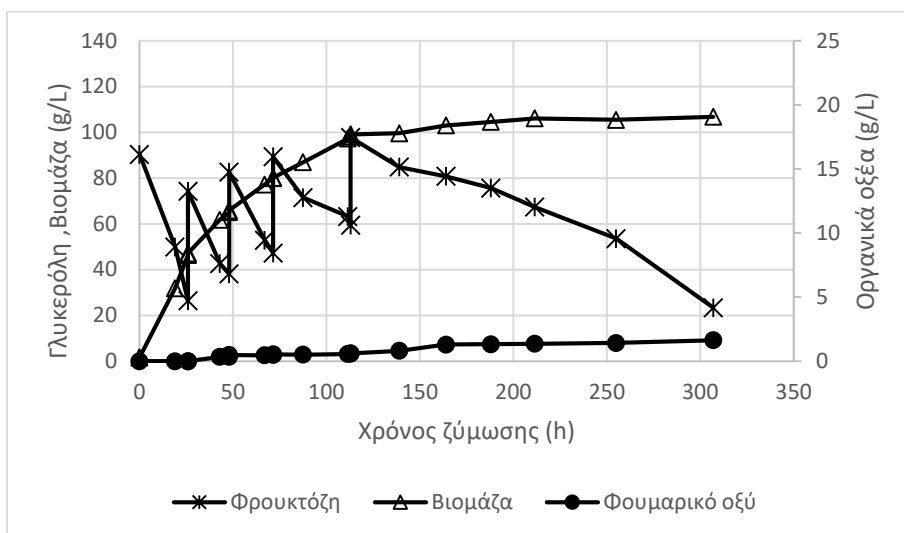
22,24,26). Τις πρώτες ώρες ζύμωσης ο μικροοργανισμός κατανάλωσε τις πηγές αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων και ανόργανου φωσφόρου (Διάγραμμα 23,25,27).



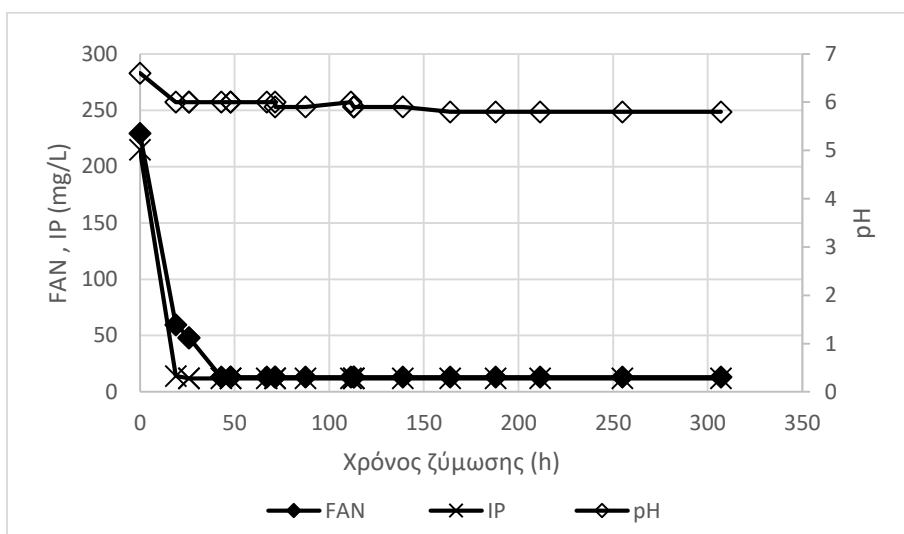
Διάγραμμα 22: Συγκέντρωση ξυλόζης, βιομάζας και φουμαρικού οξέος κατά την διάρκεια της ζύμωσης.



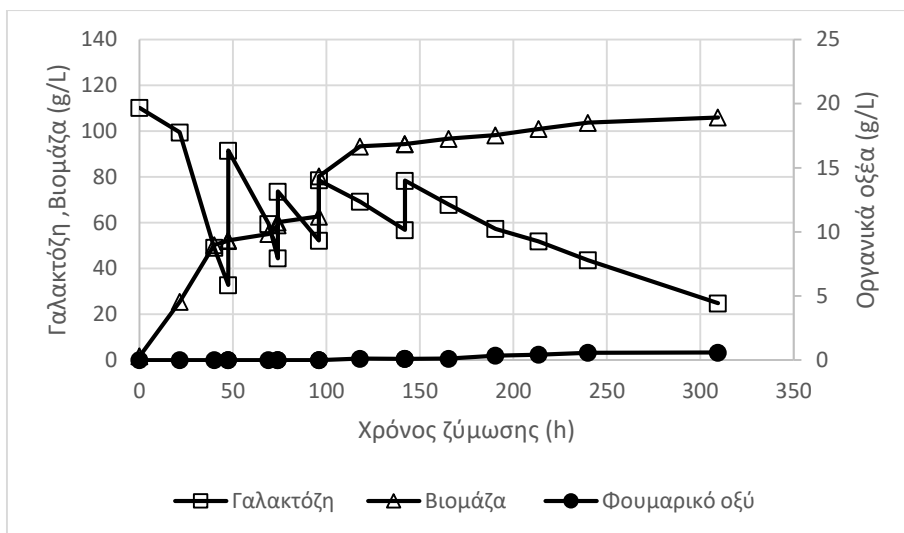
Διάγραμμα 23: Συγκέντρωση αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων των αμινοξέων και ανόργανου φωσφόρου και μέτρηση pH κατά την διάρκεια της ζύμωσης με πηγή άνθρακα τη ξυλόζη.



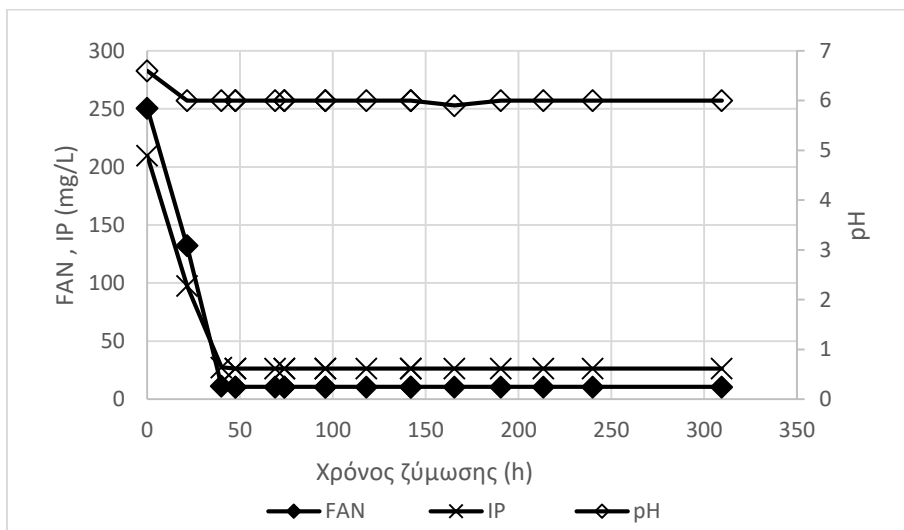
Διάγραμμα 24: Συγκέντρωση φρουκτόζης, βιομάζας και φουμαρικού οξέος κατά την διάρκεια της ζύμωσης.



Διάγραμμα 25: Συγκέντρωση αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων των αμινοξέων και ανόργανου φωσφόρου και μέτρηση pH κατά την διάρκεια της ζύμωσης με πηγή άνθρακα τη φρουκτόζη.



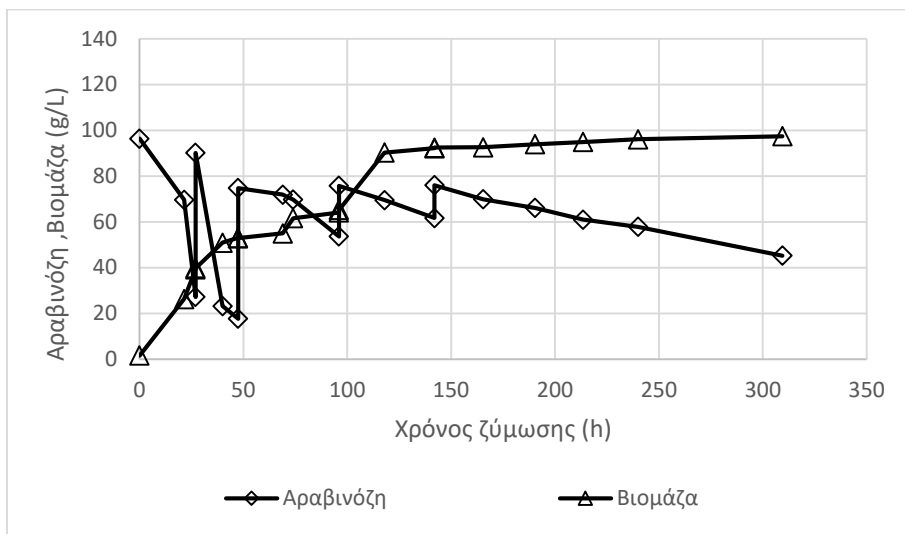
Διάγραμμα 26: Συγκέντρωση γαλακτόζης, βιομάζας και φουμαρικού οξέος κατά την διάρκεια της ζύμωσης.



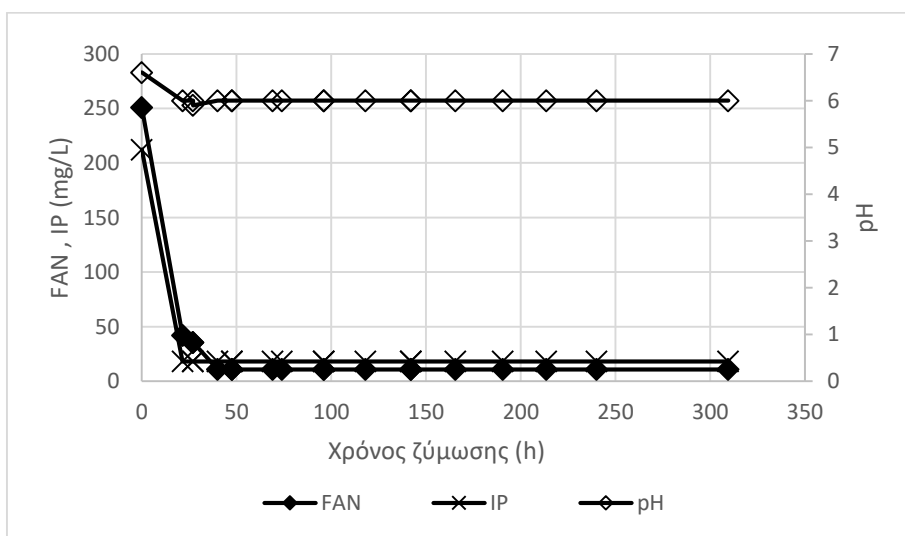
Διάγραμμα 27: Συγκέντρωση αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων των αμινοξέων και ανόργανου φωσφόρου και μέτρηση pH κατά την διάρκεια της ζύμωσης με πηγή άνθρακα τη γαλακτόζη.

Οι ζυμώσεις που πραγματοποιήθηκαν με πηγή άνθρακα την αραβινόζη και τη γλυκερόλη είχαν διάρκεια 310 ώρες χωρίς να παραχθεί καθόλου φουμαρικό οξύ. Από τον μικροοργανισμό παράχθηκε μόνο βιομάζα η οποία έφτασε στο τέλος της ζύμωσης έφτασε στα 97g/L και στα 82g/L αντίστοιχα (Διάγραμμα 28,30). Τις πρώτες ώρες ζύμωσης ο μικροοργανισμός κατανάλωσε τις πηγές αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων και ανόργανου φωσφόρου (Διάγραμμα 29,31).

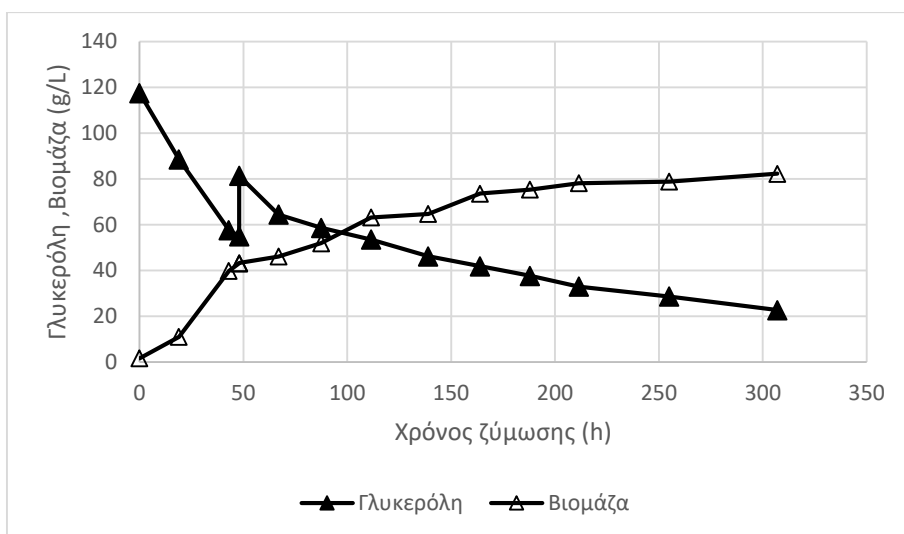




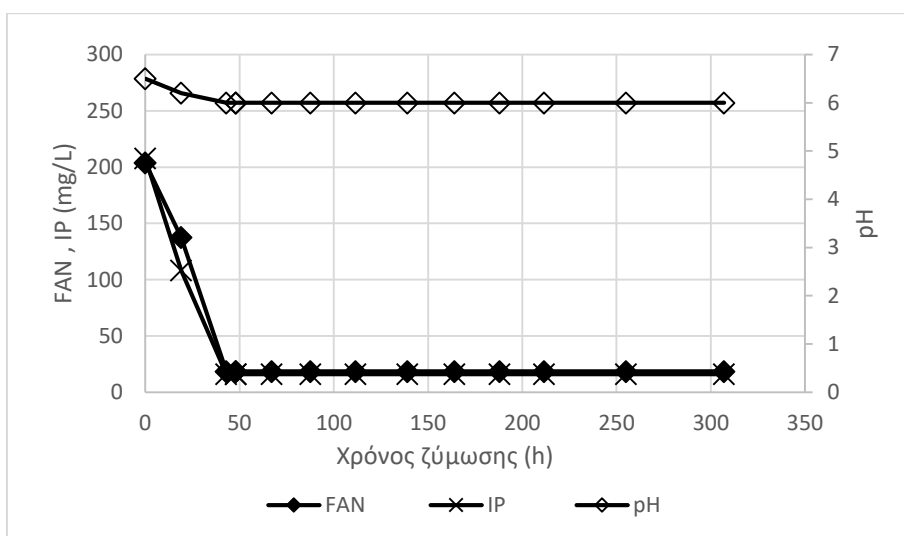
Διάγραμμα 28: Συγκέντρωση αραβινόζης, βιομάζας και φουμαρικού οξέος κατά την διάρκεια της ζύμωσης.



Διάγραμμα 29: Συγκέντρωση αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων των αμινοξέων και ανόργανου φωσφόρου και μέτρηση pH κατά την διάρκεια της ζύμωσης με πηγή άνθρακα τη αραβινόζη.



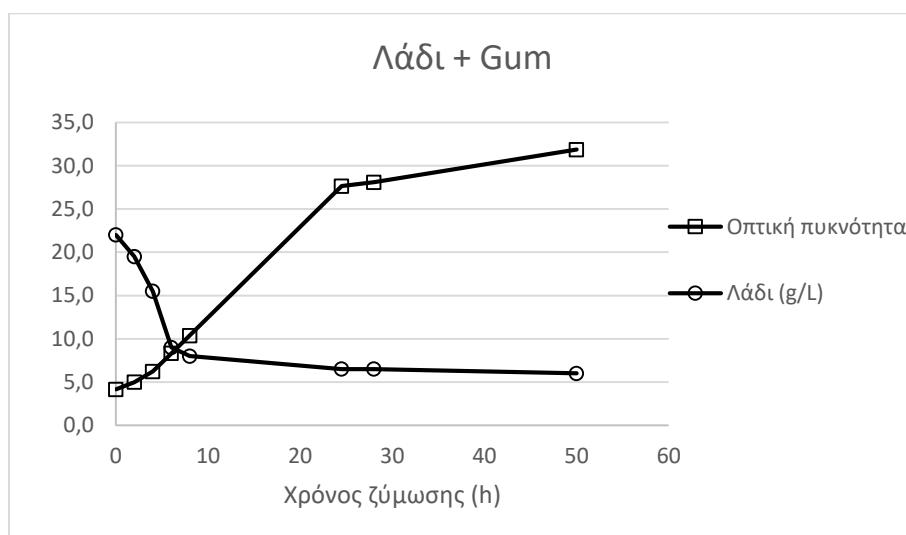
Διάγραμμα 30: Συγκέντρωση γλυκερόλης, βιομάζας και φουμαρικού οξέος κατά την διάρκεια της ζύμωσης.



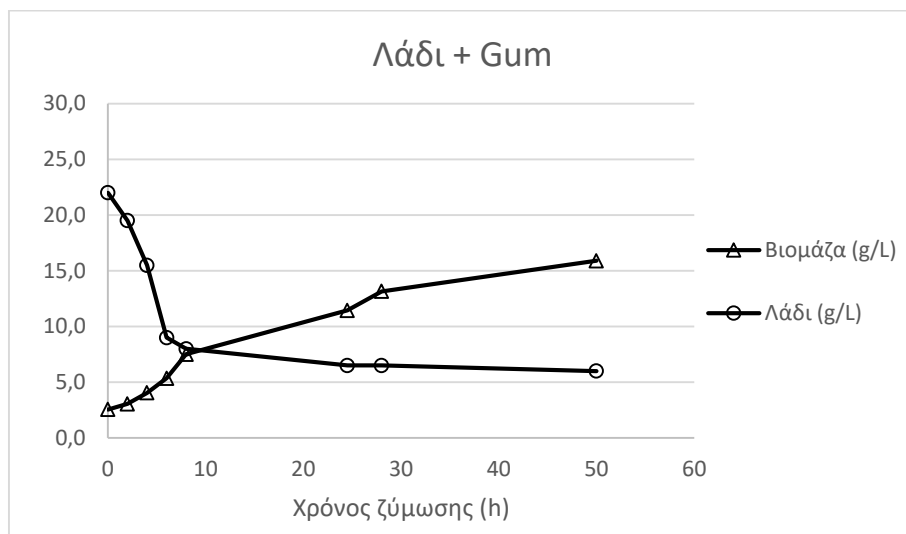
Διάγραμμα 31: Συγκέντρωση αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων των αμινοξέων και ανόργανου φωσφόρου και μέτρηση pH κατά την διάρκεια της ζύμωσης με πηγή άνθρακα τη γλυκερόλη.

### 3.1.5 Ζυμώσεις για συσχέτιση βιομάζας και οπτικής πυκνότητας με πηγή άνθρακα λάδι από υδρολυμένα αστικά απόβλητα (MSW)

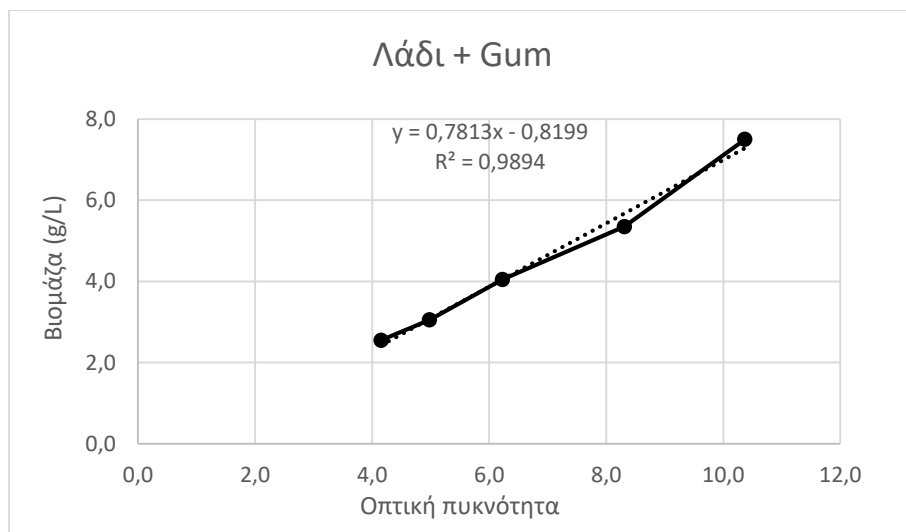
Όπως περιγράφεται στα παρακάτω διαγράμματα οι ζυμώσεις για τη συσχέτιση της βιομάζας με την οπτική πυκνότητα με πηγή άνθρακα λάδι από υδρολυμένα αστικά απόβλητα είχαν διάρκεια 50 ώρες. Ο μικροοργανισμός κατανάλωσε τα 20g/L λάδι και στις 2 περιπτώσεις. Όπως φαίνεται σε καμία από τις 2 ζυμώσεις η προσθήκη γαλακτωματοποιητή δεν εμπόδισε τον μικροοργανισμό να καταναλώσει το λάδι και να παράξει βιομάζα. Από τις 4 πρώτες ώρες της ζύμωσης έως τις 28 ώρες παρατηρείται εκθετική αύξηση της βιομάζας και της οπτικής πυκνότητας. Η βιομάζα στη ζύμωση όπου χρησιμοποιήθηκε ως γαλακτωματοποιητής gum έφτασε στα 15,9g/L ενώ στην περίπτωση όπου χρησιμοποιήθηκε tween ως γαλακτωματοποιητής ήταν 12,6g/L και η τιμή της οπτικής πυκνότητας ήταν 31,9 και 30,7 αντίστοιχα. Ο γαλακτωματοποιητής gum φαίνεται να έχει καλύτερα αποτελέσματα στην ανάπτυξη της βιομάζας κατά την διάρκεια της ζύμωσης. Πιο συγκεκριμένα αναφέρεται από τους Budde et al., ότι ο γαλακτωματοποιητής gum είναι ο καλύτερος γαλακτωματοποιητικός παράγοντας σε καλλιέργειες ελαίων, ώστε κατά τη διάρκεια της ζύμωσης να μην συλλέγεται το λάδι στα τοιχώματα της φιάλης. Σε ζυμώσεις που πραγματοποιήθηκαν με τον μικροοργανισμό *Ralstonia eutropha* σε λάδι παρατηρήθηκε και σε αυτή την περίπτωση κατανάλωση του λαδιού και ανάπτυξη της βιομάζας καθ' όλη τη διάρκεια της ζύμωσης (Budde et al.,2011).



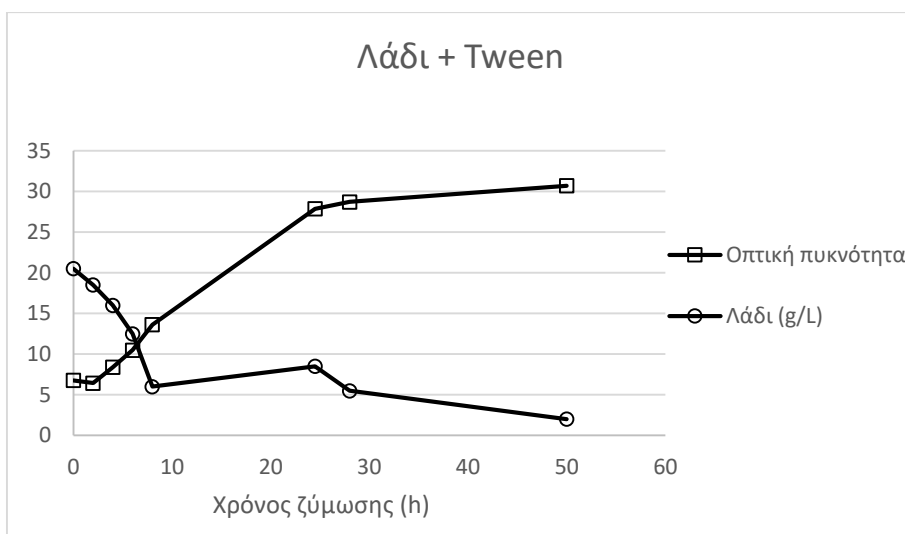
Διάγραμμα 32: Συγκέντρωση λαδιού και μέτρηση οπτικής πυκνότητας σε συνάρτηση με το χρόνο με πηγή άνθρακα λάδι και γαλακτωματοποιητή gum.



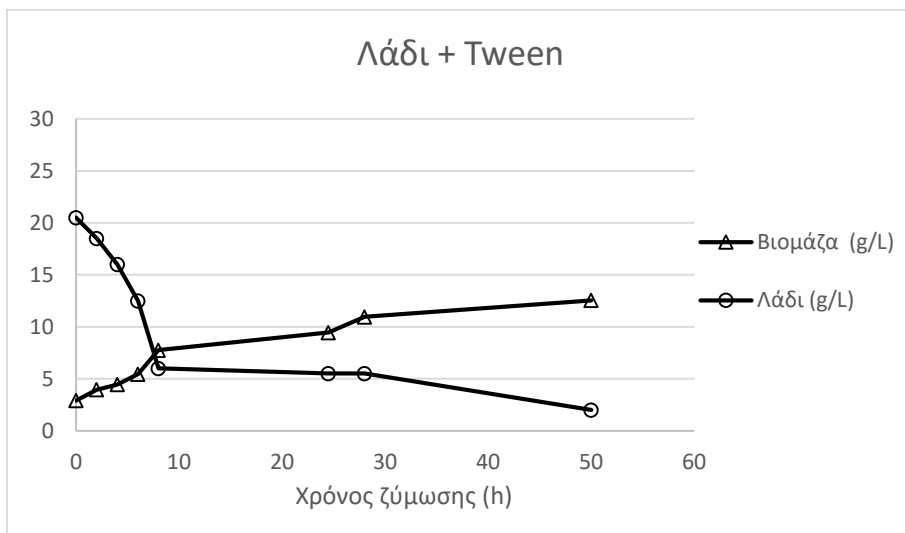
Διάγραμμα 33: Συγκέντρωση λαδιού και βιομάζας σε συνάρτηση με το χρόνο με πηγή άνθρακα λάδι και γαλακτωματοποιητή gum.



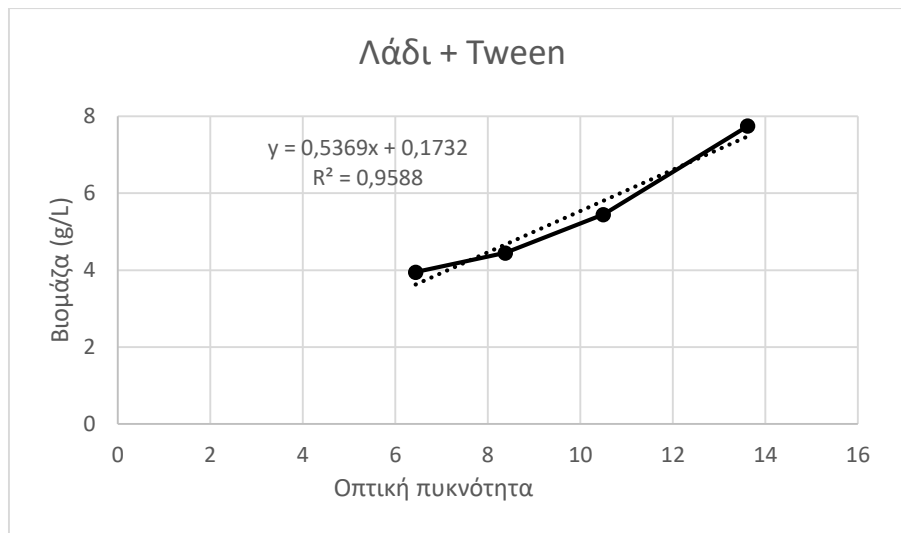
Διάγραμμα 34: Συσχέτιση βιομάζας με οπτική πυκνότητα σε ζυμώσεις με πηγή άνθρακα λάδι με γαλακτωματοποιητή gum.



Διάγραμμα 35: Συγκέντρωση λαδιού και μέτρηση οπτικής πυκνότητας σε συνάρτηση με το χρόνο με πηγή άνθρακα λάδι και γαλακτωματοποιητή tween.



Διάγραμμα 36: Συγκέντρωση λαδιού και βιομάζας σε συνάρτηση με το χρόνο με πηγή άνθρακα λάδι και γαλακτωματοποιητή tween.



Διάγραμμα 37: Συσχέτιση βιομάζας με οπτική πυκνότητα σε ζυμώσεις με πηγή άνθρακα λάδι με γαλακτωματοποιητή tween.

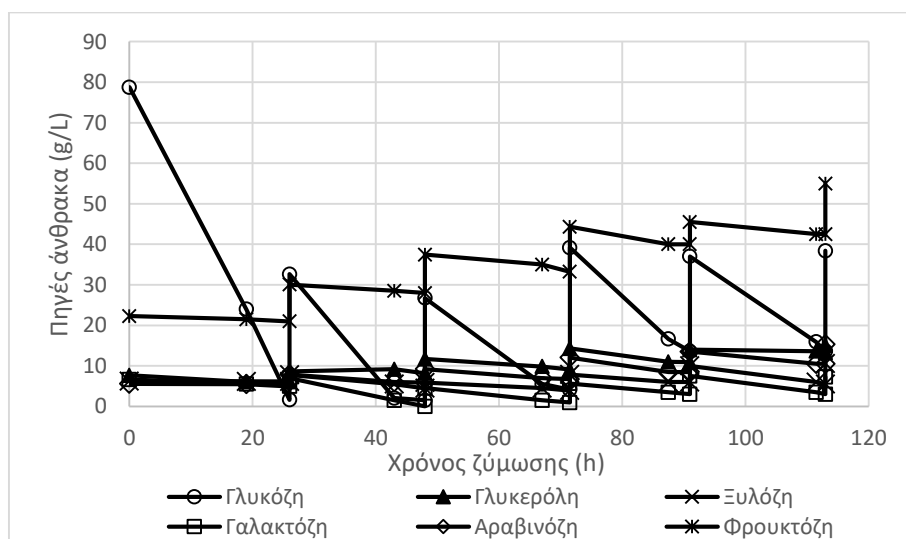
### 3.1.6 Παραγωγή φουμαρικού οξέος από υδρολυμένα αστικά απόβλητα (MSW)

Η σύσταση του υδρολύματος αστικών αποβλήτων που χρησιμοποιήθηκε στη παρούσα μελέτη παρουσιάζεται στον Πίνακα 5. Το μεγαλύτερο ποσοστό σακχάρων αποτελεί η γλυκόζη με ποσοστό 62% και ακολουθεί η φρουκτόζη με ποσοστό 14%. Σε μικρότερες ποσότητες το υδρόλυμα περιέχει γαλακτόζη, αραβινόζη, ξυλόζη και γλυκερόλη. Επίσης, το υδρόλυμα περιέχει πηγές αζώτου και ανόργανου φωσφόρου.

| Πηγή άνθρακα | Ποσοστό (%) |
|--------------|-------------|
| Γλυκόζη      | 62          |
| Γαλακτόζη    | 6           |
| Αραβινόζη    | 6           |
| Ξυλόζη       | 6           |
| Φρουκτόζη    | 14          |
| Γλυκερόλη    | 6           |

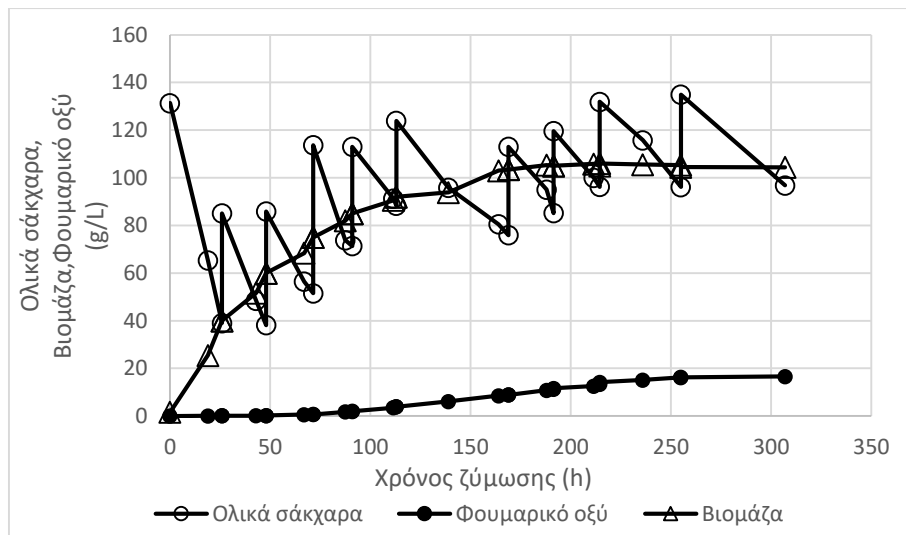
Πίνακας 5: Σύσταση υδρολύματος αστικών αποβλήτων.

Στο Διάγραμμα 38 απεικονίζεται η κατανάλωση των διαφορετικών σακχάρων που περιέχονται στο υδρόλυμα αστικών αποβλήτων από τον μικροοργανισμό. Παρατηρείται ότι η γλυκόζη καταναλώνεται καθ' όλη την διάρκεια της ζύμωσης. Η κατανάλωση της φρουκτόζης από τον μικροοργανισμό έγινε με πολύ αργό ρυθμό και αυτό είχε ως αποτέλεσμα τη σταδιακή συσσώρευσή της. Τα υπόλοιπα σάκχαρα καταναλώθηκαν από τον μικροοργανισμό. Στην αρχή της ζύμωσης ο ρυθμός καταναλώσής τους ήταν μεγαλύτερος αλλά με την πάροδο του χρόνου ο ρυθμός αυτός μειωνόταν. Για αυτό το λόγο παρατηρείται μια μικρή αύξηση στη συγκέντρωσή τους κατά τη διάρκεια της ζύμωσης.

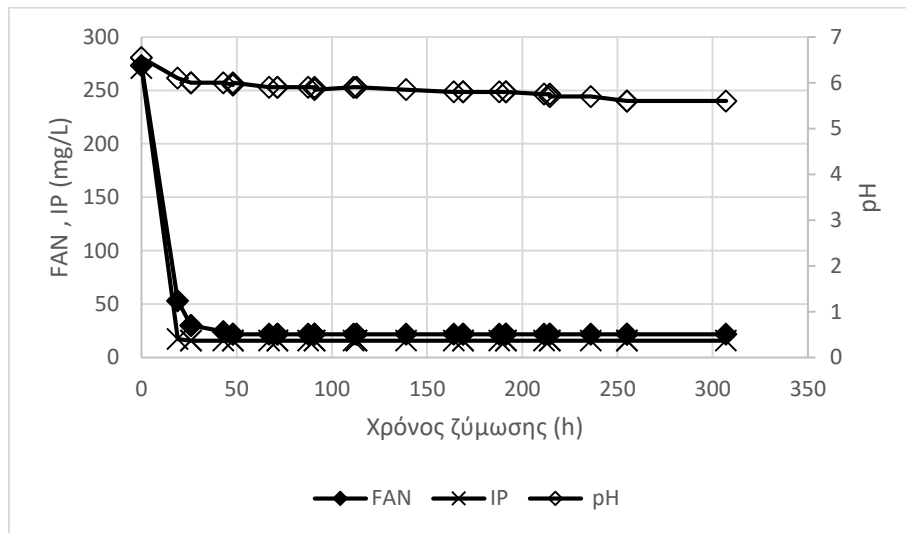


Διάγραμμα 38: Συγκέντρωση διαφορετικών πηγών άνθρακα κατά τη διάρκεια της ζύμωσης με πηγή άνθρακα υδρόλυμα αστικών αποβλήτων.

Η συνολική αρχική συγκέντρωση όλων των μονοσακχαριτών ήταν 100g/L. Η διάρκεια της ζύμωσης ήταν 307 ώρες με παραγόμενο φουμαρικό οξύ 16,57g/L. Η απόδοση ήταν 0,04g/g και η παραγωγικότητα που σημειώθηκε στις 255 ώρες ζύμωσης ήταν 0,06g/L/h. Ακόμη, η παραγωγή του ηλεκτρικού οξέος που είναι παραπροϊόν της ζύμωσης έφτασε στα 0,92g/L. Η βιομάζα αυξανόταν καθ' όλη τη διάρκεια της ζύμωσης και στο τέλος της ζύμωσης έφτασε στα 104g/L (Διάγραμμα 39). Τις πρώτες ώρες ζύμωσης όπου δεν παράχθηκε φουμαρικό οξύ ο μικροοργανισμός καταναλώνει τις πηγές αζώτου και ανόργανου φωσφόρου. Η ποσότητα αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων που καταναλώσε ο μικροοργανισμός ήταν 273g/L ενώ η ποσότητα ανόργανου φωσφόρου ήταν 271g/L (Διάγραμμα 40).



**Διάγραμμα 39:** Συγκέντρωση ολικών σακχάρων, βιομάζας και φουμαρικού οξέος κατά την διάρκεια της ζύμωσης με πηγή άνθρακα υδρόλυμα αστικών αποβλήτων.



**Διάγραμμα 40:** Συγκέντρωση αζώτου των ελεύθερων αμινομάδων των αμινοξέων και ανόργανου φωσφόρου και μέτρηση pH κατά την διάρκεια της ζύμωσης με πηγή άνθρακα υδρόλυμα αστικών αποβλήτων.

Στον Πίνακα 6 παρουσιάζεται η απόδοση κάθε ζύμωσης για παραγωγή φουμαρικού οξέος στις βέλτιστες συνθήκες και με διαφορετικές πηγές άνθρακα. Η ζύμωση με πηγή άνθρακα γλυκόζη είχε τη μέγιστη παραγωγή φουμαρικού οξέος 46,86g/L και την καλύτερη απόδοση 0,11g/g και παραγωγικότητα 0,13g/L/h. Στη ζύμωση με πηγή άνθρακα μαννόζη αλλά και στη ζύμωση με υδρόλυμα αστικών αποβλήτων παρατηρήθηκε παραγωγή φουμαρικού οξέος 16,08g/L και 16,57g/L αντίστοιχα. Στις υπόλοιπες ζυμώσεις παρατηρήθηκε πολύ μικρή ή και καθόλου παραγωγή φουμαρικού οξέος.



|   | <b>Βιομάζα<br/>(g/L)</b> | <b>Φουμαρικό οξύ<br/>(g/L)</b> | <b>Απόδοση<br/>(g/g)</b> | <b>Παραγωγικότητα<br/>(g/L/h)</b> |
|---|--------------------------|--------------------------------|--------------------------|-----------------------------------|
| <b>Γλυκόζη</b>                            | 84                       | 46,86                          | 0,11                     | 0,13                              |
| <b>Μαννόζη</b>                            | 95                       | 16,08                          | 0,06                     | 0,07                              |
| <b>Αραβινόζη</b>                          | 97                       | 0                              | 0                        | 0                                 |
| <b>Γαλακτόζη</b>                          | 106                      | 0,58                           | 0                        | 0                                 |
| <b>Ξυλόζη</b>                             | 122                      | 1,08                           | 0                        | 0                                 |
| <b>Γλυκερόλη</b>                          | 82                       | 0                              | 0                        | 0                                 |
| <b>Φρουκτόζη</b>                          | 107                      | 1,63                           | 0                        | 0                                 |
| <b>Υδρολυμένα<br/>αστικά<br/>απόβλητα</b> | 104                      | 16,57                          | 0,04                     | 0,06                              |

Πίνακας 6: Απόδοση ζυμώσεων για παραγωγή φουμαρικού οξέος από διαφορετικές πηγές άνθρακα.

Παραγωγή φουμαρικού οξέος από υδρόλυμα αστικών αποβλήτων δεν έχει μελετηθεί από άλλους ερευνητές. Μια άλλη ζύμωση η οποία μελετήθηκε ήταν αυτή για παραγωγή ηλεκτρικού οξέος από υδρόλυμα αστικών αποβλήτων από τους Stylianos et al. Σε ασυνεχείς καλλιέργειες σε βιοαντιδραστήρα του *A. Succinogenes* η παραγωγή ηλεκτρικού οξέος έφτασε τα 29,4g/L με παραγωγικότητα 0,89g/L/h και απόδοση 0,56g/g. Οι ημισυνεχείς ζυμώσεις σε βιοαντιδραστήρα οδήγησαν σε συγκέντρωση ηλεκτρικού οξέος 34,3 g/L με απόδοση 0,5 g/g και παραγωγικότητα 0,75 g/L/h. Ακόμη, στη ζύμωση αυτή όλα τα σάκχαρα τα οποία περιέχονται στο υδρόλυμα καταναλώνονται από τον μικροοργανισμό (Stylianos et al.,2020).

Επίσης, παραγωγή φουμαρικού οξέος έχει μελετηθεί από τους Papadaki et al. χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα υδρόλυμα κέικ σόγιας από διαδικασίες παραγωγής βιοντίζελ και ζάχαρη πολύ υψηλής πολικότητας (VHP) από ελαιοτριβεία με το μυκητιακό στέλεχος *R. arrhizus* NRRL 2582. Οι ζυμώσεις πραγματοποιήθηκαν σε κωνικές φιάλες και το πλούσιο σε θρεπτικά υδρόλυμα κέικ σόγιας οδήγησε στην παραγωγή φουμαρικού οξέος 40g/L, όταν η ζάχαρη VHP χρησιμοποιήθηκε ως πηγή άνθρακα (Papadaki et al.,2018).

Στον Πίνακα 7 από βιβλιογραφική ανασκόπηση που έγινε, παρουσιάζονται τα καλύτερα αποτελέσματα και γίνεται συγκριτική αξιολόγηση με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης. Παρουσιάζεται η απόδοση ζυμώσεων οι οποίες πραγματοποιήθηκαν σε κωνικές φιάλες για παραγωγή φουμαρικού οξέος από ζύμες αλλά και από μύκητες.

| Μικροοργανισμός                   | Πηγή άνθρακα        | Φουμαρικό οξύ (g/L) | Απόδοση (g/g) | Παραγωγικότητα (g/L/h) | Χρόνος ζύμωσης (h) | Αναφορά               |
|-----------------------------------|---------------------|---------------------|---------------|------------------------|--------------------|-----------------------|
| <i>Candida blankii</i> (CBS 6734) | Γλυκόζη             | 46,9                | 0,11          | 0,13                   | 307                | Παρούσα Μελέτη        |
| <i>Candida blankii</i> (NA-83)    | Παραφίνες           | 36,5                | 0,81          | 0,22                   | 168                | Tsekova et al.,1999   |
| <i>Candida blankii</i> (NA-83)    | Παραφίνες + Γλυκόζη | 21,6                | 0,39          | 0,13                   | 168                | Tsekova et al.,1999   |
| <i>Candida hydrofumarica</i>      | Παραφίνες           | 50,4                | 0,84          | 0,3                    | 168                | Furukawa et al., 1970 |
| <i>Candida hydrofumarica</i>      | Παραφίνες           | 39,1                | 0,66          | 0,23                   | 168                | Yamada et al.,1970    |
| <i>R. arrhizus</i> NRRL 1526      | Γλυκόζη             | 98                  | 0,81          | 1                      | 96                 | Kenealy et al.,1986   |
| <i>R. oryzae</i> ATCC 20344       | Γλυκόζη             | 50                  | 0,72          | 0,34                   | 147                | Zhang et al., 2015    |
| <i>R. arrhizus</i> RH-07-13       | Γλυκόζη             | 31                  | 0,35          | 1,33                   | 24                 | Gu et al., 2013       |

Πίνακας 7: Βιοτεχνολογική παραγωγή φουμαρικού οξέος σε αναδεδυόμενες φιάλες.

Η ζύμωση με την ζύμη *Candida blankii* για παραγωγή φουμαρικού οξέος μελετήθηκε από τους Tsekova et al., χρησιμοποιώντας ως πηγή άνθρακα παραφίνες ή παραφίνες σε συνδιασμό με τη γλυκόζη. Η παραγωγή σε φουμαρικό οξύ μειώθηκε σταδιακά όταν οι συγκεντρώσεις των παραφινών και της πηγής αζώτου ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) αυξήθηκαν περισσότερο από το 45g/L και 0,2g/L αντίστοιχα. Η μέγιστη τιμή φουμαρικού οξέος 36,5g/L παρατηρήθηκε στις ζυμώσεις με τις βέλτιστες συγκεντρώσεις παραφινών και πηγής αζώτου. Επίσης, στην περίπτωση όπου ως πηγή άνθρακα χρησιμοποιήθηκαν παραφίνες σε συνδιασμό με την γλυκόζη η παραγωγή φουμαρικού οξέος μειώθηκε στα 21,6g/L (Tsekova et al.,1999). Στην μελέτη των Furukawa et al., διερευνήθηκε η ζύμωση για παραγωγή φουμαρικού οξέος της *Candida hydrocarbofumarica* σε διάφορες συνθήκες καλλιέργειας. Παρατηρήθηκε ότι η προσθήκη  $\text{CaCO}_3$  και ο αερισμός ήταν παράγοντες οι οποίοι επηρεάζουν την παραγωγή φουμαρικού οξέος. Ακόμη, σε αυτή την μελέτη παρατηρήθηκε ότι η αύξηση της συγκέντρωσης των παραφινών μείωσε την παραγωγή φουμαρικού οξέος. Μια πολύ υψηλή απόδοση 0,84g/g και παραγωγή φουμαρικού οξέος 50,4g/L ελήφθη στις βέλτιστες συνθήκες σε ζυμώσεις 7 ημερών (Furukawa et al.,1970). Επίσης, οι Yamada et al. μελέτησαν τις συνθήκες ζύμωσης για παραγωγή φουμαρικού οξέος. Η μέγιστη παραγωγή φουμαρικού οξέος 39,1g/L και η μέγιστη απόδοση 0,66g/g παρατηρήθηκε στη ζύμωση στις βέλτιστες συγκεντρώσεις πηγής άνθρακα και πηγής αζώτου (Yamada et al.,1970). Συγκρίνοντας τα πειραματικά αποτελέσματα της καλύτερης ζύμωσης της παρούσας μελέτης με τη βιβλιογραφία, παρατηρούμε αντίστοιχα αποτελέσματα στη παραγωγή φουμαρικού οξέος αλλά και σε κάποιες περιπτώσεις η παραγωγή του είναι μεγαλύτερη

στη παρούσα μελέτη. Όμως οι ζυμώσεις που πραγματοποιήθηκαν στη παρούσα μελέτη ήταν ημισυνεχείς και για το λόγο αυτό παρατηρείται μικρότερη απόδοση και παραγωγικότητα σε σύγκριση με τη βιβλιογραφία.

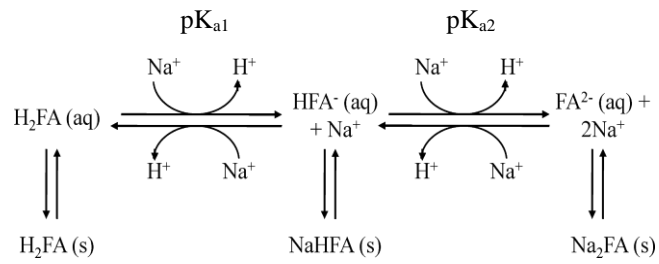
Σημειώνεται ότι αρκετές μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί με τη χρήση διάφορων στελεχών του γένους *Rhizopus* σε υπόστρωμα γλυκόζης για παραγωγή φουμαρικού οξέος με παραγόμενες ποσότητες φουμαρικού οξέος 98g/L, 50g/L και 31g/L αντίστοιχα (Kenealy et al., 1986; Zhang et al., 2015; Gu et al., 2013).

## **3.2 Διαλυτότητα φουμαρικού και μηλικού οξέος σε διαφορετικά pH**

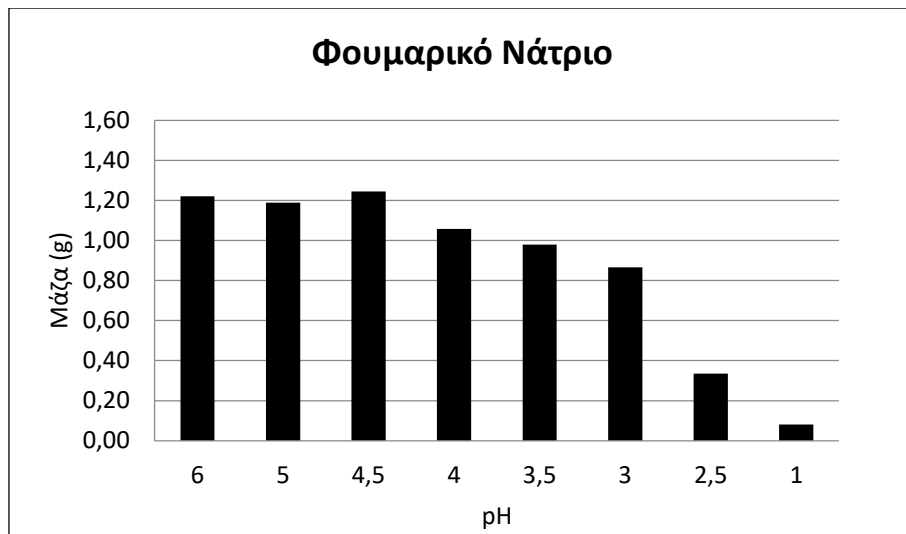
### **3.2.1 Μέτρηση διαλυτότητας φουμαρικού οξέος**

Για την ανάκτησή του φουμαρικού οξέος από το υγρό της ζύμωσης διερευνήθηκαν οι υδατικές διαλυτότητες του φουμαρικού οξέος και των αλάτων του σε διαφορετικά pH. Στα διαγράμματα που παρουσιάζονται στη συνέχεια περιγράφονται οι διαφορετικές συγκεντρώσεις φουμαρικού οξέος σε γραμμάρια και σε mol/L στις διαφορετικές τιμές pH για τα διαφορετικά διαλύματα αλάτων του φουμαρικού οξέος. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα και στις δύο περιπτώσεις του φουμαρικού οξέος με καυστικό νάτριο και του φουμαρικού οξέος με υδροξείδιο του μαγνησίου παρατηρήθηκε μείωση της διαλυτότητας του φουμαρικού οξέος με την μείωση του pH. Αρχικά, στην τιμή pH 6 όλο το φουμαρικό οξύ είναι διαλυτό. Παρατηρείται μείωση της διαλυτότητας του φουμαρικού οξέος στις τιμές pH 4 έως 1, ενώ από τις τιμές 4 έως 6 η διαλυτότητα είναι σχεδόν σταθερή. Δηλαδή, στα διαγράμματα περιγράφεται απότομη μείωση της διαλυτότητας από την τιμή  $\text{pH}=\text{pK}_{a2}=4,44$  και μετά την τιμή  $\text{pH}=\text{pK}_{a1}=3,03$ . Πιο συγκεκριμένα, το φουμαρικό άλας στην τιμή  $\text{pH}=6$  έχει συγκέντρωση 60g/L και στις τιμές pH 4 και 2,5 η συγκέντρωσή του είναι 54g/L και 15g/L αντίστοιχα. Στην τιμή  $\text{pH}=1$  το φουμαρικό οξύ που είναι διαλυτό έχει συγκέντρωση 4,5g/L. Στο Σχήμα 4 περιγράφονται αναλυτικά οι μορφές του φουμαρικού άλατος στα διαφορετικά pH. Συμπεραίνεται ότι στην τιμή pH όπου το φουμαρικό άλας βρίσκεται στην μορφή του φουμαρικού οξέος η διαλυτότητα του είναι πολύ χαμηλή.

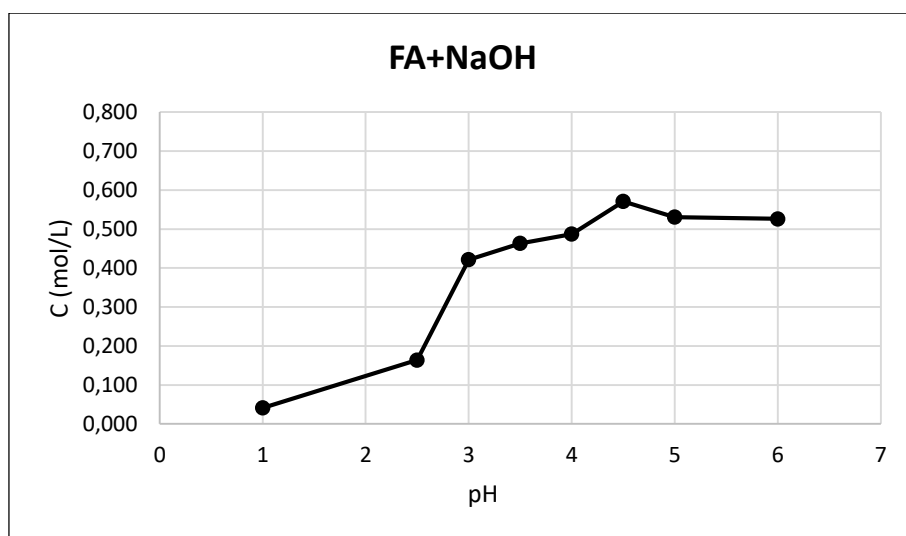
Η διαλυτότητα του φουμαρικού άλατος σε διαφορετικά pH μελετήθηκε επίσης από τους Roa Engel et al. Παρατηρήθηκαν παρόμοια αποτελέσματα με την παρούσα μελέτη όπου η διαλυτότητα του φουμαρικού άλατος μειώθηκε απότομα από την τιμή  $\text{pH}=3,8$ , ενώ στις μεγαλύτερες τιμές pH παραμένει σχεδόν σταθερή (Roa Engel et al., 2013).



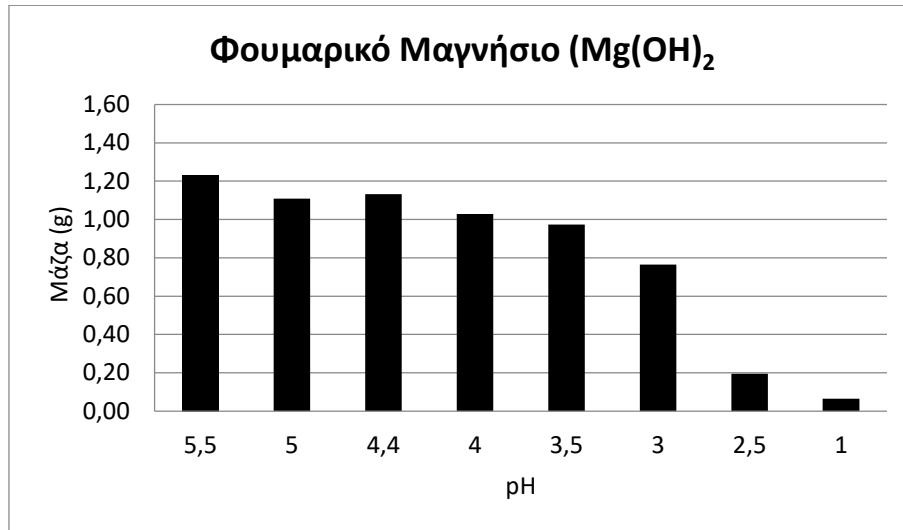
Σχήμα 4: Χημική ισορροπία του άλατος του φουμαρικού οξέος (Roa Engel et al.,2013).



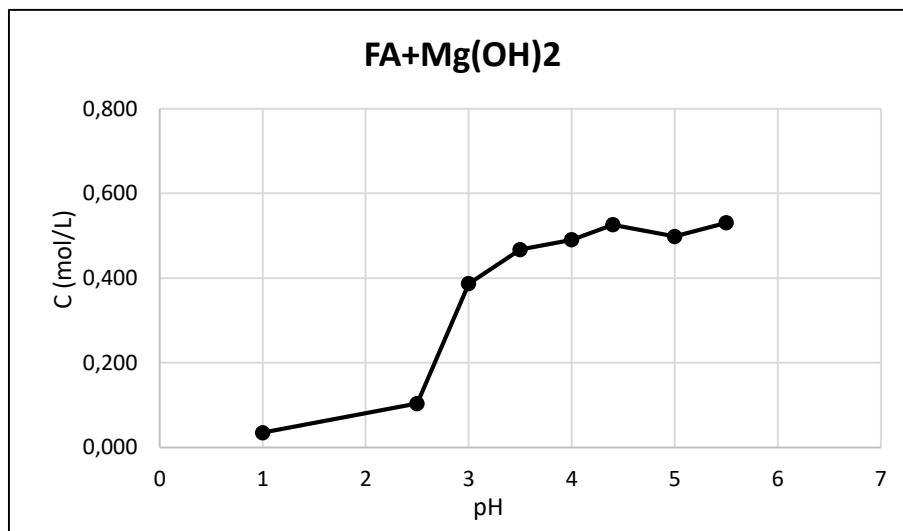
Διάγραμμα 41: Μάζα του άλατος του φουμαρικού οξέος με καυστικό νάτριο σε συνάρτηση με το pH.



Διάγραμμα 42: Συγκέντρωση (mol/L) του άλατος του φουμαρικού οξέος με καυστικό νάτριο σε συνάρτηση με το pH.



Διάγραμμα 43: Μάζα του άλατος του φουμαρικού οξέος με υδροξείδιο του μαγνησίου σε συνάρτηση με το pH.

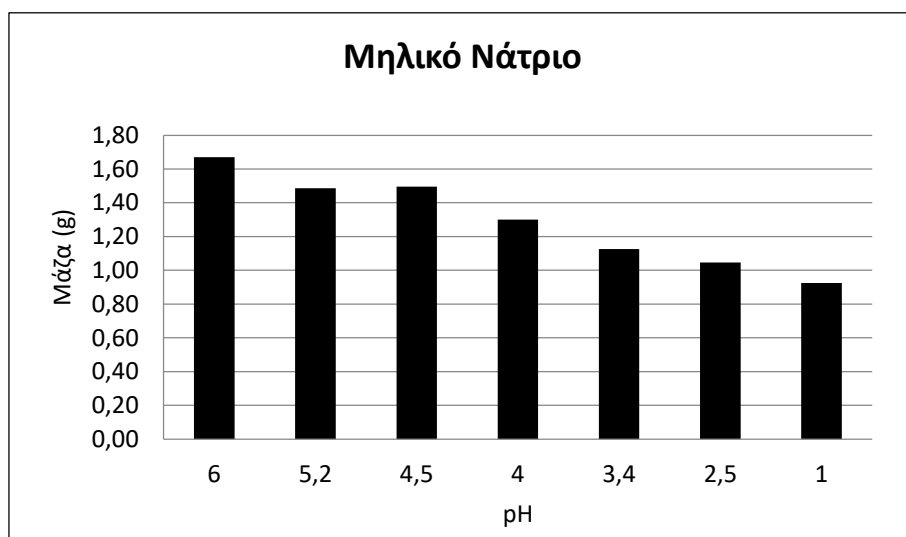


Διάγραμμα 44: Συγκέντρωση (mol/L) του άλατος του μηλικού οξέος με υδροξείδιο του μαγνησίου σε συνάρτηση με το pH.

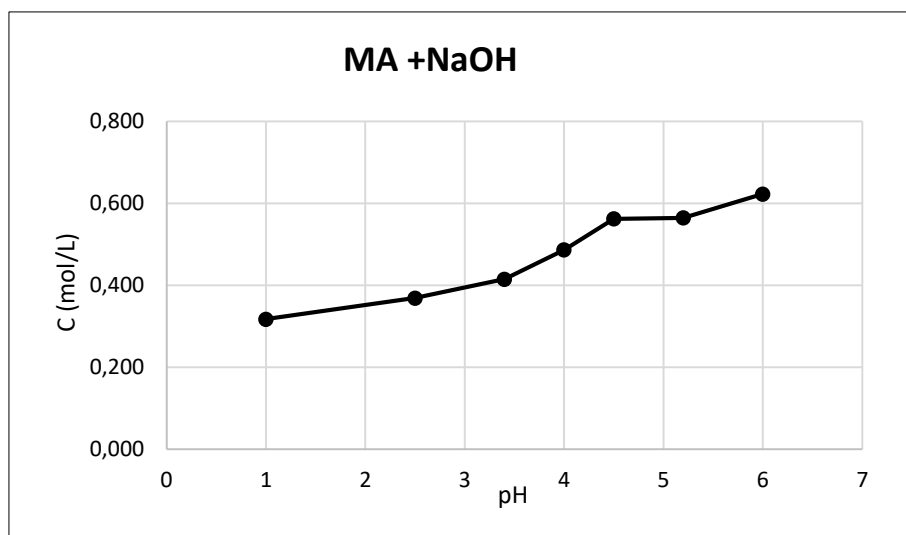
### 3.2.2 Μέτρηση διαλυτότητας μηλικού οξέος

Για την ανάκτησή και του μηλικού οξέος από το υγρό της ζύμωσης διερευνήθηκαν οι υδατικές διαλυτότητες του μηλικού οξέος και των αλάτων του σε διαφορετικά pH. Στη συνέχεια παρουσιάζονται οι διαφορετικές συγκεντρώσεις μηλικού οξέος σε γραμμάρια και σε mol/L στις διαφορετικές τιμές pH για τα διαφορετικά διαλύματα αλάτων του μηλικού οξέος οι οποίες προσδιορίστηκαν με την ίδια διαδικασία μέτρησης της διαλυτότητας του φουμαρικού οξέος. Και στις 3 περιπτώσεις των διαφορετικών αλάτων του μηλικού οξέος παρατηρείται μικρή μείωση της

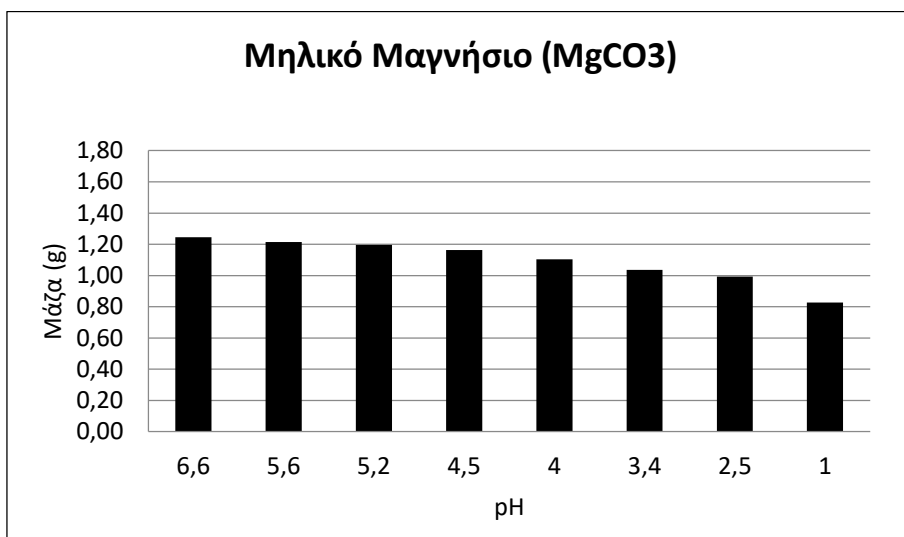
συγκέντρωσης του μηλικού οξέος με την μείωση του pH. Αρχικά, στην τιμή pH 6 όλο το μηλικό οξύ είναι διαλυτό. Πιο συγκεκριμένα, και στις 3 περιπτώσεις το μηλικό οξύ που είναι διαλυτό στις χαμηλότερες τιμές pH 2,5 και 1 έχει συγκέντρωση 55g/L και 45g/L αντίστοιχα. Όπως προκύπτει και από άλλες αναφορές η διαλυτότητα του μηλικού οξέος είναι αρκετά υψηλή της τάξης 558g/L στους 20°C σε διαλύτη νερό. Όμως, η διαλυτότητα του μηλικού οξέος και σε άλλους διαλύτες όπως η μεθανόλη, η ακετόνη και άλλοι πολικοί διαλύτες είναι υψηλή (Yalkowsky et al., 2010).



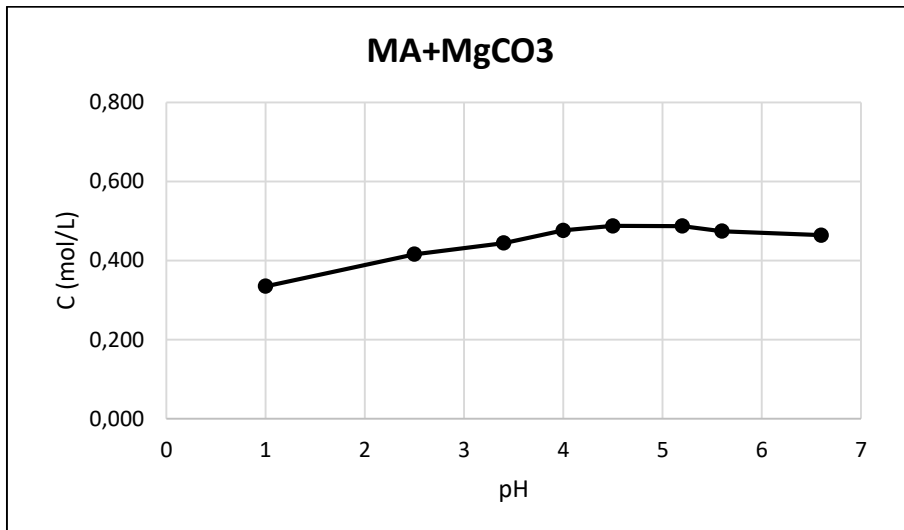
Διάγραμμα 45: Μάζα του άλατος του μηλικού οξέος με καυστικό νάτριο σε συνάρτηση με το pH.



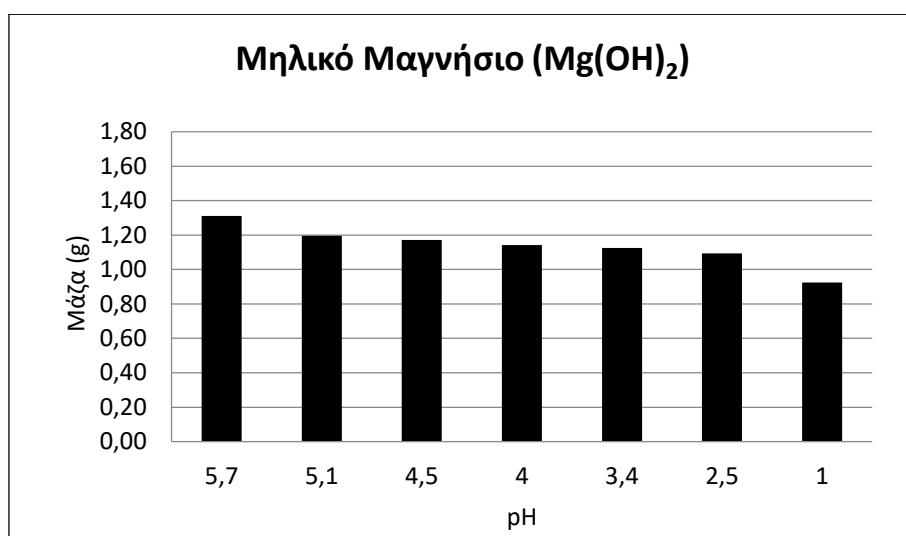
Διάγραμμα 46: Συγκέντρωση (mol/L) του άλατος του μηλικού οξέος με καυστικό νάτριο σε συνάρτηση με το pH.



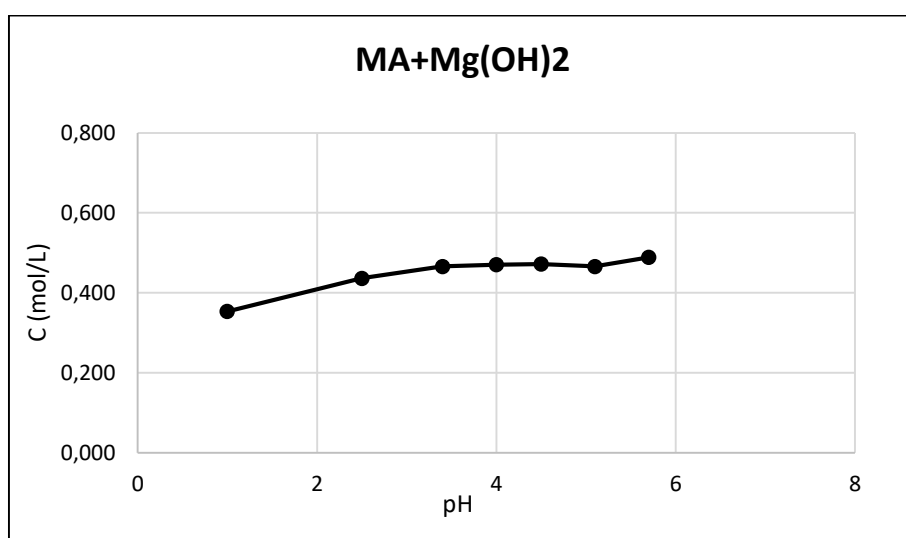
Διάγραμμα 47: Μάζα του άλατος του μηλικού οξέος με ανθρακικό μαγνήσιο σε συνάρτηση με το pH.



Διάγραμμα 48: Συγκέντρωση (mol/L) του άλατος του μηλικού οξέος με ανθρακικό μαγνήσιο σε συνάρτηση με το pH.



Διάγραμμα 49: Μάζα του άλατος του μηλικού οξέος με υδροξείδιο του μαγνησίου σε συνάρτηση με το pH.



Διάγραμμα 50: Συγκέντρωση (mol/L) του άλατος του μηλικού οξέος με υδροξείδιο του μαγνησίου σε συνάρτηση με το pH.

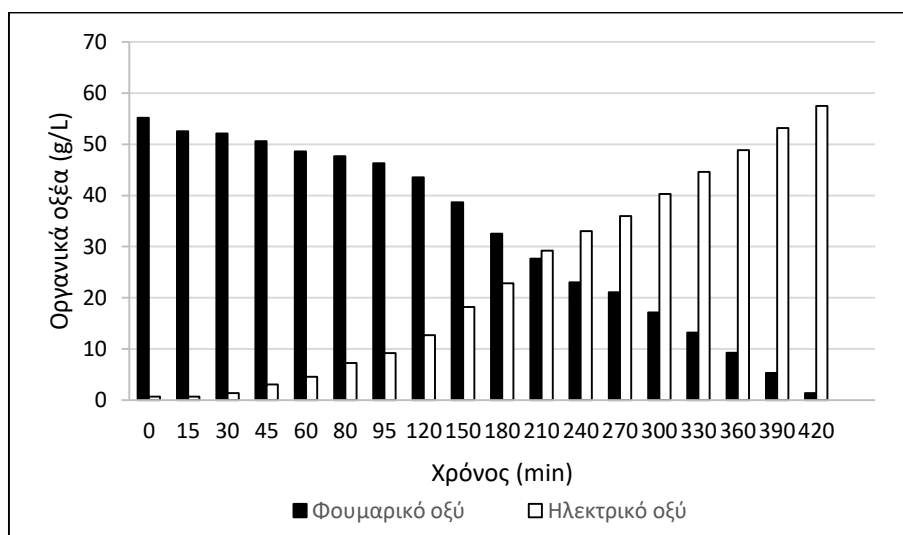


### 3.3 Χρήση ηλεκτροδίων για το διαχωρισμό ή όχι αλάτων του φουμαρικού και του μηλικού οξέος

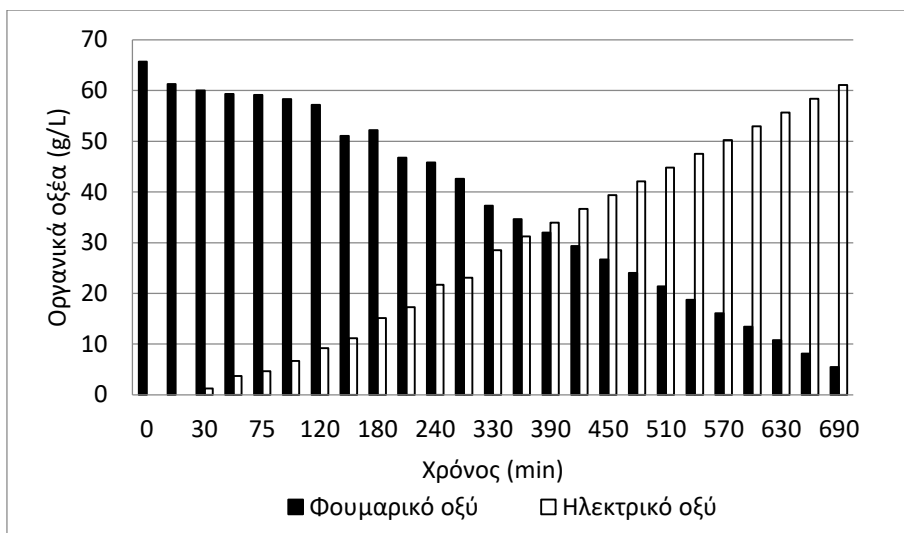
Ακόμη, για την ανάκτησή του φουμαρικού οξέος από το υγρό της ζύμωσης διερευνήθηκαν τρία διαφορετικά ηλεκτρόδια για την μετέπειτα χρήση τους σε ηλεκτροχημικό κελί. Αρχικά, περιγράφεται η χρήση των ηλεκτροδίων σε εμπορικά άλατα φουμαρικού και μηλικού οξέος. Στη συνέχεια, τα ηλεκτρόδια χρησιμοποιήθηκαν και σε διάλυμα αλάτων φουμαρικού οξέος του υγρού της ζύμωσης.

#### 3.3.1 Χρήση ηλεκτροδίων για τον διαχωρισμό αλάτων του φουμαρικού οξέος

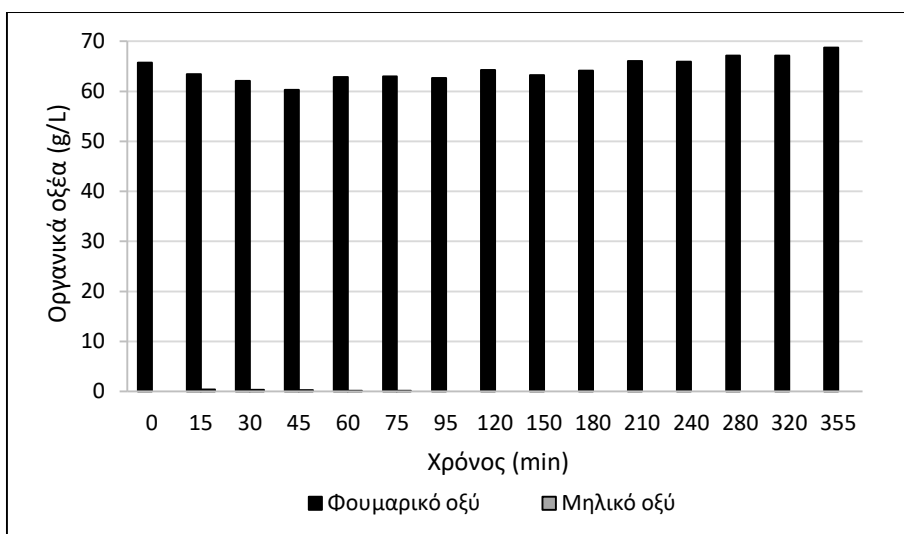
Στα διαγράμματα στη συνέχεια παρατηρείται ότι μόνο στην περίπτωση όπου χρησιμοποιήθηκε το ηλεκτρόδιο PbO στην κάθοδο δεν μετατράπηκε το φουμαρικό οξύ σε κάποιο άλλο οξύ. Στην περίπτωση αυτή τα 65g/L φουμαρικού άλατος που υπήρχαν στο διάλυμα από την αρχή της κατάλυσης παρέμειναν στη μορφή του φουμαρικού οξέος μέχρι το τέλος της κατάλυσης. Στις άλλες δύο περιπτώσεις παρατηρείται μετατροπή του φουμαρικού οξέος σε ηλεκτρικό οξύ. Όταν στην κάθοδο χρησιμοποιήθηκε το ηλεκτρόδιο ανοξειδωτο ατσάλι τα 55g/L φουμαρικό οξύ μετατράπηκαν σε 55g/L ηλεκτρικό οξύ σε 7 ώρες. Ενώ όταν στην κάθοδο χρησιμοποιήθηκε το ηλεκτρόδιο γραφίτης τα 65g/L φουμαρικό οξύ μετατράπηκαν σε 65g/L ηλεκτρικό οξύ σε 11,5 ώρες



Διάγραμμα 51: Συγκέντρωση του άλατος φουμαρικού και ηλεκτρικού οξέος (g/L) σε συνάρτηση με το χρόνο με τη χρήση του ηλεκτροδίου ανοξειδωτο ατσάλι στη κάθοδο.



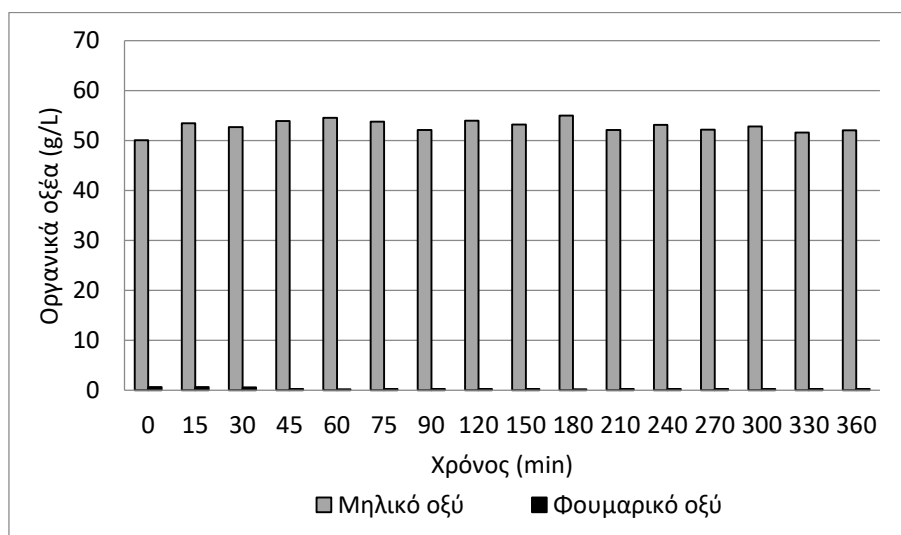
Διάγραμμα 52: Συγκέντρωση του άλατος φουμαρικού και ηλεκτρικού οξέος (g/L) σε συνάρτηση με το χρόνο με τη χρήση του ηλεκτροδίου γραφίτης στη κάθοδο.



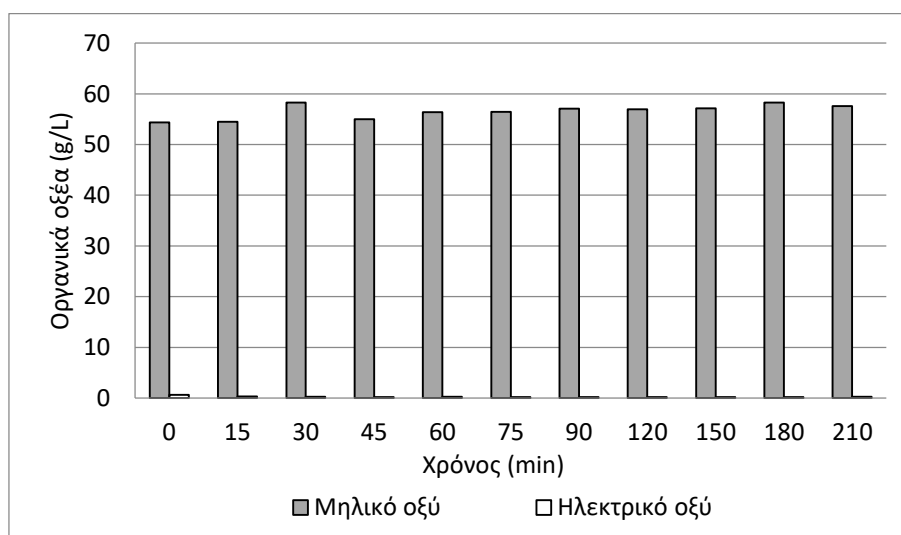
Διάγραμμα 53: Συγκέντρωση του άλατος φουμαρικού και μηλικού οξέος (g/L) σε συνάρτηση με το χρόνο με τη χρήση του ηλεκτροδίου PbO στη κάθοδο.

### 3.3.2 Χρήση ηλεκτροδίων για τον διαχωρισμό αλάτων του μηλικού οξέος

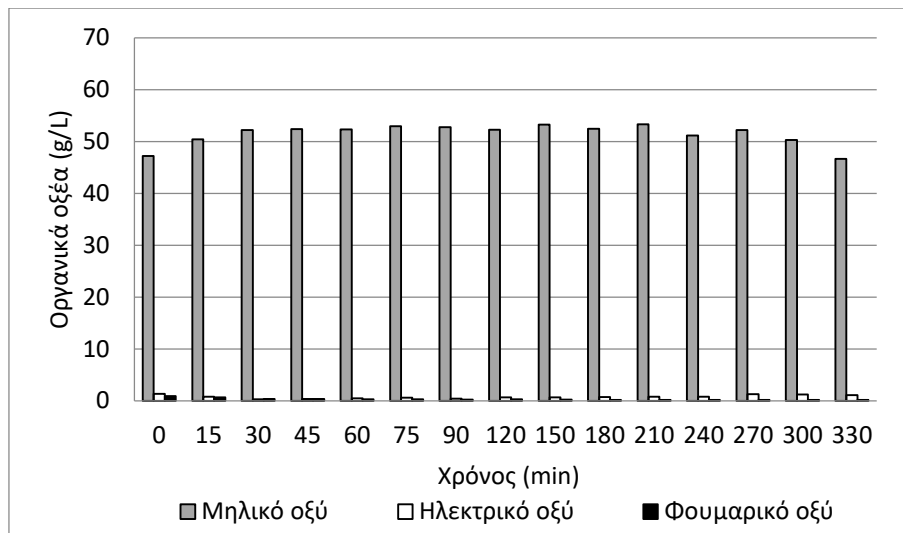
Στη περίπτωση των αλάτων του μηλικού οξέος από τα αποτελέσματα παρακάτω παρατηρείται ότι κανένα ηλεκτρόδιο δεν μετέτρεψε το άλας του μηλικού οξέος σε κάποιο άλλο οξύ. Πολύ μικρές ποσότητες φουμαρικού και ηλεκτρικού οξέος παρατηρήθηκαν και στις 3 περιπτώσεις ηλεκτροδίων. Στο τέλος, όμως, κάθε κατάλυσης παρατηρείται η ίδια ποσότητα μηλικού οξέος με αυτή όπου ξεκίνησε η κατάλυση.



Διάγραμμα 54: Συγκέντρωση του άλατος φουμαρικού και μηλικού οξέος (g/L) σε συνάρτηση με το χρόνο με τη χρήση του ηλεκτροδίου ανοξείδωτο ατσάλι στη κάθοδο.



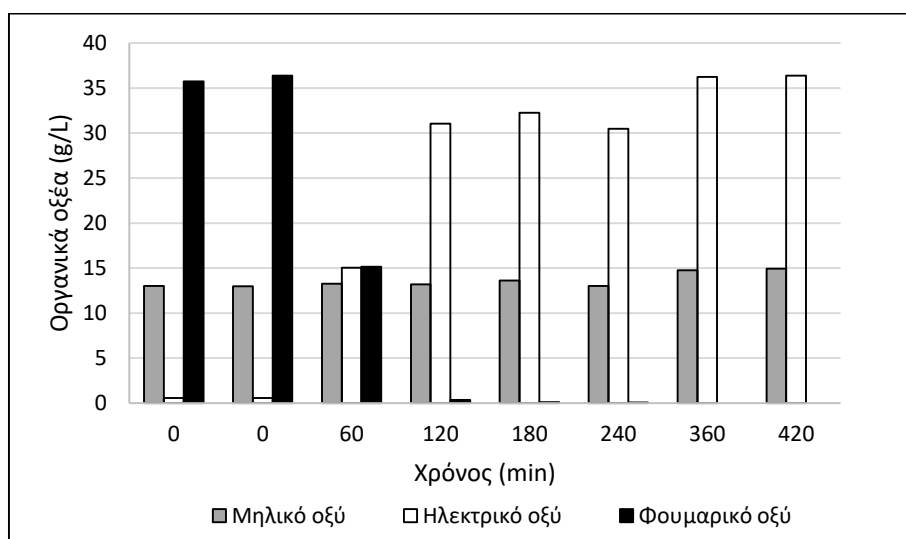
Διάγραμμα 55: Συγκέντρωση του άλατος μηλικού και ηλεκτρικού οξέος (g/L) σε συνάρτηση με το χρόνο με τη χρήση του ηλεκτροδίου γραφίτης στη κάθοδο.



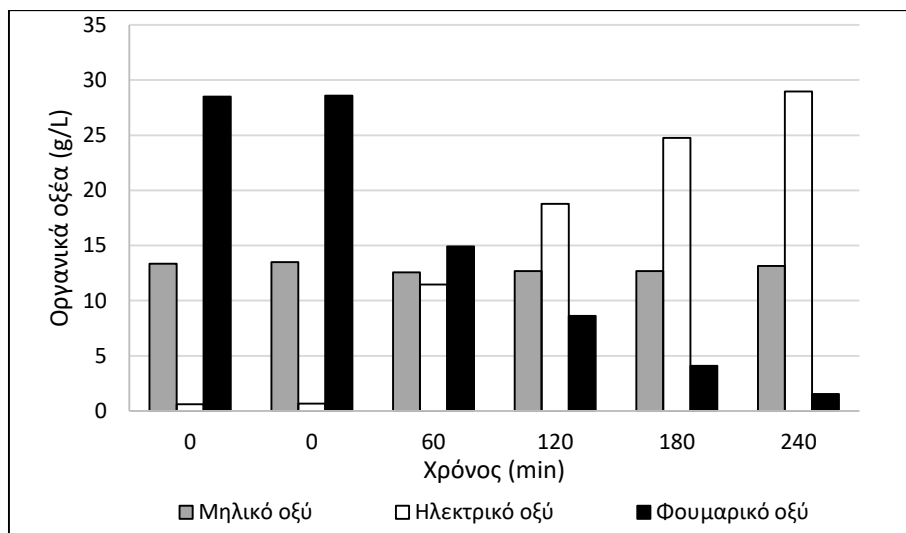
Διάγραμμα 56: Συγκέντρωση του άλατος φουμαρικού, ηλεκτρικού και μηλικού οξέος (g/L) σε συνάρτηση με το χρόνο με τη χρήση του ηλεκτροδίου PbO στη κάθοδο.

### 3.3.3 Χρήση ηλεκτροδίων για το διαχωρισμό αλάτων των οξέων που περιέχονται στο υγρό της ζύμωσης

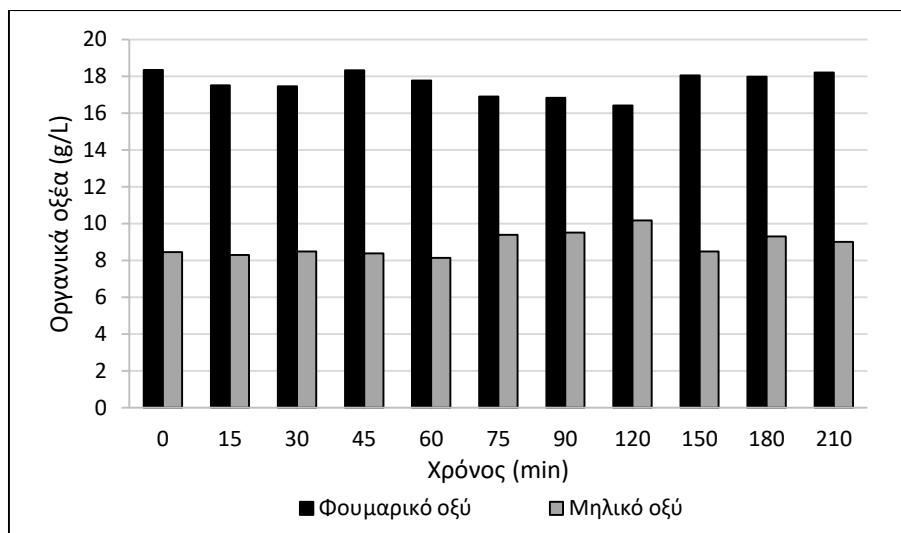
Τέλος, στα διαγράμματα στη συνέχεια παρατηρείται ότι μόνο στην περίπτωση όπου χρησιμοποιήθηκε το ηλεκτρόδιο PbO στην κάθοδο δεν μετατράπηκε το φουμαρικό οξύ σε κάποιο άλλο οξύ όπως έδειξαν και τα αποτελέσματα της χρήσης ηλεκτροδίων σε εμπορικό άλας του φουμαρικού οξέος. Στην περίπτωση αυτή η ποσότητα φουμαρικού και μηλικού άλατος που υπήρχε στο διάλυμα από την αρχή της κατάλυσης παρέμεινε στη μορφή του φουμαρικού και του μηλικού οξέος αντίστοιχα μέχρι το τέλος της κατάλυσης. Στις άλλες δύο περιπτώσεις παρατηρείται μετατροπή του φουμαρικού οξέος σε ηλεκτρικό οξύ, ενώ το μηλικό οξύ σε όλη τη διάρκεια των καταλύσεων παραμένει στην ίδια συγκέντρωση. Βάση των αποτελεσμάτων συμπεραίνεται ότι το ηλεκτρόδιο PbO της καθόδου είναι κατάλληλο για την χρήση του σε ηλεκτροχημικό κελί με σκοπό τον διαχωρισμό του φουμαρικού άλατος του υγρού της ζύμωσης σε φουμαρικό οξύ.



Διάγραμμα 57: Συγκέντρωση του άλατος φουμαρικού, ηλεκτρικού και μηλικού οξέος (g/L) που περιέχονται στο υγρό της ζύμωσης σε συνάρτηση με το χρόνο με τη χρήση του ηλεκτροδίου ανοξείδωτο ατσάλι στη κάθοδο.



Διάγραμμα 58: Συγκέντρωση του άλατος φουμαρικού, ηλεκτρικού και μηλικού οξέος (g/L) που περιέχονται στο υγρό της ζύμωσης σε συνάρτηση με το χρόνο με τη χρήση του ηλεκτροδίου γραφίτη στη κάθοδο.



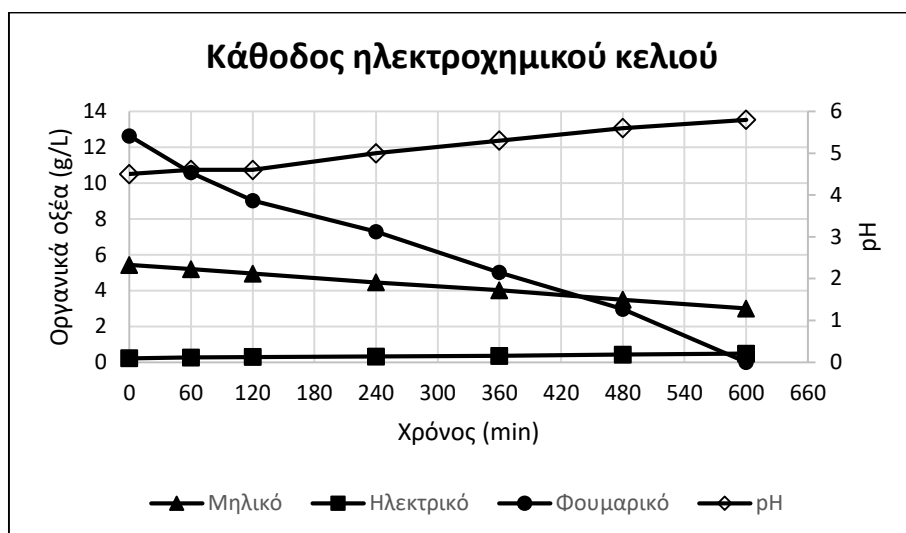
Διάγραμμα 59: Συγκέντρωση του άλατος φουμαρικού και μηλικού οξέος (g/L) που περιέχονται στο υγρό της ζύμωσης σε συνάρτηση με το χρόνο με τη χρήση του ηλεκτροδίου PbO στη κάθοδο.

### 3.4 Χρήση ηλεκτροχημικού κελιού για τον διαχωρισμό ή όχι του άλατος του φουμαρικού οξέος στο υγρό της ζύμωσης

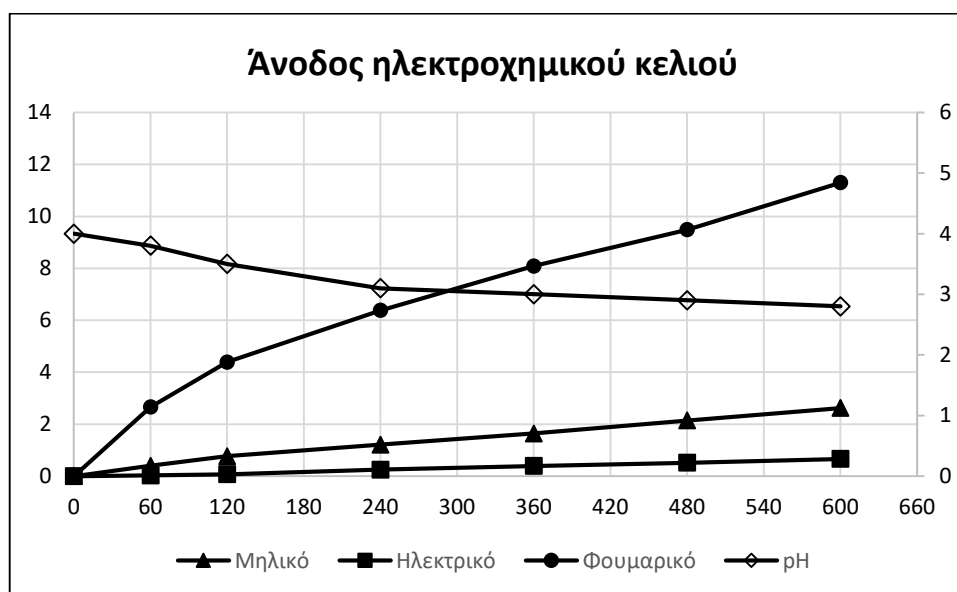
Σύμφωνα με τα διαγράμματα στη συνέχεια παρατηρείται ότι και τα 12g/L φουμαρικό οξύ πέρασαν από το θάλαμο της καθόδου στο θάλαμο της ανόδου σε 10 ώρες. Είναι φανερό ότι ο ρυθμός μετατροπής του φουμαρικού οξέος είναι μεγαλύτερος σε σχέση με το ρυθμό του ηλεκτρικού και του μηλικού οξέος. Στις 10 πρώτες ώρες της κατάλυσης παρατηρείται ότι από τα 5,5g/L μηλικού οξέος μόνο τα 2,5g/L πέρασαν στην άνοδο του ηλεκτροχημικού κελιού ενώ τα υπόλοιπα 3g/L παρέμειναν στη κάθοδο. Στην περίπτωση του ηλεκτρικού οξέος στον θάλαμο της καθόδου παρατηρείται μία μικρή αύξηση της συγκέντρωσής του η οποία οφείλεται στην μετατροπή του φουμαρικού οξέος σε ηλεκτρικό οξύ λόγω του ηλεκτροδίου της καθόδου ανοξειδωτο ατσάλι. Στον θάλαμο της ανόδου δεν παρατηρείται μετατροπή του φουμαρικού οξέος σε κάποιο άλλο οξύ.

Όσον αφορά την τιμή pH φαίνεται αύξησή της στον θάλαμο της καθόδου και μείωση της τιμής της στο θάλαμο της ανόδου. Η αύξηση της τιμής pH στον θάλαμο της καθόδου οφείλεται στα ιόντα υδροξειδίου που δημιουργούνται και αντίστροφα τα πρωτόνια που παράγονται στην άνοδο οφείλονται στην μείωση της τιμής pH.

Συμπεραίνοντας, η μέθοδος ηλεκτροδιάλυσης χρησιμοποιήθηκε επιτυχώς για την απομάκρυνση οργανικών αλάτων από το ζωμό ζύμωσης και για την ανάκτηση του φουμαρικού οξέος. Όπως αναφέρεται και από τους Prochaska et al., έχει αποδειχτεί ότι η διπολική ηλεκτροδιάλυση μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως ένα από τα στάδια καθαρισμού προς την ανάκτηση του φουμαρικού οξέος από ζωμό ζύμωσης (Prochaska et al., 2014).



Διάγραμμα 60: Συγκέντρωση του άλατος φουμαρικού, ηλεκτρικού και μηλικού οξέος (g/L) που περιέχονται στο υγρό της ζύμωσης και μέτρηση pH σε συνάρτηση με το χρόνο στην κάθοδο του ηλεκτροχημικού κελιού.



Διάγραμμα 61: Συγκέντρωση του άλατος φουμαρικού, ηλεκτρικού και μηλικού οξέος (g/L) που περιέχονται στο υγρό της ζύμωσης και μέτρηση pH σε συνάρτηση με το χρόνο στην άνοδο του ηλεκτροχημικού κελιού.

## 4 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Τα αποτελέσματα των ημισυνεχών ζυμώσεων, σε καλλιέργεια υγρής κατάστασης για την βιοτεχνολογική παραγωγή φουμαρικού οξέος με τη χρήση της ζύμης *Candida blankii*, μπορούν να συνοψιστούν στα ακόλουθα:

### 1. Χρήση γλυκόζης ως πηγή άνθρακα

- Η μεγαλύτερη συγκέντρωση φουμαρικού οξέος ήταν 46,86g/L με ταυτόχρονη παραγωγή μηλικού οξέος 22,53g/L και επιτεύχθηκε όταν ο ρυθμός ανάδευσης ήταν 180rpm και η συγκέντρωση εκχυλίσματος ζύμης 0,4g/L.
- Η μεγαλύτερη απόδοση και παραγωγικότητα του φουμαρικού οξέος ήταν 0,11g/g και 0,13g/L/h αντίστοιχα.
- Η αύξηση του ρυθμού ανάδευσης αλλά και του ολικού όγκου της φιάλης είχε ως αποτέλεσμα την μείωση της συγκέντρωσης του φουμαρικού οξέος.
- Η αύξηση της συγκέντρωσης του εκχυλίσματος ζύμης δεν ευνόησε την παραγωγή φουμαρικού οξέος.

### 2. Χρήση διαφορετικών πηγών άνθρακα

- Παρατηρήθηκε κατανάλωση λαδιού το οποίο είχε εκχυλιστεί από υδρολυμένα αστικά απόβλητα (MSW) από τον μικροοργανισμό και ανάπτυξη της βιομάζας του.
- Παραγωγή φουμαρικού οξέος παρατηρήθηκε όταν χρησιμοποιήθηκε ως πηγή άνθρακα η μαννόζη, η γαλακτόζη, η ξυλόζη και η φρουκτόζη.
- Η μεγαλύτερη συγκέντρωση φουμαρικού οξέος ήταν 16,08g/L όταν η μαννόζη χρησιμοποιήθηκε ως πηγή άνθρακα.
- Η συγκέντρωση του φουμαρικού οξέος ήταν 16,57g/L όταν υδρολυμένα αστικά απόβλητα (MSW) χρησιμοποιήθηκαν ως πηγή άνθρακα.

Τα αποτελέσματα της διαλυτότητας φουμαρικού και μηλικού οξέος σε διαφορετικά pH είναι τα ακόλουθα:

- Παρατηρήθηκε μείωση της διαλυτότητας του φουμαρικού οξέος με την μείωση του pH, ειδικά στις τιμές pH 4 έως 1.
- Παρατηρήθηκε μείωση της διαλυτότητας του μηλικού οξέος με την μείωση του pH.



Τα αποτελέσματα της χρήσης διαφορετικών ηλεκτροδίων για τον διαχωρισμό ή όχι του φουμαρικού και του μηλικού οξέος συνοψίζονται στα εξής:

- Μόνο στην περίπτωση όπου χρησιμοποιήθηκε το ηλεκτρόδιο PbO στην κάθοδο δεν παρατηρήθηκε μετατροπή του φουμαρικού οξέος σε κάποιο άλλο οξύ.
- Στην περίπτωση του μηλικού οξέος στο τέλος κάθε κατάλυσης παρατηρείται η ίδια ποσότητα μηλικού οξέος με αυτή όπου ξεκίνησε η κατάλυση.
- Η μέθοδος ηλεκτροδιάλυσης χρησιμοποιήθηκε επιτυχώς για την απομάκρυνση οργανικών αλάτων από το ζυμό ζύμωσης και για την ανάκτηση του φουμαρικού οξέος.

## 5 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Bhagavan N. V., Water, Acids, Bases, and Buffers, Medical Biochemistry (Fourth Edition), Chapter 2, 2002, 9-17.
- Bolzonella D., Fatone F., Pavan P., Cecchi F., Anaerobic Fermentation of Organic Municipal Solid Wastes for the Production of Soluble Organic Compounds, Ind. Eng. Chem. Res., 2005, 44, 3412-3418.
- Buckley H. R., N. van Uden, Five new *Candida* species, Mycopathologia et mycologia applicata volume, 1968, 36, 257–266.
- Budde C. F., Riedel S. L., Hübner F., Risch S., Popović M. K., Rha C., Sinskey A. J., Growth and polyhydroxybutyrate production by *Ralstonia eutropha* in emulsified plant oil medium, Applied Microbiology and Biotechnology, 2011, 89, 1611-1619.
- Cao N., J. Du, C.S. Gong, G.T. Tsao, Simultaneous production and recovery of fumaric acid from immobilized *rhizopus oryzae* with a rotary biofilm contactor and an adsorption column, Appl. Environ. Microbiol., 1996, 62, 2926–2931.
- Das R.C., Dash U.N., Panda K.N., Thermodynamics of dissociation of DL-malic, maleic and fumaric acids in water and water + dioxan mixtures, Journal of Chemical Society Farad Trans, 76, 2152-2158.
- Faulkner L. R., Allen J. Bard, Electrochemical Methods-Fundamentals and applications, John Wiley and Sons, 2001.
- Foster J. W., S.A. Waksman, The production of fumaric acid by molds belonging to the genus *rhizopus*, J. Am. Chem. Soc., 1938, 61, 127–135.
- Furukawa T., Nakahara T., Yamada K., Studies on the Utilization of Hydrocarbons by Microorganisms, Agricultural and Biological Chemistry, 1970, 34:9, 1402-1406.
- Gangl I. C., W.A. Weigand, F.A. Keller, Economic comparison of calcium fumarate and sodium fumarate production by *Rhizopus arrhizus*, Appl. Biochem. Biotechnol., 1990, 24-25, 663–677.
- Goldberg I., Rokem J. S., Organic and Fatty Acid Production, Microbial, Applied Microbiology: Industrial, 421-442.
- Goto M, Nara T, Tokumaru I, Fugono N, Uchida Y, Terasawa M, Yukawa H., Method of producing fumaric acid, 1998, US5783428.
- Gu C., Zhou Y., Liu L. & Deng L., Production of fumaric acid by immobilized *Rhizopus arrhizus* on net, Bioresource Technology, 2013, 131, 303–307.

- Guo F., Min Wua, Zhongxue Daia, Shangjie Zhanga, Wenming Zhanga, Weiliang Donga, Jie Zhoua, Min Jianga, Fengxue Xinnet, Current advances on biological production of fumaric acid, *Biochemical Engineering Journal*, 2020, 153, 107397.
- Ilica R. A., Kloetzer L., Galaction A. I., Cascaval D., Fumaric acid: production and separation, *Biotechnol Letters*, 2019, 41, 47–57.
- KENEALY W., ZAADY E., PREEZ J. C., STIEGLITZ B., GOLDBERG I., Biochemical Aspects of Fumaric Acid Accumulation by *Rhizopus arrhizus*, *Applied and Environmental Microbiology*, 1986, 52:1, 128-133.
- Killestein J., Rudick R.A. & Polman C.H., Oral treatment for multiple sclerosis., *The Lancet Neurology*, 2011, 10, 1026-1034.
- Koutinas A. A., V. Anestis, P. Daniel, K. Nikolaos, L.G. Isabel, I.K. Kookos, P. Seraphim, K., C.S.K. Lin, Valorization of industrial waste and by-product streams via fermentation for the production of chemicals and biopolymers, *Chem. Soc. Rev.*, 2014, 45, 2587–2627.
- Khushboo, Ankush, Karuna Yadav, Mrinal Kanti Mandal, Supriya Pal, Hirok Chaudhuri, Kashyap Kumar Dubey, Chapter 15 - Bioeconomy of municipal solid waste (MSW) using gas fermentation, *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering, Resource Recovery from Wastes*, 2020, 289-304.
- Lee S. Y., H.U. Kim, T.U. Chae, J.S. Cho, J.W. Kim, J.H. Shin, D.I. Kim, Y.-S. Ko, W.D. Jang, Y.-S. Jang, A comprehensive metabolic map for production of biobased chemicals, *Nat. Catal.*, 2019, 2, 18–33.
- Liao W., Y. Liu, C. Frear, S. Chen, A new approach of pellet formation of a filamentous fungus - *Rhizopus oryzae*, *Bioresour. Technol.*, 2007, 98, 3415–3423.
- Lie, S., The EBC-Ninhydrin method for determination of free alpha amino nitrogen, *Journal of the Institute of Brewing*, 1973, 79(1), 37-41.
- Liese A., Seelbach K. & Wandrey C., *Industrial biotransformations*, 2<sup>nd</sup> edn Wiley-VCH. Weinheim, 2006.
- Lohbeck K., H. Haferkorn, W. Fuhrmann, N. Fedtke, Maleic and fumaric acids, *Anal. Chem.*, 2000, 1454–1459.
- Long, B.-W., Li, J., Zhang, R.-R., Wan, L.: Solubility of benzoic acid in acetone, 2-propanol, acetic acid and cyclohexane: experimental measurement and thermodynamic modeling. *Fluid Phase Equilib.*, 2010, 297, 113–120.
- Martin A., Bustamanate P., and Chun A., H., C., “Physical Pharmacy,” B.I. Wavelly Pvt. Ltd., New Delhi, 1994, 4, 223.
- Martin-Dominguez V., Estevez J., Francisco de Borja Ojembarrena, Santow V. E., Ladero M., Fumaric acid production: A Biorefinery Perspective, *Fermentation*, 2018, 4, 33, 1-22.

- Mcginn S. M. , K.A. Beauchemin, T. Coates, D. Colombatto, Methane emissions from beef cattle: effects of monensin, sunflower oil, enzymes, yeast, and fumaric acid, *J. Anim. Sci.*, 2004, 82, 3346–3356.
- Mondala A. H., Direct fungal fermentation of lignocellulosic biomass into itaconic, fumaric, and malic acids: current and future prospects, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 2015, 42, 487–506.
- Mulder Marcel, *Basic Principles of Membrane Technology*. Kluwer Academic Publishers, 1996.
- Nakajima- Kambe T, Nozue T, Mukouyama M, Nakahara T, Bioconversion of maleic acid to fumaric acid by *Pseudomonas alcaligenes* strain XD-1. *J Ferment Bioeng*, 1997, 84, 165–168.
- Pateraki C., Stephen J. Andersen, Dimitrios Ladakis, Apostolis Koutinas and Korneel Rabaey, Direct electrochemical extraction increases microbial succinic acid production from spent sulphite liquor, *Green Chemistry*, 2019, 21, 2401–2411.
- Papadaki A., N. Androutsopoulos, M. Patsalou, M. Koutinas, N. Kopsahelis, A. Castro, S. Papanikolaou, A. Koutinas, Biotechnological production of fumaric acid: the effect of morphology of *rhizopus arrhizus* NRRL 2582, *Fermentation*, 2017, 3, 1-13.
- Papadaki A., Papapostolou H., Alexandri M., Kopsahelis N., Papanikolaou S., Aline Machado de Castro, Freire D. M. G., Koutinas A. A., Fumaric acid production using renewable resources from biodiesel and cane sugar production processes, *Environmental Science and Pollution Research*, 2018, 25, 35960–35970.
- Prochaska K., Marta J., Woźniak-Budych, Recovery of fumaric acid from fermentation broth using bipolar electrodialysis, *Journal of Membrane Science*, 2014, 469, 428–435.
- Qing Xu, Shuang Li, He Huang, Jianping Wen, Key technologies for the industrial production of fumaric acid by fermentation, *Biotechnology advances*, 2012, 301 1685-1696.
- Reichel K., Thaci D., Mrowietz U., Kamps A., Neureither M. & Luger T., Efficacy and safety of fumaric acid esters in the long term treatment of psoriasis: a retrospective study (FUTURE), *Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft*, 2009, 7, 603-611.
- Roa Engel C. A., Straathof A. J. J., Zijlmans T. W., Walter M. van Gulik, Luuk A. M. van der Wielen, Fumaric acid production by fermentation, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2008, 78, 379-389.
- Roa Engel C. A., Joop H. ter Horst, Pieterse M., Luuk A. M. van der Wielen, Straathof A. J. J., Solubility of Fumaric Acid and Its Monosodium Salt, *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 2013, 52, 9454–9460.
- Straathof A.J.J., van Gulik W.M., Production of Fumaric Acid by Fermentation. Reprogramming Microbial Metabolic Pathways, Wang X., Chen J. & Quinn P.J. Book Chapter. ISBN: 978-94-007-5055-5, 2012.

- Stylianou E., Pateraki C., Ladakis D., Cruz-Fernández M., Latorre-Sánchez M., Coll C. and Koutinas A., Evaluation of organic fractions of municipal solid waste as renewable feedstock for succinic acid production, *Biotechnology for Biofuels*, 2020, 13:72, 1-16.
- Tamakawa H., S. Ikushima, S. Yoshida, Efficient production of L-lactic acid from xylose by a recombinant *Candida utilis* strain, *J. Biosci. Bioeng.*, 2012, 113, 73–75.
- Tsekova K., Kaimaktchiev A., Krumov A., Production of Fumaric Acid from n-Alkanes by *Candida Blankii* NA-83, *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 1999, 13:2, 24-26.
- Wang G., D. Huang, Y. Li, J. Wen, X. Jia, A metabolic-based approach to improve xylose utilization for fumaric acid production from acid pretreated wheat bran by *Rhizopus oryzae*, *Bioresour. Technol.*, 2015, 180, 119–127.
- Xu Q., S. He, J. Ling, L. Shuang, J. Wen, R. Guan, H. He, Extractive fermentation for fumaric acid production by *Rhizopus oryzae*, *Sep. Sci. Technol.*, 2017, 52, 1512–1520.
- Yalkowsky S. H., He, Yan, *Handbook of Aqueous Solubility Data: An Extensive Compilation of Aqueous Solubility Data for Organic Compounds Extracted From The Aquasol database*, Boca Raton, 2003, 86.
- Yalkowsky S, He, Yan, Jain, P. *Handbook of Aqueous Solubility Data Second Edition*. CRC Press, 2010, 99.
- Yamada K., Furukawa T., Nakahara T., Studies on the Utilization of Hydrocarbons by Microorganisms, *Agricultural and Biological Chemistry*, 1970, 34:5, 670-675.
- Yang, W.-G., Hu, Y.-H., Chen, Z.-G., Jiang, X.-M., Wang, J.-K., Wang, R.-R.: Solubility of itaconic acid in different organic solvents: experimental measurement and thermodynamic modeling. *Fluid Phase Equilib.*, 2012, 314, 180–184.
- Zhang K., Yu C. & Yang S.T., Effects of soybean meal hydrolysate as the nitrogen source on seed culture morphology and fumaric acid production by *Rhizopus oryzae*, *Process Biochemistry*, 2015, 50, 173-179.
- Ανδρεαδάκης Α., Πανταζίδου Μ., Σταθόπουλος Α., 2008, Περιβαλλοντική Τεχνολογία, Εκδόσεις Συμμετρία.